

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Obor pediatrie



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

The importance of immunoglobulin E in cord serum from the aspect of a family history of allergy

Non-pathological *E. coli* colonisation as a treatment and prevention of morbidity and allergy in  
newborn children with high umbilical IgE

MUDr. Jiří Liška, CSc.

Mulačova nemocnice

Fakulta zdravotnických studií Západočeské univerzity

2018

## PODĚKOVÁNÍ

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

Právě proto si dovoluji vzpomenout mého učitele z doby mé klinické práce, pana profesora MUDr. Vladimíra Zavázala, DrSc., na jehož počest se v roce 2016 konal v Plzni imunologický kongres. První klinické práce v pediatrii s tématem imunologie byly vždy z jeho iniciativy. Velmi si vážím jeho podpory při obhajobě kandidatury na I. LF v Praze.

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

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

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

V neposlední řadě ředitelům Mulačovy nemocnice MUDr. P. Weishäuplovi a Ing. J. Zimmermannovi, děkance Fakulty zdravotnických studií Západočeské univerzity paní doc. PaedDr. Iloně Mauritzové, Ph.D., pracovníkům laboratoří firmy Dyntec Terezín, pracovníkovi statistického oddělení FN v Plzni RNDr. F. Šefrnovi a panu Ing. P. Hadrabovi.

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

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

## ABSTRAKT

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

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

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

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

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

Novorozenci, kteří se narodili rodičům s alergiemi, měli zvýšené hladiny produktů pokročilé glykace (AGE) v jejich pupečnickové krvi. AGE vznikají reakcí volných radikálů s glukózou nebo fruktózou v krvi. Tak působí oxidační stres se zvýšenou pravděpodobností vzniku alergie a astmatu u těchto dětí v budoucnu. Negativnímu účinku AGE je bráněno resveratrolem i jinými antioxidanty. Neenzymatická glykace (Maillardova reakce) probíhá hodiny, maximálně dny, během nichž se tvoří tzv. Schiffovy baze, později Amadoriho produkty, které se stanovují jako glykované proteiny. Chemicky se svým složením liší, např. jsou to pentosidin, pyrrolin, N-karboxymetyllysin a jiné.

Je proto důležitým předpokladem, aby tyto děti byly sledovány se snahou o snížení hladin AGE antioxidanty a hladin IgE během celého života.

(Pozn.: Oxidační stres je přebytek volných radikálů nad antioxidační kapacitou.)

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

Neonates born to parents with allergies had increased levels of advanced glycation end products (AGE's) in their umbilical cord blood. AGE's are formed by the reaction of free radicals on glucose or fructose in blood. This causes increased oxidative stress and an increased probability of allergy and asthma in childrens future. The negative effect of AGE's is hindered by resveratrol and other antioxidants. AGE's are formed by non-enzymatic glycation of proteins and free radicals. Non-enzymatic glycation (Maillard's reaction) lasts hours, maximal days during them are formed Schiff's bases, later on Amadori's products, which are considered as glycated proteins. Chemical structure of such substances is different, for example pentosidine, pyrrolidine, N-carboxymethyllysine and others.

We therefore propose that such children should be followed with the aim of lowering AGE's by antioxidants, and IgE throughout life.

# Obsah

Úvod.....	7
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>8</b>
<b>1</b> <b>IMUNOLOGICKÝ VÝVOJ U NOVOROZENCŮ .....</b>	<b>8</b>
1.1 <b>CYTOKINY.....</b>	<b>8</b>
1.2 <b>ALERGIE.....</b>	<b>8</b>
1.2.1    Genetika alergie .....	8
1.2.2    Poruchy regulace imunity - alergie a autoimunitní onemocnění .....	9
1.2.3    Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku .....	9
1.2.4    Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii .....	10
1.2.5    Potravinová alergie.....	11
1.2.6    Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku .....	12
1.2.7    Potravinová alergie a její klinické příznaky.....	12
1.2.8    Reakce na potravinové alergie .....	12
1.2.9    Výživa a alergie.....	13
1.2.10    Rizikové faktory vývoje alergie a atopie .....	13
1.2.11    Výživa a slizniční imunita .....	14
1.2.12    Příčiny nárůstu alergií a astmatu .....	15
1.3 <b>IMUNITNÍ SYSTÉM.....</b>	<b>16</b>
1.3.1    Ontogeneze imunity u novorozence .....	16
1.3.2    Prenatálním, perinatálním obdobím a imunita .....	16
1.3.3    Imunitní systém.....	16
1.3.4    Mikrobiální stimulace .....	18
1.3.5    Faktory výživy .....	18
1.3.6    MALT, GALT .....	18
1.3.7    Humorální a celulární imunita u novorozenců .....	19
1.3.8    Lymfoidní tkáň trávicího traktu .....	19
1.3.9    Imunologická nezralost novorozence a kojence.....	20
1.4 <b>VÝVOJ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY.....</b>	<b>21</b>
1.4.1    Podpora přirozené obranyschopnosti kojenců modulací střevní mikroflory.....	21
1.4.2    Receptory ve střevní mikrofloře .....	22
1.4.3    Komensální bakterie.....	23
1.4.4    Imunitní odpověď Th2.....	23
1.4.5    Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců.....	24
1.4.6    Lymfoidní systém spojený se sliznicemi - MALT .....	24
1.4.7    Gastrointestinální ekosystém .....	25
1.4.8    Střevní bakteriální mikroflóra.....	26
1.4.9    Využití složek střevní mikroflóry.....	27
1.4.10    Střevní mikroflóra v raném dětství.....	29
1.5 <b>ATOPIE.....</b>	<b>30</b>
1.5.1    Hygienická hypotéza.....	30
1.5.2    Střevní mikroflóra a atopie.....	31
<b>2</b> <b>PROBIOTIKA .....</b>	<b>33</b>
2.1 <i>Probiotika a prebiotika.....</i>	<i>33</i>
2.2 <i>Klinické aplikace probiotik.....</i>	<i>33</i>
2.3 <i>Probiotika, prebiotika a atopie.....</i>	<i>35</i>
2.3.1    Probiotika, prebiotika a atopické choroby .....	35
2.3.2    Terapie atopie .....	35
2.4 <i>Primární prevence .....</i>	<i>37</i>
2.5 <i>Využití probiotik v praxi.....</i>	<i>37</i>
2.5.1    Infekční průjmy.....	37
2.5.2    Léčba postantibiotických průjmů .....	38
2.5.3    Pseudomembranózní colitida .....	38
2.5.4    Kolitida při divertikulární nemoci .....	38
2.5.5    Alergická onemocnění .....	38

2.5.6	Průjmy cestovatelů.....	39
2.5.7	Funkční střevní dyspepsie .....	39
2.5.8	Zácpa .....	39
2.5.9	Idiopatické střevní záněty .....	39
2.5.10	Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů.....	39
2.5.11	První realizované experimentální studie s perorálním osídlením.....	42
2.5.12	Slizniční IgA a probiotika.....	43
2.5.13	Bifidogenní faktor .....	44
2.5.14	Charakteristiky probiotik .....	45
2.5.15	Mikrobiologické bezpečnostní požadavky.....	45
2.5.16	Průmyslové parametry .....	45
2.5.17	Mechanismus působení.....	45
<b>3</b>	<b>PROBIOTIKA V PEDIATRII .....</b>	<b>46</b>
3.1	<i>Využití probiotik v pediatrii a vliv na střevní mikroflóru .....</i>	<i>47</i>
3.2	<i>Spektrum užití probiotik v pediatrii .....</i>	<i>48</i>
3.3	<i>Rešerže nejznámějších publikací o aplikaci probiotik v dětském věku. ....</i>	<i>49</i>
3.4	<i>Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii .....</i>	<i>51</i>
3.5	<i>Vybraná probiotika.....</i>	<i>52</i>
3.5.1	<i>Léčebné účinky probiotika Colinfant u extrémně nezralých .....</i>	<i>52</i>
3.5.2	<i>Mutaflor E.Coli – varianta pro dospělé.....</i>	<i>52</i>
3.6	<i>Imunomodulace.....</i>	<i>53</i>
3.7	<i>Probiotika v primární prevenci .....</i>	<i>53</i>
3.8	<i>Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi - mechanismus působení bakteriálních imunomodulátorů.....</i>	<i>54</i>
	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>56</b>
4	<b>VÝZNAM STANOVENÍ PUPEČNÍKOVÉHO IMUNOGLOBULINU E VE VZTAHU K RODINNÉ ANAMNÉZE ALERGIE .....</b>	<b>57</b>
4.1	<i>Metodika stanovení.....</i>	<i>58</i>
4.2	<i>Soubor a výsledky .....</i>	<i>58</i>
4.3	<i>Studie.....</i>	<i>59</i>
5	<b>KOLONIZACE NEPATOGENNÍM E.COLI V LÉČBĚ A PREVENCI MORBIDITY A ALERGIE U NOVOROZENCŮ S VYSOKOU HODNOTOU PUPEČNÍKOVÉHO IGE.....</b>	<b>61</b>
5.1	<i>Soubor a výsledky .....</i>	<i>63</i>
5.2	<i>IgE.....</i>	<i>63</i>
5.2.1	<i>Polyklonální aktivace .....</i>	<i>64</i>
5.2.2	<i>Genová typizace probiotik.....</i>	<i>64</i>
5.3	<i>Vlastní terapie .....</i>	<i>66</i>
5.4	<i>Nemocnost .....</i>	<i>66</i>
5.5	<i>Imunoglobulin IgE.....</i>	<i>67</i>
5.6	<i>Imunoglobulin IgE.....</i>	<i>67</i>
5.7	<i>Imunoglobulin G .....</i>	<i>68</i>
5.8	<i>Imunoglobulin A .....</i>	<i>68</i>
5.9	<i>Imunoglobulin E.....</i>	<i>68</i>
5.10	<i>Připomínky k hladinám imunoglobulinů v dětské populaci .....</i>	<i>70</i>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>74</b>
	<i>Grafická část.....</i>	<i>74</i>
	<i>Mezinárodní publikace věnované problematice pupečnickového IgE.....</i>	<i>82</i>
	<i>Významné publikace o IgE a o probiotikách .....</i>	<i>84</i>
	<i>Publikované práce k habilitačnímu tématu, práce v recenzovaných .....</i>	<i>89</i>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>95</b>
	<b>OSTATNÍ PŘÍLOHY .....</b>	<b>102 - 161</b>

## Seznam zkratek

TGF  $\beta$  - Transformující růstový faktor

TH - T-helper

INF - Interferon

Ig - Immunoglobulin

TNF – Nádorový nekrotický faktor

DC – Dendritická buňka

NK - Přirozený zabíječ (natural killers)

GALT - Střevní lymfatická tkáň

MALT - Slizniční lymfatická tkáň

IL - Interleukin

ECP - eozinofilní kationtový protein

## ÚVOD

Ve svém dlouholetém působení v oblasti pediatrie a pediatrické imunologie jsem byl v počátcích klinické praxe nasměrován svým profesorem k neonatologicko – pediatrické imunologii, zejména pak k působení Imunoglobulinu E (dále jen IgE). Funkce imunoglobulinu E je v oblasti imunity, kdy zvýšené hladiny IgE jsou spojeny s přecitlivělostí jedince, jako je alergické astma a atopie. V průběhu let se můj zájem formoval na návaznost Imunoglobulinu E s výskytem alergií a atopií u dětí a alergií a morbiditou novorozenců.

V dlouhodobé studii v letech 1998–2015 jsem mohl stanovit první hypotézu, zda hladiny IgE v pupečnickové krvi jsou predikací pro alergická onemocnění do 3-4 let věku dítěte.

První fáze studie, která probíhala v letech 1998-2010 a byla zaměřena na vyšetřování hodnot imunoglobulinu E nejen z krevního séra. Cílem této první fáze studie bylo ověření údajů z literárních prací o vazbě mezi hodnotami IgE z pupečníku a hodnotami IgE v krevním séru v následujícím kojenecko-batolectím věku, ale i v dalším období a zda hodnoty pupečnickového IgE jsou v průměru rozdílné u novorozenců z rodin, kde je jeden z rodičů nebo, kdy jsou oba rodiče alergici.

Dalším cílem studie bylo zjistit, zda jsou hodnoty pupečnickového IgE závislé na faktorech, jako je roční doba porodu a sezónnost a zda může být pupečnickový IgE dalším vhodným markerem ukazatele rozvoje alergie. Soubor 3169 novorozenců v této první fázi jsme rozdělili do dvou skupin ve dvou obdobích let 1998–2002 a 2003–2010.

Klinická studie provedená u tohoto souboru 3169 novorozenců trvala 12 let.

V druhé fázi studie, v letech 2010–2015 bylo dovyšetřeno 412 novorozenců. Tato část studie je zaměřena na zkušenosti s nejčastějšími probiotiky a preventivní intervencí, kdy bylo předpokladem, že osídlení slizničních povrchů určitým typem bakterií bude mít příznivé účinky nutriční i imunologické. Samotná genová typizace byla prováděna u 3 druhů probiotik. Jedná se o E. coli typ Nissle preparát Mutaflor, E. coli typ 083 preparát Colinfant a dále Lactobacillus casei spec. Rhamnosus GG a Sacharomyces boulardii.

Druhou hypotézou této práce je ověření, zda se združuje alergie s rodinnou anamnézou a jestli jsou důvodem k preventivní intervencí ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu vysoké hodnoty pupečnickového IgE.



# 1 IMUNOLOGICKÝ VÝVOJ U NOVOROZENCŮ

## 1.1 CYTOKINY

Jako vhodný prognostický znak, ukazující na zvýšené riziko vzniku alergie, se jeví exprese cytokinů v buňkách pupečnickové krve, sledováním zastoupení cytokinů, hrajících důležitou roli při vzniku a rozvoji alergických onemocnění, zodpovědných za Th versus Th2 polarizaci imunitní odpovědi, ovlivňujících tvorbu IgE a vyvrávání střevního epitelu. U dětí alergických matek byla exprese cytokinů IL4, IL8, INF-Gama a TGF nižší a IL10 vyšší ve srovnání s dětmi zdravých matek. Snížená exprese INF-Gama u dětí alergických matek ukazuje na méně výrazný Th1 typ buněčné odpovědi a tím snazší rozvoj Th2 buněčné odpovědi podporující rozvoj alergie. Rovněž zvýšená exprese IL-10 v buňkách pupečnickové krve dětí alergických matek ukazuje na převahu Th2. Snížená exprese cytokinů TGF  $\beta$  u dětí alergických matek může přispívat k pomalejšímu vyvrávání střevního epitelu novorozenců a tím usnadňovat průchod alergenů. TGF  $\beta$  je klíčovým cytokinem izotopového přesmyku protilátek na třídu IgA, která plní ochrannou funkci na slizničním povrchu střeva. Metodou ELISA bylo naměřeno vyšší zastoupení cytokinů EGF u dětí zdravých matek. Již na úrovni buněk pupečnickové krve je zřejmý alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie. TGF  $\beta$  byl jediným cytokinem se statisticky významným rozdílem v množství v plodové vodě dětí zdravých a alergických matek. Vyšší množství interleukinů (IL 5 a IL 10) v kolostru alergických matek a také v pupečnickovém séru jejich dětí naznačuje převažující Th2 naladění imunitního systému ve skupině matek i dětí ještě bez klinických příznaků.<sup>1</sup>

## 1.2 ALERGIE

### 1.2.1 Genetika alergie

Genetická výbava jedince výrazně ovlivňuje vznik a průběh alergických reakcí. Ve studiu vlivu genů na vznik a rozvoj alergického onemocnění hraje systém HLA prioritní úlohu. Z hlediska alergie hraje důležitou roli chromosom 5, kde je celá oblast obsahující geny pro řadu cytokinů. Hledaly se souvislosti mezi hladinou IgE a genetickou výbavou. V těchto studiích se ukázalo, že hladina IgE není konstantní, ale liší se nejenom podle věku a pohlaví, ale i v jednotlivých rodinách. Hladina IgE není pod

---

<sup>1</sup> Hrdý, J., et al: *Vox Ped.* 2007, říjen, 8, ročník 7, 32.

kontrolou jen jednoho genu. IgE mediovaná imunitní odpověď závisí na receptoru, na který se IgE váže. Existuje vysoce afinní receptor a nízko afinní receptor. První je exprimován na basofilech a žírných buňkách, vazba s monomerním je vysoce afinní. Oproti tomu IgE s menší afinitou se vyskytuje na jiných buňkách, tj. lymfocyty, makrofágy, destičky, eosinofily a váže IgE s daleko menší afinitou.<sup>2</sup>

### 1.2.2 Poruchy regulace imunity – alergie a autoimunitní onemocnění

Na vzniku a rozvoji alergických a autoimunitních onemocnění se jasně podílí genetická dispozice. Genetická komponenta obou imunopatologií je velmi komplexní. Nejvíc studovaným regionem genomu ve spojitosti s alergickým onemocněním je úsek na chromosomu 5, kde jsou kódovány mnohé mediátory Th2 imunitní reakce: IL 4, IL5, IL9, IL13. Mnohé studie potvrdily asociaci SNP těchto genů s rozvojem astmatu a atopickou dermatitidou i stupněm závažnosti atopické dermatitidy. V imunopatogenezi alergických a autoimunitních onemocnění jsou za hlavní efektorové buňky považovány hlavně suppopulace jednotlivých typů T lymfocytů. Alergen specifické TH2 lymfocyty byly identifikovány v periferní krvi u alergických pacientů (Romagnini 1991). Th1, Th2 nerovnováha patří mezi nejdůležitější imunoregulační mechanismy a je podkladem hygienické hypotézy. Role B lymfocytů v patogenezi alergických onemocnění je dána především produkcí IgE (Burrows 1989, Platts-Mills 2002). Pro aktivaci specifické imunitní odpovědi jsou ale nezbytné buňky imunitní odpovědi, hlavně dendritické buňky. Dendritické buňky se nacházejí na sliznici dýchacích cest, GIT i v kůži. Jsou jedinečnou populací antigen prezentujících buněk. Hlavní funkcí DC je schopnost aktivovat adaptivní imunitní odpověď a spouštět různou reakci na různé patogeny. Na druhé straně hrají důležitou roli v indukci antigen specifické tolerance. Studie u dětí s těžkou formou AD potvrdila asociaci genů pro cytokiny s rozvojem AD a zároveň vliv genů na vývoj alergického pochodu v průběhu dětství. Byla prokázána korelace hladiny volných lehkých řetězců u dětí s aktivitou atopické dermatitidy. Jako jeden z nových možných terapeutických postupů se jeví vhodným podání monoklonální protilátky proti B lymfocytům-anti bCD 20 Rituximab.<sup>3</sup>

### 1.2.3 Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku

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

---

<sup>2</sup> Šedivá, A: Genetika alergie. Alergie 2004/4

<sup>3</sup> Kayserová, J.: autoreferát doktorské disertační práce 2013. Ústav imunologie 2.LFUK Praha

reakcích. Často se již těhotenství se připravuje půda pro budoucí alergii. Jestliže těhotná kouří, konzumuje vysoce alergenní potraviny, žije v silně alergizujícím prostředí či sama či její rodina je alergická, pak se vytváří pro alergii předurčený jedinec. Pak se rodí s hyperprodukcí IgE v pupečnickové krvi. Nedostatek IgA na povrchu sliznic, určité fenotypy HLA zapříčiňující přestřelující reakce jsou příklady příčin, proč jinak obecně mobilizující imunita mediovaná IgE začne svůj organismus poškozovat. Podle situace se může u některých jedinců vyvinout obraz určité alergie, zatímco u jiných, navzdory vytvoření specifických protilátek izotypu IgE a třeba i pozitivitu v kožních testech, k onemocnění nedochází. Podle zkušeností Zavázala se manifestuje pouze polovina latentních alergií během 3 let. U zbývajících zřejmě nedojde za tuto dobu ke zboření jakési přirozené rezistence. Děti s podnormálními hladinami IgE měly vyšší nemocnost běžnými infekcemi než děti s průměrnou hladinou IgE. Stále je otázka, zda existuje rozdíl mezi imunitním a alergizujícím IgE. Přes neexistenci podtříd IgE bývá stále častěji prokazována jeho značná funkční heterogenost. Hovořilo se o formě atopického IgE, majícího schopnost vázat histamin. Přínosem pro diagnostiku alergií může být možnost sledování faktoru nekrotizujícího nádory TNF alfa a příbuzného aktivačního faktoru T lymfocytů. Klasická antihistaminika působí až na samém konci procesu. Potřebujeme preparáty ovlivňující samotný začátek alergické odpovědi, jako například cromoglykát, ketotifen, cyclosporin A, které blokadou aktivace genů snižují sekreci mediátorů a inhibují chemotaxi eosinofilů v časně i pozdní fázi alergie.<sup>4</sup>

#### 1.2.4 Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii

Slizniční mikrobiota (mikroflora) spolu s antigeny zevního prostředí jsou hlavními podněty přispívajícími k vývoji a stimulaci celého imunitního systému. Ústřední roli hrají T regulační buňky, které svými produkty ovlivní protilátkovou odpověď různých izotypů a expresí receptorů s následnou aktivací buněk, které se účastní alergických reakcí. Lze najít takovou mikrobiální komponentu, jejíž aplikace přinese nové přístupy. Naprostá většina podnětů, které stimulují v každodenním životě náš imunitní systém, pochází z antigenů vnějšího prostředí. Velké plochy sliznic (300 m<sup>2</sup>) jsou vystaveny různorodému spektru antigenů, mikrobiálních patogenů, antigenů potravy a vzduchu, včetně alergenů. Naprostá většina mikroorganismů vstupuje do našeho organismu sliznicemi. Následkem toho dochází na sliznicích k indukci humorálních a buněčných imunitních reakcí zahrnujících tvorbu specifických

---

<sup>4</sup> Zavázal, V.: Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku. *Forum imunologie*. 6/94, 223-226.

protilátek různých izotypů i T buňkami mediovaných odpovědí ovlivňujících imunoregulační mechanismy. Slizniční a přidržené tkáně obsahují největší kvantum imunitních buněk (80 %) různých fenotypů. Hlavními buňkami zprostředkujícími interakci přirozené imunity s imunitou adaptivní jsou dendritické buňky, které jsou schopné nejúčinněji prezentovat antigeny. Výsledná odpověď, tj. aktivace T buněk vedoucí ke stimulaci slizniční imunity nebo indukce tolerance závisí na účasti různých populací dendritických buněk. Jedním z hlavních humorálních mechanismů zabezpečujících bariérovou funkci sliznic je sekreční IgA (S-IgA). U jedinců s IgA deficiencí je díky nedostatečné bariérové funkci sliznic vyšší výskyt alergií a jiných chronických chorob. Úloha bariérové funkce epitelu je v poslední době zdůrazňována i u alergických chorob dýchacího traktu. Atopické stavy jsou spojovány s dysfunkcí epitelu dýchacích cest a změnami v přirozené imunitě. Tyto nálezy mění pohled na terapii alergických chorob. Místo tlumení zánětlivých procesů se doporučuje zvýšit rezistenci dýchacích cest podnětům z prostředí modulací přirozené a adaptivní imunity.<sup>5</sup>

### 1.2.5 Potravinová alergie

Může být zprostředkována protilátkami typu IgE, ale také buněčnou opožděnou reakcí i imunokomplexy. Jsou uváděny údaje o vyšším výskytu pylové alergie u lidí narozených přímo do pylové sezony. Projevy mohou být orgánové i systémové. PA alergii můžeme rozdělit z hlediska patofyziologického – imunopatologická reakce 1. typu, kdy si pacient vyrábí více alergických protilátek typu imunoglobulinu E, která po setkání s příčinným alergenem vyvolá klasické cesty aktivace alergického zánětu. Vyplavují se mediátory časně i pozdní fáze. Složitější je situace u těch mechanismů, kde IgE zprostředkovanou přecitlivělost nenacházíme, a přesto následný proces splňuje všechna kritéria alergického zánětu. V těchto případech je nositelem antigenní specifity buněčná imunita, reprezentovaná především T lymfocyty. Jedná se o čtvrtý typ imunopatologické reakce. Není možné opomenout ani možnou existenci specifických protilátek třídy IgG s tvorbou imunokomplexů. IgE mediovanou alergii prokazujeme kožními testy nebo přímým průkazem specifických IgE v laboratoři, kde je diagnostika non – IgE alergie velmi obtížná. Často je indikován preventivní preparát v perorální formě (Nalcrom). Preventivně se používá Hylak.<sup>6</sup>

---

<sup>5</sup> Tlaskalová, H., Městecký, J.: Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii. *Alergie*. 2/2012, 124-133.

<sup>6</sup> Fuchs, M.: Potravinové alergie. *Pediatric po promoci*. 2004, 1, 26-35.

## 1.2.6 Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku<sup>7</sup>

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

## 1.2.7 Potravinová alergie a její klinické příznaky

- gastrointestinální: průjem, zácpa, nechutenství, dyspeptický syndrom, bolesti břicha, sideropenická anaemie, enterorhagie, MAS, aft. stomatitida, orální alergický syndrom, gastrooesophageální reflux, mapovitý jazyk
- kožní: urticarie, atopická dermatitida, erytém, purpura, dermatitis herpetiformis Duhring, recidivující exantémy
- respirační: rhinoconjunctivitis, laryngo a bronchospasmus, kašel, hemoptýza, Quinckeho edém, otitis, anafylaktická reakce
- méně časté příznaky potravinové alergie: artralgie, migréna, vulvovaginitida,

dále: laktulozo-manitolový test

eosinofilní kationický protein v séru

histamin v séru

tryptáza ve stolici

IgE ve stolici<sup>8</sup>

## 1.2.8 Reakce na potravinové alergie

U dětí do 3 let je postiženo asi 8 %. Nežádoucí reakce je možné rozdělit do dvou skupin. První je podmíněna imunologickými mechanizmy. Druhá se rozvíjí bez účasti imunitního systému. Alergie

---

<sup>7</sup> Jeseňák, M., et al: Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku. *Čs.Ped.* 2008, 5, 272-282.

<sup>8</sup>Lodinová – Žádníková, R.: Probiotika v pediatrii: Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem E.coli po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie.* 2002, 4, 275-279.

může být zprostředkována protilátkami IgE (I. typ), tak protilátkami IgG, IgA a imunokompetentními buňkami, jako je tomu u II., III., a IV. typu přecitlivělosti. Do této druhé skupiny jsou řazeny reakce zprostředkované neimunologickými mechanismy. Tyto reakce se zařazují pod pojem potravinová intolerance. V prvních 6 měsících života je riziko senzibilizace dítěte dosti značné. Je dáno nízkou hladinou trávicích enzymů v zažívacím traktu, nezralým slizničním imunitním systémem s nedostatečně vyvinutou schopností tzv. orální tolerance a relativně neomezenou absorpcí makromolekul ze střevního lumina (Kniker 1999). Slizniční orální tolerance je aktivní proces probíhající v oblasti slizničního imunitního systému. Jde o specifickou inhibici imunitní odpovědi po jejím předchozím navození kontaktem určitého antigenu s regulačními buňkami T, usídlenými v oblasti sliznice střeva. Na sliznici dýchacích cest k indukci tolerance nedochází, v této oblasti vyvolá stejný antigen aktivaci, tedy obrannou odpověď. Tolerance je jedna z aktivních funkcí imunitního systému zprostředkovaná supresorovým mechanismem a realizovaná prostřednictvím inhibičně působících lymfokinů, produkovaných regulačními lymfocyty T. K prolomení orální tolerance a tím i k manifestaci alergie dochází vzácně.<sup>9</sup>

### 1.2.9 Výživa a alergie

Za rizikové faktory pro vývoj alergického onemocnění hned po narození je pokládána rodinná dispozice, vysoká koncentrace IgE v prvních týdnech života novorozence, snížení hladiny CD8T lymfocytů v jeho krvi a eosinofilie v krvi či nosním sekretu. V nálezech z pupečnickové krve je rizikovým faktorem zvýšená celková hladina IgE. Souvislost s hladinou IgE v séru matky ani v amniové tekutině prokázána nebyla. Studovanými faktory jsou v současnosti u alergického astmatu volné kyslíkové radikály. Antigenní podnět vede k uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů. Pokud jsou tyto látky dále metabolizovány, dojde vlivem těchto produktů k poškození bronchiální sliznice.<sup>10</sup>

### 1.2.10 Rizikové faktory vývoje alergie a atopie

- Faktory vnitřního prostředí (alergeny roztočů a zvířat, plísní)
- Faktory vnějšího prostředí (polinosis, ovzduší, kouření)
- Faktory související s mikrobiální stimulací (RS, atypické pneumonie)

---

<sup>9</sup> Vernerová, E.: Potravinová alergie v dětském věku. *Pediatr. pro Praxi*. 2007, 8, 5, 269-272.

<sup>10</sup> Vernerová, E.: Výživa a alergie. *Pediatr. pro Praxi*. 2007, 3, 168-172.

- Dietní faktory (proteiny kravského mléka)
- Zjistili pozitivní asociaci mezi kontaminací placenty organochlorovými sloučeninami

a zvýšením IgE v pupečnickové krvi ve SR.

Alergeny vnějšího prostředí: extrémně vysoké koncentrace pylu břízy v minulosti ve Švédsku měly za následek dvojnásobný nárůst senzibilizace na alergen břízy. Měsíc narození v souvislosti se sezonou pylovou může ovlivňovat riziko atopických chorob. U dětí s pravidelnými kontakty s polnohospodářskými zvířaty je nižší prevalence atopie. Také již tehdy, strava bohatá na probiotika, snižovala riziko atopie v dětství. Nízká konzumace rybího oleje se ukázala jako rizikový faktor asthmy. Děvčata, která se stala obézní mezi 6–11 lety měla až 7násobné vyšší riziko astmatu. Mnohé studie ukázaly, že k ovlivnění vývoje imunitního systému může dojít již intrauterinně, kdy některé alergenů a škodlivé látky mají schopnost procházet placentou. Za kritické období, kdy vlivem vnějších faktorů může dojít k imunologickým změnám a následnému vývoji atopie, se považují první měsíce života. Moderní příbytky vytvářejí vhodné podmínky pro rozmnožování domácích roztočů, plísní a akumulaci alergenů a toxinů. Studie ukázaly, že více než 65 % dětí nad 3 roky je alergických na bytové alergenů. U dětí s pravidelnými kontakty se zvířaty byl pozorován protektivní vliv v přítomnosti psa a kočky v domácnosti.<sup>11</sup>

### 1.2.11 Výživa a slizniční imunita

Není doporučováno vyhýbat se alergenům v době těhotenství. Doporučuje se výlučné kojení po dobu 4 měsíců. Zavádění příkrmů mezi 4.-6. měsícem. Když nelze kojit, doporučují se extensivně nebo částečně hydrolisované formule. Z pokynů roku 2008 nedochází k omezování alergenů jak u matek v době těhotenství, tak u kojenců. Zdrojem probiotických bakterií je matka. K osídlení dochází v porodních cestách a později se uplatňuje mateřské mléko. Velmi důležitým jevem je navození orální tolerance, při které dochází k tomu, že se imunitní systém naučí reagovat na naši střevní mikrofloru a na potravinové alergenů. Tento jev se navodí v prvním půlroce života a pro jeho správný průběh je nutná stimulace imunitního systému, na které se probiotika podílí. V případě, že není možné kojit, je nutné zajistit v prvních 6 měsících pro slizniční imunitu co nejšetrnější stravu s prokázanou hypoalergenicitou. Pro prevenci alergie je odůvodněné přidávání probiotik do hydrolyzovaných formulí.<sup>12</sup>

<sup>11</sup> Hlavatá, A., et al: Environmentalne rizikové faktory vývoja atopie u detí. *Čes slov. Pediat.* 2007, 62, č. 12, 674-683.

<sup>12</sup> Nováková, D.: Riziko rozvoje alergických onemocnění v dětském věku – role časné výživy pro ustanovení vyvážené slizniční imunity zažívacího traktu. *Čs.Pediat.* 2009, 7-8.

## 1.2.12 Příčiny nárůstu alergií a astmatu

Statistiky WHO ukazují, že mezi 20.-21. stoletím nastal u chorob dýchacích cest přesun od přenosných k nepřenositelným. Na kongresech patří problematika „hygienické hypotézy“ k trvalým bodům programu (Špičák 2005). Objevila se pozorování, toto potvrzující, jako ochranný vliv expozice k mykobakteriím, o významu střevní flory, zrání imunitního systému, protektivnímu vlivu spalniček a hepatitidy A (Hoffjan 2004). Tomu odpovídá nízký počet alergiků v prostředí zemědělských farem s kontaktem se zvířaty v raném věku (Strachan 1989). Zdůrazňuje se úloha regulačních T lymfocytů. Někteří autoři (Platts-Mills 2005) se domnívají, že se musí uvažovat o třech variantách (hypotézách) příčin nárůstu astmatu a alergie:

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

Většina alergologů se domnívá, že se zúčastní všechny tři mechanismy. K celoročně působícím alergenům je nutné uvádět, že pobyt v interiérech se prodloužil, mění se teplotní a vlhkostní podmínky, mění se vybavení nábytkem, textiliemi, v bytech se zvyšuje přítomnost zvířat. Sensibilizace k alergenům roztočů a trav, která se vyvine již v období prvních let života, se projeví zvýšeným rizikem astmatu v tomto období. U domácích zvířat jsme svědky velmi odlišných výsledků, kdy v některých případech mohou navodit specifickou toleranci, ale neovlivňují senzibilizaci k jiným např. roztočovým alergenům.

Imunologické odpovědi – sklon k senzibilizaci je geneticky závislý, senzibilizace sama se nemusí ještě klinicky projevit. Ale při expozici inhalovaných endotoxinů v raném věku a v nízkých dávkách se pozorovala nižší prevalence alergie astmatu a alergické rýmy. Možná je zde úloha T regulačních lymfocytů. Ztráta respiračně – specifického ochranného účinku – přednost počítačům před sportem. Dále sem patří těhotenství ženy starší let, antibiotika v prvním roce života a život v blízkosti velkého dopravního zatížení. Alergologové se v roce 2005 domnívají, že významné údaje budou přinášet studie o významu slizniční imunity a jejího imunomodulačního vlivu.<sup>13</sup>

V návaznosti na to se snažíme předložit názory na využití i efekt probiotik z nejrůznějších klinických studií a zdůraznit tak šíři současného pohledu.

---

<sup>13</sup> Nevorál, J.: Probiotika a prebiotika. *Medical Tribune*. 13/2008.



## 1.3 IMUNITNÍ SYSTÉM

### 1.3.1 Ontogeneze imunity u novorozence

Hlavní zásoby imunoglobulinů dostávají do plodu z cirkulace matky (IgG), ale není sporu o tom, že plod aktivně syntetizuje nejen IgG, ale i s imunoglobuliny dalších tříd. Byla prokázána aktivní syntéza IgM ve fetální slezině v 10. týdnu gestace. Produkce IgG byla zjištěna v 11. týdnu v játrech a ve střevě, IgE v plicích v 11. týdnu a IgA ve střevě ve 13. týdnu gestace. Dojde-li k intenzivní antigenní stimulaci plodu např. intrauterinní infekcí, tato basální syntéza imunoglobulinů (IgM, IgA) se několikanásobně zvýší a v lymfatických tkáních se objeví plazmatické buňky secernující protilátky. B lymfocyty s povrchovými membránovými imunoglobuliny (receptory) se objeví v 8. týdnu gestace v játrech a ve 14. týdnu je jejich počet stejný jako u dospělých jedinců. Významným obranným mechanismem ve fetálním a časném postnatálním období je pasivní přenos IgG placentou z mateřského séra. Tím se do plodu dostávají protilátky třídy IgG, především proti bakteriálním toxinům. V 26. gestačním týdnu obsahuje sérum plodu stejnou hladinu jako sérum matky. V období porodu může být dokonce vyšší o 10 %. Přenos se děje výlučně placentou. Ze všech imunoglobulinových tříd je transplacentárně přenášen pouze IgG. Předpokládá se, že jde o aktivní transport molekul IgG. Úlohu zde hrají specifické buněčné receptory pro Fc fragment IgG molekuly. Z hlediska buněčné imunity se T lymfocyty objevují poprvé v 15. týdnu gestace, jejich relativní počet nedosáhne hodnot krve dospělých ani koncem gestace.<sup>14</sup>

### 1.3.2 Prenatální, perinatální období a imunita

Přirozený vývoj imunity u dítěte u dítěte formován na základě endogenních faktorů, zahrnujících především genetickou dispozici. Je známo, že alterace vyvíjejícího se imunitního systému mohou vést v pozdějším věku ke vzniku imunopatologických či alergických chorob, chronických zánětlivých procesů (metabolický syndrom) či kardiovaskulárních chorob a diabetu I. typu.

### 1.3.3 Imunitní systém

Imunitní systém dítěte prochází v průběhu embryonálního vývoje a po narození velmi dynamickým vývojem. Začátek vývoje imunitních buněk je v časném embryonálním období spojen s

---

<sup>14</sup> Miller, I.: Ontogeneze imunity plodu u novorozence. Čs.Pediat. 33, 1978, 5, 295-301.

tvorbou krvevotvorby, která začíná ve žlutkovém vaku (extraembryonální fáze). V 18. dni gestace se objevuje krvevotvorba v paraaortální splanchopleurální oblasti embrya a po 6.–8. týdnu gestace se hematopoéza přesouvá do jater a přetrvává zde během celého nitroděložního vývoje. V daných lokalitách dochází k tvorbě pluripotentních hematopoetických kmenových buněk, které osidlují kostní dřeň okolo 5. týdne gestace, od 20. týdne je kostní dřeň hlavním místem krvevotvorby. Fetální slezina se tranzitorně účastní na hematopoézi ve 3.–5. měsíci gestace (Holt 2000). Mezi první imunitní buňky patří B-lymfocyty, které nacházíme ve fetálních játrech okolo 9. týdne gestace. Během vývoje B-lymfocytů dochází především ke změnám genomu, kódujícího protilátky. Vývoj zralých B-lymfocytů je dokončen v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny aj.). Vlivem antigenní stimulace se z části B-lymfocytů vyvíjejí plazmatické buňky, schopné od 12. týdne gestace syntézy IgM, která je vystupňována při intrauterinní infekci plodu. Po 20. týdnu gestace se část aktivovaných B-lymfocytů mění v paměťové buňky (Holt 2000). Tvorba IgA není přítomna do 30. týdne gestace. Novorozenecká syntéza IgM je významná a prodloužená. Hladiny imunoglobulinu IgG jsou u plodu jako jediné z pěti tříd imunoglobulinů zajišťovány transplacentárním transportem v podstatném množství. Specifický transport IgG je prováděn pomocí neonatálního receptoru (FcRn). Hladina celkového IgG u novorozenců je dependentní na délce gestace. Transfer IgG od matky k fetu začíná již ve 13. týdnu gestace, ve 28.–32. týdnu gestace dosahují fetální hladiny IgG 50 % mateřských hladin. Většina IgG je do fetální cirkulace přenesena během posledních čtyř týdnů gravidity, takže v době termínu porodu mohou hladiny IgG plodu převyšovat o 20–30 % mateřské hodnoty. Subpopulace T-lymfocytů CD4 a CD 8 jsou identifikovatelné od 14. týdne gestace. Počet T-lymfocytů narůstá ještě v období do 6 měsíců po porodu. I když jsou fetální T-lymfocyty schopny odpovědi in vitro na mitogeny (fytohemaglutinin) již v 10.–12. týdnu gestace, jejich imunitní funkce vyvrává až po narození dítěte (Mebius 2003). Buňky NK jsou detekovány u fetu v 6. týdnu gestace a v době porodu mají 10–15% podíl na počtu všech lymfocytů v pupečnickové krvi. Mají značně sníženou cytolytickou aktivitu (Uksila 1983).

Vývoj monocyto-makrofágového systému začíná v 3.–4. týdnu gestace ve žlutkovém vaku a pokračuje ve fetálních játrech. Zralé formy neutrofilů jsou detekovatelné v 12.–14. týdnu gestace. Dendritické buňky (DC), které reprezentují spojení mezi přirozenou a specifickou imunitou, se objevují okolo 6. týdne gestace.

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

### 1.3.4 Mikrobiální stimulace

Během intrauterinního vývoje dochází k těsné interakci mezi fětem a matkou, na placentárním rozhraní je upřednostňována Th2 buněčná odpověď. Th2 typ reaktivity je charakteristický pro novorozence i v postnatálním období. Modulace imunitního systému mikrobiální zátěží začíná již prenatálně a má za následek stimulaci Th1 orientované imunitní odpovědi, zvýšení regulačních T-lymfocytů v pupečnickové krvi a změny ve vrozené imunitě v pozdějším věku. Mikrobiální stimulace v časném životě má dle hygienické hypotézy za následek urychlení maturace imunitního systému a indukci regulačních mechanismů, které mají protektivní charakter před zánětlivými procesy v pozdějším životě (Okada 2010). Parazitární infekce matky má imunomodulační efekt na vyvíjející se imunitní systém plodu.

### 1.3.5 Faktory výživy

Pokud není plod dostatečně vyživován, může dojít ke snížení NK a fagocytujících buněk. Pokud matka přijímá dostatek vitamínu D, dojde k indukci tvorby antigenu prezentujících buněk a T-regulačních lymfocytů u plodu.

### 1.3.6 MALT, GALT

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

Hlavní komponentou imunitního slizničního systému je slizniční lymfatický systém (MALT – mucous associated lymphoid tissue), v neonatálním období hraje důležitou roli GALT (gut associated lymphoid tissue). Po porodu dochází k rychlé kolonizaci neonatálního GI traktu, primárně je novorozenec exponován bakteriálním kmenům přítomným v rektovaginální floře matky. Kolonizace je dále závislá na gestačním staří novorozence, způsobu porodu a jeho výživě. U kojených dětí je primární kolonizace mateřskou fekální mikroflorou nahrazena bakteriální mikroflorou, tvořenou z 90 % bifidobakteriemi a laktobacily, které mechanismem kompetitivní inhibice zabraňují adhezii

patogenních mikroorganismů ve střevě. Současně produkcí látek fyziologickou střevní mikroflorou, ke kterým patří např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem, dekonjugované žlučové kyseliny, bakteriociny, defenziny aj. se zvyšuje baktericidní schopnost střeva (Sjogren 2009). Mikroflora rovněž přispívá k přesmyku od postnatálně dominujícího Th2 typu imunitní odpovědi na Th1 typ. Opožděná kolonizace komenzálními kmeny je přítomna u dětí porozených císařským řezem, u nedonošených dětí či u novorozenců s přítomností perinatální infekce, vyžadující terapii antibiotiky. V případě absence adekvátní střevní kolonizace může perzistovat predominance Th2 imunitní odpovědi, spojená se zvýšenou prevalencí autoimunitních či alergických chorob. K důležitým složkám MM patří imunokompetentní buňky, z nichž největší část tvoří makrofágy (cca 60 %), dále neutrofilní leukocyty (30–40 %) a lymfocyty (5–10 %). Produkty mléčného kvašení laktózy MM jsou zdrojem kyselého prostředí ve střevě novorozence a stimulují tak osídlení GIT optimální mikrobiální florou.<sup>15</sup>

### 1.3.7 Humorální a celulární imunita u novorozenců

Opsonizační aktivita novorozeneckých sér je snížena vůči pyogenimu stafylokoků a gram negativním mikrobům, které jsou častou příčinou těžkých novorozeneckých infekcí. V posledních době dominuje streptokok skupiny B. Nízké hodnoty IgM a snížená aktivita komplementového systému, jež představují nejdůležitější složky opsonizačního děje, tento fakt zčásti vysvětluje. Byly nalezeny nižší hodnoty v aktivitě celkového komplementu u dětí donošených a byly zjištěny významné rozdíly v aktivitě komplementu u dětí nižšího gestačního věku. Vysoké hodnoty nukleolárního testu ve skupině novorozenců nízké porodní hmotnosti 20 x více oproti dospělým a u zdravých donošených novorozenců 10 x více oproti dospělým jsou výrazem celulární imunity a známkami lymfocytární aktivity, vlastně nálezem stimulovaných lymfocytů.<sup>16</sup>

### 1.3.8 Lymfoidní tkáň trávicího traktu

„Jedním z fyziologicky velice důležitých oddílů imunitního systému jsou tkáně kryté epitelii. Jsou to především slizniční povrchy trávicího, dýchacího a urogenitálního traktu. Zde je kontakt organismu na uvedených sliznicích tj. 300 m<sup>2</sup>. Nejmohutnější součástí imunitního systému je lymfoidní tkáň trávicího traktu. Denní produkce IgA ve střevě je 2-5 g. Volné intraepitelové lymfocyty se dosud neobjasněným mechanismem účastní vzniku tzv. orální tolerance, tj. útlumu systémové odpovědi na

<sup>15</sup> Mocková, A.: Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatr. praxi.* 2014, 15(4), 197–200.

<sup>16</sup> Mísařovičová, Z.: Některé faktory humorální a celulární imunity u novorozenců., *Č.Pediat.*,35,1980,8,416-418. Smetana, K., et al: A further contribution to the demonstration of RNA and nucleoli of blood cells in smear preparations. *Folia haematologica*,1969,91(4),381-394

neinfekční antigen podaný především perorálně. Tímto fyziologickým mechanismem omezuje organismus imunní reaktivitu proti těm složkám potravy, které nejsou v zažívacím traktu enzymaticky rozštěpeny na malé neimunogenní fragmenty. Při její poruše mohou vzniknout patologické procesy např. potravinové alergie.“<sup>17</sup>

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

polymerní IgA plasmatické buňky

IgA a IgM jsou přenášeny přes epitelové buňky sliznic. Sekreční IgA blokuje adhezi bakterií na slizniční povrch a brání průniku antigenů do vnitřního prostředí. IgA má též schopnost reagovat s některými baktericidními látkami a přivést je na povrch bakterií. IgA má schopnost neutralizovat viry přítomné v epitelových buňkách a eliminovat v podobě imunitních komplexů nežádoucí antigeny přítomné pod epitelovou vrstvou. IgA má dvě podtřídy, a to IgA 1 v cirkulaci, a v tlustém střevě převahu buněk produkujících IgA2. Sliznice lze využít pro indukci imunity proti infekcím (vakcinace) a pro indukci tolerance (léčba autoimunitních chorob).<sup>18</sup>

### 1.3.9 Imunologická nezralost novorozence a kojence

„Imunitní systém novorozenců a malých kojenců se funkčně liší ve všech složkách od větších dětí. U novorozence a kojence je absolutní počet lymfocytů srovnatelný se starším dítětem, avšak je výraznější zastoupení CD4+ T lymfocytů na úkor cytotoxických T buněk. Současně je snížena tvorba některých cytokinů, zejména IFN $\gamma$  a IL4, která negativně ovlivňuje imunitní odpověď zvláště proti intracelulárním patogenům. Nižší je také aktivita NK buněk. Funkční schopnosti komplementového systému představují asi 50 % starších dětí. To spolu s omezenou fagocytární aktivitou vede ke zvýšené vnímavosti k bakteriálním infekcím. Plod je schopný vytvářet protilátky od 20. gestačního týdne. Nedojde-li k intrauterinní antigenní stimulaci, má novorozenec pouze imunoglobuliny, které v průběhu posledního trimestru gestace přenesly transplacentárně od matky. Posléze dochází k rozvoji fyziologické hypogamaglobulinémie, když produkce vlastních imunoglobulinů nestačí kompenzovat úbytek mateřských protilátek.“<sup>19</sup>

---

<sup>17</sup> Peters JL, et al. Prenatal negative life events increases cord blood IgE: interactions with dust mite allergen and maternal atopy. *Allergy*, 2012; 67(4): 545–551. Sjogren YM, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy*, 2009; 39(12): 1842–1851. MUDr. Alice Mocková, Ph.D.: Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatr. praxi* 2014; 15(4): 197–200.

<sup>18</sup> Tlaskalová-Hogenová, H.: Imunita na sliznicích. *Forum imunologie*. 1/94.

<sup>19</sup> Pařízková, E.: Imunologická nezralost novorozence a kojence. *Alergie, Supplementum* 3/2002, str. 14

## 1.4 VÝVOJ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY

### 1.4.1 Podpora přirozené obranyschopnosti kojenců modulací střevní mikroflory

Střevní mikroflora je tvořena u dospělých –  $10^{14}$  mikrobů o 500 druzích. Vykazuje velkou metabolickou aktivitu shodnou s aktivitou jater. Střevní mikroflora hraje zásadní roli při zachování našeho zdraví. Hlavním přínosem vyvážené střevní mikroflory je zajištění rezistence vůči kolonizaci. U kojenců ještě není vytvořena stabilní mikroflora, není ještě plně vyvinuta schopnost rezistence této mikroflory vůči kolonizaci [Favier 2002]. Normální mikroflora zajišťuje důležitou stimulaci vývoje imunitního systému. Nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům se považuje za faktor, který přispívá k rozvoji alergie [Yazdanbakhsh 2002]. Složení střevní mikroflory, nízké hladiny bifidobakterií a vysoké hladiny clostridií představují indikátor pozdějšího vývoje alergie [Kalliomaki 2001]. U malých dětí trpících alergiemi jsou rovněž ve střevech přítomny odlišné druhy bifidobakterií v porovnání se zdravými kontrolními skupinami v odpovídajícím věku [Ouweland, Isolauri 2001]. Při narození je v těle přítomno malé množství B buněk, které produkují IgA. Jejich počet postupně stoupá, až přibližně ve věku jednoho roku dosáhne hladiny odpovídající dospělým jedincům [Helgeland 2000]. Tato skutečnost jasně ilustruje význam mikroflory při vývoji imunitního systému. Střevní mikroflora hraje svou roli i ve výživě. Napomáhá trávení a získávání energie z potravinových složek, které se nestráví v důsledku produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, jež mají významný trofický účinek na střevní epitel [Pruzzo 2009]. Složení mikroflory typické pro dospělé jedince se dosahuje ve věku 1-2 let [Benno 1986]. Na kolonizaci a vývoj střevní mikroflory má u dítěte vliv řada faktorů. Jedná se o způsob porodu, medikace a způsob krmení. U dětí, které se narodily císařským řezem, byla pozorována kolonizace menším počtem bifidobakterií a druhem *Bacteroides*. Rozdíl ve složení střevní mikroflory lze pozorovat ještě po 6 měsících života [Grönlund 1999]. Medikace, zejména pomocí antimikrobiálních látek má významný rušivý vliv na složení, aktivitu a vývoj střevní mikroflory. Pro kojence, který je krmen pomocí přípravků, je charakteristická spíše nízká kolonizace bifidobakteriemi. Rozdíly se ale snižují [Orrhage 1999]. Vysvětlení je ve zlepšení složení kojeneckých přípravků, které se více blíží složení mateřského mléka. Děti krmené mateřským mlékem a děti krmené pomocí přípravků vykazují rovněž kolonizaci odlišnými typy bifidobakterií [Benno 1986]. Probiotika a prebiotika představují možnost zlepšení jejího složení. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které po požití v určitém množství vykazují prospěšné účinky na zdraví přesahující účinky základní výživy. Terapie probiotiky představuje možnost zavést speciálně vybrané mikroby do gastrointestinálního traktu. Nevýhodou tohoto přístupu je skutečnost, že mikroby musí zůstat životaschopné během jejich produkce a skladování a také během průchodu gastrointestinálním traktem. I když se řada prospěšných účinků na zdraví přičítá vybraným

kmenům probiotik [Grubb 1989], jsou pouze některé z těchto účinků podložené. Prebiotika jsou definována jako nestravitelné potravinové složky, které vykazují prospěšný účinek na zdraví hostitele prostřednictvím stimulace růstu nebo aktivity omezeného počtu prospěšných bakterií v tlustém střevě [Gibson 1995]. Nejčastěji používanými prebiotiky jsou fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy. Dostávají se do tlustého střeva, kde mohou sloužit jako zdroj energie pro mikroby zde přítomné.<sup>20</sup>

#### 1.4.2 Receptory ve střevní mikrofloře

Bakterie používá k navázání na buněčný povrch různé mechanismy, kdy adherence zahrnuje interakci mezi strukturami na povrchu bakterie (adheziny) a receptory na eukaryotické buňce. Jako receptory slouží většinou membránové glykoproteiny nebo glykolipidy. Adheziny mohou tvořit souvislou vrstvu na povrchu bakterie nebo morfologicky zřetelné výběžky v podobě fimbrií. Specifická adherence znamená, že např. gram neg. tyčinky mají afinitu k enterocytům tlustého střeva. Tvorba receptorů je kódována geneticky, takže defekt specifických receptorů vysvětluje rezistenci některých jedinců proti kolonizaci určitým bakteriálním druhem. Receptory některých enterocytů mohou být přítomny jen v některých věkových obdobích. Při kolonizaci gastrointestinálního traktu bakterie nejprve musí adherovat na receptory mikrovilózní membrány. Obsazení fyziologických receptorů usnadňuje průnik bakterie do organismu hostitele. Jakmile dojde k adherenci, bakterie mohou dále proliferovat. Interakce mezi bakterií a epiteliálními buňkami bývá nazývána „bacterial-epithelial cross talk“, což znamená, že kolonizující bakterie komunikují s buňkou hostitele (enterocytem) a využívají její nitrobuněčný aparát k usnadnění translokace. Základní výzkum v této oblasti se zaměřuje především na patologické mikroorganismy. Ale je i jasné, že i fyziologická střevní flora je v interakci s enterocyty a může zvyšovat obranu střeva hostitele proti bakteriím, které vyvolávají klinická onemocnění. Probiotika mohou chránit hostitele od patologické kolonizace mnoha mechanismy. Např. probiotické bakterie mohou preferovat receptory, které jsou společné i pro patogeny (bifidobakterie nebo coli). Jistá nezralost interakce bakterie-enterocyt může přispívat k působení patogenů u dětí v těchto věkových skupinách. Protože antiadhezivní terapie není spojena s žádným zásadním zásahem do metabolismu buněk, nebezpečí vzniku rezistence na tuto terapii je nepravděpodobné.<sup>21</sup>

To je v ostrém protikladu se současným rozvojem rezistence bakterií na antibiotika a velkým příslibem do budoucna! Experimentální modely z minulosti na zvířatech umožnily studovat reakce organismu na jeho řízené osídlování definovanými mikroby. Významným světovým pracovištěm je od konce padesátých let 20. století zejména Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR.

---

<sup>20</sup> Ouwehand, AC., et al: Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J.Allergy Clin Immunol* 2001, 108, 144-145. Functional foods forum, Universiti, Turku, 2004.

<sup>21</sup> Pozler, O.: Střevní mikroflora. Sympozium o morfologii střeva. Staré Splavy, 2004, 4, 3-4 Abstr.

### 1.4.3 Komensální bakterie

Kontakt s vnějším prostředím se odehrává především na epitelových površích sliznic vybavených vyvinutým systémem přirozené imunity a specializovaným systémem adaptivní imunity. Slizniční imunitní systém zabraňuje pronikání infekčních a imunogenních složek ze sliznic do cirkulace (barierová funkce), zajišťuje obranu proti patogenním mikroorganismům (antiinfekční úloha), orální nebo slizniční tolerance a přispívá k udržení homeostazy (barierová funkce). Střevní sliznice 200 m<sup>2</sup> má charakteristický rys, obměňuje se 1x za 3-4 dny. Na sliznicích se vyskytují základní buňky přirozené imunity, t-neutrofilů a makrofágy, dále NK, dendritické, žírné a další buňky. K nim se přiřazují i epitelové buňky, které chrání hostitele v prvních minutách po vystavení podnětu. Epitelové buňky jsou zapojené do cytokinové sítě. Hlavním úkolem buněk přirozené imunity je rozpoznat, pohlcovat, zpracovávat a předkládat antigeny buňkám adaptivní imunity, tzn. lymfocytům. Lymfatická tkáň zažívacího traktu s denní produkcí IgA ve střevě 2-5 g. Lymfatická tkáň střeva je tvořena převážně Peyerskými pláty, jednak lymfocyty. Jeden z hlavních obranných faktorů na sliznicích je IgA, který má dvě podtřídy (1,2). V sekretech je polymerní forma IgA, zatímco v cirkulaci je IgA monomerní. Sekreční IgA má funkci blokovat adhezi bakterií na slizniční povrch. Antigeny jsou u zdravých jedinců tolerovány (orální tolerance), nevyvolávají výraznou systémovou odpověď. Významná je funkce dendritických buněk, mechanismus orální tolerance je pak realizován lymfokiny. Efekty podávání probiotik: Jeden z výkladů hygienické hypotézy spočívá v nálezích nízké diverzity střevní mikroflory v postnatálních obdobích u dětí v hygienicky vyspělých oblastech. Tláskalová popisuje výrazné efekty mikroflory na vývoj imunity v postnatálním období u zvířat. Efekty podávání prebiotik i probiotik se u nás stále zkoumají.<sup>22</sup>

### 1.4.4 Imunitní odpověď Th2

Převaha Th2 imunitní odpovědi se ustavuje již koncem gestačního období. S tím souhlasí i průkaz snížené tvorby IFN gama mononukleárními buňkami periferní krve novorozenců, u nichž se později rozvíjí atopie. Iniciátorem je inhalovaný alergen. Při astmatu aktivuje žírné buňky a makrofágy, které začnou tvořit a uvolňovat prozánětlivé mediátory – leukotrieny, cytokiny a chemotaktické faktory. Antigen zpracováváný makrofágy je předkládán pomocným Th lymfocytům, u nichž vyvolá tvorbu IL4 a IL5, které pak navedou B lymfocyty k tvorbě IgE a způsobí eosinofilii. Makrofágy tvořené cytokiny, IL1, TNF alfa a TNF gama aktivují endotelové buňky a vyvolají v nich zvýšenou tvorbu adhesivních molekul. Zvýšená přilnavost k endotelu umožní vycestování leukocytů z oběhu do sliznice

---

<sup>22</sup> Tláskalová-Hogenová, H.: Střevní imunitní systém a komensální bakterie. *Medical Tribune*. 11/2008.



dýchacích cest. Nervová zakončení jsou vystavena mediátorům zánětu, důsledkem je cholinergní bronchokonstrikce a hyperreaktivita hladkých svalů bronchů. Eosinofily jsou významný faktor v etiopatogenezi asthmatu.<sup>23</sup>

#### 1.4.5 Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců

„Zvýšené koncentrace eosinofilního kationického proteinu (ECP) v séru nebo v tracheálních aspirátech se u novorozenců dávají do vztahu k následnému vývoji bronchopulmonální dysplázie. Bylo provedeno vyšetření koncentrace ECP v séru z pupečnickové a kapilární krve zdravých donošených novorozenců. Koncentrace ECP u zdravých donošených novorozenců jsou oproti hodnotám u dospělých vysoké a rovnají se nálezům popisovaným např. v souvislosti se závažnými alergickými záněty. Koncentrace ECP v pupečniku může odrážet stres matky nebo plodu před a po porodu, může být odezvou na komplex exogenních stimulů z prvních hodin života novorozence po porodu.“<sup>24</sup>

#### 1.4.6 Lymfoidní systém spojený se sliznicemi – MALT

Nejvýznamnějším sekundárním orgánem imunitního systému je lymfoidní systém spojený se sliznicemi (MALT, Mucosa Associated Lymphoid Tissue). Obrana je zde regulována tak, aby noxy vnějšího světa byly odstraňovány z povrchu, či jinak eliminovány ještě předtím, než budou stimulovat slizniční imunitu. K tomu je slizniční systém optimálně vybaven. Slizniční imunitní systém je regulován tak, aby na většinu podnětů, které nepředstavují jednoznačné signály nebezpečí, byla indukována tolerance. Stimulace slizniční imunity má za důsledek ovlivnění centrálních mechanismů imunity. Role slizničního imunitního systému je mimořádně důležitá, zvláště pro rozvoj individuální imunitní reaktivity (Kudsk 2002). Klíčové pro její optimální nastavení je období těsně po narození. Trávicí trubice embrya je sterilní. K jeho kolonizaci dochází bezprostředně po porodu. Střevní mikroflóra prodělává v tomto období rychlé proměny. První kolonizační vlnu představují především fekální mikroorganismy z rodu *Enterobacter*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*, kteří mají původ v mateřské vaginální a fekální bakteriální flóře. Zástupci uvedených bakteriálních rodů jsou schopni spotřebovávat kyslík, a vytvářejí

---

<sup>23</sup> ABC symposium 1996 Solnohrad, *Allergy* 54,suppl 49,103, str. 199

<sup>24</sup> H.Tomášová et al: Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců. *Neonatologické listy* 2000,č.4, ročník 6.

tak vhodné prostředí pro další vlnu mikroorganismů, jež kolonizuje zdravé dítě, které je kojeno, zhruba po týdnů po narození. Druhou kolonizační vlnu představují především bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Počáteční kolonizace má mimořádný význam nejenom pro rozvoj slizniční imunity, ale bakterie modulují biologickou aktivitu epitelových buněk. Odstavení kojence a přechod na pevnou stravu představuje další klíčové období pro vývoj slizniční mikroflóry. Od tohoto období převládá striktně anaerobní mikroflóra. Pouze okolo 3 % střevní mikroflóry dospělého člověka jsou aerobní bakterie nebo fakultativně anaerobní bakterie. V současnosti je definován nový termín mikrobiom, který je označován jako suma genů všech mikrobiálních druhů, které kolonizují střevo. Mikrobiom zahrnuje odhadem stokrát více genů, než má náš vlastní genom. Zajišťuje člověku využití pro něj nedostupných živin. Potlačuje kolonizaci a růst potenciálně patogenních mikroorganismů. Bakterie v trávicím traktu jsou schopny mezi sebou komunikovat. Aktivované epitelové buňky jsou vydatným zdrojem cytokinů, které ovlivňují jak intraepitelové lymfocyty, tak buňky imunitního systému nacházející se v lamina propria. Specializované M buňky umožňují vstup podnětů do lamina propria. Významnou složkou slizniční imunity jsou dendritické buňky. Dendritické buňky, které se nacházejí v lamina propria, jsou schopny pronikat svými výběžky mezi epitelové buňky do střevního lumen. Zde jakoby vzorkují mikrobiální podněty a prezentují je potom specifické imunitě. Je pravděpodobné, že takovýto kontakt s fyziologickou mikroflórou vede k indukci regulačních T lymfocytů, které tvorbou cytokinů s protizánětlivým působením (IL-10) optimalizují slizniční odpověď a indukují slizniční toleranci (Schmidt-Weber 2005). Opakovaná expozice sliznic antigenním podnětům nevede obvykle k zesílení slizniční odpovědi, ale naopak k utlumení imunitní reakce. Tento fenomén se nazývá indukce slizniční tolerance je mimořádně komplexní. Konkrétně jde o úlohu subsetu regulačních T lymfocytů (Treg). Expozice antigenům na střevní sliznici vede k rozvoji antigen specifické imunologické tolerance (orální tolerance). Je jednoznačně určována subsetem Treg T lymfocytů. Ze studií na bezmikrobních zvířatech je zřetelně doloženo, že orální tolerance nemůže být indukována v bezmikrobních zvířatech.

#### 1.4.7 Gastrointestinální ekosystém

Gastrointestinální ekosystém je vysoce integrovaný komplex, který zahrnuje střevní mikrobiom, střevní slizniční bariéru a slizniční imunitní systém. Fetální trávicí trubice je sterilní. Její mikrobiální osídlení začíná při spontánním porodu průchodem plodu porodním kanálem a pokračuje v průběhu prvního roku života z řady zdrojů. K nim patří typ porodu (spontánní, císařský řez), zralost plodu, typ výživy (kojení, umělá výživa), podávání antibiotik, celkový zdravotní stav a stres. První mikroby kolonizující střevo jsou aerobní a fakultativně anaerobní kmeny (*E. coli*, laktobacily a streptokoky), které snižují oxidoredukční potenciál a umožňují kolonizaci anaerobními kmeny

(bifidobakterie, bacteroides). Kojený, plně vyvinutý novorozenec má výhodnější MF s převahou bifidobakterií (Dai 1999). Po zavedení pevné stravy se složení MF přibližuje stále více definitivnímu stavu v dospělosti s převahou anaerobních kmenů. Hlavní lokalizací MF v trávicí trubici je tlusté střevo a konečník, v němž zastoupení anaerobů činí až 99 % (Frič 2005). Kolonizace střeva MF je tedy programována časově (doba a pořadí kmenů), kvalitativně (definice kmenů) a kvantitativně (koncentrace kmenů). Komezální MF časně po narození významně aktivuje procesy vrozené i získané imunity a podílí se na rozvoji imunitního systému střeva. Komezální MF je kritická pro rovnovážné vyvržení imunitního systému a vývoj orální tolerance, tj. tolerogenní nebo imunogenní reakce na antigenní podněty.

#### 1.4.8 Střevní bakteriální mikroflóra

Do okamžiku narození je zažívací i dýchací trakt plodu sterilní. Jeho osídlování bakteriální mikroflórou začíná za porodu při průchodu porodními cestami a velmi intenzivní je hlavně v prvních dnech po narození. Podstatným faktorem, určujícím složení střevní mikroflóry, je výživa novorozence a kojence. Kojené děti mají bakteriální mikroflóru složenou z 90 % z laktobacilů a bifidobakterií. U uměle živých dětí se v krátkém časovém období vytváří komplex téměř úplného spektra mikroflóry s dominancí anaerobních bakteroidů a enterobakterií. Fyziologická gastrointestinální bakteriální mikroflóra zahrnuje 400 až 1 000 bakteriálních druhů, z nichž kultivovatelných je 20–40 %. Obvykle bývá definována jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v zažívacím traktu zdravého člověka (Jeřábková 2008). Při optimálním složení bakteriální mikroflóry dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci cytokinů, navozujících vznik aktivní tolerance neškodných antigenů. Prenatálně nastavený typ dominance Th2 imunitní odpovědi se mění ve vyvážený typ imunitní reakce, které se adekvátně účastní lymfocyty Th1, Th2, Th3 a Treg. Mechanizmy slizniční imunity jsou proto balancovány spíše ke stavu udržení tolerance (Jeřábková 2008). Opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních imunoglobulinů IgA a prostřednictvím interleukinu-4 pak tlumí aktivitu Th1 lymfocytů, čímž indukuje převahu regulačních lymfocytů Th3, které snižují systémovou zánětlivou odpověď (Jeřábková 2008). Pro navození tolerance má velký význam i způsob prezentace antigenu imunitnímu systému prostřednictvím APC. Faktem je, že snížená antigenní stimulace v časném poporodním a kojeneckém období obvykle nenavodí u zdravého jedince přeladění imunologické reaktivity z převahy stimulace Th2 (typické pro období intrauterinního života) na rovnováhu Th1/Th2, regulující imunologické procesy postnatálně.

Přetrvávání stimulace Th2 pak může vést k snazší senzibilizaci, k vyšší tvorbě IgE a tím k následnému rozvoji alergie (Romangani 1999). Na ustanovení rovnováhy mezi Th1 a Th2 lymfocyty v imunitním systému nemá vliv jen přítomnost či nepřítomnost antigenní stimulace, ale také vlastnosti stimulujícího antigenu, způsob jeho předložení imunokompetentním buňkám a současné působení dalších faktorů. Značný význam má též období, ve kterém ke kontaktu mezi antigenem a imunitním systémem dochází. I když by tato hypotéza mohla částečně vysvětlit vzestup incidence alergických chorob v zemích žijících tzv. „západním“ stylem života, svědčí proti jejímu zjednodušenému chápání celá řada pozorování. Je totiž zřejmé, že současně s alergiemi, typickými dominancí odpovědi Th2, vzrůstá i výskyt autoimunitních onemocnění, asociovaných s genotypem Th1. Oba typy onemocnění se vyskytují u některých osob současně. Promoření populace parazity indukuje Th2 odpověď, přitom ale nezvyšuje incidenci alergických onemocnění a obyvatelé oblastí promořených parazitárními chorobami bývají obvykle před alergiemi chráněni. Z předešlého vyplývá, že vzestup incidence alergií není možné vysvětlit striktní dichotomií TH1/Th2 odpovědi. Základem současného pojetí nárůstu alergických chorob je teorie protizánětlivé imunitní odpovědi, založené na vývoji tolerance. Vznik tolerance je zřejmě řízen především aktivitou intestinálních regulačních T lymfocytů, které imunitní odpověď kontrolují a v součinnosti s dalšími složkami slizniční imunity modulují současně i imunitu systémovou. Imunomodulací rozumíme terapeutické či preventivní zásahy do činnosti imunitního systému (Bartůňková 2003, Bystroň 2005). Tato kritéria nám u dětí při indikaci imunomodulace příliš nepomohou, a proto budeme při indikaci této léčby poměrně zdrženliví.<sup>25</sup>

#### 1.4.9 Využití složek střevní mikroflóry

Interakce mezi střevní mikroflórou a slizničním imunitním systémem hostitele hraje klíčovou roli při udržování slizniční homeostázy. Bylo prokázáno, že dysbióza, změna ve složení mikrobiálních společenstev může vést k rozvoji civilizačních onemocnění, jakými jsou zánětlivá střevní onemocnění nebo alergie. V tomto ohledu jsou probiotika cenným nástrojem pro zmírnění nerovnováhy střevní mikroflóry s vhodnou stimulací imunitního systému. Při sledování imunomodulačních vlastností vybraných bakterií bifidobacterium a lactobacillus a stanovení příznivého účinku vybraných bakterií. Ve zvířecím modelu alergie se ukázalo, že neonatální kolonizace zabrání rozvoji alergické senzibilizace pravděpodobně aktivací T-regulační odpovědi. Je nutné si uvědomit, že vlastní dysbióza vede ke zpožděnému vyžívání imunitního systému a narušení mechanismu imunologické tolerance, což vede ke vzniku zánětlivých a autoimunitních onemocnění a alergií (Belkaid 2014, Sartor 2008). Podle tzv.

---

<sup>25</sup> Vernerová, E.: Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(3), 164–168.

hygienické nebo mikrobiální hypotézy se předpokládá, že za rozvoj alergických onemocnění je zodpovědná nedostatečná mikrobiální stimulace na počátku života a snížení bakteriální rozmanitosti v mikroflóře hostitele (Kaliomaki 2010, Toh 2012, Noverr 2005). Absence mikrobiální stimulace v důsledku zvýšené hygieny nebo nadužívání antibiotik má za následek oslabení slizniční imunity, doprovázené častější senzibilizací k alergenům, které jsou zdravou populací tolerovány (Tlaskalová-Hogenová 2004). Následné změny v TH1 mohou způsobit posun k TH2 imunologické odpovědi, která je zodpovědná za rozvoj alergií. Zánětlivá střevní onemocnění – ulcerózní kolitida a Crohnova choroba patří mezi chronická onemocnění spojená s nekontrolovaným zánětem GIT (Hanauer 2006). Tato onemocnění jsou způsobena poruchou střevní homeostázy a deregulovanou imunitní odpovědí vůči rezidentním složkám mikroflóry v důsledku genetických poruch slizniční bariéry, nespecifické imunity a imunoregulace. Rozvoji střevního zánětu předchází zvýšení propustnosti epiteliální vrstvy v důsledku snížené exprese nebo reorganizace některých proteinů těsných spojů. Menší výskyt kvalitních bakterií a zvýšený počet patogenních je u těchto pacientů s chronickými GIT potížemi prokázán. Vybrané probiotické kmeny bifidobacterium, lactobacillus, E. coli nisle byly úspěšně použity při prevenci nebo léčbě zánětu nebo léčbě alergií. (Abrahamson 2007, Viljanen 2005, Kukkonen 2007). Je důležité brát v úvahu imunologický stav hostitele, a i výběr probiotika (Ismail 2013). Stanovení imunomodulačních vlastností 9 bakteriálních kmenů lidského původu. Výsledkem bylo, že druhově a poddruhově specifické PCR a Rep-PCR ukázaly vysoký stupeň genetické homogenity analyzovaných kmenů. Bylo prokázáno, že specifické imunomodulační vlastnosti probiotických kmenů mohou korelovat s jejich schopností prevence zánětlivého onemocnění. Studie prokázala, že imunostimulační vlastnosti probiotických kmenů, např. bifidobakteria, jsou jednoznačně kmenově specifické, že profilaktické podávání probiotického kmene zabránilo porušení proteinů těsných spojení. Proto také bakteriální kmen může hrát důležitou roli při regulaci střevní bariéry. V modelu indukované colitidy závisí závažnost zánětlivých projevů na imunitní reakci hostitele. Podávání probiotika zabránilo porušení slizniční bariéry jak u imunodeficitních, tak u imunokompetentních zvířat. V testech neonatální kolonizace bakterií bifidobacterium přispěly ke snížení alergické senzibilizace jak na buněčné, tak na protilátkové úrovni. Neonatální monokolonizace bakterií bacterium longum snižuje alergickou senzibilizaci pravděpodobně aktivací regulačních reakcí. Analýza imunomodulačních vlastností kmenů lactobacilla potvrdila, že kolonizace myší v experimentálních modelech snížila alergickou senzibilizaci na buněčné i protilátkové úrovni. Dále indukovala systémovou a lokální produkci IgA protilátky a regulačního cytokinu TGF-B. Kolonizace zlepšila funkci střevní bariéry posílením komplexů apikálních spojů enterocytů. Jednotlivé kmeny stimulují různé hladiny cytokinů. Stimulace mononukleárních buněk periferní krve s různými kmeny probiotika vedla ke specifické produkci regulačních cytokinů. Produkované mikroorganismy působí ve střevě jako zdroj energie pro colonocyty a moduluje i oxidační

stres. Tím se zmírňuje vznik zánětlivých procesů. Účinek probiotik na imunitní systém je závislý na použitém bakteriálním kmenu. Probiotické kmeny byly selektovány na základě srovnávacích studií.<sup>26</sup>

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

#### 1.4.10 Střevní mikroflóra v raném dětství

Je již všeobecně známé a uznávané, že tzv. mikrobiální deprivace má v rozvinutých zemích za následek nevyváženost přirozené antigenní stimulace s důsledkem redukce expozice lipopolysacharidy. Probiotika mohou imunitní odpověď modifikovat. Aerobní a potenciálně anaerobní bakterie, jakmile expandují, spotřebovávají kyslík a tím umožňují anaerobním kmenům dynamicky střevo kolonizovat (bacterioides). U novorozenců porozených císařským řezem je tato kolonizace opožděna. Ale laktobacily, které kyslík tolerují, nemusí být dokonce zachyceny během prvního měsíce života. Mnohdy může být dokonce zdrojem kolonizace střevní flóra matky. Nejintenzivnější kolonizace je v prvních měsících života. Se sliznicemi asociovaný imunitní systém (MALT, Mucosa associated lymphoid tissue). Nutno podotknout, že v anatomické lokalitě zažívacího traktu se označuje zkratkou GALT (Gut associated lymphoid tissue). Jak známo, normální mikroflora zabraňuje adhezím a invazi patogenů přes epiteliální bariéru a také střevo se podílí tvorbou mucinu na nespecifické obraně organismu. Buněčná spojení epitelové bariéry jsou regulována neuropeptidy. Mechanizmů přirozené imunity se zúčastní fagocytující buňky (makrofágy, neutrofilové buňky, dendritické buňky), jež svými cytokiny regulují zánětlivou odpověď. Signál nebezpečí rozeznávají TLR – like receptory. Antigeny ze střevního lumen transportují M buňky. Dendritické buňky prezentují antigeny T lymfocytům, které jsou právě významné v indukci tolerance v interakci s regulačními T-lymfocyty. Právě produkce IL -10 a TGF-beta vede k aktivaci regulačních T lymfocytů a k indukci orální tolerance. (Barnes 2009)

Současně však patogenní mikroorganismy stimulují dendritické buňky k vyzrání. Humorální složku specifické imunitní reakce na sliznicích představují především sekreční IgA protilátky. Distribuce struktur GALT je především v Peyerských plakách. Unikátní český kmen E.coli O83:K24:H31 se vyznačuje vysokou adhesivní schopností díky fimbriím typu 1, dokáže sliznici osídlit a střevní flóru

---

<sup>26</sup> Šrůtková, D.: Charakterizace a využití složek střevní mikroflóry. Mikrobiologický ústav AV ČR, Dizertační práce 2015.

normalizovat. Jeho bezpečnost a imunomodulační aktivita byla testována na bezmikrobních modelech. Je jistě toto možné prodloužit i na atopickou populaci.<sup>27</sup>

Z imunologického hlediska a fenomenu orální tolerance je vhodné preventivní podání včas, dokud ještě není slizniční tolerance prolomena (Thon 2010.)

## 1.5 ATOPIE

### 1.5.1 Hygienická hypotéza

Vysvětlení stoupající prevalence atopických chorob v rozvinutých zemích nabízí tzv. hygienická hypotéza, kterou v základní formě formuloval Strachan v roce 1989 (Strachan 1989). U novorozenců jsou odpovědi na antigeny zevního prostředí vychýleny k Th2 cytokinovému profilu, který je charakteristický pro alergická onemocnění. V průběhu prvního roku života imunitní systém vyžívá v důsledku expozice různým mikrobiálními antigenům a imunitní odpovědi nabývají charakteru kontraregulačního Th1 profilu, který je typickou odpovědí na mikrobiální antigeny. U atopických dětí k této reorientaci imunitní odpovědi nedochází a dále přetrvává Th2 typ odpovědi. Vhodné podmínky pro takový vývoj vytváří nedostatečná expozice mikrobiálními antigenům v důsledku vysoké životní úrovně s přemrštěnou hygienou, očkovaním, časným a opakovaným podáváním antibiotik a menším počtem členů rodiny. Objevení další podskupiny T-buněk, tzv. regulačních T-buněk (Th3, Tr1) umožnilo rozšířit původní hygienickou hypotézu také na autoimunitní a infekční choroby (Rautava 2004). Neschopnost vytvořit tolerogenní stav ve střevě a na ostatních sliznicích v časném dětství může zvýšit riziko ztráty tolerance a vznik chronického zánětu. Důsledkem celkově vychýlené imunity typu Th2 u novorozence může být atopické onemocnění v dětství, kdežto autoimunitní onemocnění s Th1 typem odpovědi se objeví později, když tyto odpovědi převládnu. Současnému novorozenci mohou chybět kritické interakce s mikrobiálními kmeny prostřednictvím toll-like receptorů a CD14, které umožňují vytvoření protizánětlivého, tolerogenního imunitního prostředí udržovaného mediátory, jako jsou transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a IL-10. Vývoj střevní MF má klíčový význam pro vývoj a zachování funkcí slizniční střevní bariéry a zdraví hostitele. Střevní MF reguluje v časném období života ovlivňováním vývoje střevní lymfatické tkáně systémové a lokální imunitní odpovědi (včetně odpovědi na mikrobiální a potravinové antigeny) k tolerogennímu nezápětlivému stavu, při čemž současně udržuje schopnost přiměřené (fyziologické) zápětlivé odpovědi.

---

<sup>27</sup> Thon, V.: Intestinální mikrobiota v raném dětství – úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatr. praxi.* 2011, 12, 4, 252–256.

### 1.5.2 Střevní mikroflóra a atopie

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

Tabulka 1 - Fyziologické a terapeutické účinky probiotik

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

Zdroj: Frič, P.: Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(1), 46–50.

Výživa MF a střevní sliznice je komplexně zajištěna prostřednictvím prebiotik. To jsou látky nenatravitelné enzymy eukaryotických buněk, ale ve střevě se stávají substráty enzymů MF. Jsou to nejčastěji oligosacharidy (zejména fruktooligosacharidy, např. inulin), různé druhy vlákniny, pektiny, xylany a celulóza. Mikrobiální enzymy štěpí tyto substráty na látky významné pro MF i střevní sliznici



(krátké mastné kyseliny, aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory a antioxidantia). Tyto substance kryjí značnou část nutričních potřeb kolonické sliznice, která není schopna vyživit se pouze substráty z krevního oběhu.<sup>28</sup>

---

<sup>28</sup> Frič, P.: Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(1), 46–50.

## 2 PROBIOTIKA

### 2.1 Probiotika a prebiotika

Probiotika v případě aplikace v přiměřeném množství příznivě ovlivňují stav hostitele. Účinek jejich působení je výsledkem komplexního působení na střevní bakteriální mikroflóru a příznivý efekt přesahuje oblast imunologie. Vedle podpory specifické i nespecifické slizniční imunity probiotika syntetizují některé vitaminy (B12, K) a zajišťují energetické zdroje pro činnost enterocytů (Frühauf 2006). Probiotika jsou nestravitelné oligosacharidy, které podporují růst některých komenzálních bakterií ve střevě, a tím umožňují zlepšení kvality bakteriální mikroflóry trávicího traktu. Probiotika a prebiotika jsou souhrnně označována jako synbiotika a jejich příznivý vliv na slizniční imunitu je nyní obecně uznáván.<sup>29</sup>

Kromě obohacování kojenecké výživy je jejich podávání doporučováno v případě průjmových onemocnění kojenců a dětí a v případě antibiotické léčby. Podle některých studií snižuje jejich včasné a dlouhodobé podávání výskyt alergií u dětí (Lee 2008).

### 2.2 Klinické aplikace probiotik

Použití probiotik prokazatelně snižuje výskyt a dobu některých průjmových onemocnění. Zvláště zřetelné je to v případě průjmů způsobených rotaviry. Nepřímé důkazy existují i pro pozitivní ovlivnění průjmů bakteriálního původu, zvláště průjmů provázejících terapii antibiotiky a průjmových onemocnění cestovatelů. Probiotika podle některých studií pozitivně ovlivňují i průběh nekrotizující enterokolitidy u nedonošených dětí. Mimořádná pozornost je věnována pozitivnímu účinku podání probiotických mikroorganismů těhotným ženám a poté také kojencům. Takovéto podání *Lactobacillus rhamnosus* GG vedlo k redukci IgE zprostředkovaných alergických nemocí u dětí. Bylo prokázáno, že kombinace tří probiotických druhů *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* a *Lactococcus lactis* (tzv. Ecologic Panda) prenatálně podaných matkám dětí, s vysokým rizikem rozvoje atopické dermatitidy, potravních alergií a alergické rinitidy nebo astmatu s následnou aplikací těchto probiotik po dobu 12 měsíců jejich dětem významně snižovala výskyt atopické dermatitidy (Salvatore 2005). V *in vitro* pokusech bylo prokázáno, že vybrané kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny stimulovat produkci IL-10 především v populaci monocytů. Interleukin-10 vykazuje významné

---

<sup>29</sup> Vernerová, E.: Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(3), 164–168.

imunoregulační charakteristiky a má obecně protizáněťové působení. Tlumí tvorbu cytokinů subsetem TH2 T lymfocytů (Dunstan 2005, Niers 2005). Tento subset je klíčový v rozvoji alergického zánětu. Bylo prokázáno, že podání probiotik zvyšuje dvojnásobně koncentraci TGFβ (Transforming Growth Factor β) v mateřském mléce. Pozitivní výsledky podání probiotik nebyly potvrzeny jinými studiemi. Např. se nepodařilo ovlivnit průběh alergie na pyl břízy podáním probiotik. Zatím lze shrnout, že u dospělých jedinců s jasně vyjádřenými klinickými projevy atopické dermatitidy nepřináší probiotická terapie žádoucí klinický efekt. Naproti tomu výsledky několika studií především z Finska a Holandska jasně ukazují, že podání probiotik prenatálně matkám u dětí s vysokým rizikem rozvoje tohoto typu imunopatologie a následná aplikace probiotik po narození přináší klinický efekt, který se udržuje i v pozdějším věku dítěte. Údaje jsou zatím dostupné do věku 4 let (Baker 2006, Kalliomaki 2003, Rosenfeldt 2003). V současnosti je definováno 38 bakteriálních druhů v rámci Bifidobacterium. Z nich je 6 využíváno pro své probiotické vlastnosti. Jejich podání je bezpečné jak u imunokompetentních osob, tak u osob s imunodeficiencí. Dále je popsáno 128 druhů Lactobacillus, L.rhamosus je diskutabilní. Posledním druhem je Lactococcus, který tvoří vitamín K novorozence. L.rhamosus vedl k redukcí IgE zprostředkovaných alergií u dětí. Je prokázáno, že vybrané kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny stimulovat produkci IL 10, který vykazuje výborné imunoregulační charakteristiky. Ve výše uvedené práci Salvatore, tlumil tvorbu cytokinů subsetem TH2 T lymfocytů. Tento subset je klíčový v rozvoji alergického zánětu. Bylo prokázáno, že podání probiotik zvyšuje dvojnásobně koncentraci TGF Beta (transforming Growth Factor B) v mateřském mléce. Zatím se ale prokázalo, že u dospělých jedinců nepřináší probiotická terapie žádoucí výsledky. Také se opakovaně uvažuje o negativně snížené expozici mikrobiálním podnětům, které vyžívající imunitní systém vyžaduje pro svoje diferenační kroky. Paradoxně pozitivní změny, které vedly k dramatickému snížení mortality na alimentární nákazy, vedou k abnormálním procesům při nastavení individuální imunní reaktivity. Průmyslově vyráběné potraviny jsou v průběhu celého výrobního procesu sterilizovány. Člověk pojídá tedy potraviny, zbavené expozic živých mikroorganismů (dříve 500, toho času 50 druhů potravy) a i to má nepochybně vliv na rozvoj individuální imunní reaktivity. Na druhé straně je člověk vystaven abnormálním podnětům. Vliv na rozvoj imunní reaktivity mají nepochybně i postupující aktivní imunizace. Je možné říci, že aktivní imunizace představuje další množství podnětů. Abnormity v individuální imunní reaktivitě mohou být základem pro vznik imunopatologických onemocnění. Zásadní měrou přibývá onemocnění, které mají charakteristiky alergií zprostředkovaných protilátkami IgE. Aplikace látek s prebiotickými vlastnostmi a probiotických mikroorganismů by mohly pozitivně ovlivnit nežádoucí trend v prevalenci imunopatologických nemocí v populaci.<sup>30</sup>

---

<sup>30</sup> Krejsek, J.: *Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. Pediatr. pro Praxi. 2007, 3, 156–162.*

## 2.3 Probiotika, prebiotika a atopie

Atopie je definována jako genetická dispozice k hypersenzitivním reakcím I. typu proti různým antigenům prostředí (atopická alergie). Nejčastějšími klinickými projevy jsou alergická rhinokonjunktivitida, bronchiální astma, atopická dermatitida/ekzém (ADE) a méně často potravinová alergie. Postihuje 10–20 % dětské populace a v pubertě se k ní může přidružit respirační alergie (Červenková 2006). Je ji možno považovat za portál pro IgE zprostředkované atopické choroby (Isolauri 2004). Patogeneze a terapie atopických chorob se stávají znovu předmětem pozornosti s rozvojem poznatků o střevní mikroflóře (MF) a slizniční imunitě.

### 2.3.1 Probiotika, prebiotika a atopické choroby

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

### 2.3.2 Terapie atopie

Účinek LGG a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 u dětí s atopickým ekzémem prokázali definitivně Isolauri et al v roce 2000 (Isolauri 2000) v randomizované, dvojité slepé a placebem kontrolované studii. Výhradně kojené děti průměrného věku 4,6 měsíců s atopickým ekzémem byly převedeny na

výživu vysoce hydrolyzovanou syrovátkou s probiotiky nebo bez nich. Po dvou měsících se výrazně zlepšila probiotická skupina podle SCORAD skóre, snížení sérového CD4 a eozinofilního proteinu X v moči. Lze tedy předpokládat, že některá probiotika jsou schopna modifikovat projevy alergického zánětu a že mohou ovlivnit zánětlivé odpovědi i mimo střevo samotné. Tato interpretace je ve shodě se změnami dalších indikátorů alergické odpovědi po podání probiotik. Perorální aplikace LGG a některých dalších laktobacilů u dětí s atopickou dermatitidou je provázána zvýšením sérového IL-10 (Pessi 2000).

V důsledku stimulace regulačních T-buněk (Smits 2005). Současně dochází k zvýšení imunitních odpovědí Th1 typu prostřednictvím IFN- $\gamma$  (Prescott 2005). Bylo rovněž potvrzeno, že střevní MF u zdravých dětí a atopiků se liší během kojení i odstavu a že probiotika příznivě ovlivňují její složení. Atopici mají méně grampozitivních aerobních kmenů a celkově chudší MF. Při výraznějším postižení se zvyšují kmeny bacteroides a snižují se bifidobakterie (Kirjavainen 2001). Podávání Bifidobacterium lactis Bb-12 vede k snížení E. coli a zabraňuje zvýšení bacteroides, což může zmírnit alergický zánět (Kirjavainen 2002). Ve shodě s tím dochází u atopiků k snížení zánětlivých markerů ve stolici a zvýšení IgA po stimulaci (Viljanen 2005). Účinek LGG u dětí s intolerancí kravského mléka a atopickým ekzémem předpokládá použití živé a nikoliv tepelně inaktivované kultury. Další studie potvrdily předchozí nálezy a významně je doplnily řadou poznatků. Lactobacillus fermentum (109 CFU 2x denně) podávaný po dobu 4 měsíců zlepšuje středně těžkou a těžkou atopickou dermatitidu dětí ve věku 6–18 měsíců (Weston 2005). Rosenfeldt et al. sledovali účinky Lactobacillus rhamnosus a Lactobacillus reuteri u 1–13letých dětí s atopickou dermatitidou. SCORAD skóre bylo významně sníženo u nemocných se zvýšením sérového IgE a alespoň jedním pozitivním kožním testem. Během terapie rozsah ekzému a trávicí obtíže významně ustoupily, bariérová funkce stanovená testem propustnosti se zlepšila a sérová koncentrace eozinofilního kationického proteinu se snížila (Rosenfeldt 2003, Rosenfeldt 2004). Účinnost probiotické terapie pravděpodobně klesá s věkem dítěte a omezuje se hlavně na IgE-senzibilizované jedince (Sistek 2006, Viljanen 2005). Laitinen et al (Laitinen 2005) prokázali prospektivním sledováním dětí s rodinnou anamnézou alergického onemocnění, že perinatální podávání probiotik v kombinaci s některými dalšími látkami (retinol, vápník, zinek) je bezpečné a snižuje riziko atopického ekzému. Považují proto takovou kombinaci za vhodnou pro prevenci i terapii alergických chorob. Kombinace probiotik a prebiotik působí synergicky v terapii atopické dermatitidy. Nejvhodnější se jeví směs galaktoa fruktooligosacharidů, která významně zvyšuje počet bifidobakterií ve stolici. Tento nálezy svědčí pro schopnost oligosacharidů měnit složení střevní MF a ovlivňovat příznivě postnatální vývoj slizniční imunity. Na rozdíl od těchto sdělení nezjistili pouze Brouwer et al (Brouwer 2006) u dětí s atopickou dermatitidou (věk do 5 měsíců) po 3 měsících aplikace

LGG a *Lactobacillus rhamnosus* významné změny SCORAD skóre, senzibilizačních testů, zánětlivých parametrů a produkce cytokinů.

## 2.4 Primární prevence

Kalliomäki et al (Kalliomäki 2001) podávali LGG prenatálně matkám, které měly alespoň jednoho příbuzného 1. stupně nebo partnera s atopickým ekzémem, rhinitidou nebo astmatem a postnatálně pokračovali v léčbě u 132 dětí do 6 měsíců. Výskyt atopického ekzému ve věku 2 let se snížil tímto postupem na polovinu ve srovnání s placebovou skupinou. Preventivní účinek přetrvával u těchto dětí také ve věku 4 let (Kalliomäki 2003). LGG lze tedy považovat za účinný v prevenci časného atopického onemocnění nejspíše v důsledku jeho imunomodulačních vlastností. Ve shodě s tímto nálezem bylo zjištěno, že podávání LGG matkám 4 týdny před porodem a další 3 měsíce během kojení zvyšuje obsah TGF- $\beta$  v mateřském mléku (Rautava 2002). TGF- $\beta$  přispívá významně k vývoji orální tolerance, potlačuje Th2 imunitní odpověď, stimuluje tvorbu IgA protilátek k potravinovým antigenům a chrání před vznikem atopické nemoci během kojení (Ogden 2005).<sup>31</sup>

## 2.5 Využití probiotik v praxi

Střevní mikrobiota tvoří důležitý systém v těle člověka, jehož složení a funkce byly rozpoznány jen částečně. Probiotické bakterie, které mají uplatnění v klinické medicíně a splňují statut léčebného přípravku, zahrnují nepatogenní *E.coli* kmen Nissele 1917., *Lactobacillus rhamnosus* a rucei a *Sacharomyces boulardii*. Bakteriální kmeny jsou klasifikovány jako probiotika, když splňují příslušná kritéria. Na českém trhu je v současné době dostupných pouze pět preparátů, které splňují kritéria léčiva. Mutaflor a Colinfant New Born, obsahující nepatogenní kmen *E.colli*. Dále Lacidofil obsahující směs *lactobacilů* a Enterol obsahující *Saccharomyces boulardii*. Konečně VSL/3 obsahující osm bakteriálních kmenů.<sup>32</sup>

### 2.5.1 Infekční průjmy

Terapie zkracuje délku trvání průjmů, snížení permeability střevní bariéry, významné zvýšení tvorby slizničních IgA. Děti léčené probiotiky vykazují během 5 dnů významnou eliminaci rotavirů v porovnání s neléčenou skupinou.

---

<sup>31</sup> Frič, P.: Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(1), 46–50.

<sup>32</sup> Lukáš, M.: Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní med*. 2015, 17, 1, 14-17

## 2.5.2 Léčba postantibiotických průjmů.

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

## 2.5.3 Pseudomembranózní colitida

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

## 2.5.4 Kolitida při divertikulární nemoci

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

## 2.5.5 Alergická onemocnění

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

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

## 2.5.6 Průjmy cestovatelů

Velmi praktické se jeví využití *Saccharomyces boulardii*.

## 2.5.7 Funkční střevní dyspepsie

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

## 2.5.8 Zácpa

Příčiny sekundární zácpy

## 2.5.9 Idiopatické střevní záněty

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

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

## 2.5.10 Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů

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



nemoci probiotickou terapií skupiny nepatogenních *E. coli*, laktobacilů a bifidobakterií považovat za metodu volby, viz. tabulka 2.<sup>33</sup>

Tabulka 2 – Mikrobiologická terapie

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

Zdroj: Vlastní

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

I. Mečnikov publikoval v roce 1907 v Londýně práci, kde jako první upozornil, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje zdravotní stav a proces stárnutí dával do souvislosti s chemickou intoxikací mikrobiální florou tračníku. Jeho práce vycházela z pozorování života bulharských venkovanů.

Alfred Nissle v roce 1916 publikoval základní práci, která se stala základem probiotického kmene *E. coli* k datu 1.3.1917. V témže roce převzala farmaceutická firma G. Pohl výrobu bakterie

<sup>33</sup> Zbořil, V.: Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů. *Alergie*. 2004, 3, 151-155. ISSN 1212-3536. Zbořil, V.: Fyziologie mikroflory trávicího ústrojí jako základ probiotické terapie. *Postgraduální medicína*. 2002, 8, 824-827.

obsahujících kapsli pod názvem Mutaflor. Nissle sám je poprvní použil v roce 1930 v terapii idiopatických střevních zánětů. V roce 1987 byla vytvořena první genomová karta E.coli. Autoři během 15leté studie zjistili, že jedna bakterie E.coli K 12 může produkovat asi 1900 různých proteinů. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenními E.coli byl registrován pouze meteorismus jako známka příliš vysoké dávky Mutafloru. Průjmové stolice či jiné potíže v literatuře 1x sporně uváděné, jsme u Colinfantu nezaregistrovali.

Z jednotlivých, v tabulce 2 uváděných preparátů, je na našem trhu BION3-směs 3 probiotických kultur, lactobacilů a bifidobakterií. Lactobacily jsou také součástí preparátu Lacidofil. Z dalších je zde k dispozici VSL 3 (*Streptococcus salivarius*) pak *Saccharomyces boulardii* (Santax S). Zmíníme-li se o zkušenostech s probiotickou terapií v léčbě idiopatických střevních zánětů, autor konstatuje velmi dobré zkušenosti s Mutaflorem. Laktobacilová probiotika se neosvědčila v prevenci rekurencí po operacích Crohnovy choroby.<sup>34</sup>

Pro terapeutickou úplnost přikládáme tabulku 3 s nejčastěji používanými probiotiky od prof. Nevorala.<sup>35</sup>

Tabulka 3 - Nejčastěji používaná probiotika

Lactobacily
L. acidophilus
L. casei, spec. rhamnosus (Lactobacillus GG)
L. casei Shirota
L. delbrueckii subsp. bulggaricus
L. reuteri
L. brevis
L. cellobiosus
L. curvatus
L. fermentum
L. plantarum 299v
Grampozitivní koky

<sup>34</sup> Zbořil,V.: Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů. Alergie, 2004,3:151-155.ISSN 1212-3536. Zbořil,V.: Fyziologie mikroflory trávicího ústrojí jako základ probiotické terapie. Postgraduální medicína,2002,8,824-827

<sup>35</sup> prof. MUDr. Jiří Nevoral, CSc.: Prebiotika a probiotika v pediatrii. Pediatr.praxi 2012,13,3,167-173.

Lactococcus lactis subsp. cremonis Streptococcus salivarius subsp. thermophilus Enterococcus faecium S. diacetylactis S. intermedius
Enterobakterie
E. coli (serotyp O83:K24:H1) E. coli Nissle 1917 (serotyp O6:K5:H1)
Bifidobakterie
B. bifidum B. adolescentis B. animalis B. infantis B. longum B. thermophilum
Kvasinky
Saccharomyces boulardii

Zdroj: prof. MUDr. Jiří Nevoral, CSc.: Prebiotika a probiotika v pediatrii. Pediatr.praxi 2012,13,3,167-173.

### 2.5.11 První realizované experimentální studie s perorálním osídlením

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

Ještě po 10 letech byl u této skupiny prokázán nižší výskyt opakovaných infekcí (23 %) než u dětí kontrolních (58 %). Cílené osídlení po narození kmenem E.coli mělo též dlouhodobý vliv na výskyt alergických onemocnění – významně nižší počet byl prokázán po 10 a 20 letech (12 % po 10 letech, 16 % po 20 letech) u osídlených dětí. A u kontrolních dětí 33 % po 10 letech a 32 % po 20 letech. Výsledky jsou v souladu s údaji ve světové literatuře o významu střevní flory, která je důležitým modulátorem vývoje imunitních funkcí. Tato zpráva však neodpovídá současným tendencím medicíny založené na důkazech. Vychází z dotazníkové akce na pacienta 10 a 20 let po narození, laici. Nelze zmapovat

výtěžnost podle místa bydliště před 10 a 20 léty, když je nám známo, jak často lidé mění bydliště. Odpovědi laiků na zdravotnické otázky jsou však velmi zavádějící, zvláště když odpovídají na jejich problematiku z novorozeneckého a raného školního věku! Lidé mnohdy nevědí, co bylo v minulém roce. U bezmikrobních zvířat chybí indukce vývoje tolerance. Specifické kmeny střevní mikroflory podporují ochranu hostitele proti senzibilizaci. Po obnovení střevní flory (avšak pouze stane-li se tak v neonatálním období), obnoví se vnímavost Th1 a Th2 odpovědi k orální indukci tolerance (Sudo 1997) Ontogeneze alergické slizniční odpovědi není dosud plně objasněna. Ovlivněna je kojením, aktivací dendritických buněk, které představují primární antigen prezentující buňky a za třetí determinující úlohou cytokinů. Fetální Th2 cytokiny u zdravých dětí rychle klesají v průběhu prvního roku života, avšak u alergických dětí jejich hladina stoupá (Jones 2000)

Dítě donošené je vybaveno:

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

U nedonošených dětí se pomáhá probiotiky, což jsou mono nebo smíšené kultury živých mikroorganismů, které kladně působí na hostitele vytvářením vyrovnaného a správného složení střevní mikroflory. Kmen *E.coli* byl ve stolici sledovaných dětí v naprosté převaze po dobu 16 týdnů. Přítomnost kmene ve stolici vyvolala lokální imunitní odpověď. IgA protilátky ve filtrátech stolice přítomny. Časná indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je u těchto dětí zvláště významná, protože nahrazuje chybění tohoto imunoglobulinu obsaženého v MM. Pomocí dotazníků obsahujících 18 otázek byl zhodnocen výskyt opakovaných infekcí a alergických onemocnění po 10 a po 20 letech.<sup>36</sup>

### 2.5.12 Slizniční IgA a probiotika

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

---

<sup>36</sup> Lodinová – Žádníková, R.: Probiotika v pediatrii: Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem *E.coli* po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie*. 2002, 4, 275-279.

obranu proti infekci patogeními bakteriemi nebo viry. O stimulaci IgA bifidobakteriemi informovali jiní autoři (Yasui 1992). Bifidobakterie se uplatňují u akutního průjmu, rotavirové infekce. V testech na zvířatech informují autoři (Perdigon 1986 a 1990), o aktivaci makrofágové aktivity u myší. Stimulují protilátkovou odpověď na specifické antigeny.

### 2.5.13 Bifidogenní faktor

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

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

Vlivem jeho účinku je mikroflora s převahou laktobacilů a bifidobakterií vytvořena během jednoho měsíce. Vytvořená kyselina mléčná přispívá k tvorbě prostředí, ve kterém tyto dobře rostou, což trvá přibližně do 2 let. Fyziologická funkce normální střevní mikroflory spočívá v ničení patogenních bakterií, inhibici bakteriální adheze a konzumací živin pro růst patogenů. Právě tímto působením na střevní lymfatickou tkáň v prvních měsících života přímo reguluje systémovou i lokální imunitní odpověď, včetně odpovědi na antigeny mikroorganismů a potravinové antigeny. Tyto mikroorganismy pomáhají vytvořit rovnováhu mezi Th1a Th2 imunitní odpovědí a stimulují navození tolerance pravděpodobně prostřednictvím stimulace dalších podtříd T pomocných buněk produkujících transformující faktor beta (TGF beta a interleukin 10 (IL10)). Vhodné osídlení vede také k urychlené tvorbě sekrečního IgA.

Obohacením kojeneckých přípravků směsí oligosacharidů se střevní mikroflora blíží mikroflorě kojených dětí.<sup>37</sup>

---

<sup>37</sup> Nevoral, J.: Probiotika a prebiotika. *Medical Tribune*. 13/2008.

#### 2.5.14 Charakteristiky probiotik

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

#### 2.5.15 Mikrobiologické bezpečnostní požadavky

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

#### 2.5.16 Průmyslové parametry

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

#### 2.5.17 Mechanismus působení

Probiotika jsou směsné kultury nebo monokultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflory. Mikroorganismy používané jako probiotika jsou humánního původu s jedinou výjimkou kvasinky *Saccharomyces boulardii*. Povrch zažívacího ústrojí kolem 200 m<sup>2</sup>. Zažívací ústrojí dospělého člověka obsahuje 10<sup>14</sup> živých bakterií, jak již bylo zmíněno. Po SC je osidlování zpožděno asi o 10 dní. Téměř o jeden měsíc později osidlují zažívací trakt laktobacily a bifidobakterie. Hovoříme o prebiotické funkci mateřského mléka. Tento bifidogenní faktor je tvořen oligosacharidy. Fyziologická funkce normální střevní mikroflory je součástí obranného mechanismu, který spočívá v kompetitivní inhibici bakteriální adheze patogenních bakterií na sliznici

zažívacího traktu, v syntéze sloučenin, které inhibují a ničí patogenní bakterie a v kompetitivní konzumaci živin potřebných pro růst patogenních mikroorganismů.<sup>38</sup>

### 3 PROBIOTIKA V PEDIATRII

Po narození je gastrointestinální trakt osidlován bakteriemi z porodních cest a trávicího traktu matky za podpory oligosacharidů mateřského mléka (prebiotik), které podporují růst probiotických bakterií. Probiotické bakterie jsou nacházeny i v mateřském mléce, jak dokumentují práce z poslední doby. Účinek probiotik je udáván v několika oblastech.

- normalizace střevní flory, která spočívá ve zvýšení odolnosti k patogenům a úpravě střevní flory při poruchách motility,
- imunomodulační působení, které spočívá ve vlivu na snížení manifestace alergií (atopická dermatitis, potravinové alergie), nespecifické střevní záněty, rozvoj imunity v novorozenecko-kojeneckém věku
- metabolické účinky produkce enzymu laktázy a tím lepší tolerance mléčných výrobků, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem. Je popisovaná i odlišná střevní flóra u kojenců s nadváhou.
- prevence a terapie průjmových onemocnění, především virové etiologie
- příznivý účinek na redukci postantibiotického průjmu
- evidentní vliv na snížení výskytu nekrotizující enterocolitidy u nedonošených dětí
- příznivý účinek u ulcerosní proktokolitidy
- studie prokazující účinnost probiotik v prevenci respiračních onemocnění.<sup>39</sup>

Mečnikov prokázal, že některé mikroorganismy jsou schopné v experimentu stimulovat růst *Vibrio cholerae*, zatímco jiné mají opačný účinek. Dával do souvislosti dlouhověkost bulharských horalů s jejich pravidelnou konzumací fermentovaných mléčných produktů. Střevní mikroflora se dělí na složku stálou, autochtonní a přechodnou. Během těhotenství je GIT trakt sterilní. Dále pak jen z porodních cest a z okolí po S. Caesarea. Byl zaveden pojem bioterapeutické agens. Je otázka, zda je možno mezi probiotika řadit subcelulární složky bakterií, např. části bakteriální stěny.

Klinické využití probiotik musí splnit:

---

<sup>38</sup> Fukushima, Y., et al: Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 42, 39-44.

<sup>39</sup> Frühauf, P.: Racionální užití probiotik v pediatrii. Zdroj [www.edukafarm.cz](http://www.edukafarm.cz).

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

Mimo nejrůznější sledované efekty u dospělých se předpokládá, že některé bakteriální kmeny jsou schopné modifikovat aktivitu fagocytů a snížit aktivitu Th2 lymfocytů. Výsledkem je snížení sekrece IgE. Velmi málo popsanych vedlejších příznaků u extrémně oslabených jedinců - případy katetrových sepsí u pacientů léčených *S.boulardii*.<sup>40</sup>

### 3.1 Využití probiotik v pediatrii a vliv na střevní mikroflóru

V roce 1965 Lilly a Stilwell poprvní definovali probiotika jako faktory, které jsou produkovány mikroorganismy, a které mají příznivý účinek na podporu růstu zvířat. Zvířata živená zakysanými mléčnými výrobky, které tyto faktory obsahovaly, byla celkově zdravější a lépe rostla. V roce 1974 použil Parker termín probiotika pro organismy a substance, které mají příznivý vliv na střevní mikroflóru. V současnosti můžeme probiotika definovat jako mono či polykultury živých mikroorganismů, které mají příznivý účinek na mikrofloru člověka. Mezi probiotika patří především některé mléčné bakterie, většinou 3 skupiny: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. V každé skupině jsou specifikovány různé druhy bakterií, které se navzájem potencují. K prvnímu osídlení dochází při porodu dítěte. V trávicím traktu musí mikroorganismy překonat bariéru, kterou tvoří kyselé prostředí žaludku. Za žaludkem vytváří tzv. střevní mikrofloru. Spontánně porozené a kojené dítě je osidlováno především bifidobakteriemi. Mikrofloru tvoří více než 500 druhů bakterií. V souvislosti s mikroorganismy hovoříme i o mikrobiomu (Turnbaugh 2007). Tato se mění fyziologicky s věkem a s onemocněními. Probiotika iniciují aktivaci některých genů lokalizovaných v buňkách (Walker 2006). Perdigón (Perdigón 1999) hodnotil aktivaci imunitního systému po požití různých typů mléčných bakterií. Tato byla různá od stimulace humorální a celulární imunity až k indukci IgA. Účinek

---

<sup>40</sup> Bronský, J.: Využití probiotik v pediatrii. *Lékařské listy*. 2008.



probiotických bakterií je pevně spojen s jejich metabolismem. Probiotika zlepšují trávení bílkovin a štěpení laktozy, modifikují toxiny (Szajewska 2006).

Probiotika se uplatňují v prevenci rozvoje nekrotizující enterokolitidy, k ochraně před průjmovými onemocněními, v prevenci rozvoje alergických onemocnění – střevní mikroflora iniciuje střevní lymfatickou tkáň, zvláště plasmocyty, navozují rovnováhu Th1 a Th2. Posilují imunoregulaci. Tvoří mastné kyseliny s krátkým řetězcem, uplatňují se při intoleranci laktózy a u pacientů s hypercholesterolémií.<sup>41</sup>

### 3.2 Spektrum užití probiotik v pediatrii

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

Zde jsou rozebrána jednotlivá probiotika a jejich hlavní účinky. Role střevní mikroflory u novorozenců a kojenců. Bifidobacterie a Lactobacily zvyšují produkci T helper buněk. Střevní bakterie zvyšují sekreční imunní funkci, zvláště sekreční imunoglobulin A je důležitým predominantním imunoglobulinem povrchu mucosální sliznice. Zařizuje protekci proti antigenům, potenciálním patogenům, toxinům. Alterace střevní mikroflory u nemocí, kdy již po týdnu suplementace podávání bifidovských probiotik je patrné signifikantní zvýšení fekálních bifidobakterií. Tyto počty pak mnohdy dosahují počtů jako u kojených dětí. Bifidobakteria, Lactobacily, stejně dobře jako B.lactis vykazují zvýšení fagocyt. aktivity proti E.coli stejně dobře tak zvýšení aktivity přirozených zabíječů. Některé probiotické bakterie vykazují efekty na cytokinovou sekreci. Pokles fekálního alfa I antitrypsinu, močového eosinofilního proteinu X, TNF a dalších ukazují na regulační efekt na zánětlivé mediátory, zvláště u dětí s odlišnou zánětlivou nebo alergickou odpovědí. Tyto odpovědi jsou důležité pro vývoj imunní tolerance. Tehdy probiotika vedou k poklesu změn pro abnormální imunní hyperreaktivitu.<sup>42</sup>

*Efekt na nespecifickou imunitu:*

1. zvyšují mucinovou produkci
2. inhibují růst potenciálních patogenů
3. pokles střevní permeability
4. zvýšení aktivity přirozených zabíječů, aktivity makrofágů a fagocytozy

---

<sup>41</sup> Tláskal, P.: Využití probiotik v pediatrii. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(5), 288–292.

<sup>42</sup> Saavedra, JM., et al: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*. 2007, 22, 351-365.

*Efekt na adaptivní imunitu:*

1. zvyšují sekreci IgA, IgG a IgM
2. zvyšují totální a specifický sekreční IgA v séru a v intestinálním lumen
3. modulují zánětlivou imunní odpověď střevní
4. Nejlepší efekty sledovány u akutní diarehy s *L.rhamnosus* nebo bifidobakterie.

### 3.3 Rešerže nejznámějších publikací o aplikaci probiotik v dětském věku.

Tab. 4 - Probiotické klinické studie u kojenců a dětí: výsledky imunitního markeru

(Probiotic clinical trials in infants and children: immune protective marker outcomes)

reference	Populace/population	Probiotika/ probiotics	ochranná imunita /protective immunity
Kaila 1992	infants rotaviral diarrhea	<i>L.rhamnosus</i>	↑total IgG,IgA,IgM ↑rotavirus spec.IgA
Saavedra1994	healthy inf.	<i>B.lactis</i>	↓rotavirus shedding
Isolauri 1995	healthy inf.	<i>L.casei</i>	↑rotavirus IgA
Fukushima 1997	healthy inf.	<i>B.lactis</i>	↑fecal bifidobacterie
Fukushima 1998	healthy	<i>B.lactis</i>	↑total fecal IgA
Gupta 2000	Crohn	<i>L.rhamnosus</i>	↓intestinal permeability
Cukrowska 2002	preterm infants	<i>E.coli Nissle</i>	↑anti-E coli Nissle,IgA,IgM
Kirjavainen 2002	atopic infants	<i>B.lactis</i>	↑fecal lactobacilli ↓fecal bacteroides
Mullie 2004	healthy infants	<i>B.breve</i>	↑antipolio fecal IgA

Rinne 2005	infants with risk atopy	L.rhamnosus	↑total IgA,IgM,IgG
Viljanen 2005	atopic infants	L.rhamnosus	↑fecal IgA
Bakker–Zierkzee 2006	healthy infants	B.lactis	↑fecal IgA
Kukkonen 2006	atopic infants	L.rhamnosus	↑number of infants with high anti-Hib IgG
Mohan 2006	preterm infants	B.lactis	↑fecal bifidobacterie ↓fecal enterobacteriaceae
Rautava 2006	healthy infants	B.lactis L.rhamnosus	↑milk specific IgA
Stratiki 2007	preterm infants	B.lactis	improved intestinal permeability, ↑Bifidobacterial count

Zdroj: Saavedra, JM., et al: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. Nutrition in Clinical Practice 2007,22,351-365.

Tab. 5 - Probiotické klinické studie u kojenců a dětí: hlášené imunitní modulační výsledky

(Probiotic clinical trials in infants and children: reported immune modulatory outcomes) 43

Majamaa 1997	atopic infants	L.rhamnosus	↓fecal α-1 antitrypsin
Isolauri 2000	breastfed atopic infants	B.lactis	↓ serum sCD4
Pessi 2000	atopic infants	L.rhamnosus	↑ IL-10
Arvola 2002	atopic infants	B.lactis	↓ urinary eosinophil
Kirjavainen 2002	atopic infants	B.lactis	

<sup>43</sup> Saavedra, JM., et al: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. Nutrition in Clinical Practice 2007,22,351-365.

Rosenfeld 2003	atopic infants	L.rhamnosus	↓serum eosinophil cationic protein
Pohjavouri 2004	atopic infants	L.rhamnosus	↑IFN- $\gamma$
Viljanen 2005	atopic infants	L.rhamnosus	↓fecal $\alpha$ -1 antitrypsin
Fujji 2006	preterm infants	B.breve	↑ serum TGF- $\beta$ 1
Rautava 2006	healthy infants	B.lactis	↑ serum CD14

Zdroj: Saavedra, JM., et al: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. Nutrition in Clinical Practice 2007,22,351-365.

### 3.4 Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii

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

- Beta-glukany patří k dalším přirozeným imunomodulátorům lidského imunitního systému. Vyskytují se zejména jako typická stavební složka buňkových membrán hub (Fungi).
- Rostliny rodu Echinacea patřily mezi tradiční prostředky severoamerických indiánů používané při infekčních onemocnění. Obsahuje komplex různých látek s imunomodulačním působením (Spilková 2006).
- Omega-3/omega-6 nenasycené mastné kyseliny
- Polynenasycené mastné kyseliny jsou prekurzory vícerych mediátorů imunitního systému (prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny). Při jejich podávání se snižuje tvorba prozánětlivých mediátorů (TNF-alfa, IL-1), a dobré zkušenosti jsou proto pozorovány zejména při podávání u

autoimunitních zánětlivých onemocnění (například revmatoidní artritida, lupus, ulcerativní kolitida, Crohnova choroba) (Calder 2008, Damsgaard 2007).<sup>44</sup>

### 3.5 Vybraná probiotika

#### 3.5.1 Léčebné účinky probiotika Colinfant u extrémně nezralých

Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí prokazovala ve svém sdělení Sochorová. U novorozence se jako první objevují fakultativně anaerobní kmeny, hlavně kmeny E.coli. U kojených dětí postupně převládne bifidogenní flora. Sekreční IgA kolostra a mléka začne vykonávat svoji funkci, brání kontaktu a adhezi patogenních mikrobů na střevní sliznici. Mateřské mléko obsahuje specifické protilátky proti bakteriálním kmenům, které má matka ve stolici. Má-li dítě stejné bakteriální kmeny jako matka, je mléčnými protilátkami proti těmto kmenům chráněno. Situace je horší u nedonošených dětí, které mají omezený přenos protilátek od matky jak přímo, tak vlivem toho, že většinou nejsou kojené, jejich imunitní systém je nezralý. Častou aplikací antibiotik dochází k narušení složení střevní mikroflóry. Vzniká prostor pro uplatnění nosocomiální infekce. Proto nahradila přirozené, ale náhodné osídlení trávicích ústrojí cíleným perorálním osídlením nepatogenním kmenem E.coli, vakcínou Colinfant Newborn. Tento obsahuje lyofilizovanou suspenzi živých bakteriálních buněk nepatogenního kmene E.coli obsahem  $0,8 \times 10^9$  živých zárodků v jedné dávce přípravku. Přípravek podávala dětem, které se rodily v 29. týdnu gravidity s hmotností kolem 1200g. Snášenlivost preparátu byla velmi dobrá. Nebyla zaznamenána žádná intolerance. Přípravek byl podáván 3x v týdnu. Významný statistický rozdíl byl ve spotřebě antibiotik, u dětí se zkrátila doba hospitalizace. Neobjevily se nekrotizující enterokolitidy.<sup>45</sup>

#### 3.5.2 Mutaflor E.Coli – varianta pro dospělé

- antagonismus vůči patogenním zárodkům
- imunomodulace
- podpora normálního způsobu trávení a vyměšování
- fyziologicky jasně definovaný kmen E.coli
- fyziologická adheze colon
- apatogenita: neinvazivní, žádná tvorba enterotoxinů či cytotoxinů

---

<sup>44</sup> Végh, V., Végh, T.: Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii.: *Pediatr. pro praxi.* 2008, 9(6), 388–392.

<sup>45</sup> Sochorová, V.: Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí. *Vox.Ped.* 2003, 9, 7, 3, 26-27.

- úprava prostředí, spotřeba kyslíku, snížení redox potenciálu, regenerace anaerobní flory
- ochrana anaerobní flory proti kyslíku
- podpora metabolismu kolonocytů
- fermentativní odbourávání uhlohydrátů
- kyseliny mravenčí, octové, propionové a máselné
- snížení hodnot pH
- živiny pro kolonocyty
- tvorba vitamínu K
- lyofilizované množení schopné esch.coli
- Mutaflor otevření až v distální části tenkého střeva<sup>46</sup>

### 3.6 Imunomodulace

Vývojem došlo k velkým změnám ve způsobu přípravy jídla i stravování. Snížil se antigenní tlak patogenních mikrobů. Dříve k ukojení hladu používali 500 druhů rostlin, dnes jen 50 druhů. Je téměř nulová stimulace dozrávajícího imunitního slizničního systému u malých dětí. Slabý mikrobiální antigenní tlak. Vliv probiotik na imunitní systém je klinicky doložen zejména v oblasti Th1 a Th2 lymfocytů, kdy je působením probiotik zesílena aktivita Th1 buněk a zeslabena aktivita alergií podporujících Th2 buněk. Stimulací Th1 buněk dochází ke zvýšení produkce Th1 cytokinů/(IL12, IL18, INF gama) v monocytech a v periferních mononukleárních buňkách charakteristických pro specifický imunitní systém. Probiotika nebo symbiotika jsou doporučována u nemocných v prevenci clostridiové kolitidy, při léčbě gastrointestinální alergie, u recidivující divertikulitidy i ulcerosní colitidy. Znamé je využití v prevenci nekrotisující enterocolitidy u nedonošených novorozenců. Připravuje se využití při idiopatických střevních zánětech. Zkouší se využít synergie probiotik a B-glukanů.“<sup>47</sup>

### 3.7 Probiotika v primární prevenci

Efekt Lactobacillus na atopické nemoci, kdy je dané probiotikum podáváno budoucím matkám, které měly v poslední době atopický ekzém, alergickou rhinitis nebo asthma a postnatálně a současně

---

<sup>46</sup> Rembacken, B.J. et al: Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999,354,635-639

<sup>47</sup> Ezendam, J.: Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews*. Jan 2006, 64, 1, 1-14.

po 6 měsících jejich novorozencům. Atopický ekzém byl jako hlavní ukazatel efektu terapie byl diagnostikován u 35 % dětí ve věku 2 let tzn. 35 ze 132. Asthma bylo diagnostikováno u 6 a alergická rhinitida u jednoho. Frekvence atopického ekzému v probiotické skupině byla poloviční než v placebové skupině. *Lactobacillus* byl efektivní v prevenci včasného atopického onemocnění u dětí s vysokým rizikem. Kvalitní mikroflora je zdrojem přirozené imunomodulace. Gastrointestinální mikroflora podporuje potenciální antialergenní procesy: T helper 1 typ imunity, tvorbu transformujícího růstového faktoru Beta, který má důležitou roli v supresi T2 lymfocytů a indukci orální tolerance a za třetí IgA produkci. Závažnost ekzému hodnotili podle SCORAD indexu. Laktobacily zřejmě navyšují růstový faktor Beta a produkci interleukinu 10. Je popisována produkce anti IgE protilátek.<sup>48</sup>

### 3.8 Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi – mechanismus působení bakteriálních imunomodulátorů

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

Z výše uvedených skutečností celkem jednoznačně vyplývá, že bakteriální imunomodulátory vůbec nepatří k obsoletním léčebným přípravkům, které máme k dispozici v klinické praxi. Patří naopak k nejpřirozenějším modulátorům lidského imunitního systému. Liší se především zastoupením bakteriálních kmenů v jednotlivých přípravcích. Viz. tabulka 6. Bakteriální imunomodulátory se především uplatňují na sliznicích, se kterými přicházejí do kontaktu, aktivací nespecifických imunitních mechanismů.<sup>49</sup>

Tabulka 6 - Bakteriální imunomodulátory na lékařský předpis<sup>50</sup>

Název přípravku	Složení přípravku	Léková forma	Způsob aplikace	Indikace	Vlastní zkušenosti

<sup>48</sup> Kalliomäki, M., et al: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. Vol.357, April 7, 2001, 1076-1079.

<sup>49</sup> Bystroň, J.: Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Pediatr. praxi*. 2011, 12(6), 398–404.

<sup>50</sup> Doc. MUDr. Jaromír Bystroň, CSc.: Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Pediatr. praxi* 2011,12(6),398–404

Broncho-Vaxom	Haemophilus influenzae Streptococcus pneumoniae Klebsiella pneumoniae Klebsiella ozaenae Staphylococcus aureus Streptococcus pyogenes Streptococcus viridans Neisseria catarrhalis	Tobolky obsahující lyzáty minimálně 109 bakteriálních těl jednotlivých druhů  Celkem 7 mg  Pro děti poloviční dávka	10–30 denní kúra s následnou 3týdenní pauzou  1 tob. ráno nalačno	Prevence a léčba chronických a recidivujících infekcí dýchacích cest	Po základní 10denní kúře možno další kúry a pauzy upravit dle individuální odpovědávosti pacienta
Luivac	Staphylococcus aureus Streptococcus mitis Streptococcus pyogenes Klebsiella pneumonie Moraxella catarrhalis Haemophilus influenzae Mechanická destrukce bakterií	Tablety obsahující lyzáty minim. 109 bakteriálních těl jednotlivých druhů  Celkem 3 mg  Stejná dávka pro děti i dospělé	1 tableta denně ráno nalačno ve 28denních kúrách s 28denními pauzami	Prevence a léčba recidivujících a chronických infekcí dýchacích cest	Po základní 28denní kúře je možno další kúry a pauzy volit dle individuální odpovědávosti pacienta
Ribomunyl	Směs glykoproteidů bakteriální stěny Klebsiella pneumoniae a směs purifikovaných ribozomů bakteriálních	Sáčky nebo tablety  Pro děti i dospělé	1 tableta či sáček ráno nalačno	Prevence a léčba recidivujících a	Tablety je možno taky rozpouštět v ústech – nejlépe



	druhů Streptococcus pyogenes Klebsiella pneumoniae Haemophilus influenzae Streptococcus pneumoniae	stejná dávka Celkem 2 mg	4 dny v týdnu v prvních 3 týdnech, následně týden pauza a pokračování 1× měsíčně 4denní kúrou	chronických infekcí dýchacích cest a středouší	na noc před spaním
Uro- Vaxom	Purifikovaný extrakt Escherichia coli	Kapsle 6 mg	1 kapsle 10– 30 dnů ráno nalačno	Doplňková léčba opakovaných moč. infekcí	U chronických infekcí možno podávat 90 dnů

Zdroj: Doc. MUDr. Jaromír Bystroň, CSc.: Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. Pediatr. praxi 2011,12(6),398–404

### 4 VÝZNAM STANOVENÍ PUPEČNÍKOVÉHO IMUNOGLOBULINU E VE VZTAHU K RODINNÉ ANAMNÉZE ALERGIE

V této práci, která začala před 18 roky, byla první fáze, v letech 1998-2010, vedena snahou o vyjasnění problematiky pupečnickového IgE. Jednalo se o výtěžnost vyšetřování hodnot imunoglobulinu E nejen z krevního séra. Záměrem bylo mimo jiné ověřit údaje z literárních prací o vazbě mezi hodnotami IgE z pupečníku a hodnotami IgE v krevním séru v následujícím kojenecko-batolecím věku, ale i v dalším období a také, zda hodnoty pupečnickového IgE jsou v průměru rozdílné u novorozenců z rodin, kde jeden nebo oba rodiči jsou alergici.

Výzkum byl zaměřen na hodnoty pupečnickového IgE a jejich závislost na faktorech, jako je roční doba porodu a sezónnost. Úkolem bylo zjistit, jestli může být pupečnickový IgE dalším vhodným markerem ukazatele rozvoje alergie. Byli jsme při tomto vedení snahou o určení budoucnosti rozvoje této alergie. Byli jsme si také vědomi zvyšující se frekvence prací o důležitosti předpokládané úlohy střevní flóry dětského jedince. Při tvorbě imunitního stavu novorozence a kojence, kdy se výzkum etiopatogeneze zaměřuje na perinatální i prenatalní období. Smyslem je co nejvčasnější možnost případného terapeutického zásahu, a to i na bázi biotechnologických metod. Rád bych zdůraznil, že jsem byl inspirován publikacemi i akcentovanými medicínskými pohledy prof. MUDr V.Zavázala, DrSc., který nás do této tematiky zavedl.

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

## 4.1 Metodika stanovení

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

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

Hodnoty odpovídaly vždy dané metodice a příslušné kontrolní skupině.

## 4.2 Soubor a výsledky

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

A: 174 dětí s alergií obou rodičů

B: 577 dětí s alergií matky

C: 144 dětí s alergií otce

D: 67 dětí jako kontrolní soubor

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

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

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

A: 263 dětí s alergiemi obou rodičů

B: 1934 s alergiemi obou rodičů

C: 430 s alergií u otce

D: 30 dětí kontrolní soubor

Zde při Kruskal-Walisově testu a Mann – Whitneově testu byla zjištěna i v této skupině statistická významnost na hladině 1 promile. I zde ze statistického zpracování vyplynuly nejvyšší hodnoty IgE ve skupině novorozenců s alergií obou rodičů. Z přiložených grafů (Příloha 1) dokumentujících hodnoty IgE v jednotlivých měsících roku jsou patrné vzestupy hodnot podle pylové sezóny a kvality počasí. V prezentacích je poukázáno na roky 1999, 2000, 2001, 2002, 2003-2008, 2009-2010, což jsou hodnoty vlastně během celého desetiletí.

Pro ohodnocení skupin odebíraných novorozenců bylo u rodičů novorozenců provedeno, v osmi sledovaných letech v obou skupinách, zjištění procentuálního rozložení nejčastěji anamnesticky zjišťovaných alergií. Údaje byly v asociaci s dokumentacemi ze statistik z alergologických poraden. Nejčastější alergií byla v anamnézách nastávajících rodičů zjišťována alergie na pyly (ve 40 %) a prach (20-25 %) (Příloha 1).

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

### 4.3 Studie

V rámci diskuze studie ukázaly, že k ovlivnění imunitního systému může dojít již intrauterinně, kdy některé antigeny mají možnost procházet placentou (14 Salvatore.S. 2005). Za kritické období, kdy vlivem vnějších faktorů může docházet k imunologickým změnám a následnému vývoji atopie, se považují první měsíce života. Imunitní systém novorozence je v prvních měsících nezralý. Novorozenec tvoří jen malé množství imunoglobulinů, schopnost buněk specifické imunity reagovat na antigeny je omezená. U novorozenců, jak je zdůrazněno v této práci, je primárně posunutá nerovnováha mezi Th1 a Th2 lymfocyty ve prospěch Th2 a tím je i vyšší možnost atopické senzibilizace. Také literárně uváděná možnost senzibilizace plodu již od 22. týdne gravidity, polygenitní základ, zvýšená tvorba IgE, IL 4 a IL5 představují další rizikový faktor. Novorozenci mají také nedostatečně vyvinutou slizniční bariéru.

Zvláště u dětí, z nichž jeden nebo oba rodiče jsou alergici, se dnes považuje za vhodné v novorozeneckém věku vyšetřit pupečnickovou krev na hodnoty IgE, případně krev z periférie na hodnoty IgE. Pokud je zjištěna vyšší hladina, je tento považován za potenciálního alergika (11 Petruš, Špičák, Panzner, 21 Vernerová) zvláště v prvních měsících života. Genetická výbava jedince výrazně ovlivňuje vznik a průběh alergických reakcí. K tomu si připomínáme vyjádření našeho plzeňského učitele prof. MUDr V. Zavázala, DrSc. o tom, že když se člověk zbavil těžkých epidemií infekcí, tak jeho imunitní systém, začal reagovat na běžné věci, jako jsou pyly a podobně (23, Zavázal). Alergická onemocnění jsou cenou za osvobození od infekčních a parazitárních chorob, jak udávají některé další informace. Dá se očekávat rozdílný vliv genetického pozadí na vznik astmatu, atopické dermatitidy a dalších. Důležitou roli hraje chromosom, kde je celá oblast obsahující geny pro řadu cytokinů např. IL 4. Klíčovým mediátorem alergických reakcí je ale IgE (23 Zavázal). Další důležitá genetická oblast, související s hladinou IgE, byla zjištěna na chromosomu 5 v oblasti molekuly CD14. Tento receptor zajišťuje směr imunitní odpovědi. Imunitní systém novorozence ale nemá specifickou imunitní paměť. Tzv. hygienická hypotéza (16 Strachan, 15 Shah), jak je uváděno v teoretické části, vychází z názorů, že nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům je faktorem, přispívajícím k rozvoji alergie. Hygienická hypotéza vychází z názorů, že včasná mikrobiální stimulace vede k Th1 lymfocytové imunitní odpovědi. Na druhé straně se ale uvádí, že prodělaná RSV infekce v raném dětství nebo prodělaná atypická pneumonie předkládá převahu Th2 lymfocytů. Již na úrovni buněk pupečnickové krve je patrný alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie. Také významně vyšší množství IL 5 a IL 10 v kolostru alergických a také v pupečnickovém séru jejich dětí naznačuje převažující ladění TH2 imunitního systému. Také snížená exprese TGF-B u dětí alergických matek může přispívat k pomalejšímu vyzrání střevního epitelu novorozenců a tím usnadňovat průchod alergenů (2,3 Isolauri, 6 Kalliomaki, 7 Kjellman). Nebyla zjištěna žádná korelace mezi sérem matky a novorozence. Imunitní systém dostává první alergenové podněty v těhotenství, zvláště v jeho posledním trimestru.

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

## 5 KOLONIZACE NEPATOGENNÍM E.COLI V LÉČBĚ A PREVENCI MORBIDITY A ALERGIE U NOVOROZENCŮ S VYSOKOU HODNOTOU PUPEČNÍKOVÉHO IGE

Ve studii, která probíhala od roku 1998 a pokračovala, až do roku 2010 byla ve dvou obdobích, tj. v letech 1998-2002 a 2003-2010 ověřována hodnota IgE z pupečníku, následně v 1. roce věku a ve 3 letech z periférie. Vyšetřovaný soubor byl veliký, vyšetření byla prováděna celoročně. Díky této studii bylo možné dospět k závěrům, ze kterých bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou (významnost 1 promile). První příznaky alergických chorob se posunují do prvních let života. Pravděpodobně literárně poprvé se podařilo graficky znázornit, jaké jsou v desetiletém období rozdíly v sezónnosti (Příloha 1). Vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou, k preventivní intervenci, mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Bylo čerpáno z četných literárních odkazů, především finských autorů. Tito autoři prezentovali mnoho publikací o vlivu různých probiotik při léčebném ovlivnění recidivujících onemocnění horních cest dýchacích, astmatu, otitis media, atopické dermatitidy, gastroenteritid bakteriálních i virových, nekrotisující enterocolitidy nezralých dětí a ulcerosní colitidy v dětském věku. Důležitým výstupem studie bylo přesvědčení o významu vyšetřování pupečnickového IgE a o následných souvislostech ve vazbě na další imunoglobuliny, především IgA i IgG. Při významu vyšetřování pupečnickové krve byly sledovány vlastnosti cytokinů, faktory humorální a celulární imunity novorozenců i faktory imunologické nezralosti. S tím následně souvisí opsonizační a fagocytární aktivita. Dále pak reakce imunitního slizničního systému trávicího traktu a podpora přirozené obranyschopnosti novorozenců a kojenců modulací střevní mikroflóry. Také genetická komponenta obou imunopatologií (alergických a autoimunních onemocnění) je velmi komplexní. Důležitá je reakce mezi alergeny specifickými Th2 lymfocyty a Th1 lymfocyty při velké ploše sliznic slizničního mikrobiota (mikroflóry), spojená s vlivem sekrečního a slizničního IgA a také v současné době zdůrazňovaný vliv regulačních T lymfocytů v pupečnickové krvi. Zdůrazňovaná je nerovnováha mezi Th2 a Th1 lymfocyty v počátečních obdobích života a také úloha pomocných Th lymfocytů, u kterých antigen vyvolá tvorbu IL 4 a IL 5, které pak navedou B lymfocyty k tvorbě IgE a způsobí eosinofilii. Právě výše uvedený případný kontakt s fyziologickou mikroflórou vede k indukci regulačních T lymfocytů, které tvorbou cytokinů s protizánětlivým působením (IL 10), optimalizují slizniční odpověď, indukují slizniční toleranci (Schmidt-Weber 2005). Opakovaná expozice sliznic antigenům podnětům nevede obvykle k zesílení slizniční odpovědi, ale naopak k utlumení imunitní reakce. Tento jev je nazýván indukce slizniční tolerance, který je mimořádně komplexní se spoluúčastí regulačních T lymfocytů (Treg). Vycházíme z četných literárních odkazů, že expozice antigenů na střevní sliznici vede k rozvoji antigen specifické

imunologické tolerance (orální tolerance). Literárně je uvedeno v přehledu časové rozvrstvení zásadních prací o používání probiotik (Saavedra 2007).

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

Charakteristiku probiotika Colinfant Newborn a jeho způsob podávání přikládáme.

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

Podotýkám, že jsem se nikdy nesetkal s vedlejšími účinky této kapkové vakcíny, nezjistil jsem žádné známky intolerance. Jedná se o živou perorální vakcínu, lyofilizovaný nepatogenní kmen E.coli. Je schopen vytěsnit osídlení střevního traktu patogenními kmeny. Vyroben původně Ústavem sér a očkovacích látek, obsah je 12 lahviček. Každá lahvička obsahuje E.coli sérotyp 083:K24:H31min.0,8 x 109. Je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflóry. Použití kmene a příprava vakcíny byly patentovány v roce 1989 pod číslem 2645722. Vakcína byla registrována v SÚKlu v roce 1997 pod registračním číslem 59/762/97-C. E.coli, ze které je připravována vakcína, je nepatogenní kmen s výše uvedeným serotypem. Je vysoce selektovaný, citlivý na běžná antibiotika, netvoří enterotoxin a nemá plasmid. Nepatří mezi žádné skupiny enteropatogenních E.coli. Jeho výborná kolonizační schopnost je zajištěna i přítomností fimbrií prokázaných hemaglutinací. Kmen má výborné kolonizační vlastnosti, obsazuje receptory střevní sliznice, brání adhezenci patogenů a vytlačuje přítomné enteropatogenní kmeny. Indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je zvláště významná, protože nahrazuje zčásti deficit tohoto imunoglobulinu. Prokázalo se, že po osídlení novorozenců vymizí jejich bakteriální patogeny ze stolice, krku, nosu (Lodinová 1999). Při testech přetrvával vakcinační kmen po dobu 16 týdnů, ale byl i prokázán po několika letech. Přítomnost kmene stimuluje tvorbu specifických i nespecifických protilátek, prokazatelnou ve střevním traktu, ve slinách i v séru. Ukázal se velmi důležitý fakt, že specifické kmeny střevní flóry mohou podporovat ochranu hostitele nejen proti sensibilizaci a alergii, ale i proti infekci! Jedná se o velký efekt vakcíny v prevenci infekcí a pro výrazné snížení nemocnosti u léčených dětí do 4 let věku. Tyto závěry byly ověřeny s rodiči při kontrolách dětí po 1. roce a po 3. roce věku podrobnou konkrétní anamnézou a u všech léčených dětí

kontrolami krevního biochemismu (imunoglobuliny G, A, E, KO diff, CRP, metabolismus Fe, vyloučení osídlení patogenními mikroby).

## 5.1 Soubor a výsledky

V první skupině léčených pacientů s vysokým pupečnickovým IgE a následně kontrolovaných v letech 2005-2007 byla zjištěna normalizace hodnot IgE (porovnáváných s laboratorní normou) u 106 ze 116 pacientů. Průměrná hodnota u těchto pacientů byla 25,7 U/ml. Další skupina léčených pacientů byla vyšetřena v letech 2007-2008. Graficky je toto v práci znázorněno. Z toho vyplývá, že normalizace hodnot IgE v dané skupině po léčbě nastala u 87 % pacientů (Příloha 2). Vzhledem k tomu, že na základě podrobné anamnézy rodiče upozorňovali na nápadně nízkou nemocnost vakcínou přeléčených pacientů, byly zpracovány u všech pacientů průměrné hodnoty IgG a zánětlivé ukazatele a metabolismus Fe. Hodnoty IgG jsou znázorněny na grafu 2 (Příloha 2). Výsledky byly srovnávány se skupinou zdravých dětí. Překvapující byly velmi dobré hodnoty IgG v léčených ročních skupinách. Následně vše bylo zpracováno statisticky. Byly zpracovány nejen hodnoty IgG a IgE, ale i IgA. Hodnoty se změnily u léčených Colinfantem v novorozeneckém věku mezi 1.-3. rokem, a to na hladině významnosti 1 promile. IgG u nemocných se zvýšilo v mediánu ze 4,55 na 6,87, IgA u nemocných se zvýšilo v mediánu z 0,26 na 0,62 a IgE u nemocných se optimálně zvýšilo v mediánu jen z 8,87 na 17,09. Ve 3 letech věku statisticky významně koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 promile.

Léčba Colinfantem přispěla k tomu, že výsledné IgE u léčených dětí se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí. Nemocnost léčených dětí Colinfantem oproti kontrolní skupině neléčených sourozenců je graficky znázorněna na kruhovém grafu č.3 a č.4 (Příloha 2 a 3).

## 5.2 IgE

Japonští autoři uzavírají (Matsamura 2010), že nejlepším prediktorem alergie je u novorozence pozitivní rodinná historie a elevace pupečnickového IgE. Také včasné podávání antibiotik, zvláště v prvním roce věku přispívá alergii, pravděpodobně ovlivněním střevní flóry. Také bylo ověřováno, pomocí hodnot pupečnickového IgA, potenciální kontaminaci s mateřskou krví.



### 5.2.1 Polyklonální aktivace

Osídlení slizničních povrchů určitým typem bakterií má příznivé účinky nutriční i imunologické. Dokáží snížit adhezi patogenů na povrch střeva. Jejich působením dochází ke snížení intraepiteliálních regulačních lymfocytů T ve střevní sliznici. Na enterocytech zvyšují expresi MHC molekul II. třídy, čímž zvyšují jejich schopnost prezentovat antigen. Významně i stimulují syntézu slizničního IgA. Pravděpodobně se jedná o určitý typ polyklonální aktivace. Možnost ovlivnění střevní flory probiotiky je uváděna v řadě prací (2 Björksen 2004, 7 Čadová 2012, 8 Desphande 2010, 10 Fukushima 1998, 19 Kukkonen 2007, 22 Lievin 2000, 30 Nevorál 2012, 49 Vernerová 2009). Pro zařazení mezi probiotika musí splňovat celou řadu kritérií.

### 5.2.2 Genová typizace probiotik

Samotná genová typizace byla prováděna zatím jen u 3 druhů probiotik. Jedná se o E.coli typ Nissle preparát Mutaflor, E.coli typ 083 preparát Colinfant a dále Lactobacillus casei spec. Rhamnossus GG a Sacharomyces boullardi. Tento poslední druh ale není humánního původu, a tak nepatří mezi pravá probiotika. Bakteriální kmeny musí být izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládaný příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do zažívacího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií. Tyto bakterie musí mít schopnost přežít v zažívacím ústrojí a být dostatečně metabolicky aktivní.

„Probiotika pro klinické použití by měla být vždy izolována z lidských materiálů. Probiotika ze zvířecích materiálů mohou v sobě skrýt faktory rizikové pro lidský organismus. Ačkoliv běžně nepředstavují pro zdravého člověka žádné riziko, u oslabených pacientů byly pozorovány ojediněle nežádoucí účinky (46 Thomas DW 2010).“

Jedná se o děti, které jsou imunosuprimovány, trpí chronickými onemocněními nebo mají zavedenu nějakou medicínskou pomůcku. Dokud nebudou eliminována bezpečnostní rizika pro velmi vážně nemocné děti, neměla by být u nich léčba zaváděna. Sem patří stavy po chemoterapii, radioterapii, po biologické léčbě autoimunních onemocnění a po orgánových transplantacích. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenním E.coli byl registrován literárně pouze meteorismus a u našeho Colinfantu vyrážka, která po ukončení terapie vymizela, a nebylo možno speciálně vazbu na preparát určit.

Vlastní smysl léčby probiotiky spočívá v přesměrování imunologické odpovědi od Th2 fenotypu k Th1 ještě dříve, než je ustavena imunitní odpověď na antigeny z okolního prostředí. Imunitní systém v časném dětském věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro

stimulaci a regulační funkce i k léčbě průjmů. Mnoho odborníků se shoduje, že takto nedochází k jeho dostatečnému „vyzrání“ a důsledkem je vychýlení imunitní reakce k reakci Th2 typu. Uplatňuje se zde navíc ještě mechanismus navození imunologické tolerance do 2-3 let věku. Ze studií se ukazuje, že z podávání probiotik profitují především děti s IgE zprostředkovanou alergií (4 Bosquet 1983).

Z historického hlediska probiotický kmen E.coli strain Nissle byl poprvé podán v roce 1917 (11 Henker 2007, 41 1992 Schröder). Termín probiotika byl poprvé použit v roce 1965 (Lilly), pro popis látky vylučované organismy, které stimulují růst jiných organismů. V Plzni a vůbec zřejmě poprvé i v tehdejší Československé republice jej použili v nemocniční studii Kneifl (LFUK Plzeň – katedra hygieny) spolu s Vlčkem a na DO nemocnice v Klatovech –Lactobacillus (LAT) s velmi dobrým efektem při podpůrné léčbě kojeneckých průjmů. Osobně jsem mohl tento efekt sledovat po nástupu po promoci do praxe. Plzeňská LF UK má tak zřejmě historicky nedostatečně proklamované prvenství v léčbě kojeneckých průjmů probiotikem i v mezinárodním měřítku. Začali již v roce 1965. Poněkud s nadsázkou je možné tak k prospěchu medicíny sdělit, že by se mohlo jednat o 50leté sledování. Mnozí autoři (1 Abrahamsson,2011) tvrdí, že probiotika redukuje incidenci IgE asociovaného ekzému u kojenců. Další k tomu dodávají (10 Fukushima 1998), že také zvyšují fekální hladinu IgA, která tak může přispívat ke zvýšení mucosální rezistence proti GIT infekci. Tyto pohledy jsou také v souladu s našimi klinickými výsledky i laboratorními nálezy hodnot sérového IgA u léčených pacientů. Kromě toho je prokázáno, že některá bifidobakteria také stimulují produkci IgA in vitro (10 Fukushima 1998).

Z možného působení probiotik je vhodné uvádět uznávanou úpravu střevní permeability a stimulaci imunitní odpovědi na patogeny, a to uznávaným zvýšením produkce sekrečního i sérového IgA, ale i prokázané normalizace hodnot sérového IgG i IgA a také zvýšením protizánětlivě působících cytokinů IL10, TGF Beta (Hrdý 2007, Vouloumanou 2009). Opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též prostřednictvím IL4 k útlumu aktivity Th1 lymfocytů. Tímto indukuje převahu regulačních Th3 lymfocytů, které snižují systémovou zánětlivou odpověď. Pro navození tolerance má velký význam i prezentace antigenu prostřednictvím APC (antigen prezentujících buněk). V četných studiích (Saavedra 2007 shrnutí) je uváděn nesporný vliv probiotik na prevenci GIT problémů u kojenců, léčbu a rychlejší úpravu rotavirových i bakteriálních gastroenteritid.

Další autoři se zabývali také klinickými obrazy novorozeneckého věku, ale i možným ovlivněním prenatálního období. Podávání probiotik matkám prenatálně i po porodu, podávání prebiotických oligosacharidů v prvním půlroce života a omezování alergenů ke konci těhotenství vedlo jen ke sporným nebo nedokladovatelným výsledkům. ESPGHAN (2011) se shodují, že pokud matka nekojí, v rodinách alergiků se podávají částečně hydrolyzovaná mléka do 4. měsíce věku. Thon (2011), Björksen

(2004), Isolauri (2008), Lilly (1965) a mnoho dalších autorů uvádí pozitivní ovlivnění střevní mikroflory přes mechanismy imunního systému GALT (Petrů 2004, Růžičková 2011, Novák 2012).

Právě v části studie, v letech 1998-2010 bylo cílem zjištění diagnostického a léčebného postupu. Studie zahrnula 3619 novorozenců. Diagnostická část byla provedena z větší části. Zbytek byl dovyšetřen v letech 2010-2015, a to 412 novorozenců.

Do druhé části studie, týkající se léčebného efektu používaného preparátu Colinfant, byli zařazeni pacienti – novorozenci z rodin s pozitivní rodinnou anamnézou a hodnotami pupečnickového IgE přesahujícími 2 směrodatné odchytky. Musím zde také zdůraznit dlouhodobost této studie a vývoj medicínských pohledů vzhledem ke klinickým studiím, dále také nesmírnou klinickou náročnost laboratorního vyšetřování dětí daného věkového období, zahrnujícího novorozenecký, kojenecký, batolecí ale i část předškolního věku. S tím souvisela anamnestická pečlivost středního zdravotnického personálu, zejména v porodním období, která se týkala souhlasu matek rodiček, ale i časného pobytu novorozenců a matek. Vše se řešilo cílenými anamnestickými dotazy, nikoliv formou dotazníkové korespondenční akce, zvláště pak v rodinách, kde se sledovala nemocnost sourozence.

Výsledkové hodnoty pupečnickového novorozeneckého IgE byly k dispozici po náběrech vždy již druhý den po porodu. K dispozici byly též všechny 3 metodiky, během sledovaných 20 let a výsledky kontrolní skupiny, které byly porovnávány s normálními hodnotami. K vyloučení přítomnosti krve matky byla vyšetřována v příslušném vzorku přítomnost IgA. Pokud zde byl přítomen v měřitelných hodnotách, vzorek byl vyřazen. Těchto vzorků však bylo zcela zanedbatelné minimum.

### 5.3 Vlastní terapie

Probiotikum Colinfant, živá perorální vakcína, liofyzovaný nepatogenní kmen E.coli, v krabičce 12 ampulí, byl podáván od 10. dne věku, přesně podle písemného návodu, relativně na lačno. Aplikován per os třikrát v týdnu. Zároveň u matek, v případech, kdy ženy nekojily, nebylo doporučováno požívání citrusových plodů, aromatického ovoce a ořechů. Pokud nekojily, do 4 měsíců bylo doporučováno podávání hypoalergenního mléka, v našem souboru používáme HA BEBU. Po měsíci bylo podávání Colinfantu ukončeno jeho spotřebováním.

### 5.4 Nemocnost

V 1 roce věku a ve 3 letech věku byly děti, s podáváním Colinfantem, anamnesticky a laboratorně vyšetřeny. Překvapením hned na počátku byly údaje rodičů o velmi minimální nemocnosti jejich dětí v předchozích obdobích. Zajímavé byly také údaje o nápadně lehkém průběhu nemocnosti umíněných dětí v době virových epidemií. Tyto děti byly porovnány se sourozenci. Rozdíly v obou

náhodně vybraných léčených skupinách se skupinou kontrolní jsou velmi významné a uvedené v kruhových grafech (Příloha 2 a 3)

## 5.5 Imunoglobulin IgE

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

## 5.6 Imunoglobulin IgE

Je typ protilátek, který se vyskytuje jenom u savců. Je produkován plazmatickými buňkami a následně se váže na povrch basofilů, mastocytů a eosinofilů. Hraje hlavní úlohu při vzniku alergií. Má relativní molekulovou hmotnost 197000 s poločasem katabolismu v séru 2-3 dny. IgE vázané na receptorech žírných buněk ale přetrvává i několik měsíců (Lochman 2002). Syntéza je ovlivňována T lymfocyty, interleukinem 4 a genetickým vybavením jedince. Tvoří asi 0.004 % celkových imunoglobulinů. Hraje roli v patogenezi přecitlivělosti 1. typu.<sup>51</sup>

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

---

<sup>51</sup> 1. Lochman, I., et al: Úskalí v laboratorní diagnostice alergických onemocnění. Vox Paediatricae, 2002, 6, 28-29. Zavázal, V.: Hladiny imunoglobulinů G, A, M, D a E v běžné dětské populaci. Čs. Pediat., 29, 1974, 5, 249-252

## 5.7 Imunoglobulin G

Postupně byla sledována nápadná normalizace hodnot Imunoglobulinu G v jednotlivých letech studie, konkrétně v letech 2005–2008, vždy v 1. roce věku. Je zde také prezentována i poslední třetí skupina, vyšetřenou na IgG v 1 roce i ve 3 letech věku, která spadá do roků 2010-2014 uvedené studie. Uvádím zde velmi dobré výsledky, které jsou stejně jako předcházející, vyšší než hodnoty kontrolní skupiny a zcela souhlasí se sdělovanými údaji rodičů o minimální nemocnosti těchto dětí.

## 5.8 Imunoglobulin A

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

## 5.9 Imunoglobulin E

Imunoglobulin E byl objeven manžely Ishizakovými v roce 1966, kteří bezpečně prokázali, že je nositelem reaginové aktivity (23, Zavázal). Sérová koncentrace IgE tvoří jen 41 % celkového množství v organismu, zbytek je vázán na receptory žírných buněk a basofilních granulocytů. Poločas vázaného IgE je 2 týdny. Syntéza IgE je ovlivňována T lymfocyty, speciálně IL 4 a genetickým vybavením jedince. IgE se zúčastní imunopatologické reakce 1. typu, která vede ke klinickým projevům atopie. K této reakci dochází u jedinců, kteří mají geneticky podmíněnou tendenci reagovat na přítomnost některých antigenů (alergenů) nadměrnou tvorbou protilátek izotypu IgE. Syntéza IgE v embryonálním stádiu byla prokázána od 11. týdne, takže jeho koncentrace v pupečnickové krvi je odrazem této tvorby. Hladiny IgE v séru matky nekorelují s hladinou u novorozence. V pupečnickové krvi byla také prokázána přítomnost lymfocytů nesoucích molekuly IgE.

V minulosti byla také sledována imunitní odpověď atopických žen a jejich plodů s vlivem potravinových alergenů v pozdním těhotenství (8 Lilja). Úpravy mateřské stravy v posledním trimestru gravidity mají v předcházení atopické senzibilizace menší vliv na plod, než se předpokládalo (4 Jones). Stanovení IgE v pupečnickové krvi má nepříznivý význam pro ohrožení alergií v dalším období (7 Kjellman, 9 Liška) jestliže obsah IgE přesahuje o dvě směrodatné odchylky nad stanovený normální průměr. Některé práce poukazují na určitou kontroverznost tohoto parametru (15 Shah).

Riziko senzibilizace je v prvních 6 měsících značné. Je dáno nízkou hladinou trávicích enzymů v zažívacím traktu, nezralým slizničním imunitním systémem, nedostatečně vyvinutou schopností orální tolerance a relativně neomezenou absorpcí makromolekul ze střevního lumina. Orální tolerance je aktivní proces probíhající v oblasti slizničního imunitního systému. Jde o specifickou inhibici imunitní

odpovědi po jejím předchozím navození kontaktem určitého antigenu s regulačními T buňkami usídlenými v oblasti sliznice střeva. Tolerance je vlastně jedna z aktivních funkcí imunitního systému zprostředkovaná supresorovým mechanismem a realizovaná prostřednictvím inhibičně působících lymfokinů produkovaných regulačními lymfocyty.

Pozitivní ovlivnění abnormální imunologické aktivity u dětí, se zvýšeným rizikem rozvoje alergie zprostředkované IgE protilátkami, může preventivně působit proti vzniku atopie. Kmeny bifidobakterií alergických jedinců (atopiků) se podobají spíše složení bifidobakterií dospělých jedinců než zdravých dětí. Tyto nálezy dovolují předpokládat, že odchylky ve složení střevní mikroflóry předcházejí vzniku atopie (6 Kaliomaki, 10 Ouwehand). Právě zde je místo předpokládaného efektu probiotika. Navíc některá probiotika redukuje riziko akutních infekcí (13Rautava).

Za rizikové faktory jsou pokládány:

- rodinná dispozice
- polygenní základ
- zvýšené pupečnickové IgE
- vysoká koncentrace IgE v prvních týdnech života
- zvýšená dispozice k tvorbě specifických protilátek
- pozitivní kožní testy
- pozitivita specifických IgE protilátek
- eozinofilie v krvi
- snížení hladiny CD8 lymfocytů

K vlastní zvýšené tvorbě IgE se uvádí (11 Petru), že sliznicí proniklý antigen je vyváznán ve tkáních a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. Na tom se údajně podílí i deficit T-supresorových lymfocytů.

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

## 5.10 Připomínky k hladinám imunoglobulinů v dětské populaci

Podle prací Zavázala ze šedesátých let 20. stol. se hodnoty IgG pohybovaly v hodnotách dospělých, IgM až kolem 6. měsíce dosahoval hodnot dospělých, IGA neměl detekovatelné hladiny. IgE po narození v dané skupině měl těžko detekovatelné hodnoty. Obsah IgE v novorozenecko kojeneckém období mnohdy stoupal a znamenalo to, že tvorba tohoto imunoglobulinu mohla začít již v době před porodem. Dosahovala vrcholu v časně dospělosti a poté opět mnohdy klesla. Obsah tohoto imunoglobulinu jde paralelně s vývojem dispozice k atopickým onemocněním. Ve studii byly patrné velké směrodatné odchylky při malém počtu vyšetřených. Hladina IgA byla nulová a začala se objevovat až kolem 14. dne života. Hodnoty dospělých byly dosaženy nejdříve u IgM a to do konce prvního roku života. Hladiny IgG u dětí ve věku 3 let dosáhly 94% hodnot dospělých a v témže období hodnoty IgA dosáhly 67 % hodnot zdravé dospělé populace.

## 5.11 Kyslíkové radikály v pupečnickovém séru z hlediska rodinné historie alergie - první informace

Při kontrolách dětí v roce, ve 3 a 4 letech byla zjištěna v 90 % normalizace IgE, úpravy hodnot IgA i IgG ve srovnání s rokem věku a u IgE i ve srovnání s pupečnickovými hodnotami. V této době bylo zcela zřejmé, že pro včasnou diagnózu jsou zapotřebí mimo rodinné anamnézy a pupečnickové IgE ještě další ukazatele. Využil jsem údajů o vztahu alergické reakce k volným radikálům a pokusil se objasnit, zda mimo uvedená zjištění existuje ještě další prediktor pro alergický vývoj zdravotního stavu dítěte k posouzení diagnózy, prognózy a případně také k možnosti ovlivnění terapie. Proto jsem se zaměřil na oxidační stres, o kterém je známo, že zvyšuje zánětlivou odpověď na alergii a asthma. Dále jsem chtěl potvrdit odpověď, že náchylnost k alergii vzniká již během intrauterinního života. Alergie a její formy jsou provázeny zvýšením volných radikálů. Je otázka, zda u malých dětí je zvýšení volných radikálů již prokazatelné. Účelem je také mimo jiné zjistit, zda i eventuelní terapií antioxidanty lze pozitivně ovlivnit budoucnost dětí z hlediska alergie. Vztah alergické reakce k volným radikálům se zdá být důležitým faktorem, který může vysvětlit některé reakce dětí, případně i posoudit diagnózu, prognózu a ovlivnit terapii. Glykované bílkoviny, AGE (advanced glycation end-products) aktivují receptory (RAGE) a působí dlouhotrvající záněť, provázený tvorbou volných radikálů.

Oxidační stres zvyšuje zánětlivou odpověď na asthma a alergii, asthma snižuje suplementace antioxidanty, ale nebrání vzniku astmatu či alergie (4). Volné kyslíkové radikály podávané těhotným

ženám nesnížily signifikantně výskyt astmatu, rhinitidy či ekzému jejich dětí v 5 letech věku. Proto byly vybrány dvě skupiny novorozenců, jedna bez alergie rodičů, druhá s alergickou anamnézou jednoho nebo obou rodičů a proběhlo vyšetření na hladinu IgE, IgA a AGE z pupečnickové krve.

Novorozenci, jejichž rodiče jsou alergici, mají signifikantně zvýšenou hladinu AGE látek už v pupečnickové krvi. Ty působí zvýšení oxidačního stresu a zvyšují pravděpodobnost budoucího vzniku alergií a astmatu. Proto je třeba tyto děti dispenzarizovat a uvedené biochemické parametry sledovat a pokud možno držet na nízkých hladinách.

Odkazují na přílohu této práce.



## ZÁVĚR

Studie, která probíhala v letech 1998–2010 byla zaměřena na diagnostiku. Tato klinická studie byla provedena u velkého souboru 3169 novorozenců trvala 12 let. Došel jsem k závěrům, jak velká je důležitost podrobné alergologické anamnézy rodiček před porodem, která je prováděna v porodnici a je zaměřena na celou rodinu s připravenými cílenými otázkami. Velmi důležitý je také kvalitní odběr a zpracování pupečnickové krve u pozitivních anamnéz vyšetřených je rozděleno do dvou skupin dětí a je vyšetřováno metodikami v různých časových intervalech. Základním rizikovým faktorem rozvoje alergie je zřejmě rodinná zátěž a lze vyzdvihnout dominující roli obou rodičů při vzniku alergie, kdy tyto jsou statisticky významné na hladině 1 promile. U nejvýznamnější alergie obou rodičů nebo jen u matky je významnost na hladině 1 promile. První příznaky alergických projevů se v posledních desetiletích posunují do prvních let života dětí a sezónnost hodnot pupečnickového IgE v závislosti na jednotlivých ročních obdobích je velmi nápadná. Tento závěr by mohl sloužit i pro plánování termínu konce těhotenství a doby plánovaného porodu.

Druhá část studie, která probíhala v letech 2005–2015 byla převážně terapeutická a byla rozdělena na 2 skupiny, a to druhou skupinu v letech 2005–2010 a třetí skupinu v letech 2010-2015.

Souhrnně v celé dlouhodobé studii, která probíhala v letech 1998–2015 jsem stanovil v úvodu této práce hypotézu, zda hladiny IgE v pupečnickové krvi jsou predikací pro alergická onemocnění do 3-4 let věku dítěte a zda se združuje alergie s rodinnou anamnézou a jestli jsou důvodem k preventivní intervenci ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu vysoké hodnoty pupečnickového IgE. Hodnocení této studie přineslo zjištění, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu, nejlépe použitím uvedeného preparátu Colinfant Newborn. Z výsledků v letech 2005-2008 vyplývá, že u léčených pacientů s primárně zvýšenými hodnotami IgE z pupečnickové krve se tyto hodnoty v roce věku normalizovaly v 90 %. Byl také zjištěn vliv léčby na hodnoty ostatních imunoglobulinů IgG a IgA vzhledem k nápadně snížené nemocnosti léčených pacientů. Byl popsán vliv léčby Colinfantem na hodnoty imunoglobulinů G a A v 1. a ve 3. roce věku, a celý soubor byl statisticky zpracován (hodnoty korelují na hladině významnosti 1 promile). Z výsledků je patrné, že léčba Colinfantem měla pozitivní účinek v tom smyslu, že výsledné IgE se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí. Hodnoty se v čase změnily u léčených mezi 1.-3. rokem na hladině významnosti 1 promile. IgG a IgA byly v mediánu zcela v hodnotách normality. Tomu odpovídá zanedbatelná následná nemocnost novorozenců, kteří byli léčeni uvedeným probiotikem a na druhé straně u léčených se IgE mezi 1.-3. rokem zvýšilo v mediánu jen na zcela normální hodnoty, a to v rámci předpokládaného protialergického efektu léčby. Velmi příznivý efekt

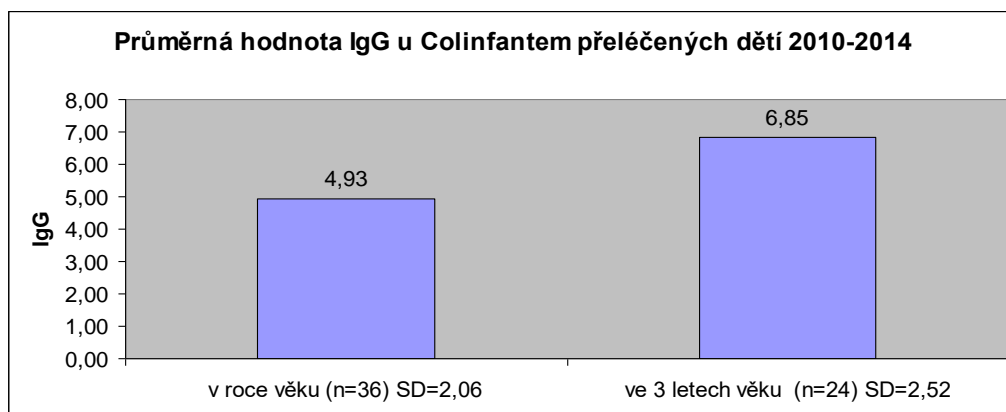
terapie na nemocnost dětí, který byl srovnán oproti kontrolní skupině v předem definovaném souboru stejného věkového období, je graficky znázorněn v příloze. Ve třetí skupině, naposledy zpracovávané v letech 2010-2014, bylo dosaženo ještě lepších výsledků v hodnotách sledovaných imunoglobulinů souběžně s velmi nízkou nemocností (viz. příloha). Velkým kladem je prakticky výborná tolerance preparátu.

Lze také konstatovat, že novorozenci, jejichž rodiče jsou alergici, mají signifikantně zvýšenou hladinu AGE látek už v pupečnickové krvi. Ty působí zvýšení oxidačního stresu a zvyšují pravděpodobnost budoucího vzniku alergií a astmatu. Proto je třeba tyto děti dispenzarizovat a uvedené biochemické parametry sledovat a pokud možno držet na nízkých hladinách.

## Přílohy

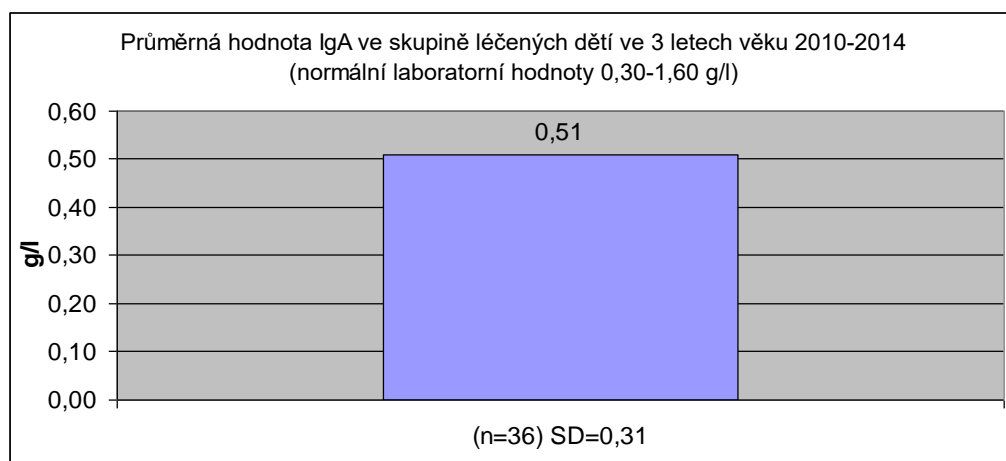
### Grafická část

Graf č. 1 – Průměrná hodnota IgG



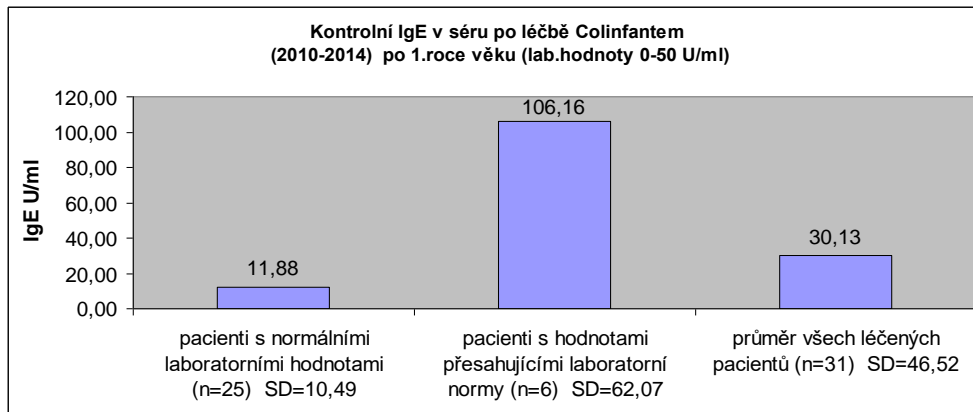
Zdroj: vlastní

Graf č. 2 – Průměrná hodnota IgA



Zdroj: vlastní

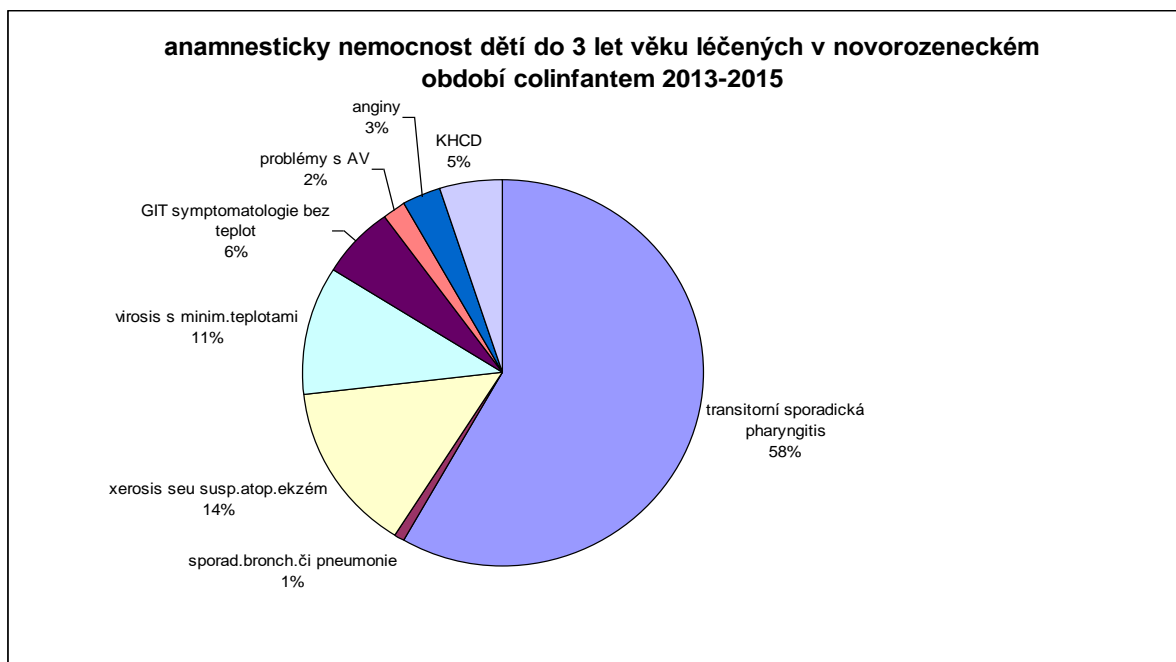
Graf č. 3 – Kontrolní IgE



Zdroj: vlastní

Graf č. 4 – Nemocnost dětí

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



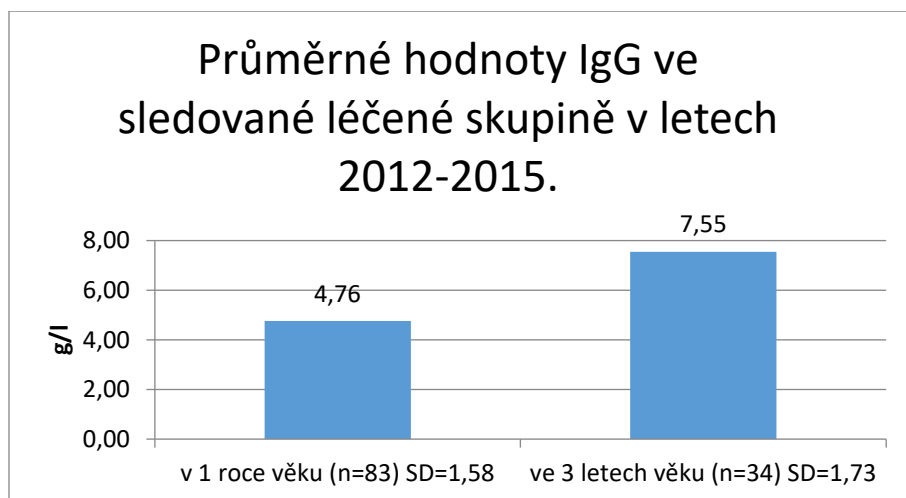
Zdroj: vlastní

Z uvedeného grafu vyplývá, že do tří let věku je 58 % dětí prakticky zdravých, výjimečně jen s transitorní zanedbatelnou nemocností a s velmi lehkými průběhy. I v ostatních klinických obrazech jsou popisována redukovaná onemocnění bez závažnější etiologie. Z hlediska kožní nebo respirační složky alergie se jedná většinou jen o redukované, velmi lehké průběhy alergie, z kožního hlediska správně popisované s diagnózou xerosis. Nebyla zaznamenána jediná diagnóza astmatu, recidivujících

asthmoidních bronchitid nebo klasického atopického ekzému. Pro zajímavost uvádím, že z posledního 36členného souboru dětí, bylo po domluvě alergologa a pediatra, vzhledem k rodinné anamnéze, preventivně testováno celkem 11 dětí, a to vždy s negativními nálezy.

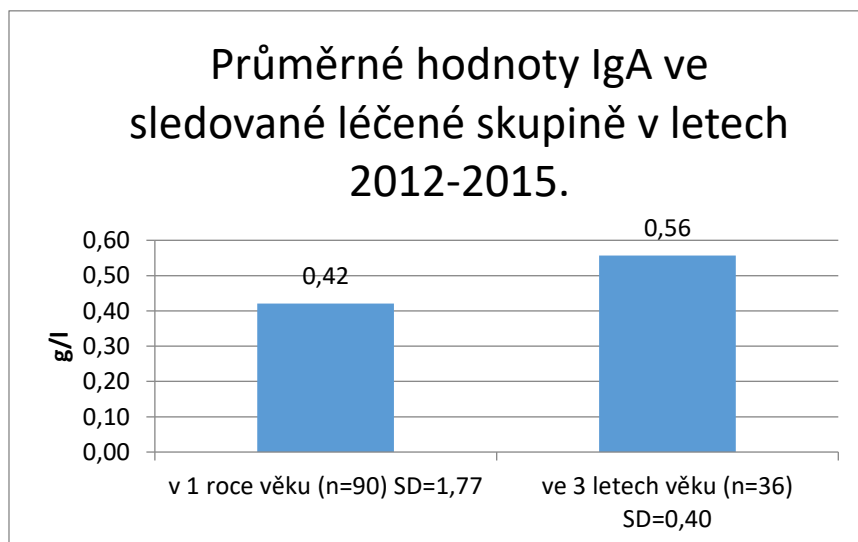
Závěrem můžeme shrnout výborný efekt uvedeného preparátu na výrazné snížení nemocnosti dětí raného věku založené na cílených anamnestických i laboratorních důkazech. Pravděpodobně z toho vycházel zájem prezentace dané práce na 7 th International Conference on Drug Discovery & Therapy a 4 th Biotechnology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

Graf č. 5 – Hodnoty IgG 2012 - 2015



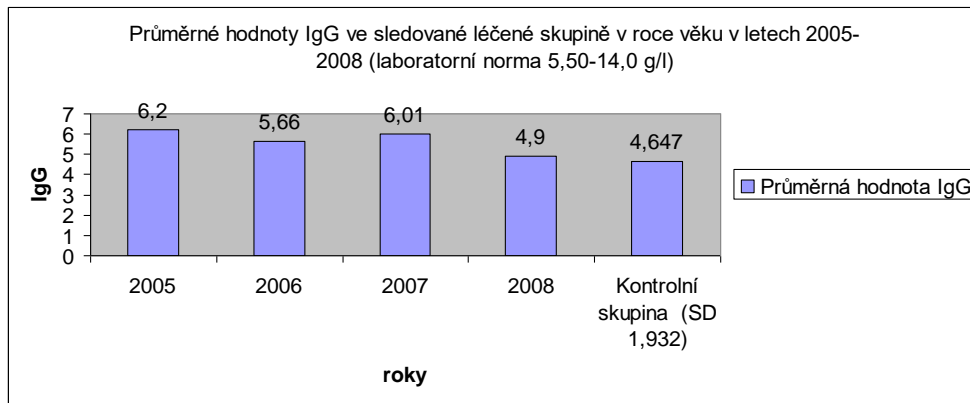
Zdroj: vlastní

Graf č. 6 – Hodnoty IgA 2012 - 2015



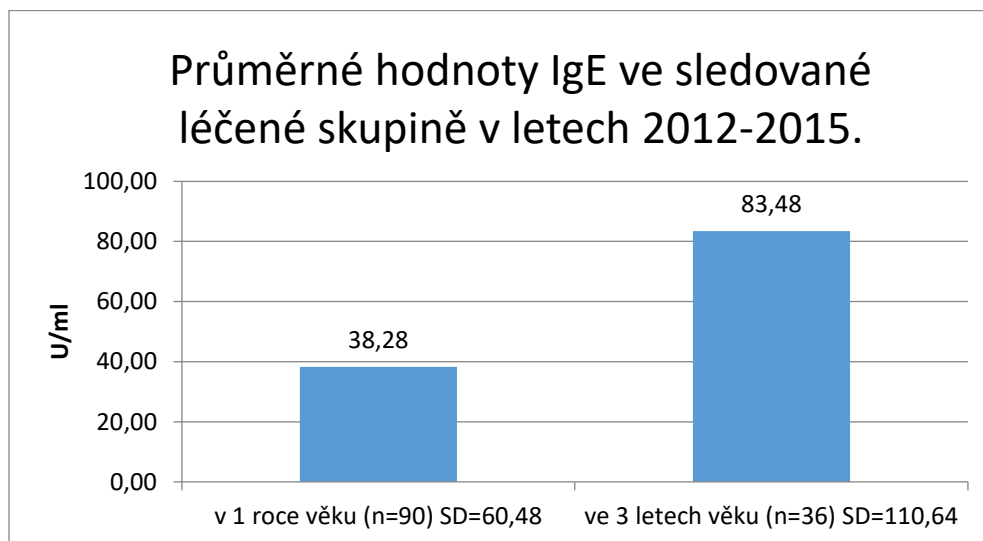
Zdroj: vlastní

Graf č. 7 – Hodnoty IgG 2005 - 2008



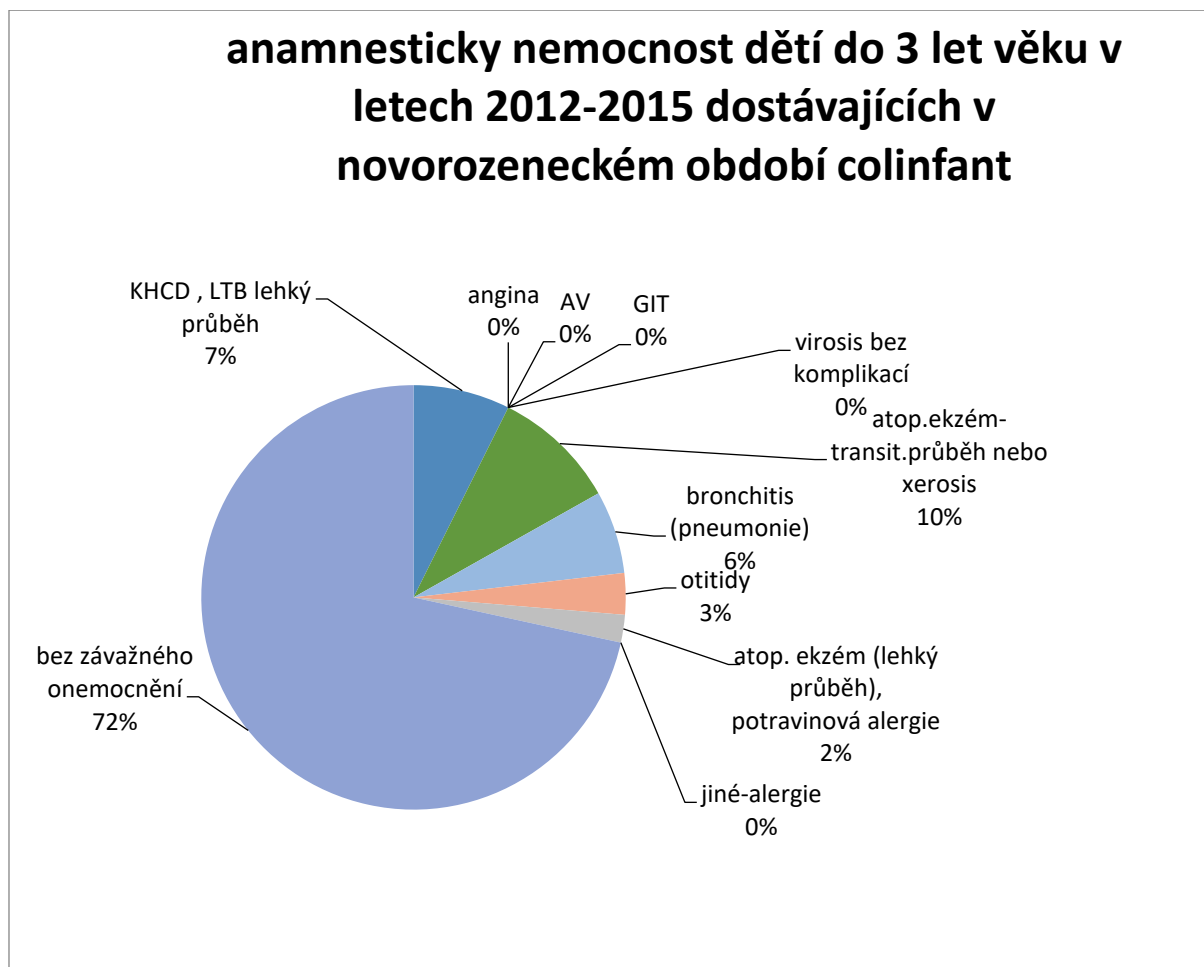
Zdroj: vlastní

Graf č. 8 – Hodnoty IgE 2012 - 2015



Zdroj: vlastní

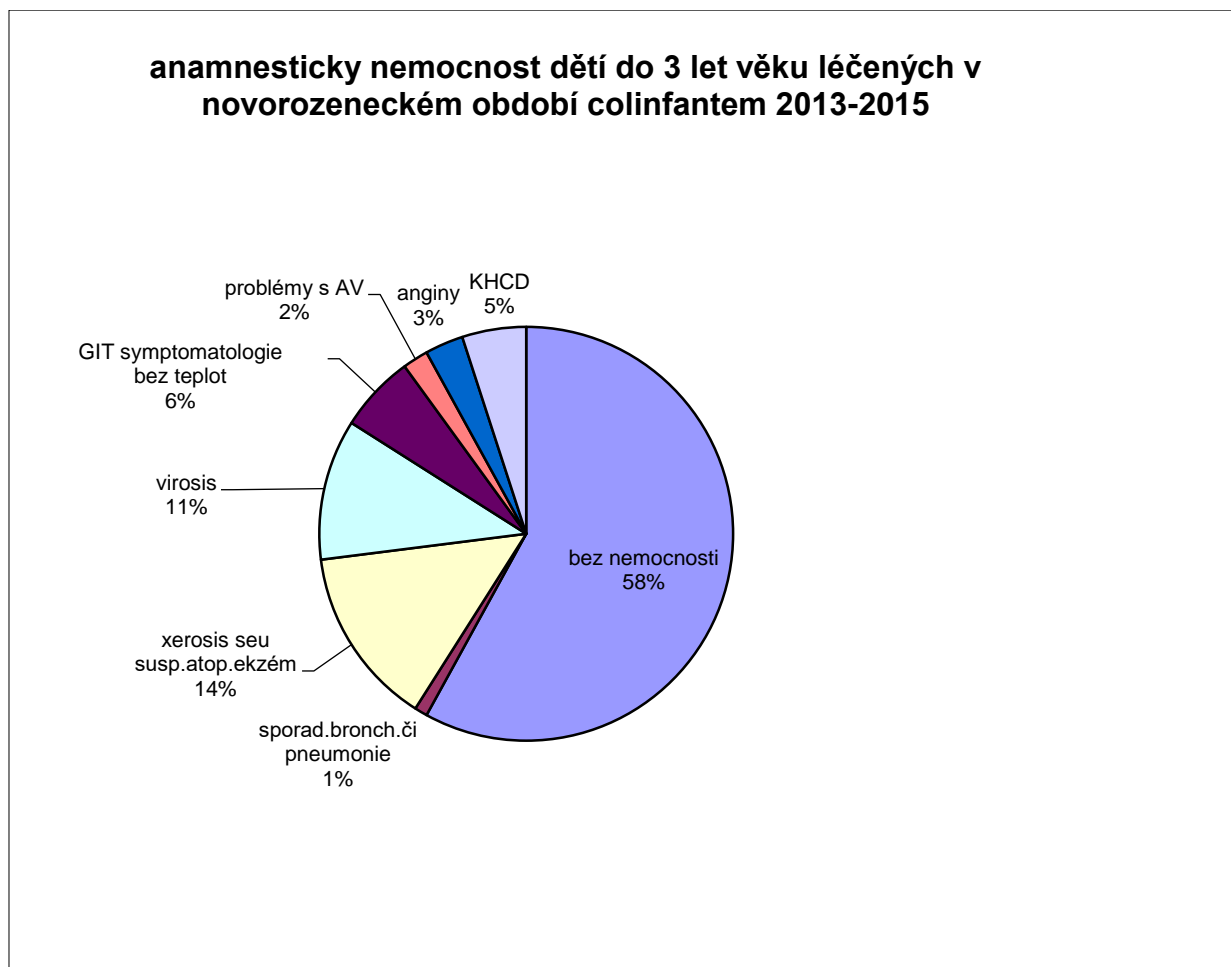
Graf č. 9 – Nemocnost dětí 2012 - 2015



Zdroj: vlastní

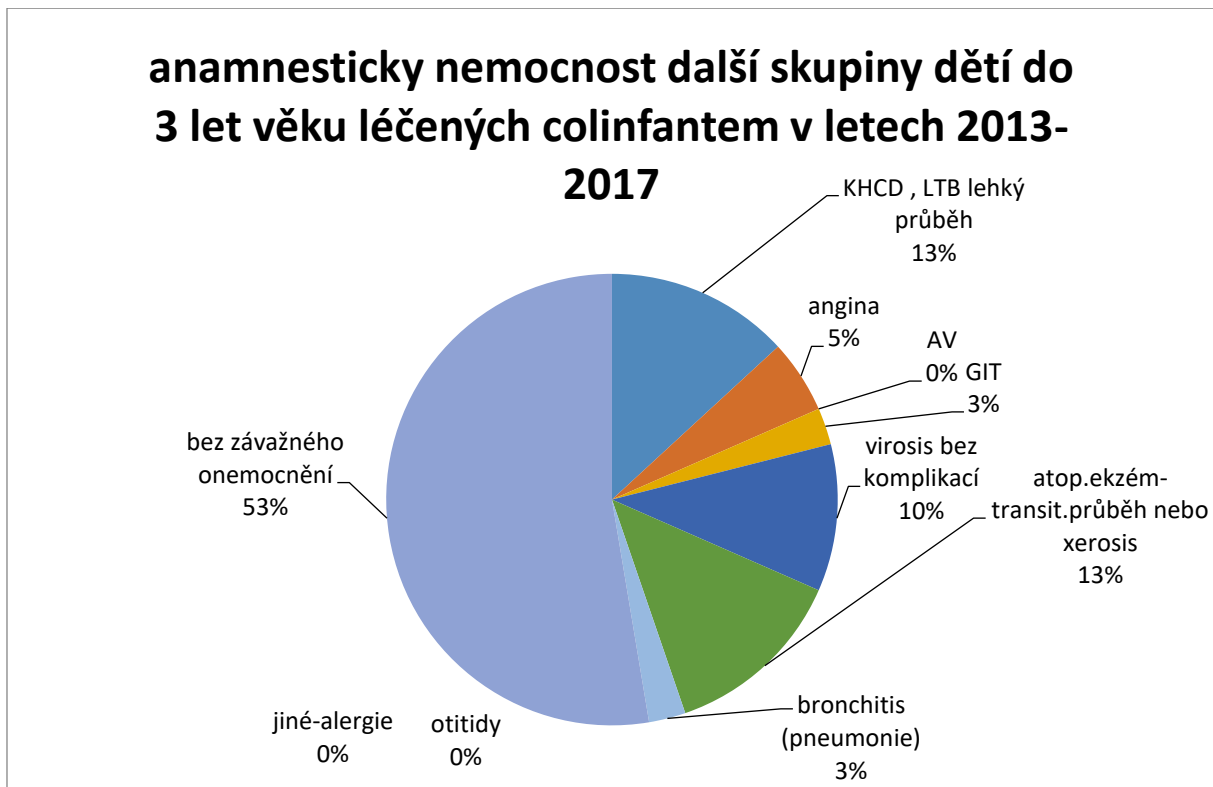


Graf č. 10 – Nemocnost dětí 2013 - 2015



Zdroj: vlastní

Graf č. 11 – Nemocnost dětí 2013 – 2017



Zdroj: vlastní

## Mezinárodní publikace věnované problematice pupečnickového IgE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Významné publikace o IgE a o probiotikách

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

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

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

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

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

Polovina testovaných dětí podle autorů měla zvýšené IgE v krvi od matek. Domnívají se, že je to možné na základě jiných vyšetřovacích metod.

K odlišení vždy používáme současně vyšetřované IgA v pupečnickové krvi, které musí být jen v nedetekovatelných hodnotách, abychom vyloučili příměs krve od matky.

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

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

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

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

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

Bylo vyšetřeno 1314 novorozenců od roku 1990 po dobu 2 let. 499 mělo anamnesticky vysoké riziko atopie i s hodnotami IgE v pupečnickové krvi. Zjistilo se, že 31 % kojenců bylo sensibilisováno proti jednomu z potravinových nebo inhalačních alergenů, a to bylo v signifikantní asociaci k hodnotám IgE z pupečnickové krve. Nelze zatím nalézat spojitosti pro primární prevenci.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

Dermatitis posuzována podle SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis).

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

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

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

## Publikované práce k habilitačnímu tématu

Habilitační téma:

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

1. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie. IV. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie. Hradec Králové, 1999.
2. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie, Čs. Pediatrie. 2000, suppl. 1, p.S 41, ISSN 0069-2328, Indexed in embase (Excerpta Medica).
3. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. Vztah jednotlivých ročních období k nalezeným hodnotám. Neonatologické listy. 7(3), 2001, 1.
4. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie Postgraduální lékařské dny Plzeň, vědecká konference, 15.-16. 2. 2001, Plzeň.
5. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi ve vztahu k ročním obdobím, XIX. Neonatologické dny, Srní na Šumavě 31. 10. 2001.
6. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie Čs.Pediat., III. Slovenský pediatrický kongres s mezinárodní účastí Martin, Suppl. 1/2001 s 56/p 22, ISSN 0069-2328 Indexed in embase (Excerpta Medica).
7. Liška, J., et al.: Estimation of immunoglobulin E of the cord blood from the view of the possibility to prerecognize the development of allergy. Abstracts of Program P95/1. 5th. Czech Pediatric Congress with international participation. ISBN: 80-238-9194-4 Teplice, September 5-7.2002.
8. Liška, J. a spol.: Význam vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie. Postgraduální lékařské dny. Plzeň, 2004.
9. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie, ČS. Pediatrie. 2006, č. 5, r. 61, 293-294, ISSN 0069-2328, Indexed in embase, Excerpta Medica.
10. Liška, J., Kepková, M., a spol.: Stanovení imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. ČS. Pediatrie. 2008, r. 63, č. 7-8, str. 388, ISSN 0069-2328.

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

## Původní práce v recenzovaných časopisech

### Původní práce v recenzovaných časopisech

1. Suchý, M., Fikrle, T., Macharáček, V., Liška, J., Slováček, R., Slípková, D.: Fázová scintigrafie ledvin u nemocných s akutní a chronickou glomerulonefritidou pomocí Tc DTPA. *Časopis lékařů českých*. 1983, 122, 29, 901-905.
2. Liška, J., Slováček, R.: Terapie renální hypertenze u dětí. *Čs. Pediatrie*. 1984, 39, č. 8, 475-478.
3. Grym, V., Liška, J.: Některé poznatky z přímořského klimatického léčení dětí v Jugoslávii. *Čs. Pediatrie*. 1984, 39, č. 6, 346-350.
4. Liška, J., Varvařovská, J., Lošan, F., Hlad, J.: Metabolické defekty u dětí s fetálním hydantoinovým syndromem. *Čs. Pediatrie*. 1985, 40, č.5, 280-283.
5. Liška, J., Slováček, R., Varvařovská, J., Topolčan, O., Karlíček, V., Dvorák, I.: Možnosti nových terapeutických postupů u renálního diabetes insipidus. *Čs. Pediatrie*. 1985, 40, č. 7, 403-406.
6. Suchý, M., Liška, J., Fikrle, T., Slípková, D., Hlad, J., Slováček, R., Popule, P.: Inhalační aerosolová scintigrafie plic u dětí. *Čs. Pediatrie*. 1985, 40, č. 8, 440-446.
7. Liška, J., Varvařovská, J., Černý, V., Slováček, R., Fabiánová, J., Holub, V.: Renální komplikace provázející periapendikální absces u dětí. *Praktický lékař*. 1985, 65, č. 12, 450-452.
8. Liška, J., Slováček, R., Varvařovská, J., Zavázal, V., Mračková, E.: Imunologická reaktivita u dětí s idiopatickým nefrotickým syndromem. *Čs. Pediatrie*. 1985, 40, č. 8, 453-457.
9. Stožický, F., Liška, J., Varvařovská, J., Dobiášová, M., Elleder: Odchytky v transportu a metabolismu lipoproteinů u nemocí ze střádání cholesterolu. *Čs. Pediatrie*. 1985, 40, 515-518.
10. Stožický, F., Liška, J., Dobiášová, M., Slováček, R.: Metabolismus cholesterolu u dětí s idiopatickým nefrotickým syndromem, *Čs. Pediatrie*. 1988, 43, č. 6, 323-326.
11. Lišk, J., Burdová, V., Lehmanová, A., Holub, V., Stočková, M., Holeček, V.: Zkušenosti s použitím počítače pro výpočty a hodnocení výsledků při vyšetřování clearance endogenního kreatininu v dětském věku. *Biochem Clin Bohemoslov*. 1990, 19, 2, 137-147.

12. Varvařovská, J., Liška, J., a spol.: Hyperimmunoglobulinemie u dětí s chronickou infekcí virem Epstein Barrové. *Čs. Pediatrie*. 1990, 45, 12, 711-714.
13. Liška, J., Slováček, R., Dvořáková, J., Valentová, E.: Pokroky v léčbě renální hypertenze v dětském věku. *Čs. Pediatrie*. 46, 1991, č. 1, 26-27.
14. Liška, J., Zavázal, V., Sochor, M. a spol.: Vliv letních klimatických pobytů v Nízkých Tatrách pořádaných Dětskou nadací na hodnoty IgE a funkci respiračního systému. *Čs. Pediatrie*. 1997, č. 10, ročník 52, 749-753.
15. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečníkové krvi z hlediska predikce alergie. *Čs. Pediatrie*. 2000, suppl. 1, p.S 41 ISSN 0069-2328, Indexed in embase (Excepta Medica).
16. Stožický, F., Liška, J.: Metodické doporučení pro selektivní screening a léčení dětí s dyslipoproteinemií se zaměřením na prevenci aterosklerózy. *Čs. Pediatrie*. 2000, 55, No. 10, 655-659.
17. Stožický, F., Liška, J.: Prevence vzniku a rozvoje aterosklerózy u dětí (Prevence ischemické choroby srdeční v průběhu dětství). *Čs. Pediat*. 2000, 55, No. 10, 655-659.
18. Stožický, F., Liška, J. a spol.: Selektivní screening dětí rizikových pro časnou aterosklerózu v České republice. *Čs. Pediatrie*. 2003, 58, 7, 433-435.
19. Holeček, V., Liška, J., Racek, J., Rokyta, R.: Význam volných radikálů a antioxidantů u sportovní zátěže. *Československá fyziologie*. 53, 2004, č. 2, 76-79.
20. Liška, J., Kepková, M., Holeček, V., Kuthanová, Š.: Pětileté zkušenosti s využitím nootropních preparátů při kombinované léčbě dětských enuréz. *Čs. Pediatrie*. 2005, roč. 60, č. 2, str. 109, ISSN 0069-2328, Indexed in embase / Excepta Medica.
21. Liška, J., Kepková, M., Holeček, V.: Roční zkušenosti s léčbou Minirinem tbl u dětských enuréz. *Čs. Pediatrie*. 2005, roč. 60, č. 2, str. 109, ISSN 0069-2328, Indexed in embase / Excepta Medica.
22. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečníkové krvi z hlediska predikce alergie. *Čs. Pediatrie*. 2006, č. 5, r. 61, 293-294, ISSN 0069-2328, Indexed in embase, Excepta Medica.

23. Liška, J., Kepková, M., a spol.: Stanovení imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. *Čs. Pediatrie*. 2008, r. 63, č. 7-8, str. 388, ISSN 0069-2328.
24. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M.: Překvapující pozitivní účinek desmopresinu s nootropikem u dětí s rezistentní enuresis nocturna. *Čs. Pediatrie*. 2010, č. 5, r. 65, str. 321, ISSN 0069-2328.
25. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M., Sobotová, Š.: Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie. *ALERGIE*. 2012, 14, č. 1, 25-32.
26. Liška, J., Holeček V., Sobotová, Š., Kepková, M., Šefrna, F.: Léčba novorozenců s vysokými hodnotami IgE v pupečnickové krvi perorálním osídlením nepatogenním *E.coli* a jeho vliv na imunitní systém a zabránění rozvoje alergické reakce. *ALERGIE* (v tisku).

#### **Článek v odborném časopise**

1. Liška, J., Burdová, V., Slováček, R., Petříková, V.: Význam stanovení LDH isoenzymů v diagnostice onemocnění močového ústrojí. *Plzeňský lékařský sborník*. 1985, 53, 55-59.
2. Hlad, J., Liška, J.: Nerozpustný glykoprotein v dětském věku. *Plzeňský lékařský sborník*. 1985, 53.
3. Liška, J.: Zpráva o XXIII. kongresu EDTA - Evropská renální asociace, Budapešť, 1986. *Čs. Pediatrie*. 42, 1987, č. 9, 571-572.
4. Liška, J., Stožický, F., Varvařovská, J.: Lysenyl - použití v terapii Raynaudova fenomenu. *Farmakoterapeutické zprávy*. 1987, 33, č. 3, 257-258.
5. Liška, J., Varvařovská, J., Slováček, R., Zavázal, V., Mračková, E.: Účast imunologických mechanismů v patogenezi idiopatického nefrotického syndromu a možnosti jejich terapeutického ovlivnění. *Imunologický zpravodaj III*. 1988, č. 1, 149.
6. Liška, J.: Juvenilní (primární) - esenciální hypertenze. *Vox Paediatricae*. 1999, č. 1, 3-7.
7. Liška, J. a spol.: Desatero léčby horečky v dětském věku. *Vox Paediatricae*. 1999, č. 1, 7.

8. Holeček, V., Liška, J., Racek, J.: Výživa u vegetariánů s ohledem na matku a dítě. *Vox Paediatricae*. 2001, 1, 10, 27-28.
9. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. Vztah jednotlivých ročních období k nalezeným hodnotám. *Neonatologické listy*. 2001, 7(3), 121.
10. Liška, J., Kasal, E.: Uštknutí zmijí obecnou. *Vox Paediatricae*. 2002, ročník 2, č.5,28-29.
11. Holeček, V., Liška, J.: Volné radikály a antioxidanty v imunologii. *Vox Paediatricae*. 2002, č. 6, ročník 2, 30.
12. Liška, J. a kol.: Třileté zkušenosti s využitím piracetamu při kombinované léčbě dětských enuréz. *Vox Paediatricae*. 2002, ročník 2, číslo 1, 13.
13. Liška, J., Holeček, V. a spol.: Hypertenze u dospívajících. *Vox Paediatricae*. č. 2, ročník 2002, 26-28.
14. Holeček, V., Liška, J., Racek, J., Rokyta, R.: Význam volných radikálů a antioxidantů u sportovní zátěže. *Československá fyziologie*. 2004, 53, č. 2, 76-79.
15. Liška, J., Kepková, M., Holeček, V. a spol.: Význam a závěry serologického vyšetřování *Helicobacter pylori* u dětí s bolestmi břicha. *Vox Paediatricae*. 2005, ročník 5, č. 3, 21-23.
16. Liška, a spol.: Zkušenosti s acebutalolem v léčbě juvenilních hypertenzí. *Vox Paediatricae*. 2005, č. 1, r. 5, 28-29.
17. Liška, J.: Patogeneze a terapie hypertenze se zaměřením na terapii juvenilní hypertenze. *Vox Paediatricae*. 2008, roč. 8, č. 7, 20-21.
18. Liška, J.: Enuresis nocturna v praxi PLDD. *Vox Paediatricae*. 2011, č. 3, 11, 25-26.
19. Liška, J.: Ohlédnutí za zkušenostmi s přímošskými klimatickými pobyty a s pobyty na horách u dětí s alergiemi a astmatem. *Časopis Alergie, asthma, bronchitida - Česká iniciativa pro asthma*. Nakl. Tígis. 2013, 29-32.
20. Liška, J.: Novinky v léčbě teploty v dětském věku. *Vox Paediatricae*. 2014, 6, str.26.
21. Liška, J., Holeček, V., Sobotová, Š., Kepková, M., Šefrna, F.: Vliv včasné léčby novorozenců perorálním osídlením nepatogenním *E.coli* na vývoj jejich imunoalergického systému. *Vox Paediatricae*. č. 6, 14, 2014, 22-29.
22. Liška, J., Holeček, V.: Alergie a volné radikály. *Vox Paediatricae*. 2016, 16, 3, 16-17.

## Použitá literatura

- ABC symposium 1996 Solnohrad, *Allergy*. 54, suppl 49, 103, str. 199.
- Abrahamson, TR., et al.: Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allerg. Clin. Immunol.* 2007, 119, 5, 1174-1180.
- Baker, BS.: The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2006, 144, 1–9.
- Barnes, MJ., et al.: Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*. 2009, 31, 3, 401-411.
- 67
- Bartůňková, J.: Bakteriální imunomodulátory. *Causa subita*. 2003, 6, 384–386.
- Bednář, M., et al.: *Lékařská mikrobiologie*. eds.1996, Marvil Praha.
- Belkaid, Y., et al.: Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014, 157, 1, 121-141.
- Bennet, R., et al.: Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection*. 1987, 15, 5, 332-336.
- Benno, E., et al.: Development of intestinal microflora in humans et animals: Bifidobacteria and Microflora. 1986, 5, 13-25.
- Brouwer, ML., Wolt-Pomplen, SA., Dubois, AE., et al.: No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2006, 36, 899–906.
- Burrows, B.: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J med*. 1989, 2, 320(5), 271-277.
- Bronský, J.: Využití probiotik v pediatrii. *Lékařské listy*. 2008.
- Bystroň, J.: Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Pediatr. praxi*. 2011, 12(6), 398–404.
- Č.Pediat. 35,1980,8,416-418.
- Bystroň, J.: Imunomodulace u recidivujících infekcí dýchacích cest. *Klin Farmakol*. 2005, 19, 235–238.
- Calder, PC.: Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2008, 52, 885–897.
- Codex alimentarius comission. Joint FAO/ WHO Food standarts programme. Codex commitee for specially dietary uses. July 2002., CX/NFSDU02/2.
- Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Enders, C., et al.: Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. *Scand J Immunol*. 2002, 55, 204–209.
- Cunningham-Rundles, S., McNeeley, DF., Moon, A.: Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin Immunol*. 2005, 115, 1119–1128.
- Červenková, D., Kliment, M., Ketys, P.: Probiotiká a atopická dermatitída. V: Kuchta M, Pružinec P: Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. Bonus CCS. Bratislava, 2006, 98–106.
- Dai, D., Walker, WH.: Protective nutrients and bacterial colonization in the premature human gut. *Adv Pediatr*. 1999, 46, 353–382.
- Damsgaard, CT., Lauritzen, L., Kjaer TM, et al.: Fish oil supplementation modulates immune function in healthy infants. *J Nutr*. 2007, 137, 1031–1036.
- Dunstan, JA., Hale, J., Breckler, L., et al.: Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35, 1309–1317.
- Enck, P., et al.: The effects of maturation on the colonic microflora in infancy and childhood. *Gastroenterol Res Pract*. 2009, 1-7.
- Eyles, JE.: Therapeutic use of molecules that mimic pathogen danger signals. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2007, 7, 177–186.
- Ezendam, J.: Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews*. Jan 2006, 64, 1, 1-14.



- Favier, CF., et al.: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 219-226.
- Feleszko, W., et al.: Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp. Allergy.* 2007, 37, 4, 498-505. 68
- Frič, P.: Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatr. pro Praxi.* 2008, 9(1), 46–50.
- Frühauf, P.: Racionální užití probiotik v pediatrii. Zdroj [www.edukafarm.cz](http://www.edukafarm.cz).
- Fuchs, M.: Potravinové alergie. *Pediatric po promoci.* 2004, 1, 26-35.
- Fukushima, Y., et al: Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology.* 1998, 42, 39-44.
- Frič, P.: Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu. I. Teorie a experimentální doklady. *Postgrad medicina.* 2005, 7, 472–477.
- Frühauf, P., Fuchs, M., Polášková, S., Vernerová, E., Zlatohlávková, B.: Alergie kojeneckého věku, Nestlé Nutrition. Olomouc: Solen print. 2006, 3–59.
- Fuchs, M.: Potravinová alergie. *Postgraduální medicína.* 2004, 5, 546-549.
- Gibson, GR., et al.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, 1401-1412.
- Gotoff, SP.: Neonatal immunity. *J. Pediatr.* 1974, 85, 149.
- Grönlund, G., et al.: Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999, 28, 19-25.
- Grubb, R., et al.: Editors, Conway PL., *Lactobacilli: Fact and fiction, in the regulatory and protective role of the normal microflora.* Macmillen press. Hampshire, 1989, 263-281.
- He, F., Morita, H., Hashimoto, H., et al.: Intestinal Bifidobacterium species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2002, 109, 1035–1036.
- Hanauer, SB.: Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel, Dis.* 2006, 12, 3-9.
- Helgeland, L., et al.: Development and function of intestinal B and T cells. *Microb Ecol Health Dis.* 2000, 11, 110-127.
- Hlavatá, A., et al: Environmentalne rizikové faktory vývoja atopie u detí. *Čes slov. Pediat.* 2007, 62, č. 12, 674-683.
- Hrdý, J., et al: *Vox Ped.* 2007, říjen, 8, ročník 7, 32.
- Hoffjan, S., et al.: Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004, 113, 511-518.
- Holgate, ST.: The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2011, 242, 205-219.
- Holt, PG., Jones, CA.: The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000, 55(8), 688–697.
- Chen, K., Huang, J., Gong, W., et al.: Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007, 7, 1271–1285.
- Ismail, IH., et al.: Probiotic effects in allergic disease. *J.Paediatr Child health.* 2013, 49, 9, 709-715.
- Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., et al.: Lactobacillus casei strain LGG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology.* 1993, 105, 1643–1650.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., et al.: Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy.* 2000, 30, 1604–1610.
- Isolauri, E., et al.: Probiotics: effects of immunity. *Am J Clin Nutr.* 2001, 73, suppl.2, 444-450.
- Isolauri, E.: Dietary modification of atopic disease: use of probiotics in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004, 4, 270–275.

- Jeseňák, M., et al.: Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku. *Čs.Ped.* 2008, 5, 272-282.
- Jeřábková, M.: Střevní mikroflóra – součást slizničního imunitního systému. *TIGIS*, 2008, 12, 23–44.
- Jones, CA.: Does atopic disease start in foetal life? *Allergy*. 2000, 55, 2-10.
- Kalliomäki, M., et al.: Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J. Allergy Clin Immunol.* 1999, 104, 1251-1257. 69
- Kalliomäki, M., et al.: Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants whom atopy was and was not developing. *J.Allergy Clin Immunol.* 2001, 107, 129-134.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., et al.: Probiotics in primary prevention of atopic disease. *Lancet.* 2001, 357, 1076–1079.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., et al.: Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003, 361, 1869–1871.
- Kalliomäki, M., et al.: Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin.Nutr.* 2008, 87, 534-538.
- Kalliomäki, M., et al.: Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J. Nutr.* 2010, 140, 3, 713S-21S.
- Kalliomäki, M., et al.: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet.* Vol.357, April 7, 2001, 1076-1079.
- Kayserová, J.: autoreferát doktorské disertační práce 2013. Ústav imunologie 2.LFUK Praha.
- Kirjavainen, PV., Apostolou, E., Arvola, T., et al.: Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001, 32, 1–7.
- Kirjavainen, PV., Arvola, T., Salminen, SJ., et al.: Abberant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut.* 2002, 51, 51–55.
- Kniker, TW.: Delayed and non-IgE mediated reactions in: Frieri M, Kettelhut, B. Food hypersensitivity and adverse reactions. Marcel Dekker, Inc. 1999, 165-193.
- Krejsek, J.: Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatr. pro Praxi.* 2007, 3, 156–162.
- Kudsk, KA.: Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surgery.* 2002, 183, 390–398.
- Kukkonen, K., et al.: Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, 119, 1, 192-198.
- Laitinen, K., Kalliomäki, M., Poussa, T., et al.: Evaluation of diet and growth in children with and without atopic eczema: follow-up study from birth to 4 years. *Br J Nutr.* 2005, 94, 565–574.
- Lee, JAB., Seto, DBA., Bielary, L.: Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008, 121, 116–121.
- Levy, O.: Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(5), 379–390.
- Lodinova-Zadnikova, R., Slavikova, M., Tlaskalova-Hogenova, H., et al.: The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* O83. *Pediatr Res.* 1991, 29, 31–39.
- Lodinova-Zadnikova, R., Tlaskalova-Hogenova, H., Bartakova, Z.: The antibody response in infants after colonization of the intestine with *E. coli* O83. Artificial colonization used as prevention against nosocomial infections. *Adv Exp Med Biol.* 1991, 310, 329–333.
- Lodinova-Zadnikova, R., Cukrowska, B., Tlaskalova-Hogenova, H.: Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol.* 2003, 131, 209–211.

- Lodinová – Žádníková, R.: Probiotika v pediatrii: Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem E.coli po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie*. 2002, 4, 275-279.
- Lochman, I., et al.: Úskalí v laboratorní diagnostice alergických onemocnění. *Vox Paediatricae*. 2002, 6, 28-29.
- Lukáš, M.: Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní med*. 2015, 17, 1, 14-17
- Majamaa, H., Isolauri, E.: Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997, 99, 179–185.
- Malmgren, R., et al.: Lowered glutathione–peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance. *Allergy*. 1986, 41, 43-45. 70
- Marques, AH., et al.: The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci*. 2013, 7, 120.
- Martin, E., et al.: Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr*. 2003, 14, 754-758.
- Matsamura, T., et al.: Studies on congenital sensitization. 1. Detection of food antigens and antibodies in the maternal serum, umbilical cord serum, the serum and the 1st voided urine of newborn infants, amniotic fluid and meconium. *Arerugi*. 1967, 16, 12, 858-65.
- Mebius, RE.: Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. 2003, 3(4), 292–303.
- Miettinen, M., et al.: Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12, IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 1998, 66, 6058-62.
- Miler, I.: Ontogeneze imunity plodu u novorozence. *Čs.Pediatr*. 33, 1978, 5, 295-301.
- Mísařovičová, Z.: Některé faktory humorální a celulární imunity u novorozenců
- Mocková, A.: Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatr. praxi*. 2014, 15(4), 197–200.
- NASPGHAN Nutrition Report Committee et al: Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus of children. NASPGHAN Nutrition Report Committee. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006, 43, 550-557.
- Neaville, VA., et al.: Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunological expression of atopy during the first year of life. *J. Allergy Clin Immunol*. 2003, 112, 740-746.
- Nevoral, J.: Prebiotika a probiotika v pediatrii. *Pediatr. praxi* 2012, 13, 3, 167-173.
- Nevoral, J.: Probiotika a prebiotika. *Medical Tribune*. 13/2008.
- Nováková, D.: Riziko rozvoje alergických onemocnění v dětském věku – role časně výživy pro ustanovení vyvážené slizniční imunity zažívacího traktu. *Čs.Pediatr*. 2009, 7-8.
- Niers, LE., Timmerman, HM., Rijkers, GT., et al.: Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35, 1481–1489.
- Noverr, MC.: The microflora hypothesis of allergic diseases. *Clin Exp. Allergy* 2005, 35, 12, 1511-1520.
- Ogden, NS., Bielory, L.: Probiotics: a complementary approach in the treatment and prevention of pediatric atopic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005, 5, 179–184.
- Okada, H., et al.: The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2010, 160(1), 1–9.
- Olivares, M., et al.: Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J. Appl Microbiol*. 2006, 10, 72-79.
- Orrhage, K., et al.: Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr*. 1999, 88, 47-57.
- Ouwehand, AC., Isolauri, E., He, F., et al.: Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J. Allergy Clin Immunol*. 2001, 108, 144-145.

Ouwehand, AC., et al: Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J. Allergy Clin Immunol* 2001, 108, 144-145. Functional foods forum, Universiti, Turku, 2004.

Pařízková, E.: Imunologická nezralost novorozence a kojence. *Alergie, Supplementum*. 3/2002, str. 14.

Pozler, O.: Střevní mikroflora. *Symposium o morfologii střeva. Staré Splavy*, 2004, 4, 3-4 Abstr.

Parracho, H., et al: Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc Nutr. Soc.* 2007, 66, 3, 405-411.

Pelech, T., Frič, P., Fixa, B., et al.: Srovnání Mutafloru a mesalazinu v udržovací léčbě neaktivní idiopatické proktokolitidy. *Prakt Lékař*. 1998, 78.

Perdigon, G., et al.: Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 1986, 53, 404-410.

Perdigon, G., et al.: The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protection*. 1990, 53, 404-410.

Perdigon, G., et al.: Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 6, 1108-1114. 71

Perrier, C., et al.: Gut permeability and food allergies. *Clin Exp. Allergy*. 2010, 41, 20-28.

Pessi, T., Sutas, Y., Hurme, M.: Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus rhamnosus GG: *Clin Exp Allergy*. 2000, 30, 1804-1808.

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

Petrů, P., Špičák, V. a kol.: Vývoj alergie v průběhu života. *Alergologie. Galén*, 2004, 149-151.

Platts-Mills, TA.: The role of allergens in the induction of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002, 2, (2), 175-180.

Platts-Mills, TA., et al.: Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma? *Allergy*. 2005, 79, 60, 25-31.

Platts-Mills, TAE.: Indoor allergens. In: Adkinson NFJR, Yunginger JW, Busse WW., et al. *Middleton's Allergy Principles & Practice*. Philadelphia, Pennsylvania. Mosby. 2003, 568.

Prescott, SL., Dunstan, JA., Hale, J., et al.: Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma response in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35, 1557-1564.

Pruzzo, C.: Short chain fatty acids, menaquinones and ubiquinones and their effects on the host. *Microb Ecol in Health and disease*. 2009, 12, 209-215.

Rautava, S., Kalliomäki, M., Isolauri, E.: Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2002, 109, 119-121.

Rautava, S., Ruuskanen, O., Ouwehand, A., et al.: The hygiene hypothesis of atopic disease – an extended version. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004, 38, 378-388.

Rembacken, BJ., et al: Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999, 354, 635-639.

Romagnini, E., et al.: Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol*. 1991, 94 (1-4), 133-136.

Romangani, S.: The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1999, 105, 399-408.

Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, SD., et al.: Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003, 111, 389-395.

Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Valerius, NH., et al.: Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*. 2004, 145, 612-616.

Saavedra, JM., et al.: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanism of action and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*. 2007, 22, 351-365.

- Salvatore, S., Keymolen, K., Hauser, B., Vandenplas, Y.: Intervention during pregnancy and allergic disease in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005, 16, 558–566.
- Sartor, RB.: Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2008, 105, 43, 16413-16414.
- Schmidt-Weber, CB., Blaser, K.: New insights into the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005, 5, 525–530.
- Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., et al.: Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clin Exp Allergy.* 2006, 36, 629–633. 72
- Sjogren, YM., et al.: Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy.* 2009, 39(12), 1842–1851.
- Smetana, K., et al.: A further contribution to the demonstration of RNA and nucleoli of blood cells in smear preparations. *Folia haematologica.* 1969, 91(4), 381-394.
- Smits, HH., Engering, A., van der Kleij, et al.: Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T-cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115, 1260–1267.
- Sochorová, V.: Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí. *Vox.Ped.* 2003, 9, 7, 3, 26-27.
- Spilková, J.: Echinacea sp. – obsahové látky a léčebné využití. *Prakt. lékáren.* 2006, 2, 89–92.
- Strachan, DP.: Hay fever, hygiene and household size. *BMJ.* 1989, 299, 1259-1260.
- Strimas, JH., et al.: Significance of IgE level in amniotic fluid and cord blood for the prediction of allergy. *Ann Allergy.* 1988, 61, 133-136.
- Sudo, N., et al.: The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* 1997, 159, 1739-1745.
- Sýkora, J., et al.: Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J. Clin. Gastroenterology* 2005, 39(8), 692-698.
- Szajewska, H., et al.: Probiotics in gastrointestinal diseases in children. Hard and not-so hard evidence of efficacy. *J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2006, 42, 454-475.
- Šedivá, A.: Genetika alergie. *Alergie.* 2004/4.
- Šrůtková, D.: Charakterizace a využití složek střevní mikroflóry. Mikrobiologický ústav AV ČR, Dizertační práce 2015.
- Špičák, V.: Hygienická hypotéza-možnost nebo dogma. *Alergie.* 2005, 3, 180-183.
- Thon, V.: Imunologické principy bezpečného očkování dětí. *Pediatr. pro Praxi.* 2010, 11, 6, 354-357.
- Tlaskalová-Hogenová, H., et al.: Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2004, 93, 2-3, 97-108.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Zádníková, R., Štěpánková, R., Cukrowska, B., Funda, DP., et al.: Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002, 128, 77–89.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Tučková, L., Farre, MA., Funda, DP., Verdu, EF., et al.: Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora. *Folia Microbiol.* 1998, 43, 545–50.
- Thon, V.: Intestinální mikroflóra v raném dětství – úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatr. praxi.* 2011, 12, 4, 252–256.
- Tláškal, P.: Využití probiotik v pediatrii. *Pediatr. pro Praxi.* 2008, 9(5), 288–292.
- Tlaskalová, H., Městecký, J.: Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii. *Alergie.* 2/2012, 124-133.
- Tlaskalová-Hogenová, H.: Imunita na sliznicích. *Forum imunologie.* 1/94.

- Tláskalová-Hogenová, H.: Střevní imunitní systém a komensální bakterie. *Medical Tribune*. 11/2008.
- Tomášová, H. et al: Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců. *Neonatologické listy*. 2000, č. 4, ročník 6.
- Toh, ZQ., et al.: Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. *Front. Pharmacol*. 2012, 3, 171.
- Turnbaugh, P.: The human microbiome project. *Nature*. 2007, 449, 804-810.
- Uksila, J., et al.: Development of natural killer cell function in the human fetus. *J Immunol*. 1983, 130(1), 153–156.
- Vandenbulcke, L., et al.: The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005, 139, 159-165.
- Vandenplas, Y.: *Microorganism administered for the Benefit of the host. Facts and Myths. Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 2002.
- Végh, V., Végh, T.: Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii.: *Pediatr. pro praxi*. 2008, 9(6), 388–392.
- Vernerová, E.: Potravinová alergie v dětském věku. *Pediatr. pro Praxi*. 2007, 8, 5, 269-272.
- Vernerová, E.: Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. *Pediatr. pro Praxi*. 2008, 9(3), 164–168.
- Vernerová, E.: Výživa a alergie. *Pediatr. pro Praxi*. 2007, 3, 168–172.
- Viljanen, M., Kuitunen, M., Haahtela, T., et al.: Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005, 16, 65–71.
- Viljanen, M., et al.: Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*. 2005, 60, 4, 494-500. 73
- Walker, WA., et al.: Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *Eur. J. Nutr.* 2006, 45, Suppl 9, 1-18.
- Walker, WA.: Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the Development of Intestinal Host Defense. *J of Ped Gastroenterol and Nutr*. 2000, 30, S2-S7.
- Weston, S., Halbert, A., Richmond, P., et al.: Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child*. 2005, 90, 892–897.
- Wuthrich, B.: Food allergy, frequency of symptoms and of food allergens among 402 patients with food allergy. *Allergologie*. 1993, 16, 280-287.
- Yasui, H., et al.: Detection of bifidobacterium strains that induce large quantities of IgA. *Microb. Ecol. Health Dis*. 1992, 5, 155-162.
- Yazdanbakhsh, M., et al.: Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002, 296, 490-494.
- Zavázal, V.: Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku. *Forum imunologie*. 6/94, 223-226.
- Zavázal, V.: Hladiny imunoglobulinů G, A, M, D a E v běžné dětské populaci. *Čs.Pediatr*. 1974, 29, 5, 249-252.
- Zbořil, V.: Fyziologie mikroflory trávicího ústrojí jako základ probiotické terapie. *Postgraduální medicína*. 2002, 8, 824-827. 66
- Zbořil, V.: Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů. *Alergie*. 2004, 3, 151-155. ISSN 1212-3536.
- Zieger, RS: Development and prevention of allergic diseases in childhood. In: Middleton E., et al, eds, *Allergy Principles and Practices*, 4th ed., 1993, vol. 11, pp 1137-1171.

## Ostatní přílohy

Str. 103–162

- 1) Význam stanovení pupečnickového IgE
- 2) Vliv včasné léčby novorozenců vox\_2014-06
- 3) Léčba novorozenců s vysokými hodnotami IgE
- 4) Effect of Early Treatment of Newborns by Peroral Colonization Using Non-pathogenic E. coli on the Development of Their Immuno-allergic System
- 5) Dubai & Boston poster
- 6) Umbilical IgE and advanced glycation products in association with allergies in childhood
- 7) 7th International Conference on Drug Discovery
- 8) Boston Kongres
- 9) Colinfant nex born spc.
- 10) Ohlasy ze světa

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

The importance of assessment of immunoglobulin E in cord serum  
from the aspect of family history of allergy

JIŘÍ LIŠKA, VÁCLAV HOLEČEK, MONIKA KEPKOVÁ, ŠTĚPÁNKA SOBOTOVÁ

*Mulačova nemocnice, Plzeň*

## SOUHRN

V dlouhodobé studii (1998–2010) jsme chtěli stanovit, zda hladiny imunoglobulinu E v pupečnickové krvi jsou predikací pro alergická onemocnění do 18 měsíců či do 6 let věku. Včasná detekce sklonu k alergii má velký prognostický význam. Podrobná alergická anamnéza rodiče je nutná. Rodinná alergická zátěž je nepochybně rizikovým faktorem rozvoje alergie.

Vyšetřili jsme celkem 3619 vzorků pupečnickové krve chemiluminiscenční metodou (Immulite) a od r. 2003 až do dneška metodou ELISA na IgE a IgA. V první sledované skupině (1998–2002) bylo vyšetřeno 962 vzorků. Ve druhé sledované skupině (2003–2010) bylo vyšetřeno 2657 vzorků. Metodika neměla vliv na výsledek. Náběry i vyšetření byly prováděny celoročně po celou uvedenou dobu. Ukázaly se rozdíly v sezónnosti, které jsou v práci podrobně graficky dokumentovány. Z výsledků je patrné, že alergie se sdružuje s rodinnou anamnézou, i když nálezy nemusí být vždy jednoznačné. Přesto se vztahují nepřímo k předchozí rodinné anamnéze. První příznaky alergických projevů se v posledních desetiletích posunují do prvních let života. Dokonce se jeví, že ovlivnění budoucího novorozence alergií je uvažováno v posledních 6 týdnech gravidity. V posledních dvou letech jsme měli dokonce možnost korelovat vyšetřené hodnoty s pylovým kalendářem. Z výsledků lze vyzdvihnout dominující roli obou rodičů při vzniku alergie. Tyto jsou statisticky významné na hladině 1 promile. Proto se domníváme, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem, spolu s rodinnou anamnézou, k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu.

*Klíčová slova:* imunoglobulin E, alergie, imunita

## SUMMARY

In the long-termed study (1998–2010) we wanted to estimate, whether the level of immunoglobulin E in cord blood may predict the allergic disease in 18-months or in 6 years of the life. The possibility of allergic disease in time is of a great prognostic value. The importance of of detailed allergic history of parents is necessary. The family allergic load is doubtlessly the risk factor of allergy development.

Quite of 3619 samples of cord blood were examined by chemiluminiscent methods (Immulite) and from the year 2003 up to now by ELISA method on IgE and IgA. In the first group (1998–2002) were examined 962 samples, in the second group (2003–2010) 2657 samples. The methods didn't influence the results. The blood uptakes and examinations were produced during the whole mentioned time. There are differences between the season. This is documented in graphs. From the results is apparent, that allergy is combined with family history, even if the results may be sometimes not unambiguous. In spite of it they are in relation with not directly previous family history. The first symptoms of allergic manifestation in last decades are shifted to the first years of the life. Even the affect of the future newborn by allergy may be present in last 6 weeks of pregnancy. In last two years we had the possibility to correlate our results with the pollen calendar. From the results we can evaluate the dominant role of the parents in the development of allergy. These are statistically significant on the level of 1 per mille. Therefore we suppose, that the high values of cord blood IgE is the reason, combined with family history, to the preventive intervention and to influence the microbiological flora of gastrointestinal tract.

*Key words:* immunoglobulin E, allergy, immunity



### Úvod

Smyslem naší práce je snaha o vyjasnění problematiky pupečnickového IgE. Současně ověřit, zda pupečnickové IgE je závislé na faktorech, jako je roční doba porodu a sezónnost. Zjistit i rozdíly mezi atopickými a neatopickými rodiči. Jsme vedeni snahou o budoucnost nejen nutriční prevence alergie, ale i ovlivnění alergických projevů ve vztahu k dnes již předpokládané úloze střevní flóry. Kladlí jsme si také za úkol, zda může být pupečnickový IgE v převážně většině případů markerem rozvoje alergie.

### Materiál a metoda stanovení

V letech 1998–2002 jsme odebírali vzorky 2 ml pupečnickové krve a po její centrifugaci byla stanovena hladina IgE na chemiluminiscenčním analyzátoru IMMULITE firmy DPC s rozsahem měření od 1,0 IU/ml do 2000 IU/ml. Přestože výrobce udává stabilitu koncentrace 3 dny při 2–8 °C, bylo měření prováděno nejdéle do 24 hodin po odběru. Hemolytické vzorky byly sice analyzovány, ale vzhledem k možnému vlivu hemolýzy nebyly do prezentovaného souboru zařazeny. Fyziologické hodnoty deklarované výrobcem jsou uváděny do 4 IU/ml.

Od roku 2003 do roku 2010 se vyšetřování provádělo metodou ELISA (sety firmy RADIM, rozsah měření 0,4–1000 IU/ml), fyziologické hodnoty deklarované výrobcem do 2 IU/ml.

### Soubor a výsledky

Celkem 3619 vyšetřených vzorků pupečnickové krve fyziologických novorozenců

**Průměrné hladiny ve skupinách od roku 1998–2002** tvoří celkem 962 vzorků pupečnickové krve. Podle rodinné anamnézy odebrané od matek jsme rozdělili novorozence do 4 skupin (graf 1).

- A – 174 dětí s alergií obou rodičů
- B – 577 dětí s alergií matky
- C – 144 dětí s alergií otce
- D – 67 dětí – kontrolní soubor

### Skupina vyšetřovaných v letech 1998–2002

#### Kruskal Wallisův test

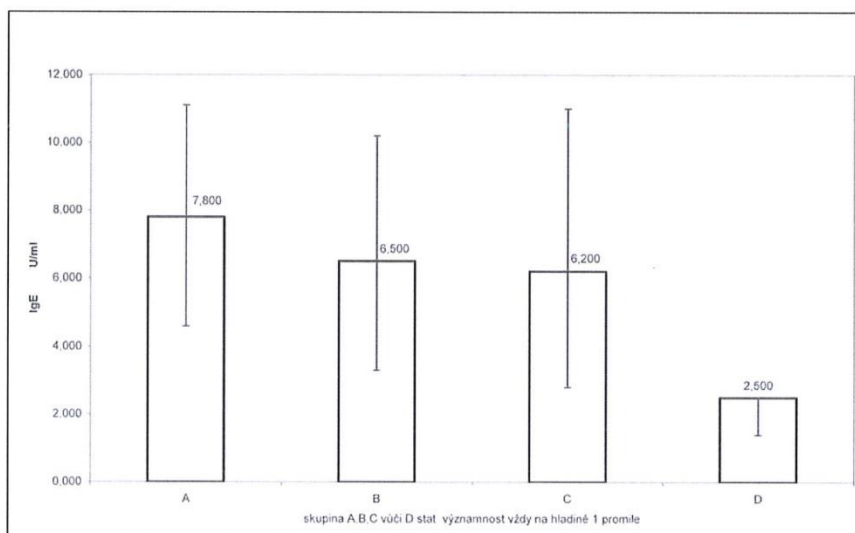
Úroveň	Četnost	Medián	Kvartil	Rozpětí
A	174	7800	4600	11100
B	576	6500	3300	10200
C	144	6200	2800	11000
D	67	2500	1400	2500

#### Mann-Whitneyův test

Srovnání úrovní	P
A:D	+++
B:D	+++
C:D	+++

+++ statistická významnost na hladině 1 promile  
vysvětlivky: A. oba rodiče B. matka C. otec D. kontrolní skupina

Grafické znázornění viz graf 1.



Graf 1: Hodnoty pupečnickového IgE u jednotlivých skupin pacientů (1998–2002)

Skupina vyšetřovaných v letech 2003–2010**Průměrné hladiny ve skupinách od roku 2003 do roku 2010**

tvoří celkem 2657 vzorků pupečnickové krve. Podle rodinné anamnézy odebrané od matek jsme rozdělili novorozence do 4 skupin.

- A – 263 dětí s alergií obou rodičů
- B – 1934 dětí s alergií matky
- C – 430 dětí s alergií otce
- D – 30 dětí – kontrolní soubor

**Kruskal Wallisův test**

Úroveň	Četnost	Medián	Kvartil	Rozpětí
A	263	2340	1260	4220
B	1976	1910	1090	3390
C	436	2030	1160	3280
D	41	1210	1000	1750

**Mann-Whitneyův test**

Srovnání úrovní	
A:D	+++
B:D	+++
C:D	+++

- statistická významnost na hladině 1 promile
- +++ statistická významnost na hladině 1 promile
- ++ statistická významnost na hladině 1 procento
- + statistická významnost na hladině 5 procent

Grafické znázornění viz graf 2.

Pro zajímavost jsme zdokumentovali procentuální rozložení nejčastěji anamnesticky zjištěných alergií u rodičů novorozenců – tab. 1.

Procentuální rozložení nejčastěji anamnesticky zjištěných alergií u rodičů novorozenců.

Tab. 1:

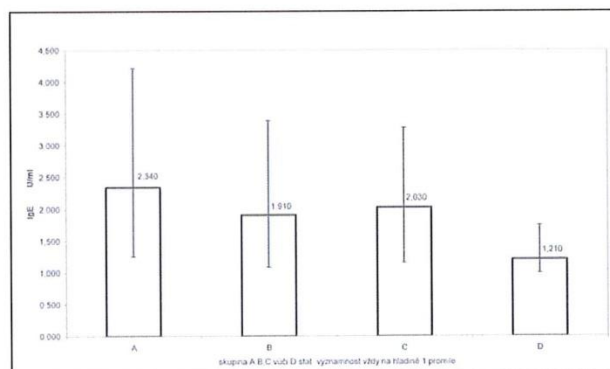
Sledované skupiny	1998–2002	2002–2006
alergie pylu	40 %	43 %
alergie peří	3,5 %	3,3 %
alergie prachu	20 %	25 %
alergie roztoče	5,2 %	6,0 %
alergie plíseň	2,6 %	2,7 %
alergie potravin	2,2 %	3,6 %
alergie bakterie	1 %	1,5 %
alergie včela, vosy	5,2 %	4,8 %
alergie kontaktní kovy	3,5 %	3,5 %
alergie kontaktní chemikálie	6 %	6,5 %
alergie léky	15,2 %	12,2 %

Uváděnou sezónnost měsíčních hodnot v jednotlivých letech dokumentují vybrané grafy 3, 4, 5 a 6.

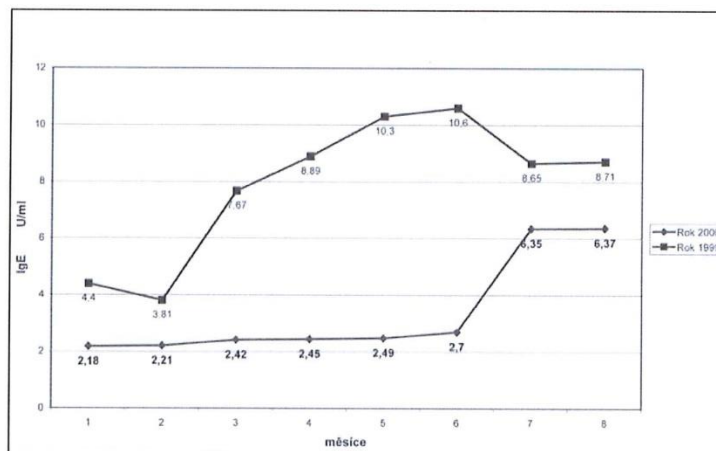
Z přiložených grafů, dokumentujících hodnoty pupečnickového IgE v letech 1998–2010 je evidentně patrná sezónnost vyšetřovaných hodnot.

**Diskuze**

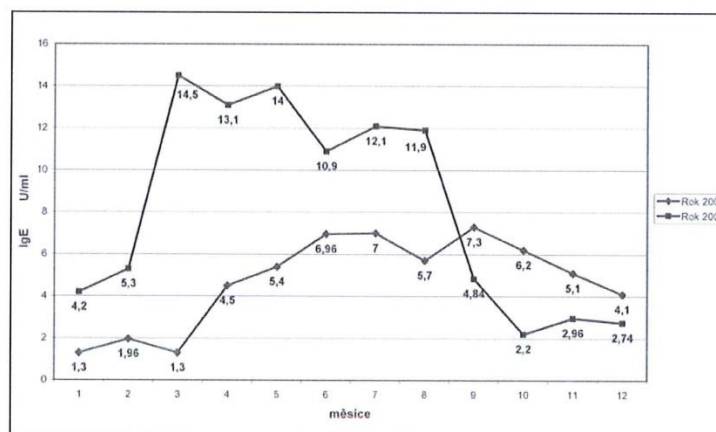
Po fyziologickém porodu lze již za 5–10 minut prokázat vaginální flóru v žaludečním obsahu a za 3–24 hodin dochází k osídlení střeva. Střevní mikroflóra chrání střevní sliznici před kolonizací patogeny a ovlivňuje střevní peristaltiku. První se objevují fakultativně anaerobní kmeny, hlavně *E. coli*. Situace je komplikovanější u nedonošených dětí, kde nosokomiální infekce představuje závažný zdravotnický problém. V posledních dekáдах je pozorován výrazný nástup alergických onemocnění s maximem výskytu v dětském věku, a proto se výzkum etiopatogeneze zaměřuje i na prenatální a perinatální období a faktory působící v raném dětství. Studie ukázaly,



Graf 2: Hodnoty pupečnickového IgE u jednotlivých skupin pacientů (2003–2010)



Graf 3: Průběh průměrných hodnot pupečnickového IgE v roce 1999–2000

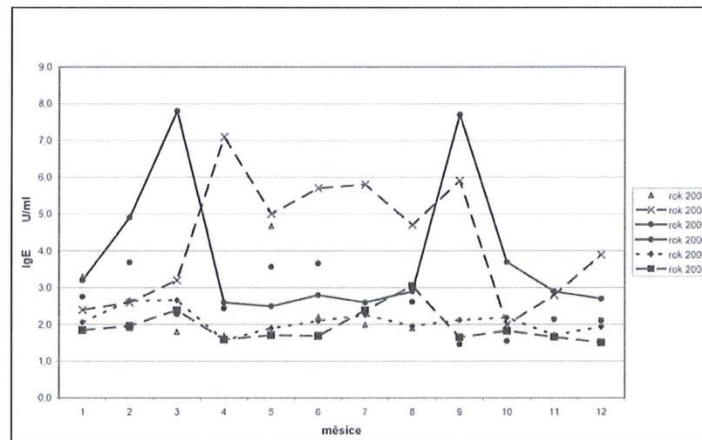


Graf 4: Průběh průměrných hodnot pupečnickového IgE v roce 2001–2002

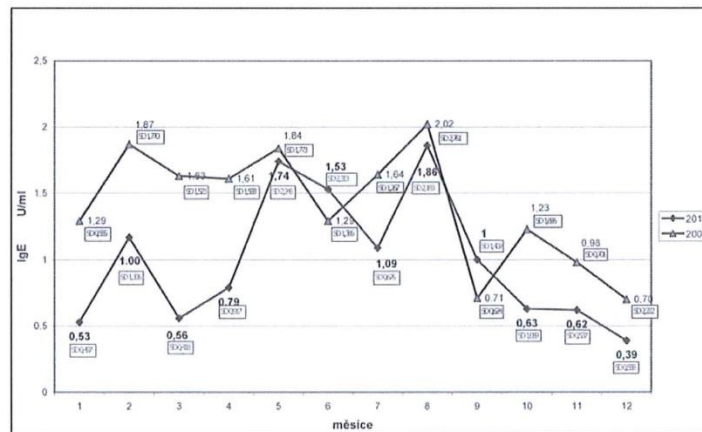
že k ovlivnění imunitního systému může dojít již intrauterinně, kdy některé alergeny mají schopnost procházet placentou (14). Za kritické období, kdy vlivem vnějších faktorů může docházet k imunologickým změnám a následnému vývoji atopie, se považují první měsíce života. Také se v minulosti prokázala pozitivní asociace mezi kontaminací placenty a zvýšením IgE v pupečnickové krvi. Stejně tak se prokázalo, že děti z venkovských regionů mají nižší koncentraci pupečnickového IgE. Imunitní systém novorozence je v prvních měsících nezralý a vyvíjí se postupně tak, aby byl schopen poskytnout optimální ochranu. Novorozence tvoří jen malé množství imunoglobulinů, schopnost buněk specifické imunity reagovat na antigeny je omezená. U novorozenců je primárně posunutá nerovnováha mezi Th1- a Th2-lymfocyty ve prospěch Th2, a tím je i vyšší možnost atopické senzibilizace. Také možnost senzibilizace plodu již od

22. týdne gravidity, polygenní základ, zvýšená tvorba IgE, IL4 a IL5 představují další rizikový faktor. Novorozenci mají také nedostatečně vyvinutou slizniční bariéru, což představuje vyšší možnost propustnosti pro alergeny.

Zvláště u dětí, jejichž jeden nebo oba rodiče jsou alergici, se dnes považuje za vhodné v novorozeneckém věku vyšetřit krev na přítomnost IgE. Pokud je zjištěna vyšší hladina, je tento považován za potenciálního alergika (11, 21), zvláště v prvních měsících života (11). Genetická výbava jedince výrazně ovlivňuje vznik a průběh alergických reakcí. K tomu si připomínáme vyjádření našeho plzeňského učitele prof. MUDr. V. Zavázala, DrSc. o tom, že když se člověk zbavil těžkých epidemií infekcí, tak jeho imunitní systém, nemaje co na práci, začal reagovat na běžné věci, jako jsou pyl a podobně (23). Připomíná to jiná sdělení, že alergická onemocnění jsou cenou za osvobození od infekčních a parazitárních chorob. Na



Graf 5: Průběh průměrných hodnot pupečnickového IgE v letech 2003–2008



Graf 6: Průběh průměrných hodnot pupečnickového IgE v roce 2009 a 2010 včetně směrodatných odchylek (SD)

druhé straně významné potlačení infekcí nedává ale úplně a konečné vysvětlení pro zvyšování prevalence alergických stavů (16). Dá se očekávat rozdílný vliv genetického pozadí na vznik astmatu, atopické dermatitidy a dalších. Důležitou roli hraje chromozom 5, kde je celá oblast obsahující geny pro řadu cytokinů, např. IL4. Klíčovým mediátorem alergických reakcí je ale IgE (23). Další důležitá oblast, související s hladinou IgE, byla zjištěna na chromozomu 5 v oblasti molekuly CD14. Tento receptor zajišťuje směr imunitní odpovědi, včetně směřování reakce k TH2 typu imunitní odpovědi. Musíme si přitom uvědomit, že imunitní systém novorozence nemá specifickou imunitní paměť.

Takzvaná hygienická hypotéza (15) uvádí, že nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům je faktorem, přispívajícím k rozvoji alergie. Faktory, jako v nějakém směru odlišné složení střevní mikroflóry, nízké hladiny

bifidobakterií a vysoké hladiny clostridií představují indikátor pozdějšího vývoje alergií. Hygienická hypotéza vychází z názorů, že mikrobiální stimulace vede k TH1 lymfocytové imunitní odpovědi. Také při RSV infekci v raném dětství se zjistila převaha TH2-lymfocytů a tyto děti mají pak častěji astmatické potíže. Stejně tak se uvádí souvislost po prodělaných atypických pneumoniích v raném dětství.

Preventivní účinek kojení na vývoj atopie může být zvýrazněn vyloučením potenciálních alergenů ze stravy kojící matky, již na úrovni buněk pupečnickové krve je zřejmý alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie. Také významně vyšší množství IL5 a IL10 v kolostru alergických matek a také v pupečnickovém séru jejich dětí naznačují převažující ladění TH2 imunitního systému. Také snížená exprese TGF-B u dětí alergických matek může přispívat

k pomalejšímu vyzrávání střevního epitelu novorozenců a tím usnadňovat průchod alergenů (2,3,6,7). Nebyla zjištěna žádná korelace mezi sérem matky a novorozence. Imunitní systém plodu dostává prvě alergenové podněty již v průběhu těhotenství, nejvíce v posledním trimestru. Nízké hladiny specifických IgE proti potravinovým alergenům a alergenům v ovzduší jsou prokazatelné u většiny novorozenců dětí.

CD4 T-lymfocyty z pupečnickové krve dětí atopických rodičů produkují *in vitro* větší množství IL4 než CD4 T-lymfocyty od novorozenců neatoických rodičů. U novorozenců jsou odpovědi na antigeny zevního prostředí vychýleny k TH2 cytokinovému profilu, který je charakteristický pro alergická onemocnění. V průběhu prvního roku života imunitní systém dozrává v důsledku expozice a imunitní odpovědi nabývají charakteru TH1 profilu. U atopických dětí k této reorganizaci nedochází a dále přetrvává TH2 typ odpovědi s uvolňováním IL4 a IL5. Tyto pak hrají klíčovou roli v regulaci tvorby IgE. Při deficitu imunoglobulinu vzniká současně deficit blokujících protilátek, takže snadno sliznicí procházející antigen je ve tkáních s menší intenzitou vyvázan a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. Na té se podílí i deficit T-supresorových lymfocytů, který je u alergických chorob prokázán.

IgE je imunoglobulin s relativní molekulovou hmotností 197 000 a poločasem katabolismu v séru 2–3 dny. Byl objeven manžely Ishizakovými v roce 1966, kteří bezpečně prokázali, že je nositelem reaginové aktivity (23). Sérová koncentrace IgE tvoří jen asi 41% celkového množství v organismu, zbytek je vázán na receptory především žírných buněk a bazofilních granulocytů. Poločas vázaného IgE je 2 týdny. Syntéza IgE je ovlivňována T-lymfocyty IL4 a genetickým vybavením jedince. IgE se zúčastní imunopatologické reakce I. typu, která vede ke klinickým projevům atopie. K této reakci dochází u jedinců, kteří mají geneticky podmíněnou tendenci reagovat na přítomnost některých antigenů (alergenů) nadměrnou tvorbou protilátek isotypu IgE. Syntéza IgE v embryonálním stádiu byla prokázána od 11. týdne, takže jeho koncentrace v pupečnickové krvi je odrazem této tvorby. Hladiny IgE v séru matky nekorelují s hladinou u novorozence. V pupečnickové krvi byla také prokázána přítomnost lymfocytů nesoucích molekuly IgE. Mezi dětmi s vyšší hladinou IgE bylo nalezeno vysoké procento alergií, někdy zvýšení předchází klinické manifestaci alergických onemocnění.

V minulosti byla sledována imunitní odpověď atopických žen a jejich plodů ve smyslu účinků potravinových alergenů v pozdním těhotenství (8). Výsledky ukázaly, že úpravy mateřské stravy v posledním trimestru gravidity ve snaze předcházet atopické senzibilizaci *in utero* mají ale menší vliv na plod, než se dříve předpokládalo (4). Navíc dietní omezení jsou pro těhotnou ženu náročná. Nebyly zaznamenány signifikantní odchylky v hodnotách IgE v pupečnickové krvi ve skupinách s různými dietami matek. Stanovení IgE v pupečnickové krvi a u novorozence nemá ovšem jen teoretický význam pro poznání životní dynamiky IgE. Má především nepříznivý prognostický význam pro ohrožení alergií v dalším období několika

let (7,9), jestliže obsah IgE přesahuje o dvě směrodatné odchylky nad stanovený normální průměr. Některé práce také poukazují na určitou kontroverznost tohoto parametru (15,21). Také riziko senzibilizace je v prvních 6 měsících značné (21). Je dáno nízkou hladinou trávicích enzymů v zažívacím traktu, nezralým slizničným imunitním systémem s nedostatečně vyvinutou schopností orální tolerance a relativně neomezenou absorpcí makromolekul ze střevního lumina. Orální tolerance je vlastně aktivní proces probíhající v oblasti slizničného imunitního systému. Jde o specifickou inhibici imunitní odpovědi po jejím předchozím navození kontaktem určitého antigenu s regulačními T-buňkami usidlenými v oblasti sliznice střeva. Na sliznici dýchacích cest k této indukci nedochází, v této oblasti vyvolává stejný antigen aktivaci, tedy obrannou odpověď. Tolerance je vlastně jedna z aktivních funkcí imunitního systému zprostředkovaná supresorovým mechanismem a realizovaná prostřednictvím inhibičně působících lymfocytů produkovaných regulačními T-lymfocyty.

Také u některých dětí s alergií na kravské mléko jsou nacházeny vysoké hodnoty IgE v pupečnickové krvi. Musíme brát v úvahu, že prvě příznaky alergických chorob se posunuly do prvních let života. Pro astma to znamená, že téměř polovina případů dětského astmatu začíná v prvních pěti letech života. Riziko vývoje vzniku astmatu u dětí s klinickými obrazy atopické dermatitidy je vysoké (18,22). Zajímavé jsou přitom již údaje o větším výskytu pylové alergie u dětí narozených do pylové sezóny (1). Bylo také prokázáno, že u dětí do pěti let věku je pro rozvoj astmatu nejvýznamnějším pozitivním faktorem astma u matky. Pozitivní ovlivnění abnormální imunologické aktivity u dětí se zvýšeným rizikem rozvoje alergie zprostředkované IgE protilátkami může preventivně působit proti vzniku atopie. Kmeny bifidobakterií alergických jedinců atopiků se podobají spíše složení bifidobakterií dospělých jedinců než zdravých dětí. Tyto nálezy dovoluují předpokládat, že odchylky ve složení střevní mikroflóry předcházejí vzniku atopie (6,10). Podle některých autorů také probiotika redukují riziko akutních infekcí (13).

Za rizikové faktory jsou pokládány rodinná dispozice, polygenní základ, zvýšená tvorba IL4 a IL5, zvýšená dispozice k tvorbě specifických protilátek, zvýšené pupečnickové IgE, vysoká koncentrace IgE v prvních týdnech života, pozitivní kožní testy a pozitivita specifických IgE protilátek, dále snížení hladiny CD8 lymfocytů a eozinofilie v krvi nebo v nosním sekretu (16). Mnozí autoři se snažili s pomocí široké sady povrchových leukocytárních znaků a humorálních faktorů nalézt rozdíly u novorozenců, kteří mají v důsledku nezralosti specifických i nespecifických imunitních mechanismů zvýšené riziko infekce. Vyšetřovali proto pupečnickovou krev (12) u novorozenců, kdy zjistili rozdíly u rizikové skupiny ve větším zastoupení CD3 + CD64 a vyšší počet CD23. K vlastní zvýšené tvorbě IgE se uvádí (11), že sliznicí proniklý antigen je vyvázan ve tkáních a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. Na tom se údajně podílí i deficit T-supresorových lymfocytů.

Ze souboru je patrné, že zvýšená hladina IgE v pupečnickové krvi ve srovnání s kontrolními skupinami je

u novorozenců s pozitivní alergickou anamnézou matky nebo otce či obou rodičů statisticky výrazně vysoká.

Další velmi zajímavý údaj, který uvádíme v předložených grafech, je nápadná sezónnost vysokých a zvýšených hodnot IgE v závislosti na probíhajících ročních obdobích a jejich charakteru. Z grafů jsou patrné určité meziroční rozdíly v hodnotách IgE v jednotlivých obdobích. V letech 1999–2000 je patrný rozdíl v nástupu zvýšených hodnot pupečnickového IgE mezi jednotlivými uvedenými léty, v roce 2001–2002 jsou opět patrné meziroční rozdíly, zvláště evidentní rychlý nástup vysokých hodnot IgE v roce 2001 již v jarních měsících a poměrně rychlý pokles v zimních měsících. V letech 2003–2008 jsou patrné vrcholy v některých letech v obdobích března, dubna a srpna, září. V letech 2009–2010 jsme grafy doložili i směrodatnými odchylkami. Z tohoto je patrné, jak velký vliv na hladiny pupečnickového IgE má počasí, potažmo koncentrace pylů v prostředí. Hodnoty IgE u novorozenců z rodin s výraznou pozitivní anamnézou alergie vykazují oproti kontrolním skupinám výrazné rozdíly. Je možné dokonce i uvažovat o plánování porodu v rodinách s výraznou alergií na mimosezónní období.

Z etického hlediska při vyšetřování IgE jde o výkon nezatažující novorozence ani rodičku. Již v rámci poporodního screeningu se u všech novorozenců provádí z pupečnickové krve automaticky vyšetřování RRR, acidobasická rovnováha, v případě Rh negativity i Coombs. V indikovaných případech, při zánětlivém a jiném podezření, se vyšetřuje v krevním séru i CRP a imunoglobuliny. Při dotazování rodiček v rámci předporodní anamnézy byly tyto informovány o odběrech krve na vyšetření IgE v případě pozitivní rodinné anamnézy. S vyšetřením souhlasily a dokonce jej uvítaly. Ani jednou jsme se nesetkali s negativní reakcí. Odběry prováděli lékaři-porodníci. Vyšetření IgA současně bylo prováděno z důvodu naší jistoty, že nedojde k přimíšení mateřské krve. V případě pozitivní hodnoty IgA byl tento vzorek vyřazen.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o vyšetření pupečnickové krve, které matku ani dítě nezatažovalo a bylo prováděno se zájmem a souhlasem matek, nebylo možné z etického hlediska vytipovat skupinu disponovanou

k léčení a záměrně neléčenou. Jedná se o klinickou studii. Jejím cílem bylo zjištění diagnostického a léčebného postupu. Byla prováděna na vybrané skupině nemocných za předem stanovených podmínek. Samozřejmě se nejedná o studii zaslepenou, protože byla vedena ku prospěchu dětí v novorozeneckém a kojenecko-batolecím věku. Studie byla realizována po celou dobu 12 let na jednom klinickém pracovišti a zpracovávána ve stejné laboratoři.

### Závěr

**Klinická studie prováděná u velkého souboru 3619 novorozenců trvala 12 let.**

**Důležitost podrobné alergologické anamnézy rodiček před porodem, prováděná v porodnici se zaměřením na celou rodinu připravenými cílenými otázkami.**

**Kvalitní odběr a zpracování pupečnickové krve u pozitivních anamnéz vyšetřených ve dvou skupinách dětí dvěma metodikami v různých časových intervalech.**

**Základním rizikovým faktorem rozvoje alergie je zřejmě rodinná zátěž.**

**Sezónnost hodnot pupečnickového IgE v závislosti na jednotlivých ročních obdobích je velmi nápadná. Tento závěr by mohl sloužit i pro plánování těhotenství v rodinách alergiků.**

*Autoři děkují za spolupráci členům porodnicko-gynekologického oddělení daného pracoviště, jmenovitě prim. MUDr. Z. Kestřánkovi a jeho zástupcům, MUDr. H. Jahnové a MUDr. B. Kunešovi a v neposlední řadě i vrchní sestře nemocnice Editě Krňoulové a RNDr. Františku Šefrnovi z FN Plzeň za statistické zpracování. Zároveň autoři děkují MVDr. J. Užičarovi a spolupracovníkům, FA Dyntec, Terežín.*

*Za cenné rady a pomoc při závěrečném hodnocení děkují autoři doc. MUDr. Petru Panznerovi, CSc., přednostovi oddělení klinické imunologie a alergologie v Plzni.*

*Práce byla prezentována opakovaně na pediatrických kongresech v ČR a SR s mezinárodní účastí v roce 2000, 2001, 2002, 2006 a 2008.*

### LITERATURA

- Fuchs M. Lze alergiím předcházet? *Pediatric pro praxi*, 2009, 10/2/82-86.
- Isolauri E, Tahvanainen A, Peltola T et al. Breast feeding of allergic infants. *J. Pediatr.*, 134, 1999, 1, 27-32.
- Isolauri E, Kalliomäki M, Laitinen K, Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: A novel target in allergic disease. *Curr. Pharm. Des* 2008, 14/14:1368-1375
- Jones A, Holloway JA, Warner JO. Does atopic disease start in foetal life. *Allergy* 2000, 55, 2-10.
- Hrdý J et al. Expresí cytokinů v buňkách pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek. *Vox Pediatr.*, 2007, 7, 8, 32.
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilomni H. Probiotics in primary prevention of atopic disease a randomized placebo, controlled trial. *Lancet*, 2001, 357, 1076-1079.
- Kjellman M, Johanson GO. IgE and atopic allergy in newborns and infants with a family history of atopic disease. *Acta PaediatrScand*, 1976, 65, 601-607.
- Lilja G. Immune response of the atopic woman and foetus: Effects of high and low dose food allergen intake during late pregnancy. *Clin.Allergy*, 1988, 18, 131-142.
- Liška J, Holeček V, Horáková E, Kestřánek Z, Jahnová J, Ulčová I, Zavázal V, Weishäupl P, Zeithaml J. Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie. *Česko-Slov.Pediatr.*, (Abstract), 2000, 55, (Suppl.1): 41.



## Vliv včasné léčby novorozenců perorálním osídlením nepatogenním *E. coli* na vývoj jejich imunoalergického systému

MUDr. Jiří Liška, CSc.<sup>1)</sup>, MUDr. Václav Holeček, CSc.<sup>1)</sup>, MUDr. Štěpánka Sobotová<sup>1)</sup>,  
MUDr. Monika Kepková<sup>1)</sup>, RNDr. Ing. František Šefrna<sup>2)</sup>

1) Mulačova nemocnice – PRIVAMED, Plzeň

2) Oddělení zdravotního účtování a statistiky FN Plzeň

V naší předchozí otištěné práci (1) jsme prezentovali výsledky 12leté studie (1998–2010), ze které jsme předložili určité závěry. Jednalo se o poměrně rozsáhlý soubor, ve kterém bylo vyšetřeno 3619 vzorků pupečnické krve. Dospěli jsme k několika výsledkům, ze kterých bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou (statistická významnost na hladině 1%). První příznaky alergických chorob se posunují do prvních let života. Ukázaly se rozdíly v sezónnosti, které jsou v práci graficky dokumentovány v jednotlivých letech. Došli jsme k hodnocení, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE spolu s rodinnou anamnézou jsou důvodem k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Použili jsme přípravek Colinfant Newborn, perorální vakcínu, probiotikum. Jedná se o lyofilizovaný nepatogenní kmen *E. coli*. Uvedený kmen jsme podávali od 10. dne věku 3× v týdnu po dobu jednoho měsíce.

Z výsledků v letech 2005–2008 vyplývá, že u léčených pacientů s primárně zvýšenými hodnotami IgE z pupečnické krve se tyto hodnoty v roce věku v séru kojenců v 90% zcela normalizovaly. Vzhledem ke zjištěné anamnesticky udávané minimální nemocnosti těchto pacientů jsme začali vyšetřovat i hodnoty IgG v roce věku a porovnávali s kontrolní skupinou. Hodnoty po léčbě se normalizovaly. V letech 2009–2012 jsme zjišťovali vliv léčby na hodnoty imunoglobulinů IgE, IgG, ale i IgA, celý tento další soubor jsme statisticky zpracovali v jednom roce a ve třech letech věku. Statisticky v jednom roce věku i ve třech letech věku spolu korelují IgG s IgA na hladině významnosti 1%. Z výsledků je patrné, že léčba Colinfantem mohla mít pozitivní účinek v tom smyslu, že výsledné hodnoty IgE se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí. Hodnoty se v čase změnily

u léčených mezi prvním a třetím rokem na hladině významnosti 1%. IgG a IgA u léčených byly v mediánu zcela v hodnotách normality. Tomu odpovídá zcela zanedbatelná následná nemocnost novorozenců léčených uvedeným probiotikem. Na druhé straně u léčených se IgE mezi prvním a třetím rokem zvýšilo v mediánu jen na zcela normální hodnoty v rámci předpokládaného protialergického efektu léčby.

V období po prvním roce byly nalezeny významné korelace pupečnickového IgE se sérovým IgE, IgG, IgA a korelace sérového IgG s IgA.

Velmi příznivý efekt terapie na nemocnost dětí oproti kontrolní skupině v předem definovaném souboru stejného věkového období je graficky znázorněn.

### ■ Úvod

Tato práce je ve shodě s řadou studií posledních let, které věnují zásadní pozornost střevní sliznici a s ní spojené slizniční imunitě, která má zásadní důležitost v prevenci alergií. Nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům se považuje za faktor, který přispívá k rozvoji alergie. Vzhledem k tomu, že novorozenci se rodí s nezralou specifickou imunitní odpovědí, je potřeba pro dozrání imunitní odpovědi dodat systému podněty. Probiotické bakterie představují podněty pro náš imunitní systém bezpečně. Pro pozdější manifestaci alergických, ale i autoimunitních chorob je zásadní zdravá střevní sliznice a vyváženost imunitního systému nutností. Důležité je navození tzv. orální tolerance především v prvním půlroce života, kdy je nutná stimulace imunitního systému, a to právě pod vlivem probiotik. Specifická imunitní odpověď s převahou Th2 je vyvinuta již při porodu.

Smysl léčby Colinfantem spočívá v přesměrování imunologické paměti alergického

charakteru od Th2 fenotypu ještě dříve, než je ustavena imunitní odpověď na antigeny ze zevního prostředí. U atopiků s klinickými příznaky onemocnění jinak dochází k převaze Th2 imunitní odpovědi, zatímco u neatopiků je tento typ odpovědi potlačován ve prospěch Th1. Rozdíl tedy není v míře expozice, ale ve způsobu, jak na ni imunitní systém různých jedinců odpovídá.

Imunitní systém v časném novorozeneckém věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro stimulační a regulační funkce imunitního systému. Imunoterapie alergických nemocí snižuje tvorbu IL-4 alergen specifickými Th2 lymfocyty a zvyšuje tvorbu IFN- $\gamma$  specifickými Th1 lymfocyty.

Většina buněk imunitního systému je lokalizována pod povrchem sliznic, kde tvoří slizniční lymfatický systém. Ten představuje největší část imunitního systému organismu, neboť zahrnuje 80% imunokompetentních buněk v těle. Tento systém chrání před průnikem patogenních mikroorganismů, ale i před rozvojem sebepoškozujících zánehtlivých systémů. Fyziologická bakteriální mikroflóra vytváří ochrannou bariéru. Při jejím optimálním složení dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci cytokinů, navozujících vznik aktivní tolerance neškodných alergenů. Negativní opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních IgA a prostřednictvím IL-4 pak tlumí aktivitu Th1 lymfocytů. Indukce IgE odpovědi je závislá na interakci mezi T buňkami a antigen prezentujícími buňkami. Střevní mikroflóra vykazuje velkou metabolickou aktivitu, která je shodná s aktivitou jater, jež jsou neaktivnějším orgánem těla.

Mezi probiotické kmeny jsou řazeny desítky specifických druhů, z nichž většina patří mezi mléčnou kyselinu produkující laktobacily a bifidobakterie.



Probiotika tvoří specifické látky, které ovlivňují růst množení a adhezi ostatních mikroorganismů. Dále mají vliv na pokles lumenálního pH, zvýšení tvorby mucinu a modulace. Terapie probiotiky tedy představuje možnost zavést speciálně vybrané mikroby do gastrointestinálního traktu. Mikroby musejí zůstat životaschopné během jejich produkce, skladování a průchodu GIT traktem. Stimulace imunitního systému probíhá cestou interakce s tool-like receptory na dentritických buňkách. Touto cestou dochází k regulaci Th1 odpovědi a inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů. Dále jsou probiotika schopna podpořit přirozenou imunitu prostřednictvím tvorby antimikrobiálně účinných peptidů označovaných jako defenziny.

#### Metodika používání

Pro podávání probiotik bývá typické, že terapeuticky účinná dávka se liší v závislosti na druhu použitého bakteriálního kmene, složení přípravku a věku pacienta. Zcela obecně je možné říci, že doporučená denní dávka pro kojence je 0,5–1 mld., pro děti 5–10 mld. a pro dospělého 10–20 mld. CFU, tj. kolonií tvořících jednotek. Zajímavým zjištěním bylo pozorování, že doba podávání probiotika neměla pozorovatelný vztah k terapeutickému účinku.

Experimentálně bylo prokázáno, že kmen podaný krátce po narození má lepší podmínky pro uchycení. Tvorbu protilátek lze prokázat již za 14 dní po prvním osídlení, a to i tehdy, bylo-li provedeno krátce po narození. Na možnost prenatální senzibilizace se myslí proto, že v pupečnickové krvi jsou nacházeny vysoké hodnoty IgE.

V našem sledovaném a léčeném souboru jsme používali nepatogenní kmen *E. coli*.

#### Colinfant Newborn – nová perorální vakcína – probiotikum

Jedná se o živou perorální vakcínu. Jde o lyofilizovaný nepatogenní kmen *E. coli*, který je schopen vytěsnit osídlení střevního traktu patogenními kmeny. Vyroben Ústavem sér a očkovacích látek, 12 lahviček. Každá lahvička obsahuje *Escherichia coli* sérotyp O83:K24:H31 min.  $0,8 \times 10^9$ . Je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflóry. Vakcína byla registrována v SÚKL v roce 1997 pod registračním číslem 59/762/97-C. Použití kmene a příprava vakcíny byly patentovány v roce 1989 pod číslem 2645722. *E. coli*, ze kte-

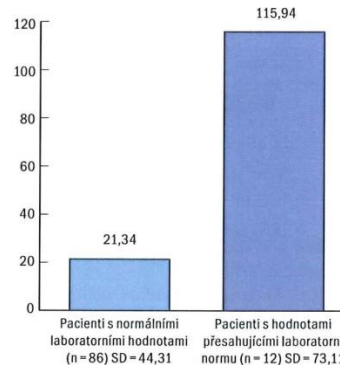
rého je připravována živá vakcína, je nepatogenní kmen s výše uvedeným sérotypem. Je uložen ve sbírce typových kmenů pod číslem A034/86. Je vysoce selektovaný, citlivý na běžná antibiotika, netvoří enterotoxin a nemá plazmid. Frekvence případného přenosu R1 plazmidu z donorové kultury je asi  $100 \times$  nižší než u kontrolního standardního kmene *E. coli*. Nepatří mezi žádné ze skupiny enteropatogenních *E. coli*. Jeho výborná kolonizační schopnost je zajištěna i přítomností fimbrií prokázovaných hemaglutinací. Po perorální aplikaci suspenze byla prokázána translokace mikrobů pouze do mezenterálních uzlin, ale ne ve slezině, játrech a plicích. Kmen má výborné kolonizační vlastnosti, obsazuje receptory střevní sliznice, brání adhezenci patogenů a vytlačuje přítomné enteropatogenní kmeny. V testech byl kmen pro bezmikrobní selata zcela nepatogenní. Indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je u novorozenců zvláště významná, protože zčásti nahrazuje deficit tohoto imunoglobulinu. Po osídlení novorozenců vymizí jejich bakteriální patogeny ze stolice, krku i nosu. Vakcinační kmen přetrvává ve střevním traktu osídlovaných dětí po dobu 16 týdnů, ale byl prokázán i po několika letech. Přítomnost kmene stimuluje tvorbu specifických i nespecifických protilátek, prokazatelnou ve střevním traktu, ve slinách i v séru. Ukazuje se, že specifické kmeny střevní flóry mohou podporovat ochranu hostitele proti senzibilizaci i proti vzniku alergií, ale i proti infekci. Vakcína je dodávána v balení  $1 \times 12$  lahviček. Toto balení je určeno pro 1 pacienta ve věku do jednoho roku bez ohledu na jeho hmotnost. Je zásadně podáváno perorálně, obsah lahvičky se rozpustí v 1 ml tekutiny (voda, čaj), přeneše se do nápoje a dá se dítěti vypít. Podává se  $3 \times$  týdně 1 lahvička po dobu 4 týdnů. Po dobu aplikace antibiotik se podávání přerušuje. Nedoporučuje se podávat vakcínu v akutním stadiu průjemových onemocnění. Výdej je vázán na lékařský předpis pediatra. Tč. jej vyrábí společnost Dyntec v Terezíně.

#### Soubor a výsledky

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

Graf 1

Kontrolní IgE v séru po léčbě Colinfantem Newborn v letech 2007–2008 (laboratorní norma 0–75 U/ml)



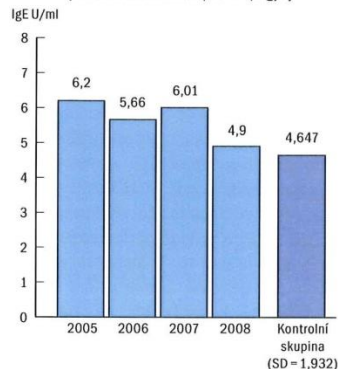
Další skupina léčených pacientů byla vyšetřena v letech 2007–2008 (graf 1).

Z toho je patrné, že normalizace hodnot IgE v dané skupině po léčbě nastala u 87,7 % pacientů.

Vzhledem k tomu, že jsme na základě podrobné anamnézy začali zjišťovat velmi nápadně sníženou nemocnost léčených pacientů, zpracovali jsme u všech těchto pacientů průměrné hodnoty IgG (graf 2). Výsledky srovnány s kontrolní skupinou 25 zdravých dětí. Překvapující pro nás byla průměrná hodnota IgG ve sledovaných letech. Statistické zpracování výsledků IgE, IgA, IgG, v následujících letech 2009–2012 u pacientů s vysokým pupečnickovým IgE léčených po porodu a jejich kontroly v jednom roce a ve třech letech věku ve srovnání

Graf 2

Průměrné hodnoty IgG ve sledované léčené skupině v roce věku v letech 2005–2008 (laboratorní norma 5,50–14,0 g/l)







s kontrolní skupinou 53 zdravých dětí z nefrologické ordinace.

Tab. 1 Základní statistiky - kontroly

Položka	n	průměr	medián	1. kvart.	3. kvart.
IgG1	20	4,258	3,640	3,060	5,700
IgA1	20	0,345	0,355	0,210	0,430
IgE1	14	31,00	7,47	3,63	41,40
IgG3	35	7,373	7,530	5,98	8,350
IgA3	35	0,655	0,600	0,460	0,770
IgE3	35	24,98	14,90	5,40	40,80

Tab. 2 Základní statistiky - nemocní

Položka	n	průměr	medián	1. kvart.	3. kvart.
PUP_IgE	136	3,098	2,365	1,790	3,560
IgG1	133	4,728	4,550	3,620	5,730
IgA1	136	0,473	0,260	0,200	0,380
IgE1	135	37,54	8,87	3,96	21,50
IgG3	67	6,964	6,870	5,690	8,160
IgA3	67	0,644	0,620	0,460	0,760
IgE3	66	59,49	17,09	7,65	60,12

Byla zamítnuta hypotéza normality rozložení pomocí šikmosti a špičatosti. Proto byly dále použity neparametrické metody.

#### Porovnání nemocných versus kontroly

Tab. 3 Wilcoxonův test nepárový (nemocní vs. kontroly)

Položky	n1 (kontroly)	n2 (nemocní)	P
IgG1	20	133	20,5
IgA1	20	136	17,5
IgE1	14	135	99,2
IgG3	35	67	29,4
IgA3	35	67	65,4
IgE3	35	66	18,2

Relativně nejbliže k významnosti mělo IgA v roce věku.

#### Vývoj v čase u nemocných

Tab. 4 Wilcoxonův test párový - po jednom roce vs. po třech letech

Položky	poč. měř.	P
IgG1	IgG3	61 0,0 +++
IgA1	IgA3	62 0,0 +++
IgE1	IgE3	63 0,0 +++

Hodnoty se v čase změnily u nemocných mezi jedním a třemi lety, a to na hladině významnosti 1 %.

IgG u nemocných se zvýšilo v mediánu z 4,55 na 6,87.

IgA u nemocných se zvýšilo v mediánu z 0,26 na 0,62.

IgE u nemocných se zvýšilo v mediánu jen z 8,87 na 17,09. Hodnoty zůstaly zcela v normě. U kontrol nebyl vývoj v čase testován pro malý počet kompletních dvojic měření.

#### Korelace veličin u kontrol

Tab. 5 Pořadová korelace v jednom roce - kontroly

Položky x,y	n	Spearman	P	Kendall	P
IgG1 IgA1	20	0,7040	0,2 ++	0,5105	0,2 ++
IgG1 IgE1	14	0,2992	28,1	0,1758	38,1
IgA1 IgE1	14	0,2227	42,3	0,1429	47,7

IgG v jednom roce věku koreluje s IgA v roce věku na hladině P = 1 %.

Tab. 6 Pořadová korelace ve třech letech - kontroly

Položky x,y	n	Spearman	P	Kendall	P
IgG3 IgA3	35	0,1973	25,0	0,1395	23,9
IgG3 IgE3	35	0,0003	99,9	0,0118	92,1
IgA3 IgE3	35	0,0482	77,9	0,0454	70,1

Ve třech letech již nebyla u kontrol nalezena žádná statisticky významná korelace.

#### Korelace veličin u nemocných:

Tab. 7 Pořadová korelace v jednom roce - nemocní

Položky x,y	n	Spearman	P	Kendall	P
PUP_IgE IgG1	128	0,2330	0,9 ++	0,1658	0,5 ++
PUP_IgE IgA1	131	0,2684	0,2 ++	0,1830	0,2 ++
PUP_IgE IgE1	130	0,1729	5,0 +	0,1193	4,4 +
IgG1 IgA1	132	0,5203	0,0 +++	0,3853	0,0 +++
IgG1 IgE1	130	0,0887	31,4	0,0582	32,6
IgA1 IgE1	133	0,0720	40,9	0,0491	40,2

Statisticky významně v jednom roce věku u nemocných spolu koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 %, korelace kladná, přímo úměrná. V jednom roce věku pupečnickové IgE koreluje se všemi sérovými imunoglobuliny, nejvíce s IgG a IgA.

Tab. 8 Pořadová korelace ve třech letech - nemocní

Položky x,y	n	Spearman	P	Kendall	P
IgG3 IgA3	67	0,6000	0,0 +++	0,4197	0,0 +++
IgG3 IgE3	66	0,0916	46,0	0,0643	44,5
IgA3 IgE3	66	0,0626	61,4	0,0434	60,7

Ve třech letech statisticky významně koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 %.

#### Vysvětlivky:

IgE1, IgA1, IgG1 - hodnoty v jednom roce věku

IgE3, IgA3, IgG3 - hodnoty ve třech letech věku

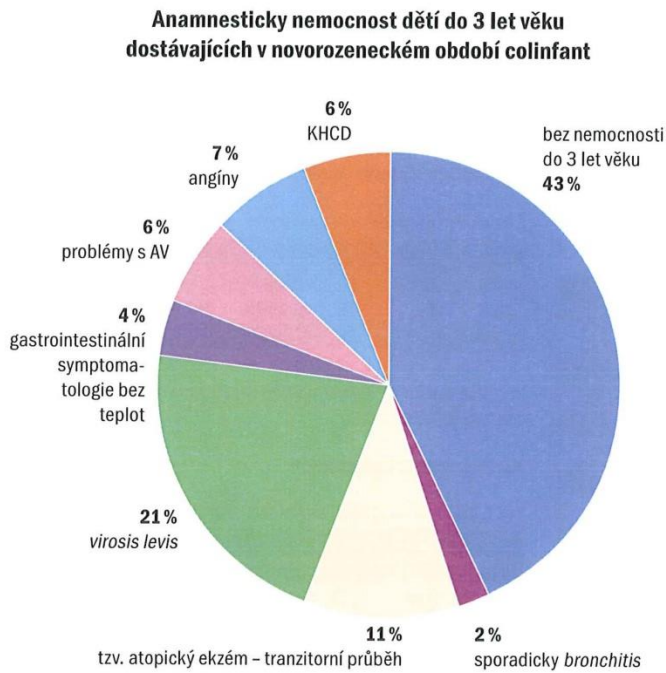
P - výsledná pravděpodobnost

PUP\_IgE - pupečnickové IgE

n - počty pacientů



Graf 3 Graficky znázorněná nemocnost dětí léčených Colinfantem

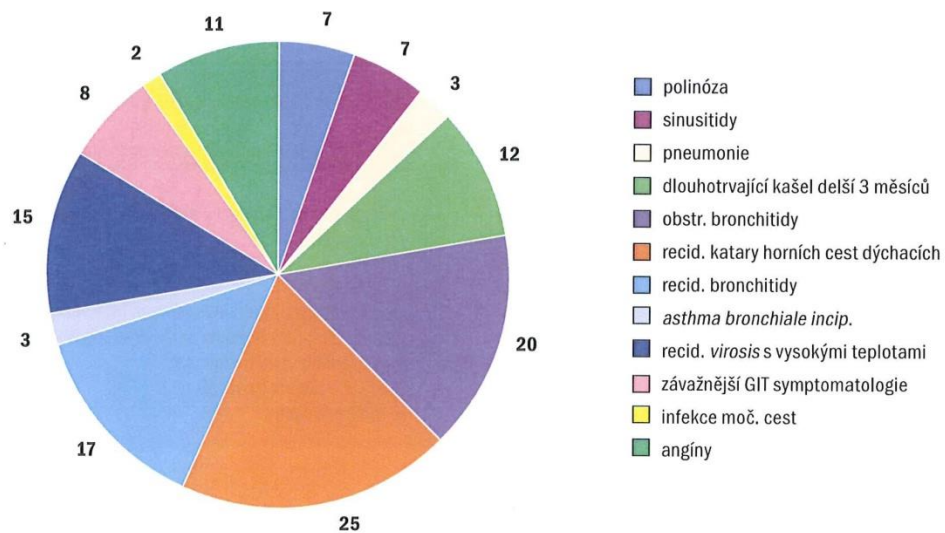


Léčba Colinfantem přispěla k tomu, že výsledné hodnoty IgE u léčených dětí se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí.

Efekt léčby v novorozeneckém věku pomocí daného přípravku z hlediska nemocnosti jsme znázornili při porovnání přeléčené skupiny 142 dětí v porovnání s kontrolní skupinou 73 sourozenců (graf 3, graf 4). Podotýkáme, že z hlediska heredity se jedná o stejnou rizikovou skupinu monitorovanou ve stejném věkovém období. Prakticky nulová závažná nemocnost léčených dětí se vymykala možnosti kvalitního statistického zpracování.

Graf 4 Graficky znázorněná nemocnost kontrolní skupiny neléčených sourozenců

**Anamnesticky nemocnost colinfantem neléčených sourozenců dětí do 3 let věku**





## ■ Diskuse

V naší předchozí publikaci (1) jsme po vyšetření 3619 vzorků pupečníkové krve dospěli k závěru, že koncentrace imunoglobulinu E v pupečníkové krvi je predikací pro alergická onemocnění do 18 měsíců věku či do 6 let věku. Ukázaly se rozdíly v sezónnosti. Dále bylo patrné, že alergie se sdružuje s rodinnou anamnézou, první příznaky se posunují do prvních let života. Dokonce se jeví, že ovlivnění budoucího novorozence alergií je uvažováno v posledních 6 týdnech gravidity. I v našem souboru jsme měli skupinu novorozenců – mladších sourozenců, kteří byli narozeni v zimních měsících a jejich hodnoty pupečníkového IgE byly zcela v mezích normy proti prvním, starším sourozencům užívajícím Colinfant. Tito starší sourozenci se narodili stejným rodičům, ale v zimních měsících. Na to jsme právě již upozorňovali v první práci. Z výsledků bylo možné vyzdvihnout také dominující roli obou rodičů při vzniku alergie. Tyto výsledky byly významné na hladině 1 %. Proto jsme dospěli k závěru, že vysoké hodnoty pupečníkového IgE spolu s rodinnou anamnézou jsou důvodem k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry. Je známo, že predikce IgE je pod genetickou kontrolou. Ještě musíme zopakovat, že tvorba IgE začíná u lidského foetu v játrech a plicích v 11 týdnech a ve slezině v 21 týdnech. Většina novorozenců má velmi nízké nebo minimálně detekovatelné hladiny IgE v pupečníkové krvi. Jiní autoři uváděli prediktivní hodnoty IgE v pupečníkové krvi jako rizikový faktor pro novorozence pro vývoj včasného začátku atopie. Matsumura nicméně uzavírá, že nejlepším prediktorem alergie u novorozence je pozitivní rodinná historie a elevace pupečníkového IgE. Všimli si také druhu a začátku alergie. Uváděli, že alergie se rozvinula u 29 % dětí, které měly pozitivní rodinnou historii alergie. Z nich pak v roce věku mělo diagnostikovanou alergií 23 % dětí, z toho bylo 40 % kojeno. Také si, stejně jako my, ověřovali pomocí pupečníkového IgA potenciální kontaminaci mateřskou krví. Je známo, že u novorozenců je primárně posunutá nerovnováha mezi Th1 a Th2 lymfocyty ve prospěch Th2 a tím je i vyšší možnost atopické senzibilizace. Dále se literárně také uvádí, že podání antibiotik do šestého měsíce života zvyšuje incidenci astmatu 2,8×, podání širokospektrého antibiotika až devětkrát!

Probiotika jsou podle definice WHO z roku 2001 živé organismy, převážně lidského

původu, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Osídlení slizničních povrchů určitým typem bakterií má příznivé účinky nutriční i imunologické. Dokáží snížit adhezi patogenů na povrch střeva. Jejich působením dochází ke snížení počtu intraepiteliálních regulačních T lymfocytů ve střevní sliznici. Na enterocytech zvyšují expresi MHC molekul II. třídy, čímž zvyšují jejich schopnost prezentovat antigeny. Podle některých prací významně stimulují syntézu slizničního IgA. Pravděpodobně se jedná o určitý typ polyklonální stimulace. O prvních variantách probiotik se zmiňuje Mečnikov, který v roce 1907 zdůraznil význam střevní mikroflóry a její důležitou roli při obraně organismu. Již tehdy konstatoval, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje zdravotní stav. Možnost ovlivnění střevní flóry probiotiky je uváděna v dalších pracích.

Pro zařazení mezi probiotika musejí mikroorganismy splňovat celou řadu kritérií. Samotná genová typizace byla prováděna zatím jen u tří druhů probiotik. Jedná se o *E. coli* typ Nissle a *E. coli* typ O83 (přípravek Colinfant), dále *Lactobacillus casei spec. Rhamnosus* – *Lactobacillus GG* a *Saccharomyces boulardii*. Poslední uvedené ale není humánního původu a nepatří tak mezi pravá probiotika. Bakteriální kmeny musejí být izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládán příjemce, nesmějí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do zaživacího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií. Ty musejí mít schopnost přežít v zaživacím ústrojí a být dostatečně metabolicky aktivní. Výše uvedený typ *E. coli* Nissle 1917, který je dnes součástí přípravku Mutaflor, je právě tato nepatogenní *E. coli*. Má profylaktické účinky v remisi ulcerózní kolitidy srovnatelné s mesalazinem. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenními *E. coli* byl registrován literárně pouze meteorismus a u vlastního našeho Colinfantu 1× nadýmání a 1× vyrážka, která po ukončení vymizela. V tomto případě však nelze vyloučit problematiku při distribuci a skladování. Jinak se nikdy nic neobjevilo. Schopnost probiotik k ovlivnění střevní permeability ve vazbě na potravinové alergie studoval Perrier. V této souvislosti je nutné podotknout, že dospělý typ střevní mikroflóry je ustaven ve věku kolem dvou let. V dnešní době je již známo, že alergie se manifestuje v prvních letech letech gastrointestinálními příznaky, atopickým ekzém

mem a mnohdy již i respiračními potížemi. Z hlediska výskytu a průběhu respiračních onemocnění existují na jedné straně studie, které neprokazují pozitivní vliv probiotik, na druhé straně studie prokazující určitý i statisticky signifikantní efekt na snížení výskytu respiračních onemocnění. Stejná situace je u alergického astmatu, kde podávání probiotik nevedlo k efektu, na druhé straně u alergické rýmy podávání probiotik v batolecím a předškolním věku vedlo ke snížení výskytu. V další studii byla podávána různá probiotika a sledován vliv na respirační infekce. Zjistilo se však jen zkrácení doby a redukce tíže onemocnění, probiotika neredukovala incidenci. Stejná situace je popisována u atopického ekzému. Jiní uvádějí profit z probiotik u atopického ekzému, ale na druhé straně další prameny uvádějí selhání probiotik. V této souvislosti si musíme uvědomit, že probiotika by měla být pro klinické použití izolována z lidských materiálů, protože probiotika ze zvířecích materiálů v sobě mohou skrývat faktory rizikové pro lidský organismus. Ačkoliv běžně nepředstavují pro zdravého člověka žádné riziko, u oslabených pacientů byly ojediněle pozorovány různé nežádoucí účinky. Jedná se o děti, které jsou imunosuprimovány, trpí chronickými onemocněními nebo mají zavedenu nějakou invazivní medicínskou pomůcku. Dokud tedy nebudou dostatečně eliminována bezpečnostní rizika pro velmi vážné nemocné děti, neměla by u nich být léčba probiotiky zaváděna. Sem patří i stavy po chemoterapii, po ozařování, po biologické léčbě autoimunitních onemocnění, po orgánových transplantacích či po transplantacích krevetvorných buněk.

Na druhé straně další autoři tvrdí, že probiotika mohou redukovat incidenci IgE asociovaného ekzému u kojenců. O antiinfekčním efektu probiotik je však opakovaně referováno a jedním z mechanismů může být i nespecifická stimulace imunity. Fukushima referoval o tom, že při podávání bifidobakterií fekální hladina IgA i anti-poliovirus IgA byla během příjmu signifikantně vyšší než před příjmem. Toto zvýšení hladiny lokálního IgA může přispívat ke zvýšení mukózní rezistence proti GIT infekci. Z možného působení probiotik je vhodné uvádět úpravu střevní permeability a stimulaci imunitní odpovědi na patogeny, a to zvýšením produkce sekrečního IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL-10, TGF- $\beta$ . Při optimálním složení střevní mikroflóry totiž dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci



cytokinů, navozující vznik aktivní tolerance neškodných antigenů. Opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních imunoglobulinů IgA. Prostřednictvím IL-4 tlumí aktivitu Th1 lymfocytů. Tím indukují převahu regulačních lymfocytů Th3, které snižují systémovou zánětlivou odpověď. Na druhé straně nemáme zprávy o věrohodných studiích o tom, že probiotika v kojenecké mléčné výživě by mohla být škodlivá. Rovněž další uvádějí nesporný vliv probiotik na prevenci GIT problémů u kojenců a na rychlejší úpravu klinických obrazů rotavirové infekce. Autoři zabývající se problematikou novorozeneckého věku konstatují, že podávání probiotik matkám před porodem a následně 6 měsíců po porodu dětem nepřineslo žádoucí efekt na prevenci alergického onemocnění. Všichni však v těchto pracích podávali laktobacily, většinou *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, nebo *B. lactis*. K prevenci nekrotizující enterokolitidy u dětí velmi nízké porodní váhy je používali u nás v Brně v roce 2003, nyní uvádějí další. Podporu některým hypotézám poskytují práce např. o výhodnosti včasné expozice kravskému mléku ve smyslu protekce proti IgE. Mezinárodní společnosti zabývající se výživou doporučují v případě nerealizovatelného kojení hydrolyzovanou kojeneckou výživu s ověřenou sníženou alergenicitou do 4. měsíce věku nebo částečně hydrolyzovaná mléka. Již nedochází k výraznějšímu omezování alergenů, jak u matek v době těhotenství a kojení, tak ve výživě dětí po 6. měsíci života. U matek při předpokladu, že nebudou kojit, jsme doporučovali v prvních čtyřech měsících stravu s předpokládanou hypoalergenicitou (v celém souboru jednotně HA Beba). Na druhé straně studie ukazují, že z podávání probiotik profitovaly především děti s IgE zprostředkovanou alergií. Vlivem probiotik, která, jak je známo, usnadňují rovnováhu mezi Th1 a Th2 prostřednictvím regulačních buněk, zvýšení produkce IgA a IL-10 a potlačení tvorby prozánětlivých cytokinů, se u nás široce zabývají někteří autoři. Možnost pozitivního ovlivnění střevní mikroflóry probiotiky je uváděna v několika pracích. U nás uvádějí údaje o českém kmeni, vyrobeném v minulosti v Ústavu sér a očkovacích látek. Kmen má vysokou adhezivitu a je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflóry. Smysl léčby probiotikem spočívá v přeměrování imunologické odpovědi od fenotypu Th2 k Th1 ještě dříve, než je ustavena imu-

nitní odpověď na antigeny z okolního prostředí. Imunitní systém v časném dětském věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro stimulaci a regulační funkce imunitního systému. Tím nedochází k jeho dostatečnému „vyzrání“ a důsledkem je vychýlení imunitní reakce k reakci typu Th2. Navíc je zde zřejmě mechanismus navození imunologické tolerance do 2–3 let věku.

Organismus je právě ve věku kritickém pro navození imunologické tolerance vystaven pro něj novým molekulám. Je nepochybné, že složení střevní mikroflóry novorozence ovlivňuje kojení a hygienická opatření. GIT trakt osidluje *E. coli*, enterokoky a *Enterobacter*. Jakmile expandují, spotřebovávají kyslík a umožňují kolonizaci střeva anaerobními kmeny – *Bacterioides*, *Clostridium*. Slizniční a imunitní tkáň obsahují zdaleka největší kvantum imunitních buněk (80 %) různých fenotypů.

Výše uváděný probiotický kmen *E. coli strain Nissle 1917* podávali v roce 1917 k léčbě průjmů. Mezi věkem 6–12 měsíců účinkoval lépe než ostatní probiotika. Stejný kmen podávali v roce 1992. Termín probiotika pak byl poprvé použit v roce 1965 pro popis látky vylučované organismy, které stimulují růst jiných organismů.

V Plzni a zřejmě i v ČR poprvé používali *Lactobacillus* v nemocniční studii Knaifl s Vlčkem. Srovnávali hodnoty pupečnickového IgE, specifického IgE, spirometrie a klinickou diagnózu po porodu a na začátku dospívání. Hodnoty IgE skromně korelovaly s celkovým IgE a větší tendencí k senzibilizaci. Korelace ale byla malá. Vazba byla silnější tam, kde dospívající v prvních letech života nebyli v kontaktu s domácími zvířaty. Jiní používali čtyři bakteriální kmény u 1223 gravidních žen před porodem a u jejich dětí do 6 měsíců života. Ve dvou letech došlo k výrazné redukci alergických onemocnění spojených s IgE.

Mimo hygienickou hypotézu je nutné se zmínit také o hapténové hypotéze, která zdůvodňuje nárůst atopie přes mechanismy nespecifické imunity v důsledku opakovaného podprahového vystavování organismu pro něj novým molekulám, především ve věku kritickém pro navození imunologické tolerance, tj. do věku 2 let. Haptény v opakovaných podprahových dávkách nevyvolávají obvyklou kontaktněalergickou reakci (senzibilizaci), ale vedou k antigenně nespecifickému vychýlení, resp. perzistenci reakce II. typu.

Vzhledem k tomu, že naše práce začíná v novorozeneckém věku, podotýkáme, že novorozenci mají stejně jako astmatici geneticky podmíněnou nedostatečnou obranu proti infekci. Novorozenci mají kvůli nezralosti imunitního systému sníženou tvorbu IFN- $\gamma$  v důsledku snížené funkce T1 helper buněk. Opakovaný kontakt s patogeny u nich navodí selhání imunity. Zdravé dítě až ve věku kolem pěti let reaguje s převahou Th1, která vede k rychlé eradikaci virů. Také u astmatu je snížená tvorba IFN- $\gamma$  T lymfocyty a zvýšená tvorba IL-4,5. To má za následek zpožděnou eradikaci viru, poškození epitelu, přetrvávající eozinofilii a amplifikaci alergického zánětu. Dvě třetiny exacerbací astmatu vyvolávají rinoviry. Místo IFN- $\gamma$  buňky tvoří IL-4,5. IL-4 stimuluje B lymfocyty k tvorbě IgE. Při defektu imunoglobulinů vzniká současně defekt blokujících protilátek, takže snadno sliznicí procházející antigen je ve tkáních s menší intenzitou vyvázan a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. U astmatiků se ve větší míře tvoří další mediátory, zejména leukotrieny a histamin. Při virové infekci se tvoří i IL-8, následně pak dochází ke zvýšení bronchiální reaktivity, a to i u zdravých jedinců. Dnes je již ale také známo, že u dětí s potravinovou alergií brzy dochází ke vzniku alergií na inhalované alergeny.

V minulé práci jsme si dali za cíl zjištění diagnostického a léčebného postupu. Diagnostická část byla tehdy provedena z velké části, zbytek jsme dovyšetřili v následujícím období. Do této druhé části práce jsme vytipovali novorozence z rodin s pozitivní rodinnou anamnézou a hodnotami pupečnickového IgE přesahujícími rozmezí normálních hodnot. Musíme zdůraznit dlouhodobost této studie i vývoj medicínských pohledů vzhledem ke klinickým obrazům. Chceme zdůraznit nesmírnou technickou náročnost laboratorního vyšetřování dětí daného věkového období. Začali jsme je sledovat a podrobně anamnesticky i laboratorně po indikované léčbě Colinfantem vyšetřovat na hodnoty IgE, IgA, IgG. V rodinách, kde byl starší sourozenec, jsme cílenými anamnestickými dotazy (ne dotazníkovou akcí) zaznamenali všechna onemocnění staršího neléčeného sourozence.

Výsledkové hodnoty novorozeneckého pupečnickového IgE posléze léčených novorozenců, hodnoty IgE v roce a ve třech letech stejně jako hodnoty IgG a IgA v roce a ve třech letech věku jsou uvedeny v grafickém znázornění a statistickém zpracování.



### ■ Chce se váš pacient léčit v zahraničí a od vás žádá radu?

**Řekněte mu, že musí mít předem dost vlastních peněz a pohlídat si spoustu chytáků.**

Média informují, že se teď čeští pacienti mohou vyjet léčit na zahraniční pracoviště podle svého vlastního výběru. Není to však až tak jednoduché. Od 22. dubna platí v Česku evropská směrnice, podle níž může pojištěnec ze svého rozhodnutí vyjet do jiné členské země EU za ambulantní i lůžkovou lékařskou péči. Co to obnáší, vyplývá z informací VZP a Centra mezinárodních úhrad:

**Placení:** Pojištěnec si musí všechnu péči v zahraničí sám zaplatit a až doma mu ji pak jeho zdravotní pojišťovna proplatí do 30 dnů, u složitých případů do 60 dnů. Musí tedy předložit doklady: originály všech faktur a lékařské zprávy.

**Limity proplacení:** Pojišťovna refunduje jen do výše „české ceny“, tedy do sumy, kterou by stála stejná léčba v Česku. Pokud léčba stojí víc, dostane pacient zpět jen část ceny.

**Limity výběru léčení:** Zdravotní pojišťovny budou refundovat jen takovou léčbu, která je hrazena i v Česku, nikoli léčení, které se třeba v zahraničí už nabízí, ale u nás ze zdravotního pojištění hrazeno ještě není.

**Další chytáky:** Léčba musí být indikována lékařem v Česku, který má odbornost přesně odpovídající onemocnění. Některá léčba je v Česku vážná na předchozí schválení revizním lékařem a totéž platí i pro její refundaci, pokud by byla uskutečněna v zahraničí. Pravidla pro léčení v zahraničí platí jen v členských zemích EU, nikoli ve Švýcarsku, Norsku, Lichtenštejnsku či na Islandu.

**Poznámka:** Tzv. nezbytná péče bude i nadále hrazena do výše, jakou jí mají hrazenou pojištěnci států, kde je péče čerpána. Český pacient platí spoluúčast stejnou jako místní lidé a náklady na péči si přeučtují zdravotní pojišťovny. Podobně zůstává v platnosti dosavadní praxe v případě zahraniční péče, kterou předem schválila zdravotní pojišťovna – pacient platí v hotovosti jen případnou spoluúčast, zbytek platí rovnou pojišťovna.

**Závěr:** Je zřejmé, že pokud se chce váš pacient léčit v zahraničí, doporuďte mu, ať se radší přece jen předem poradí se svou zdravotní pojišťovnou. Další informace ze zákona poskytuje Centrum mezinárodních úhrad ([www.cmu.cz](http://www.cmu.cz)).

Zdroj: *doktorvlach.cz*, 28. 4. 2014

Zároveň jsme skupinu námi neléčených sourozenců z daných rodin po důkladném anamnestickém zpracování použili jako srovnání výskytu alergie a nemocnosti. Naše původní dotazy při kontrolách směřovaly na výskyt alergie s cílem zjistit efekt Colinfantu a vyšetřit hodnoty IgE. Proto jsme nejdříve všechny děti laboratorně vyšetřili v roce věku. Normalizace hodnot IgE v daných skupinách po léčbě nastala u 91,3 % a 87,7 % pacientů.

Tehdy jsme ještě důkladně laboratorně nesledovali nemocnost, proto jsme jen při opakovaných informacích rodičů, že tyto děti nejsou prakticky vůbec nemocné, a to i při nemocnosti celé rodiny, zprůměrovali nabírané hodnoty IgG v roce věku u léčených pacientů. Byli jsme překvapeni prakticky všude normálními hodnotami IgG, dokonce ve třech letech odpovídajícími laboratorním hodnotám a ve čtvrtém roce těsně pod udávanými laboratorními hodnotami, ale s hodnotami vyššími než kontrolní skupina zdravých dětí z jiné ambulance. Tím jsme do jisté míry dávali za pravdu sdělením rodičů.

Oproti výše uvedeným zahraničním autorům podotýkáme, že jsme v práci u naší velké skupiny používali fyziologický bakteriální kmen *E. coli*, a to již od 10. dne věku života, vycházejíce z rodinné pozitivní alergologické anamnézy a ze zvýšených hodnot pupečnickového IgE, a následně klinické i laboratorní kontroly v dalších letech. Nevycházeli jsme z dotazníků, ale z ambulantních kontrol.

Ohledně dalších možností, jako je stav výživy hypoalergenními mléky a redukce rizika vzniku alergického onemocnění, se nedospělo k jasným efektům. Je však přijímána varianta o podávání hypoalergenních mlék (HA) do 4. měsíce života u disponovaných jedinců. Racionální využití HA mléka může být spíše v léčbě alergie. Aplikace HA mlék byla doporučena již v roce 2008 ESPGHAN. Na druhé straně autoři uvádějí, že výsledky nejsou přesvědčivé. My jsme u dané skupiny, která dostávala Colinfant, podávali v případě dokrmu jednotně HA Bebu nejméně do 4. měsíce věku.

V další vytvořené skupině léčených dětí, tj. v letech 2009–2012, jsme již sledovali hodnoty IgE z pupečnicku, ale spolu s tím i IgG a IgA v roce a ve třech letech. Dále jsme do kruhového grafu zaznamenali údaje o dětech léčených Colinfantem i jejich neléčených sourozenců z hlediska alergie i nemocnosti. Rozdílů jsou velmi nápadné

a i potvrzují původní četné anamnestické údaje rodičů.

### ■ Závěr

1. Autoři vycházejí z předchozí otištěné práce, ze které bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou, posunuje se do prvních let života a dokonce se objevuje možnost korelace hodnot s pylovým kalendářem. Také dominující role obou rodičů byla statisticky významná.

2. To nás vedlo spolu s hodnotami pupečnickového IgE u novorozenců v těchto rodinách k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu probiotikem Colinfant, nepatogenním kmenem *E. coli*.

3. Domníváme se, že efekt této léčby je patrný na předložených laboratorních výsledcích v porovnání s kontrolními skupinami.

4. Tyto výsledky se týkají nejen hodnot IgE, ale i IgG a IgA.

5. Nápadným zjištěním je velmi významný rozdíl v nemocnosti obou sledovaných skupin.

6. Prakticky nulové negativní vedlejší účinky léčby nás vedou k možnosti plošného využití daného přípravku v rámci rozšíření péče o nejmladší populaci.

Autoři děkují za spolupráci členům porodnicko-gynekologického oddělení vedeného prim. MUDr. Z. Kestřánkem. Zároveň autoři děkují MUDr. Uličáři a spolupracovníkům z firmy Dyntec Terežín za distribuci přípravku Colinfant. Za cenné rady děkují autoři doc. MUDr. Petru Panznerovi, CSc., přednostovi Oddělení klinické imunologie a alergologie FN v Plzni. Jednotlivé výsledky práce byly opakovaně prezentovány na pediatrických kongresech v ČR a SR s mezinárodní účastí v letech 2000, 2001, 2002, 2006 a 2008 a na Europaediatrics Congress v roce 2008 v Istanbulu.

### ■ Literatura

1. Liška J et al. Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie. *Alergie*. 2012;14(1):25–33

Další literatura u autora.  
e-mail: [mudr.jiri.liska@seznam.cz](mailto:mudr.jiri.liska@seznam.cz)

# Léčba novorozenců s vysokými hodnotami IgE v pupečnickové krvi perorálním osídlením nepatogenním *E. coli* a jeho vliv na imunitní systém a zabránění rozvoje alergické reakce

Treatment of newborn children with high umbilical IgE with per oral colonisation with non-pathological *E. coli*, it's effect on the immune system and reduced allergic reactions

JIŘÍ LIŠKA<sup>1</sup>, VÁCLAV HOLEČEK<sup>1</sup>, ŠTĚPÁNKA SOBOTOVÁ<sup>1</sup>, MONIKA KEPKOVÁ<sup>1</sup>, FRANTIŠEK ŠEFRNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mulačova nemocnice, Plzeň

<sup>2</sup>Oddělení zdravotního účtování a statistiky FN Plzeň

## SOUHRN

V předchozí naší otištěné práci (21) jsme prezentovali výsledky 12leté studie (1998-2010), ze které jsme předložili určité závěry. Jednalo se o poměrně rozsáhlý soubor, ve kterém bylo vyšetřeno 3619 vzorků pupečnickové krve. Náběry i vyšetření byla prováděna celoročně. Dospěli jsme k několika výsledkům, ze kterých bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou, (statistická významnost na hladině 1%). První příznaky alergických chorob se posunují do prvních let života. Ukázaly se rozdíly v sezónnosti, které jsou v práci graficky dokumentovány v jednotlivých letech. Došli jsme k hodnocení, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem, spolu s rodinnou anamnézou, k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Použili jsme preparát Colinfant Newborn, perorální vakcinu, probiotikum. Jedná se o lyofilizovaný nepatogenní kmen *E. coli*. Uvedený kmen jsme podávali od 10. dne věku 3× v týdnu po dobu jednoho měsíce.

Z výsledků v letech 2005–2008 vyplývá, že u léčených pacientů s primárně zvýšenými hodnotami IgE z pupečnickové krve se tyto hodnoty v roce věku v séru kojenců v 90 % zcela normalizovaly. Vzhledem ke zjištěné anamnesticky udávané minimální nemocnosti těchto pacientů jsme začali vyšetřovat i hodnoty IgG v roce věku a porovnávali s kontrolní skupinou. Zjistili jsme, že tyto hodnoty se v průměru v daných letech po léčbě také pohybovaly v normě. V letech 2009–2012 jsme zjišťovali vliv léčby na hodnoty imunoglobulinů IgE, IgG, ale i IgA a celý tento další soubor statisticky zpracovali v 1 roce a ve 3 letech věku. Statisticky v 1. roce věku i ve 3. roce věku spolu koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1%.

Z výsledků je patrné, že léčba Colinfantem mohla mít pozitivní účinek v tom smyslu, že výsledné IgE se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí. Hodnoty se v čase změnily u léčených mezi 1. a 3. rokem na hladině významnosti 1%. IgG a IgA u léčených byly v mediánu zcela v hodnotách normality. Tomu odpovídá zcela zanedbatelná následná nemocnost novorozenců léčených uvedeným probiotikem. Na druhé straně u léčených se IgE mezi 1.–3. rokem zvýšilo v mediánu jen na zcela normální hodnoty v rámci předpokládaného protialergického efektu léčby.

V období po 1 roce byly nalezeny významné korelace pupečnickového IgE se sérovým IgE, IgG, IgA a korelace sérového IgG s IgA.

Velmi příznivý efekt terapie na nemocnost dětí oproti kontrolní skupině v předem definovaném souboru stejného věkového období je graficky znázorněn.

*Keřová slova:*

## SUMMARY

In our previous publication (21) we presented the results of our 12 year study (1998–2010) which produced several conclusions. A total of 3619 samples of umbilical blood were investigated throughout each calendar year. We demonstrated that allergy is very strongly associated with a positive family history. The first signs of allergic disease appear during the early years in life. The seasonal differences were presented graphically for each year. We arrived at the conclusion that the presence of high IgE levels and a positive family history may be reasons for intervention, including the use of agents influencing gastrointestinal flora. We used Colinfant Newborn, a lyophilised nonpathological strain of *E. coli*, as an oral vaccine/probiotic. This was given from the 10th day of life, three times weekly for one month.

In years 2005–2008, in patients with a primary elevation of umbilical IgE, 90 percent of treated children achieved normal serum values of immunoglobulin. Because of the low morbidity in these children, we investigated IgG levels at one year of age and compared the values with the control group. These levels were similar to the control group. In years 2009–2012 we demonstrated the effects of treatment on levels of IgE,

IgG, and IgA, with statistical evaluation being performed for ages one year and three years of age. The IgG and IgA levels correlate well with each other in the first and third years of life to a level of 1 0/00

From our results, it is apparent that treatment with Colinfant may have a positive role in affecting circulating levels of IgE to a statistically significant level. The levels changed during the first and third years of life. IgG and IgA median levels in treated children were the same as in the control group. ... On the other hand, the IgE levels at one and three years of life was raised to otherwise normal levels within the realms of anti-allergic effects of therapy.

After the first year of life there was significant correlation of umbilical IgE and serum IgE, IgG, IgA and correlations of serum IgG with IgA. The highly beneficial effect of therapy on potential morbidity compared with the control group in a previously defined cohort is demonstrated graphically.

*Key words:*

## Úvod

Tato práce je ve shodě s řadou studií posledních let, které věnují zásadní pozornost střevní sliznici a s ní spojené slizniční imunitě, která má zásadní důležitost v prevenci alergií (9,14,19,33,54). Nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům se považuje za faktor, který přispívá k rozvoji alergie. Vzhledem k tomu, že se rodí novorozenci s nezralou specifickou imunitní odpovědí je potřeba pro dozrání imunitní odpovědi dodat systému podněty. Probiotické bakterie představují tyto podněty pro náš imunitní systém bezpečně. Pro pozdější manifestaci alergických, ale i autoimunitních chorob je zásadní zdravá střevní sliznice a vyváženost imunitního systému nutností. Důležité je navození tzv. orální tolerance především v prvním půlroce života, kdy je nutná stimulace imunitního systému a to právě pod vlivem probiotik. Specifická imunitní odpověď s převahou Th2 je vyvinuta již při porodu.

Smysl léčby Colinfantem spočívá v přesměrování imunologické paměti alergického charakteru od Th 2 fenotypu ještě dříve než je ustavena imunitní odpověď na antigeny ze zevního prostředí. U atopiků s klinickými příznaky onemocnění dochází jinak k převaze Th2 imunitní odpovědi, zatímco u neatopiků je tento typ odpovědi potlačován ve prospěch Th1. Rozdíl tedy není v míře expozice, ale ve způsobu jak na ni imunitní systém různých jedinců odpovídá. Imunitní systém v časném novorozeneckém věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro stimulační a regulační funkce imunitního systému. Imunoterapie alergických nemocí snižuje tvorbu IL4 alergen specifickými Th2-lymfocyty a zvyšuje tvorbu IFN-Gama specifickými Th1-lymfocyty.

Většina buněk imunitního systému je lokalizována pod povrchem sliznic, kde tvoří slizniční lymfatický systém. Ten představuje největší část imunitního systému organismu, neboť zahrnuje 80 % imunokompetentních buněk v těle. Tento systém chrání před průnikem patogenních mikroorganismů, ale i před rozvojem sebepoškozujících zánětlivých systémů. Fyziologická bakteriální mikroflora vytváří ochrannou bariéru. Při jejím optimálním složení dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci cytokinů, navozujících vznik aktivní tolerance neškodných alergenů. Negativní opakovaná aktivace Th2-lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních IgA a prostřednictvím IL4 pak tlumí aktivitu Th1-lymfocytů. Indukce IgE odpovědi je

závislá na interakci mezi T-buňkami a antigen prezentujícími buňkami. Střevní mikroflora vykazuje velkou metabolickou aktivitu, která je shodná s aktivitou jater, které jsou neaktivnějším orgánem těla.

Mezi probiotické kmeny jsou řazeny desítky specifických druhů, z nichž většina patří mezi mléčnou kyselinu produkující laktobacily a bifidobakterie.

Probiotika tvoří specifické látky, které ovlivňují růst množení a adhezi ostatních mikroorganismů. Dále mají vliv na pokles lumenálního pH, zvýšení tvorby mucinu a modulace. Terapie probiotiky tedy představuje možnost zavést speciálně vybrané mikroby do gastrointestinálního traktu. Mikroby musí zůstat životaschopné během jejich produkce, skladování a průchodu GIT traktem. Stimulace imunitního systému cestou interakce s tool-like receptory na dendritických buňkách. Touto cestou dochází k regulaci Th1 odpovědi a inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů. Dále probiotika jsou schopna podpořit přirozenou imunitu prostřednictvím tvorby antimikrobiálně účinných peptidů označovaných jako defensiny.

## Metodika používání

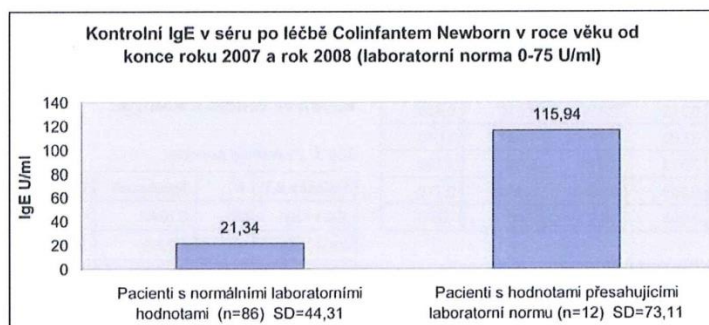
Pro podávání probiotik bývá typické, že terapeuticky účinná dávka se liší v závislosti na druhu použitého bakteriálního kmene, složení přípravku a věku pacienta. Zcela obecně je možné říci, že doporučená denní dávka pro kojence je 0,5–1, pro děti 5–10 a pro dospělého 10–20 miliard CFU, tj. kolonií tvořících jednotek. Zajímavým zjištěním bylo pozorování, že doba podávání probiotika neměla prokazatelný vztah k terapeutickému účinku.

Experimentálně bylo prokázáno, že podaný kmen krátce po narození má lepší podmínky pro uchycení. Tvorbu protilátek lze prokázat již za 14 dní po prvním osídlení a to i tehdy, bylo-li provedeno krátce po narození. Na možnost prenatální sensibilizace se myslí proto, že jsou nacházeny v pupečnickové krvi vysoké hodnoty IgE.

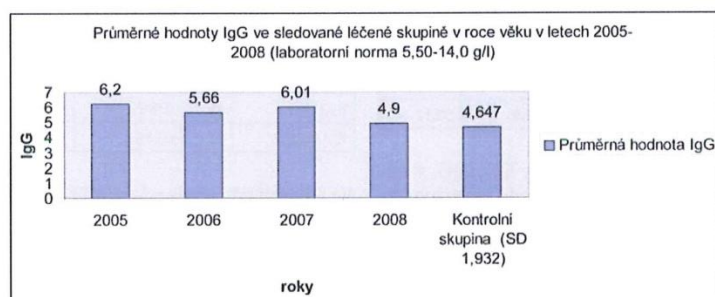
V našem sledovaném a léčeném souboru jsme používali nepatogenní kmen E. Coli.

Colinfant Newborn – nová perorální vakcína – probiotikum.

Jedná se o živou perorální vakcínu. Jde o lyofilizovaný nepatogenní kmen E. coli. Je schopen vytěsnit osídlení střevního traktu patogenními kmeny. Vyroben Ústavem sér a očkovacích látek, 12 lahvíček. Každá lahvíčka obsahuje Escherichia coli sérotyp 083:K24:H31 min.  $0,8 \times 10^9$  Je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflory. Vakcína byla registrována v SÚKL v roce 1997 pod registračním číslem



Graf 1



Graf 1

59/762/97-C. Použití kmene a příprava vakcíny byly patentovány v roce 1989 pod číslem 2645722. E. coli, ze kterého je připravována živá vakcína je nepatogenní kmen s výše uvedeným serotypem. Je uložen ve sbírce typových kmenů pod číslem AO34/86. Je vysoce selektovaný, citlivý na běžná antibiotika, netvoří enterotoxin a nemá plasmidu z donorové kultury je asi 100× nižší než u kontrolního standardního kmene E. coli. Nepatří mezi žádné ze skupiny enteropatogenních E. coli. Jeho výborná kolonizační schopnost je zajištěna i přítomností fimbrií prokázaných hemaglutinací. Po perorální aplikaci suspenze byla prokázána translokace mikrobů pouze do mesenterálních uzlin, ale ne ve slezině, játrech a plicích. Kmen má výborné kolonizační vlastnosti, obsazuje receptory střevní sliznice, brání adhezenci patogenů a vytlačuje přítomné enteropatogenní kmene. V testech byl kmen pro bezmikrobní selata zcela nepatogenní. Indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je u novorozenců zvláště významná, protože nahrazuje zčásti deficit tohoto imunoglobulinu. Po osídlení novorozenců vymizí jejich bakteriální patogeny ze stolice, krku i nosu. Vakcinační kmen přetrvává ve střevním traktu osídlovaných dětí po dobu 16 týdnů, ale byl prokázán i po několika letech. Přítomnost kmene stimuluje tvorbu specifických i nespecifických protilátek, prokazatelnou ve střevním traktu, ve slinách i v séru. Ukazuje se, že specifické kmene střevní flóry mohou podporovat ochranu hostitele proti senzibilizaci i proti vzniku

alergií, ale i proti infekci. Vakcína je dodávána v balení 1 × 12 lahviček. Toto balení je určeno pro 1 pacienta ve věku do jednoho roku bez ohledu na jeho hmotnost. Je zásadně podáváno perorálně, obsah lahvičky se rozpustí v 1 ml tekutiny (voda, čaj), přenese se do nápoje a dá se dítěti vypít. Podává se 3 × týdně 1 lahvička po dobu 4 týdnů. Po dobu aplikace antibiotik se podávání přerušuje. Nedoporučuje se podávat vakcínu v akutním stadiu průměrných onemocnění. Výdej je vázán na lékařský předpis pediatra. T. č. jej vyrábí společnost Dyntec v Terezíně.

### Soubor a výsledky

V první skupině léčených pacientů s vysokým pupěčnickovým IgE a následně kontrolovaných v letech 2005–2007 / porovnávaných s laboratorní normou / jsme zjistili normalizaci hodnot v roce věku u 106 ze 116 pacientů. Průměrná hodnota u těchto 106 pacientů byla 25,7 U/ml. Další skupina léčených pacientů vyšetřena v letech 2007–2008. Graf 1.

Z toho je patrné, že normalizace hodnot IgE v dané skupině po léčbě nastala u 87,7% pacientů.

Vzhledem k tomu, že jsme na základě podrobné anamnézy začali zjišťovat velmi nápadně sníženou nemocnost léčených pacientů, zpracovali jsme u všech těchto pacientů průměrné hodnoty IgG (graf 2). Výsledky srovnány s kontrolní skupinou 25 zdravých dětí. Překvapujícím pro nás byla průměrná hodnota IgG ve sledovaných letech.



Tab. 1: Základní statistiky kontroly

Položka	N	Průměr	Medián	1. kvart	3. kvart
IGG1	20	4,258	3,640	3,060	5,700
IGA1	20	0,345	0,355	0,210	0,430
IGE1	14	31,00	7,47	3,63	41,40
IGG3	35	7,373	7,530	5,980	8,350
IGA3	35	0,655	0,600	0,460	0,770
IGE3	35	24,98	14,90	5,40	40,80

Tab. 2: Základní statistiky nemocní

Položka	N	Průměr	Medián	1. kvart	3. kvart
PUP_IGE	136	3,098	2,365	1,790	3,560
IGG1	133	4,728	4,550	3,620	5,730
IGA1	136	0,473	0,260	0,200	0,380
IGE1	135	37,54	8,87	3,96	21,50
IGG3	67	6,964	6,870	5,690	8,160
IGA3	67	0,644	0,620	0,460	0,760
IGE3	66	59,49	17,09	7,65	60,12

Statistické zpracování výsledků IgE, IgA, IgG, v následujících letech 2009–2012 u po porodu léčených pacientů s vysokým pupečnickovým IgE a jejich kontroly v 1. roce a ve 3. roce věku ve srovnání s kontrolní skupinou 53 zdravých dětí z nefrologické ordinace.

Byla zamítnuta hypotéza normality rozložení pomocí šikmosti a špičatosti.

Proto byly dále použity neparametrické metody.

#### Porovnání nemocných versus kontroly:

Tab. 3: Wilcoxonův test nepárový (nemocní vs kontroly)

Položky	N1	N2	P
IGG1	20	133	20.5
IGA1	20	136	17.5
IGE1	14	135	99.2
IGG3	35	67	29.4
IGA3	35	67	65.4
IGE3	35	66	18.2

Relativně nejbliže k významnosti mělo IGA v roce věku

#### Vývoj v čase u nemocných:

Tab. 4: Wilcoxonův test párový po 1. roce vs po 3 letech

Položky	Poc. Mer	P
IGG1 IGG3	61	0.0 +++
IGA1 IGA3	62	0.0 +++
IGE1 IGE3	63	0.0 +++

Hodnoty se v čase změnily u nemocných mezi 1–3 rokem a to na hladině významnosti 1 ‰

IgG u nemocných se zvýšilo v mediánu z 4,55 na 6,87

IgA u nemocných se zvýšilo v mediánu z 0,26 na 0,62

IgE u nemocných se zvýšilo v mediánu jen z 8,87 na 17,09. Hodnoty zůstaly zcela v normě.

U kontrol nebyl vývoj v čase testován pro malý počet kompletních dvojic měření.

#### Korelace veličin u kontrol:

Tab 5: Pořadová korelace

Položky X,Y	N	Spearman	P	Kendall	P
IGG1 IGA1	20	0.7040	0.2 ++	0.5105	0.2 ++
IGG1 IGE1	14	0.2992	28.1	0.1758	38.1
IGA1 IGE1	14	0.2227	42.3	0.1429	47.7

IGG v roce věku koreluje s IGA v roce věku na hladině P = 1 ‰

Tab 6: Pořadová korelace

Položky X,Y	N	Spearman	P	Kendall	P
IGG3 IGA3	35	0.1973	25.0	0.1395	23.9
IGG3 IGE3	35	0.0003	99.9	0.0118	92.1
IGA3 IGE3	35	0.0482	77.9	0.0454	70.1

Ve 3 letech již nebyla u kontrol nalezena žádná statisticky významná korelace.

#### Korelace veličin u nemocných:

Tab 7: Pořadová korelace

Položky X,Y	N	Spearman	P	Kendall	P
PUP_IG IGG1	128	0.2330	0.9 ++	0.1658	0.5 ++
PUP_IG IGA1	131	0.2684	0.2 ++	0.1830	0.2 ++
PUP_IG IGE1	130	0.1729	5.0 +	0.1193	4.4 +
IGG1 IGA1	132	0.5203	0.0 +++	0.3853	0.0 +++
IGG1 IGE1	130	0.0887	31.4	0.0582	32.6
IGA1 IGE1	133	0.0720	40.9	0.0491	40.2

Statisticky významně v 1 roce věku u nemocných spolu koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 ‰, korelace kladná, přímo úměrná.

V 1. roce věku pupečnickové IgE koreluje se všemi sérovými imunoglobuliny, nejvíce s IgG a IgA .

Tab. 8: Pořadová korelace

Položky X,Y	N	Spearman	P	Kendall	P
IGG3 IGA3	67	0.6000	0.0 +++	0.4197	0.0 +++
IGG3 IGE3	66	0.0916	46.0	0.0643	44.5
IGA3 IGE3	66	0.0626	61.4	0.0434	60.7

Ve 3 letech statisticky významně koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 ‰

#### Vysvětlivky:

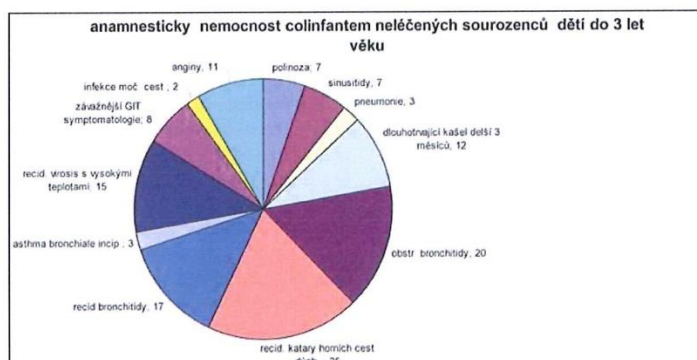
IgE1, IgA1, IgG1 jsou hodnoty v 1. roce věku

IgE3, IgA3, IgG3 jsou hodnoty ve 3. roce věku.

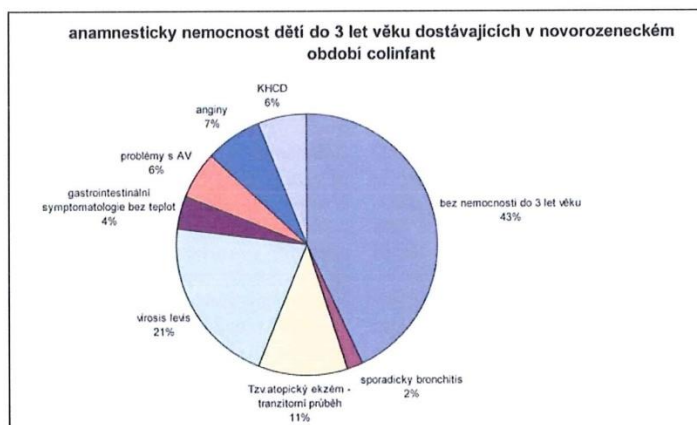
P – výsledná pravděpodobnost

Pup IgE – pupečnickové IgE

N – počty pacientů



Graf 3



Graf 4

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

Efekt léčby v novorozeneckém věku pomocí daného preparátu z hlediska nemocnosti jsme znázornili při porovnání přeléčené skupiny 142 dětí v porovnání s kontrolní skupinou 73 sourozenců. Podotýkáme, že z hlediska heredity se jedná o stejnou rizikovou skupinu monitorovanou ve stejném věkovém období. Prakticky nulová závažná nemocnost léčených dětí se vymykala možnosti kvalitního statistického zpracování.

Graficky znázorněná nemocnost Colinfantem léčených dětí versus kontrolní skupina neléčených sourozenců.

#### Diskuze

U malých dětí trpících alergiemi jsou rovněž ve střevech odlišné druhy bifidobakterií. Při narození je v těle přítomno také malé množství B buněk, které produkují

IgA, jejich počet ve věku jednoho roku dítěte dosáhne počtu jako u dospělých jedinců. Složení mikroflory typické pro dospělého jedince se dosahuje ve věku 1–2 let.

V naší předchozí publikaci (21) jsme po vyšetření 3619 vzorků pupečnickové krve dospěli k závěru, že hladiny imunoglobulinu E v pupečnickové krvi jsou predikací pro alergická onemocnění do 18 měsíců věku či do 6 let věku. Ukázaly se rozdíly v sezónnosti. Dále bylo patrné, že alergie se sdružuje s rodinnou anamnézou, první příznaky se posunují do prvních let života. Dokonce se jeví, že ovlivnění budoucího novorozence alergií je uvažováno v posledních 6 týdnech gravidity. I v našem souboru jsme měli skupinu novorozenců- mladších sourozenců, kteří byli porozeni v zimních měsících a jejich hodnoty pupečnickového IgE byly zcela v mezích normy proti prvním, starším sourozencům užívajícím Colinfant. Tito starší sourozenci se narodili stejným rodičům, ale v zimních měsících. Na toto jsme právě již upozorňovali v 1. práci. Z výsledků bylo možné vyzdvihnout také dominující roli obou rodičů při vzniku alergie. Tyto výsledky byly

významně na hladině 1 promile. Proto jsme dospěli k závěru, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flory. Možnosti predikce alergie byly uváděny i v pracích (39), který se pokoušel o předpověď z amniotické tekutiny u 83 dětí. Hodnoty IgE se pohybovaly od 0,5 do 5,9 IU ml., podezřelé se jim jevíly hodnoty již od 0,9 IU/ml. Ale z amniotické tekutiny hodnotili jasně patologickými vyšší hodnoty až přes 8 IU/ml (13), amniotická tekutina obsahuje ale velmi nízké hodnoty IgE, sensitivity těchto údajů je velmi nízká. Dále (28) první demonstroval vrozenou sensibilizaci in utero a toto ve svých pracích uvádějí další. Incidence tohoto fenomenu však nepřekračuje 2 % všech novorozenců. (18). Je známo, že predikce IgE je pod genetickou kontrolou. (3). Ještě musíme zopakovat, že tvorba IgE začíná u lidského foetu v játrech a plicích v 11 týdnech a ve slezině v 21 týdnech (31). Většina novorozenců má velmi nízké nebo minimálně detekovatelné hladiny IgE v pupečnickové krvi. Jiní autoři uváděli (4) prediktivní hodnoty IgE v pupečnickové krvi jako rizikový faktor pro novorozence pro vývoj včasného začátku atopie. Matsumura nicméně uzavírá, že nejlepším prediktorem alergie u novorozence je pozitivní rodinná historie a elevace pupečnickové IgE. Všimli si také druhu a začátku alergie. Uváděli, že alergie se rozvinula u 29 % dětí, které měly pozitivní rodinnou historii alergie. Z těchto pak v roce věku mělo alergii diagnostikováno 23 % dětí. Z toho bylo 40 % kojeno. Také si ověřovali pomocí pupečnickového IgA potenciální kontaminaci s mateřskou krví stejně jako my. Je známo, že u novorozenců je primárně posunutá nerovnováha mezi Th1 a Th2 lymfocyty ve prospěch Th2 a tím je i vyšší možnost atopické sensibilizace. Dále se literárně také uvádí, že podání antibiotik do šestého měsíce života zvyšuje incidenci astmatu 2,8×, podání širokospektrého antibiotika až 9×!

V druhé části naší práce jsme se již zabývali literárně uváděnými zkušenostmi s nejčastějšími probiotiky a našimi zkušenostmi s preventivní intervencí mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu a to speciálním probiotikem. Probiotika jsou podle definice WHO z roku 2001 živé organismy, převážně lidského původu, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Osídlení slizničních povrchů určitým typem bakterií má příznivé účinky nutriční i imunologické. Dokáží snížit adhezi patogenů na povrch střeva. Jejich působením dochází ke snížení počtu intraepiteliálních regulačních lymfocytů T ve střevní sliznici. Na enterocytech zvyšují expresi MHC molekul II. třídy, čímž zvyšují jejich schopnost prezentovat antigen. Podle některých prací významně stimulují syntézu slizničního IgA. Pravděpodobně se jedná o určitý typ polyklonální stimulace (12). O prvních variantách probiotik se zmiňuje Mečnikov (27), který v roce 1907 zdůraznil význam střevní mikroflóry a její důležitou roli při obraně organismu. Již tehdy konstatoval, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje zdravotní stav. Proces stárnutí dával do souvislosti s chemickou intoxikací mikrobiální florou tračnicku. Je dobré připomenout, že povrch zažívacího ústrojí činí 150 m<sup>2</sup> až

zažívací ústrojí obsahuje 10/14 živých bakterií. Možnost ovlivnění střevní flory probiotiky je uváděna v dalších pracích (2,7,8,10,19,22,30,45,49).

Pro zařazení mezi probiotika musí tato splňovat celou řadu kritérií. Samotná genová typizace byla prováděna zatím jen u 3 druhů probiotik. Jedná se o E. coli typ Nissle a E. coli typ O83/preparát Colinfant/, dále Lactobacillus casei spec. Rhamnossus-Lactobacillus GG a Saccharomyces boullardi. Tento poslední ale není humánního původu a tak nepatří mezi pravá probiotika. Bakteriální kmeny musí být izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládaný příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do zažívacího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií. Tyto musí mít schopnost přežít v zažívacím ústrojí a být dostatečně metabolicky aktivní. Výše uvedený typ E. coli Nissle 1917, který je dnes součástí preparátu Mutaflor, je právě toto nepatogenní E. coli. Má profylaktické účinky v remisi ulcerosní colitidy srovnatelné s mesazalazinem. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenními E. coli byl registrován literárně pouze meteorismus a u vlastního našeho Colinfantu 1× nadýmání a 1× vyrážka, která po ukončení vymizela. Nelze však v tomto případě vyloučit problematiku při distribuci a skladování. Jinak se nikdy nic neobjevilo. Schopnost probiotik k ovlivnění střevní permeability ve vazbě na potravinové alergie studoval (36). Další výsledky např. u zvířat vedou k pohledu, že specifické kmeny střevní mikroflory podporují ochranu hostitele i proti sensibilizaci (40). Je nutné v této souvislosti podotknout, že dospělý typ střevní mikroflory je ustaven ve věku kolem 2 let. V dnešní době je již známo, že alergie se manifestuje v prvních 3 letech gastrointestinálními příznaky, atopickým ekzémem a mnohdy již i respiračními potížemi (36). Z hlediska výskytu a průběhu respiračních onemocnění existují studie, které neprokazují pozitivní vliv probiotik, na druhé straně studie prokazující určitý i statisticky signifikantní efekt na snížení výskytu respiračních onemocnění. Stejná situace je u alergického astmatu, kde podávání probiotik nevedlo k efektu, na druhé straně u alergického rýmy podávání probiotik v batolecím a předškolním věku vedlo ke snížení výskytu. Další ve studii podával různá probiotika a sledoval vliv na respirační infekce. Zjistil však jen zkrácení doby a redukcí tíže onemocnění, probiotika neredukovala incidenci. Stejná situace je popisována u atopického ekzému (15,16) Jiní uvádí profit z probiotik u atopického ekzému (20), ale na druhé straně další uvádí selhání probiotik (5,45). V této souvislosti si musíme uvědomit, že probiotika pro by měla být pro klinické použití izolována z lidských materiálů, protože probiotika ze zvířecích materiálů mohou v sobě skrývat faktory rizikové pro lidský organismus. Ačkoliv běžně nepředstavují pro zdravého člověka žádné riziko, u oslabených pacientů byly pozorovány ojediněle různé nežádoucí účinky (46). Jedná se o děti, které jsou imunosuprimovány, trpí chronickými onemocněními nebo mají zavedenu nějakou invazivní medicínskou pomůcku. Dokud tedy budou dostatečně eliminována bezpečnostní rizika pro velmi vážně nemocné děti, neměla by být u nich léčba

probiotiky zaváděna. Sem patří i stavy po chemoterapii, po ozařování, po biologické léčbě autoimunitních onemocnění, po orgánových transplantacích či po transplantacích krvetvorných buněk (27).

Na druhé straně další autoři (1) tvrdí, že probiotika mohou redukovat incidenci IgE asociovaného ekzému u kojenců. O antiinfekčním efektu probiotik je však opakovaně referováno a jedním z mechanismů může být i nespecifická stimulace imunity. Fukushima (10) referoval o tom, že při podávání bifidobakterií fekální hladina IgA a i anti-poliiovirus IgA byla během příjmu signifikantně vyšší než před příjmem. Toto zvýšení hladiny lokálního IgA může přispívat ke zvýšení mucosální rezistence proti GIT infekci. Některá bifidobakteria stimulují produkci IgA *in vitro*. Při podávání bifidobakterií se jejich počty ve stolici evidentně zvýšily, ale po zastavení jejich podávání se stav vrátil. Z možného působení probiotik je vhodné uvádět úpravu střevní permeability a stimulaci imunitní odpovědi na patogeny a to zvýšením produkce sekrečního IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL 10, TGF-Beta (52). Při optimálním složení střevní mikroflory totiž dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci cytokinů, navozující vznik aktivní tolerance neškodných antigenů. Opakovaná aktivace Th2-lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních imunoglobulinů IgA. Prostřednictvím IL4 tlumí aktivitu Th1-lymfocytů. Tímto indukují převahu regulačních lymfocytů Th3, které snižují systémovou zánětlivou odpověď. Pro navození tolerance má velký význam i způsob prezentace antigenu imunitnímu systému prostřednictvím APC. Na druhé straně nemáme zprávy o věrohodných studiích o tom, že probiotika v kojenecké mléčné výživě by mohla být škodlivá. Další z efektů léčby probiotiky se uvádí stav, kdy u dráždivého tračnicku popisoval výraznou redukci předchozí nadýmavosti. Rovněž další uvádějí nesporný vliv probiotik na prevenci GIT problémů u kojenců a na rychlejší úpravu klinických obrazů rotavirové infekce (38).

Autoři zabývající se problematikou novorozeneckého věku konstatují, že podávání probiotik matkám před porodem a následně 6 měsíců po porodu dětem nepřineslo žádoucí efekt na prevenci alergického onemocnění. Všichni však v těchto pracích podávali lactobacilly, většinou rhamnosus, reuteri nebo b.lactis. Někteří podávali prebiotické oligosacharidy v prvních 6 měsících věku a jejich protektivní působení zdůvodňovali právě podáváním již od prvních dnů života. K prevenci nekrotisující enterokolitidy u dětí velmi nízké porodní váhy používali u nás v Brně v roce 2003 (43) a nyní uvádí další (8). Podporu některým hypotézám poskytují práce např. o výhodnosti včasné expozice kravského mléka ve smyslu protekce proti IgE (17). Mezinárodní společnosti zabývající se výživou doporučují v případě nerealizovatelného kojení hydrolyzovanou kojeneckou výživu s ověřenou sníženou alergenicitou do 4. měsíce věku nebo částečně hydrolyzovaná mléka. Již nedochází k výraznějšímu omezování alergenů, jak u matek v době těhotenství a kojení, tak ve výživě dětí po 6. měsíci života. U matek při předpokladu, že nebudou kojít, jsme doporučovali v prvních 4 měsících

stravu s předpokládanou hypoalergenicitou (v celém souboru jednotně HABeba).

Další uvádějí (47), že nejintenzivnější kolonizace nastává v prvních měsících života, klesá v roce a pak zůstává do dospělosti. Jiní uvádějí, že opožděná kolonizace kmeny po císařském řezu může souviset s některými údaji o rozvoji atopického ekzému, který se ve 2/3 vyskytne do 2 roku života. Na druhé straně studie ukazují, že z podávání probiotik profitovaly především děti s IgE zprostředkovanou alergií (4). Vlivem probiotik, která, jak je známo, usnadňují rovnováhu mezi Th1 a Th2 prostřednictvím regulačních buněk, zvýšení produkce IgA a IL 10 a potlačení tvorby prozánětlivých cytokinů se u nás široce zabývají autoři (30,37,48).

Imunní systém GALT (37) zabraňuje adhezenci a invazi patogenů přes epitelální bariéru. Tvorba mucinu ve střevě se zúčastní na nespecifické obraně organismu. Mechanismů přirozené imunity se aktivně zúčastní fagocytující buňky /makrofágy, neutrofile a dentritické buňky, jež svými cytokiny regulují zánětlivou odpověď. Antigeny ze střevního lumen aktivně transportují M buňky. Dentritické buňky pak prezentují antigeny T lymfocytům. Produkce IL 10 a TGF-beta vede k aktivaci regulačních T lymfocytů a k indukci orální tolerance. Patogenní mikroorganismy aktivují T lymfocyty s jejich buněčnou odpovědí. V humorální složce imunitní reakce převládají sekreční IgA protilátky, zabraňující průniku antigenů ze střeva. V distálním ileu se nacházejí Payerské plaky. Zárodečná centra se stávají zřejmá až po narození v závislosti na antigenní stimulaci, jež je spojena se zvětšováním a stoupáním počtu Payerských plaků. Sekreční protilátky jsou aktivně transportovány do střevního lumen. Hygienická hypotéza je založena na faktu, že klesá antigenní tlak včetně infekcí. Mikrobiální deprivace může mít za následek nevyváženost přirozené antigenní stimulace. Možnosti pozitivního ovlivnění střevní mikroflory probiotiky je uváděna v pracích (2,38).

U nás (26) uvádějí údaje o českém kmeni, vyrobeném v minulosti v Ústavu sér a očkovacích látek. Kmen má vysokou adhesivitu a je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflory. Ostatní uváděno v materiálu. Smysl léčby probiotikem spočívá v přesměrování imunologické odpovědi od Th2 fenotypu k Th1 ještě dříve než je ustavena imunitní odpověď na antigeny z okolního prostředí. Imunitní systém v časném dětském věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro stimulaci a regulační funkce imunitního systému. Takto nedochází k jeho dostatečnému „vyzrání“ a důsledkem je vychýlení imunitní reakce k reakci Th2 typu. Navíc je zde zřejmě mechanismus navození imunologické tolerance do 2–3 let věku.

Organismus je právě ve věku kritickém pro navození imunologické tolerance vystaven pro něj novým molekulám. Je nepochybné, že složení střevní mikroflory novorozence ovlivňuje kojení a hygienická opatření. GIT trakt osidluje *E. coli*, Enterokoky a Enterobacter. Jakmile expandují, spotřebovávají kyslík a umožňují anaerobním kmenům střevo kolonizovat – Bacterioides, Clostridium (48).

Slizniční a imunitní tkáň obsahují zdaleka největší kvantum imunitních buněk (80 %) různých fenotypů.

Výše uváděný probiotický kmen *E. coli* strain Nissle 1917 podávali v roce 1917 (11,41) k léčbě průjmů. Mezi věkem 6–12 měsíci účinkoval lépe než ostatní probiotika. Totéž používali v roce 1992 (41), kdy podávali stejný kmen. Termín probiotika pak poprvé použil v roce 1965 (24) pro popis látky vylučované organismy, které stimuluje růst jiných organismů. V Plzni a zřejmě i v ČR poprvé používali v nemocniční studii *Lactobacillus* Knaifl s Vlčkem.

Hodnoty pupečnickového IgE, specifického IgE, spirometrie a klinickou diagnosu po porodu a na začátku dospívání srovnávali (42,53). Hodnoty IgE skromně korelovaly s celkovým IgE a větší tendencí k sensibilizaci. Korelace ale byla malá (6). Vazba byla silnější tam, kde dospívající v prvých letech života nebyli v kontaktu s domácími zvířaty. Jiní používali 4 bakteriální kmeny u 1223 gravidních žen před porodem a u jejich dětí do 6 měsíců života (19). Ve 2 letech došlo k výrazné redukci s IgE spojených alergických onemocnění. Mimo hygienickou hypotézu je nutné se zmínit také o hapténové hypotéze, která zdůvodňuje nárůst atopie přes mechanismy nespecifické imunity v důsledku opakovaného podprahového vystavování organismu pro něho novým molekulám, především ve věku kritickém pro navození imunologické tolerance tj. do věku 2 let. Haptény v opakovaných podprahových dávkách nevyvolávají obvyklou kontaktně alergickou reakci (sensibilizaci), ale vedou k antigenně nespecifickému vychýlení, resp. perzistenci reakce II. typu.

Vzhledem k tomu, že naše práce začíná v novorozeneckém věku, podotýkáme, že novorozenci mají stejně jako astmatici geneticky podmíněnou nedostatečnou obranu proti infekci. Novorozenci mají kvůli nezralosti imunitního systému sníženou tvorbu interferonu Gama v důsledku snížené funkce T1 helper buněk. Opakovaný kontakt s patogeny u nich navodí selhání imunity (3,4,33,34,35,36,47,48,50,51,52). Zdravé dítě až ve věku kolem 5 let reaguje s převahou Th1, která vede k rychlé eradikaci virů. Také u astmatu je snížena tvorba interferonu Gama T-lymfocyty a zvýšená tvorba IL 4,5. To má za následek zpožděnou eradikaci viru, poškození epitelu, přetrvávající eosinofilii a amplifikaci alergického zánětu. Dvě třetiny exacerbací astmatu vyvolávají rhinoviry. Místo INF gama buňky tvoří IL 4,5. IL 4 stimuluje B-lymfocyty k tvorbě IgE. Při defektu imunoglobulinů vzniká současně defekt blokujících protilátek, takže snadno sliznici procházející bantigen je ve tkáních s menší intenzitou vyvázan a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. U astmatiků se ve větší míře tvoří další mediátory, zejména leukotrieny a histamin. Při virové infekci se tvoří i IL 8 a následně pak dochází ke zvýšení bronchiální reaktivity a to i u zdravých jedinců. Je dnes již ale také známo, že u dětí s potravinovou alergií dochází brzo ke vzniku alergie na inhalované alergeny. Nyní ke konkrétním probiotikům.

Vlastní probiotika se dělí na:

1. Lactobacily
2. Gram pozitivní koky

3. Enterobakterie *E. coli*/serotyp 083:K24:H31 a *E. coli* Nissle serotyp O6:K5:H1
4. Bifidobakterie
5. Kvasinky.

V minulé práci jsme si dali za cíl zjištění diagnostického a léčebného postupu. Diagnostická část byla tehdy provedena z valné části, zbytek jsme dovyšetřili v následujícím období. Do této 2. části práce jsme vytipovali novorozence z rodin s pozitivní rodinnou anamnézou a hodnotami pupečnickového IgE přesahujícími rozmezí normálních hodnot. Musíme zdůraznit dlouhodobost této studie i vývoj medicínských pohledů vzhledem ke klinickým obrazům. Chceme zdůraznit nesmírnou technickou náročnost laboratorního vyšetřování dětí daného věkového období. Toto jsme začali sledovat a podrobně anamnesticky i laboratorně po indikované léčbě Colinfantem vyšetřovat na hodnoty IgE, IgA, IgG. V rodinách, kde byl starší sourozenec, jsme cílenými anamnestickými dotazy (ne dotazníkovou akcí) zaznamenali všechna onemocnění staršího neléčeného sourozence.

Výsledkové hodnoty novorozeneckého pupečnickového IgE posléze léčených novorozenců, hodnoty IgE v roce a ve 3 letech stejně jako hodnoty IgG a IgA v roce a ve 3 letech věku jsou uvedeny v grafickém znázornění a statistickém zpracování. Zároveň skupinu námi neléčených sourozenců z daných rodin jsme použili po důkladném anamnestickém zpracování jako srovnání výskytu alergie a nemocnosti. Naše původní dotazy při kontrolách směřovali na výskyt alergie s cílem zjistit efekt Colinfantu a vyšetřit hodnoty IgE. Proto jsme nejdříve všechny děti laboratorně vyšetřili v roce věku. Normalizace hodnot IgE v daných skupinách po léčbě nastala u 91,3 % a 87,7 % pacientů.

Tehdy jsme ještě nesledovali důkladně laboratorně nemocnost, proto jsme jen při opakovaných informacích rodičů, že tyto děti nejsou prakticky vůbec nemocné a to i při nemocnosti celé rodiny zprůměrovali nabírané hodnoty IgG v roce věku u léčených pacientů. Byli jsme překvapeni prakticky všude normálními hodnotami IgG, dokonce ve 3 letech odpovídajícím laboratorním hodnotám a ve čtvrtém roce těsně pod udávanými laboratorními hodnotami, ale při hodnotách vyšších než kontrolní skupina zdravých dětí z jiné ambulance. Tímto jsme do jisté míry dávali za pravdu sdělením rodičů.

Oproti výše uvedeným zahraničním autorům podotýkáme, že jsme v práci u naší velké skupiny používali fyziolog. bakt. kmen *E. coli* a to již od 10. dne věku života, účinkoval daleko lépe než ostatní probiotika na základě rodinné pozitivní alergologické anamnézy, vycházející ze zvýšených hodnot pupečnickového IgE a následných kontrol klinických i laboratorních v dalších letech. Nevycházeli jsme z dotazníků, ale ambulantních kontrol.

O dalších možnostech, jako je stav výživy hypoalergenními mléky a redukce rizika vzniku alergického onemocnění (30) se nedospělo k jasným efektům. Je však přijímána varianta o podávání hypoalergenních mlék / HA/ do 4. měsíce života u disponovaných jedinců. Racionální využití HA mléka může být spíše v léčbě alergie.

## původní práce

Aplikace HA mlék byla doporučena již v roce 2008 ESPGHAN (9). Na druhé straně autoři (29) uvádí, že výsledky nejsou přesvědčivé. My jsme u dané skupiny, která dostávala Colinfant podávali v případě dokrmu jednotně HA Bebu nejméně do 4. měsíce věku.

V další vytvořené skupině léčených dětí tj. v letech 2009-2012 jsme již i sledovali hodnoty IgE z pupečníku, ale spolu s tím i IgG a IgA v roce a ve třech letech. Dále jsme do kruhového grafu zaznamenali údaje o dětech léčených Colinfantem i jejich neléčených sourozenců z hlediska alergie i nemocností. Rozdíly jsou velmi nápadné a i potvrzují původní četné anamnestické údaje rodičů.

### Závěr

1. Autoři vycházejí z předchozí otřesné práce, ze které bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou, posunuje se do prvních let života a dokonce se objevuje možnost korelace hodnot s pylovým kalendářem. Také dominující role obou rodičů byla statisticky významná.
2. Toto nás vedlo spolu s hodnotami pupečnickového IgE u novorozenců v těchto rodinách k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu probiotikem Colinfant, nepatogenním kmenem *E. coli*.
3. Domníváme se, že efekt této léčby je patrný na předložených laboratorních výsledcích v porovnání s kontrolními skupinami.
4. Tyto výsledky se týkají nejen hodnot IgE, ale i IgG a IgA.
5. Nápadným zjištěním je velmi významný rozdíl v nemocnostech obou sledovaných skupin.
6. Prakticky nulové negativní vedlejší účinky léčby nás vedou k možnosti plošného využití daného preparátu v rámci rozšíření péče o nejmladší populaci.

*Autoři děkují za spolupráci členům porodnicko-gynekologického oddělení vedeného prim. MUDr. Z. Kestránkem. Zároveň autoři děkují MUDr. Užičárovi a spolupracovníkům, FA Dyntec, Terezín za distribuci preparátu Colinfant. Za cenné rady děkují autoři doc. MUDr. Petru Panznerovi, CSc., přednostovi Oddělení klinické imunologie a alergologie FN v Plzni.*

*Jednotlivé výsledky práce byly prezentovány opakovaně na pediatrických kongresech v ČR a SR s mezinárodní účastí v letech 2000, 2001, 2002, 2006 a 2008 a na Euro-paediatrics Congress v roce 2008 v Istanbulu.*

### LITERATURA

1. Abrahamsson T et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema. *J. Allergy Clin Immunol* 119, 2, 201, 1174-1180.
2. Björksen B et al. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma of allergy. *Springer Immunopathol* 2004; 25, 3-4: 257-270.
3. Blumenthal MN et al. Preventive Allergy: genetics of IgE-mediated diseases. *J. Allergy Clin Immunol.* 1986; 78, 963.
4. Bosquet J et al. Predictive value of cord serum IgE determination the development of „early onset“ atopy. *AnnAllergy* 1983; 51: 291.
5. Brower M et al. No effects of probiotics on atopic dermatitis of infancy. *Clin and Exp. Allergy* 2006; 36: 899.
6. Businco L et al. Predictive value of cord blood IgE levels in „at risk“ newborn babies and the influence of type of feeding. *Clin Allergy* 1983;13: 503.
7. Čadová L. Nové trendy v používání probiotik. *Pediatr. praxi* 2012; 113: 60-62.
8. Desphande G et al. Updated Meta Analysis of Probiotics for Preventing Necrotising Enterocolitis in Preterm Neonates. *Pediatrics* 2010; 125, 5: 921-930.
9. ESPGHAN Committee on Nutrition: Supplementation on Infant Formula with Probiotics and/or Prebiotics: A Systematic Review and Comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition *JPGN* 2011; 52: 238-250.
10. Fukushima Y et al. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of food Microbiology* 1998; 42: 39-44.
11. Henker J et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917/EcN/ stops acute diarrhea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* 2007; 166: 311-318.
12. Hill J et al. Investigation of the effect of short term change of dietary magnesium intake in asthma. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 2225-2229.
13. Heiner DC. IgE in colostrum, maternal blood and amniotic fluid, in *Proceedings XI International Congress of Allergology and Clinical Immunol.* London, 1982; 149-150.
14. Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease. *Curr Pharm Des.* 2008; 14 (14): 1368-75.
15. Kalliomaki M et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease. a randomized placebo - controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-1079.
16. Kalliomaki M et al. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow up a randomised placebo – controlled trial. *Lancet* 2003; 361, 31: 1869-1871.
17. Katz Y et al. Early exposure to cows milk protein is protective against IgE-mediated cows milk protein allergy. *J. Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 77-82.
18. Kjellmann N et al. Cord blood IgE determination for allergy prediction – a follow up to seven years of age in 1651 children. *AnnAllergy* 1984; 53: 167.
19. Kukkonen K et al. Probiotics and prebiotic galactooligos. in the prevention of allergic diseases. *J. Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 192-198.
20. Lee J et al. Meta analysis of clinical trias of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2008; 121: 116-121.
21. Liška J et al. Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie. *Alergie*, 2012; 1: 25-33.
22. Lievin V et al. Bifidobacterium from resident infect human gastroenterol microflora exert antimicrob. act. *GUT*, 2000; 47: 646-652.
23. Lin JS. Different effects of prohibitive species on infections in preschool children. *Vaccine*, 2009; 27: 1073-1079.
24. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-748.

25. Liong MT. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr Rev* 2008; 66: 192-202.
26. Lodinová-Žádníková R. Vliv perorálního osídlení nepatogenním *E. coli* po narození na složení střevní flory, imunitní odpověď a výskyt nosocomiálních infekcí u donošených a nedonošených dětí. *Čs. Pediatr.*, 1999;54(6): 268-273.
27. Metchnikoff E. *The prolongation of life. Optimistic Studies* London: G. P. Putnam and Sons, 1907.
28. Matsumura T et al. Congenital sensitization to food in humans. *Excerpta Med.* 1967; 144, 67.
29. Miller D et al. Synthesis of Ig by the human conceptus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1973; 52: 182.
30. Nevorál J et al. Prebiotika a probiotika v pediatrii. *Pediatric pro praxi*, 2012; 13, 3: 167-173.
31. Novák J, Novotná B. Alergie a asthma. GRADA, 2012; 132-148.
32. Pawankar R et al. White book on Allergy 2011-2012. Executive Summary. World Allergy Organisation, World Fed. of Allergy, Asthma and Clinical Immunology Societies.
33. Penna FJ et al. Probiotics and mucosal barrier in children. *Curr. Opin. Clin. Nutr. MetabCare*, 2008; 11: 640-644.
34. Perrier C et al. Gut permeability and food allergies. *Clin. Exp. Allergy* 2010; 41: 20-28.
35. Petřů V. Problémy péče o alergiky v raném dětském věku. *Čs. Pediatr.*, 1982; 37(3): 147-151.
36. Petřů VM, Špičák V, Panzner P. Vývoj alergie v průběhu života. *Alergologie Galén* 2004; 149-151.
37. Růžičková Jarešová L. Akné a atopická dermatitida v ordinaci pediatra. *Pediatric pro praxi*, 2011; 12(5): 309-312.
38. Saavedra JM et al. Use of probiotics in pediatrics: ratio mechanism of action and practical aspects. *Nutr. Clin. Pract.*, 2007; 22(3): 351-356.
39. Strimas J et al. Significance of IgE level in amniotic fluid and cord blood for the prediction of allergy. *Annals of Allergy*, Vol. 1988;61: 133-136.
40. Sütas E et al. Supresion of lymphocyte proliferation in vitro by bovine casein hydrolysed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: 216-224.
41. Schröder H et al. Entwicklung der aeroben Darmflora bei Neugeborenen nach Kolonisierung mit dem *E. coli* – Stamm Nissle 1917. *Kinderarzt* 1992; 23: 1619-1625.
42. Shah P D. The relationship between cord blood immunoglobulin levels and allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2011, Abstr.
43. Sochorova V. Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí. *Vox Pediatr.*, 2003; 7: 26.
44. Szajewska H et al. Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.*, 2001; 138-361.
45. Taylor AJ et al. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high risk children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119, 184-191.
46. Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126: 1217-1231.
47. Thon V. Intestinální mikroflora v raném dětství – úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatric pro praxi*, 2011; 12(4): 252-256.
48. Tlaskalová-Hogenová H et al. Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scan. J. Immunol.* 2005; 62(suppl. 1): 106-113.
49. Vernerova E. Slizniční imunita u dětí. Možnosti imunomodulace alergie. *Pediatric pro praxi*, 2008; 9(3): 164-167.
50. Viljanen M et al. Probiotics in the treatment of atopic eczema. *ALLERGY* 2005; 60: 494-500.
51. Vliagoftis H. Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 570-579.
52. Vouloumanou EK et al. Probiotics for the prevention of respiratory tracts infections. *International Journal Antim. Agents*, 2009; 34(197): 1-10.
53. Wegienka S et al. The relationship between cord blood immunoglobulin E levels and allergy. *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 2011; 106(3): 245-251.
54. Nováková D. Probiotika v rané dětské výživě. *Vox Pediatr.*, 2013;13(3): 32.

MUDr. Jiří Liška, CSc.  
 novorozenecké oddělení a odborné ordinace  
 Mulačova nemocnice  
 Dvořákova 17  
 301 00 Plzeň  
 e-mail: mudr.jiri.liska@seznam.cz

## Effect of Early Treatment of Newborns by Peroral Colonization Using Non-pathogenic *E. coli* on the Development of Their Immuno-allergic System

Jiří Liška<sup>1,\*</sup>, Konrad Siala<sup>1</sup>, Václav Holeček<sup>1</sup>, Štěpánka Sobotová<sup>1</sup>, Monika Kepková<sup>1</sup> and RNDr. Ing. František Šefrna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mulačova Hospital, Plzeň; <sup>2</sup>Department of Health Accounting and Statistics, University Hospital, Plzeň, Czech Republic



J. Liška

**Abstract:** In our previous work, we presented the results of a 12-year study (1998-2010) from which we derived several important conclusions. This was a large cohort, in which were examined 3619 samples of umbilical cord blood. We reached several conclusions from which it was clear that allergy was significantly associated with a positive family history (statistical significance at 1 %). The first symptoms of allergic disease occurred in the first years of life. We also observed significant seasonal differences. High levels of umbilical IgE and a positive family history were found to be grounds for preventive intervention by influencing the microbial flora of the gastrointestinal tract (GIT). We used Colinfant Newborn peroral probiotic vaccine - a lyophilized non-pathogenic strain of *E. coli*. The results in 2005-2008 and 2008-2009 confirmed that in treated patients with primary elevated levels of immunoglobulin E (IgE) in umbilical cord blood, IgE values at one year of age fully normalized in 90 %. The medical history of these children indicated minimal sickness rates. We further investigated IgG values at one year of age and compared this with a control group. After treatment these levels were also normalized. From 2009-2012, we investigated the effect of treatment on the values of immunoglobulins IgE, IgG, but also IgA, and statistically processed the data at 1 year of age and 3 years of age. Statistically, a correlation was observed between IgG and IgA in the 1<sup>st</sup> year of life and at 3<sup>rd</sup> years of age with a significance level of 1 %. The results show that treatment with Colinfant has a positive effect in the sense that the resulting IgE did not statistically significantly differ from referent values of healthy children. These values changed in time in treated patients between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> year at a significance level of 1 %. IgG and IgA in treated patients were, in median, entirely within the values of normality. In the period after 1 year, we found significant correlations of umbilical IgE with serum IgE, IgG, IgA and correlation of serum IgG with IgA. Very favourable effects of therapy on sickness rate of children compared to control group in a predefined file of the same age period is shown graphically.

**Keywords:** Allergy, immunology, newborn, probiotics, therapy-newborn.

### INTRODUCTION

Because the occurrence of allergic illnesses in the Czech Republic continues to rise exponentially, the use of predictive and prognostic methods are gaining increased significance. This also opens the possibility of attempting a preventive and pre-emptive strategy in high risk children.

The Academy of Sciences of the Czech Republic [5] have suggested that the expression of TH1 and TH2 cytokines in umbilical blood is associated with an increased risk of allergies. The counterbalance of TH1 and TH2 affect IgE production and maturation of the gastrointestinal tract epithelium [1]. A higher expression of interleukin10 (IL10) was discovered in the umbilical blood cells of children with allergic mothers. This infers a predominant Th2 cell-response which encourages the future development of allergy. On the other hand a reduced expression of the cytokine TGF - Beta among children of allergic mothers may contribute

\*Address correspondence to this author at the Neonatal Department and specialist surgery, Mulačova hospital, Dvořákova 17, 30100 Plzeň, Czech Republic;  
E-mail: [mudr.jiri.liska@seznam.cz](mailto:mudr.jiri.liska@seznam.cz)



to slower maturing of intestinal epithelium in newborns. This subsequently may then increase intestinal permeability to allergens and hence lead to allergy induction. Higher epidermal growth factor cytokines were also been found in children of non-atopic mothers. It was suggested that any agent that may improve the maturation of the intestinal epithelium may be a possible point of therapy for an atopic child's future immunomodulation. This demonstrates that the allergic phenotype may already be present in umbilical blood.

Our work is in line with a number of studies of recent years, which paid considerable attention to the intestinal mucosa and associated mucosal immunity, which is essential in the prevention of allergy [2-12]. Insufficient exposure to microbial antigens is considered an important factor that contributes to the development of allergy [10-13, 18]. It is accepted that a necessary stimulus for GIT maturation is required for a specific response. The latter is lacking in all newborn children. Probiotic bacteria represent a safe stimulus for our immune system, where the induction of so-called oral tolerance should occur within the first six months of life. Specific immune response with predominance of Th2 is already developed at birth.

The wisdom of treatment with Colinfant consists of the redirection of immunological memory of allergic character from Th2 phenotype even before there is an established adjusted immune response to antigens from the external environment. Atopic patients with clinical signs of the disease demonstrate a predominantly Th2 immune response, whilst non-atopic patients benefit with activated Th1 processes. Immunotherapy of allergic diseases reduces the formation of IL4 by allergen-specific Th2 lymphocytes and ensures formation of IFN-gamma specific TH1 lymphocytes.

The optimal status occurs when the induction of immune reactions leads to the production of cytokines which induce the formation of active tolerance of harmless allergens. Apart from the stimulation of IgE, repeated activation of Th2 lymphocytes also leads to increased production of IgA secretion, the suppression of Th1 lymphocyte activity via IL4. Induction of the IgE response is dependent on the interaction between T cells and antigen-presenting cells [19-21]. Microbes must remain viable during their production, storage and passage through GIT (gastrointestinal tract).

Stimulation of the immune system runs through interaction with toll-like receptors on dendritic cells. This leads to the regulation of Th1 response and the inhibition of proinflammatory cytokine production.

## METHOD

Mann-Whitney's two-sampled selection test; in the results is used an older named Wilcoxon's unpaired test, the title adopted from English original. Nowadays is demanded Mann-Whitney's American test. Wilcoxon's unpaired test, Rank correlation - Spearman and Kendall. Eventually is possible to tell that Rank Correlation Test was applied because the hypothesis about normality was rejected by using a test of skewness and kurtosis.

## Biological Material

Umbilical cord blood was collected without anticoagulant agents at birth. Venous blood was collected without anticoagulant agents in the first and third year of life. Determination of IgE was performed using ELISA kits f.RADIM, calibration range 0,4-1000 IU/ml expected values under 5 years less then 75IU/ml. Determination of IgA was performed using immunoturbidimetric kits IgA K – Assay IgG Beckmann Coulter on the Analyser AU 480 Beckman Coulter, calibration range was 0,2-8 g /l. Determination of IgG was performed also using immunoturbidimetric kits IgG Beckman Coulter, on the Analyser AU 480 Beckman Coulter, calibration range 0.004 -30 g /l expected values up to 1 year of age 5,5-14,7g/l to 15 years 5,5-14,0 g /l.

## Colinfant Newborn – New Peroral Vaccine – A probiotic

This is a live peroral vaccine containing lyophilized non-pathogenic *E. coli*. This strain is able to displace colonization of intestinal tract by pathogenic strains. It is originally patented by the Institute of Serums and Vaccines. Our source of 12 vial batches was derived from the present manufacturer, Dyntec company in Terezín.

Each vial contains *Escherichia coli* serotype 083: K24: H31 (minimum 0.8 x 10<sup>8</sup> CFU), and is representative of group of bacteria that are part of the normal intestinal microflora. The vaccine was registered at the State Institute for Drug Control in 1997 under registration number 59/762/97-C. Use

of the strain and preparation of the vaccine were patented in 1989 under number 2645722. *E. coli*, from which the live vaccine is prepared, are a non-pathogenic strain with the above mentioned serotype. It is saved in the collection of type strains under number AO34/86. The strain is highly selected, sensitive to common antibiotics, does not form enterotoxin and does not have a plasmid. Its excellent colonizing ability is ensured also by the presence of fimbriae demonstrated by haemagglutination. After peroral administration of the suspension, translocation of microbes has been demonstrated only into mesenteric lymph nodes, though not into the spleen, liver and lungs. The strain has excellent colonizing characteristics, occupies receptors of in the intestinal mucosa, prevents adherence of pathogens and expels present enteropathogenic strains. In the tests, the strain for germ-free piglets was completely non-pathogenic. The induction of IgA secretion is particularly significant in newborns, since it partly replaces a deficit of this immunoglobulin. After colonization of newborn GIT, bacterial pathogens disappear from stool, throat and nose. The vaccine strain has been shown to persist in the intestinal tract of colonized newborns for 16 weeks, though it was demonstrated even after several years. The presence of this strain stimulates the formation of specific and non-specific antibodies, demonstrable in the intestinal tract, saliva and serum. This package is designed for 1 patient at the age until 1 year, regardless of his/her weight. It is administered perorally, the content of bottle is dissolved in 1 ml of liquid (water, tea), and given to the child to drink. One bottle is administered three times a week for a period of 4 weeks. The administration is interrupted during application of antibiotics. It is not recommended to administer the vaccine during the acute stage of diarrheal disease. *Colinfant* is not available as on over the counter preparation and must be prescribed by a licensed physician.

## RESULTS

In the first group the study was performed between 2005-2007 where upon 468 subjects (one or both of parents had allergic disease – either mother or father or both, and a control group of healthy parents) in whom we measured levels of IgE immediately at birth. In this test group atopy was predetermined in 68 fathers, 320 mothers and 80 where both parents were allergic. There were 30 children in the control group.

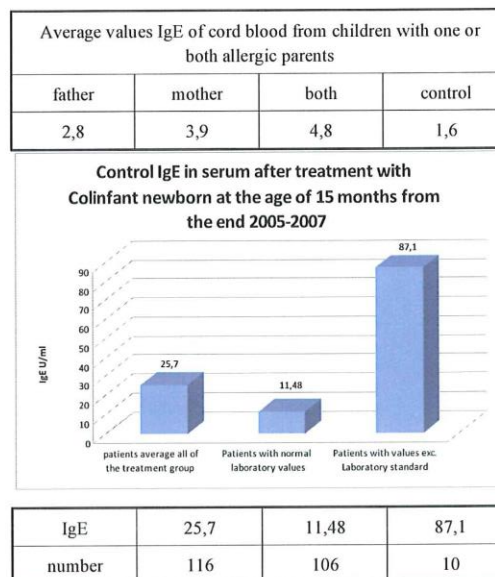


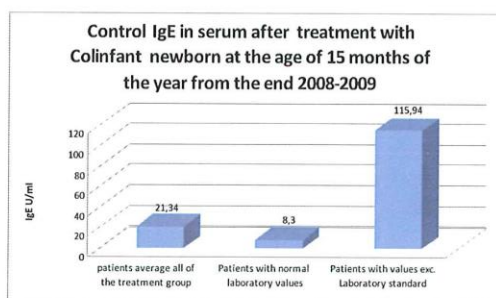
Fig. (1). Control IgE in serum after treatment with Colinfant newborn at the age of 15 months from the end of 2005-2007.

From Fig. (1). 116 patients, in whom pathological levels of IgE was measured, we applied Colinfant. There were no children in whom we found pathological IgE and did not apply colinfant – for ethical reasons. Once pathological levels of IgE were measured, we applied Colinfant within 30 days 3times weekly between meals. Second measurement of IgE levels was performed at the age of 15 months (+/- 14 days). At this point we also measured levels of IgG in all patients (Graph.3.) The values of IgE and IgG were compared with healthy controls of the same age. These control subjects were children that have been followed by specialists due to anatomic anomalies of the urogenital tract, and were known to be otherwise healthy. The results of these measurements are presented in the results graphs.

## Second Group

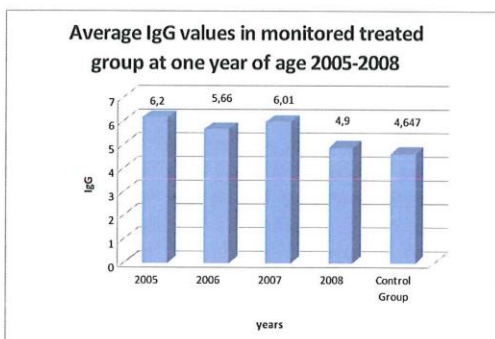
Between 2008-2009 150 new subjects were enrolled into the study. The same inclusion criteria were applied as above. In this test group atopy was predetermined in 23 fathers, 99 mothers and 28 where both parents were allergic. There were 30 children in the control group (Fig. 2).

Average values IgE of cord blood from children with one or both allergic parents			
father	mother	both	control
2,4	2,9	4,1	0,9



**Fig. (2).** Control IgE in serum after treatment with Coliinfant newborn at the age of 15 months of the Year from the end of 2008-2009.

IgE	21,34	8,3	115,94
number	98	86	12



**Fig. (3).** Average IgG values in monitored treated group at one year of age 2005-2008.

Normal values of IgG in the treated children, with very low illness rates.

The results of IgE and IgG levels were compared.

Because we were informed by parents that children treated with colinfant were almost completely disease free for the entire duration of the study, we decided to continue with this study in order to objectively assess the overall disease incidence in subjects with elevated IgE levels.

N.B. the initiator for continuing with the study was the pronounced proclamation of parents that their child was overtly healthy as compared with the rest of the family.

In all children in whom there was a positive family history, and also in whom there were elevated levels of IgE - comprised 98 subjects. There were no subjects with non-atopic parents that had elevated IgE at birth. All parents of children in each group signed approval for testing and filled out a questionnaire asking about their atopic status.

The treatment protocol was repeated as per the first group. At fifteen months we again measured IgE+IgG+ as well as documenting the health status of each child during this period.

For this 15 month visit, we specifically required the presence of both parents. The information was gained by one person filling out a questionnaire in the presence of both parents. The levels of immunoglobulins and health status over fifteen months was compared. The results were present in the graphs in the results section (Fig. 2).

### Group 3

Using an entirely new cohort of subjects of 380 children in the years 2009-2012. In this test group atopy was predetermined in 56 fathers, 258 mothers and 66 where both parents were allergic. There were 30 children in the control group (Fig. 3).

136 were treated with Coliinfant. Because of the continued interesting reduction in IgE and normal, within reference values of IgG, and low illness rates in children in Groups 1 and Group2, we decided to continue with the study and measure not only levels of IgE at birth but also IgA. Again at 15 months we measured IgG and IgE and IgA. We asked both parents about the health status of their child during the test period. We then invited these families for a repeat measurement of immunoglobulins at the age of three years (+/- 1 month). Within this study frame 67 children reached the age of three. Six children who reached the age of three within the study period did not appear for testing because they had moved to another region.

Overall health status of these children was assessed using the same questionnaire and criteria as with groups 1 and 2.

We compared these 67 children's health status with their siblings – at age 15 months and again until the age of three years. Only three families had more than 2 children. The results were presented graphically.

Statistical processing of results of IgE, IgA, IgG, in the following years 2009-2012 in patients with high umbilical IgE treated after birth and their controls in the first year and in the third year of age in comparison to control group of 53 healthy children from nephrology clinic (Table 1-8).

**Table 1. Basic statistics controls.**

ITEM	N	AVERAGE	MEDIAN	1 <sup>ST</sup> QUARTER	3 <sup>RD</sup> QUARTER
IGG1	20	4.258	3.640	3.060	5.700
IGA1	20	0.345	0.355	0.210	0.430
IGE1	14	31.00	7.47	3.63	41.40
IGG3	35	7.373	7.530	5.980	8.350
IGA3	35	0.655	0.600	0.460	0.770
IGE3	35	24.98	14.90	5.40	40.80

**Table 2. Basic statistics sick patients.**

ITEM	N	AVERAGE	MEDIAN	1 <sup>ST</sup> QUARTER	3 <sup>RD</sup> QUARTER
PUP_IGE	136	3.098	2.365	1.790	3.560
IGG1	133	4.728	4.550	3.620	5.730
IGA1	136	0.473	0.260	0.200	0.380
IGE1	135	37.54	8.87	3.96	21.50
IGG3	67	6.964	6.870	5.690	8.160
IGA3	67	0.644	0.620	0.460	0.760
IGE3	66	59.49	17.09	7.65	60.12

There was rejected a hypothesis of normality of distribution using skewness and kurtosis.

Thus further were used non-parametric methods.

**Comparison of Sick Patients Versus Controls**

**Table 3. Wilcoxon unpaired test (Sick vs Control).**

ITEMS	N1 (controls)	N2 (sick)	P
IGG1	20	133	20.5
IGA1	20	136	17.5
IGE1	14	135	99.2
IGG3	35	67	29.4
IGA3	35	67	65.4
IGE3	35	66	18.2

Relatively close to the significance was IGA at the age of one year.

**Development in Time At Sick Patients**

**Table 4. Wilcoxon paired test after first year vs after three years.**

ITEMS	NUMBER OF MEASUREMENTS	P
IGG1 IGG3	61	0.0 +++
IGA1 IGA3	62	0.0 +++
IGE1 IGE3	63	0.0 +++

The values changed in time at sick patients between 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> year, at a significance level 1 %.

IgG at sick patients increased in median from 4.55 to 6.87.

IgA at sick patients increased in median from 0.26 to 0.62

IgE at sick patients increased in median only from 8.87 to 17.09. The values remained completely in the standard.

P+++ statistical significance was reached at the level of 1 promile, i.e. a significant protective effect, increased IgE and IgA. A significant decrease in IgE in-line with the decreased illness rates in these patients. The development in time at controls was not tested for a small number of complete pairs of measurements.

**Correlation of Variables in Controls**

**Table 5. Rank correlation.**

ITEMS	X,Y	N	SPEARMAN	P	KENDALL	P
IGG1	IGA1	20	0.7040	0.2 ++	0.5105	0.2 ++
IGG1	I GE1	14	0.2992	28.1	0.1758	38.1
IGA1	I GE1	14	0.2227	42.3	0.1429	47.7

IGG at one year of age correlates with IGA at one year of age at a level P=1 %

**Table 6. Rank correlation.**

ITEMS	X,Y	N	SPEARMAN	P	KENDALL	P
IGG3	IGA3	35	0.1973	25.0	0.1395	23.9
IGG3	I GE3	35	0.0003	99.9	0.0118	92.1
IGA3	I GE3	35	0.0482	77.9	0.0454	70.1

At three years of age, there was not in control found any statistically significant correlation.

### Correlation of Variables in Sick Patients

**Table 7. Rank correlation.**

ITEMS	X,Y	N	SPEARMAN	P	KENDALL	P
PUP_IG	IGG1	128	0.2330	0.9 ++	0.1658	0.5 ++
PUP_IG	IGA1	131	0.2684	0.2 ++	0.1830	0.2 ++
PUP_IG	I GE1	130	0.1729	5.0 +	0.1193	4.4 +
IGG1	IGA1	132	0.5203	0.0 +++	0.3853	0.0 +++
IGG1	I GE1	130	0.0887	31.4	0.0582	32.6
IGA1	I GE1	133	0.0720	40.9	0.0491	40.2

At 1 year of age in sick patients, there were statistically significantly correlates between IgG and IgA at a significance level of 1 ‰, correlation was positive and directly proportional.

At 1 year of age, the umbilical IgE correlates with all serum immunoglobulins, the most with IgG and IgA.

P level of significance at 1 promile ( +++) and 1 ‰ ( ++ ) and reflects the positive clinical and laboratory status of the children.

**Table 8. Rank correlation.**

ITEMS	X,Y	N	SPEARMAN	P	KENDALL	P
IGG3	IGA3	67	0.6000	0.0 +++	0.4197	0.0 +++
IGG3	I GE3	66	0.0916	46.0	0.0643	44.5
IGA3	I GE3	66	0.0626	61.4	0.0434	60.7

At 3 years of age, there were statistically significant correlates between IgG and IgA at a significance level of 1‰.

P level of significance ( +++) - demonstrating a significant protective effect

- Explanatory notes: IgE1, IgA1, IgG1 are values at the first year of age
- IgE3, IgA3, IgG3 are values at the third year of age
- P – resulting probability
- Pup IgE – umbilical IgE
- N – numbers of patients

Treatment with Colinfant contributed to the fact that the resulting IgE in the treated children did not statistically significantly differ from the reference values for healthy children.

Graphically illustrated sickness rate of children treated with Colinfant versus control group of non-treated siblings.

95% of treated children by the age of three years were minimally ill. The use of antibiotics in these children was exceptionally rare.

The effect of treatment with Colinfant in 142 children, in terms of sickness rates, was compared with a control group of 73 siblings.

### DISCUSSION

In our previous publication [22], after examining 3619 samples of umbilical cord blood, we concluded that levels of immunoglobulin E in umbilical cord blood are predictive for allergic disease to the age of 6 years. There were clear demonstrable differences in seasonability. Furthermore it was apparent that allergy is associated with a positive family history; the first symptoms being observed in the first years of life. It also appeared that the last six weeks of pregnancy affected the final allergy (Fig. 4).

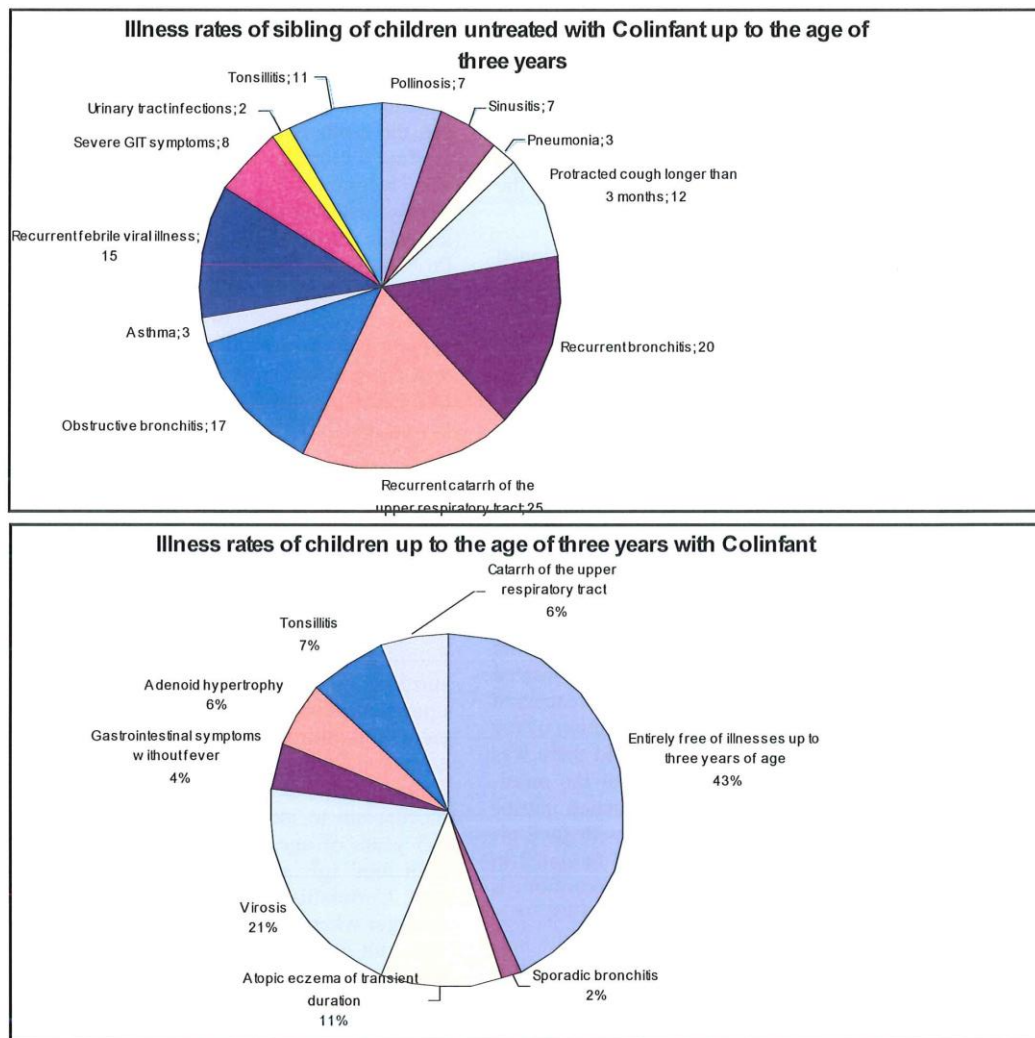


Fig. (4). Illness rate of children upto three years a) untreated with colinfants b) treated with colinfants.

In our cohort of winter born, allergy risk children, we found normal levels of umbilical IgE following treatment with Colinfant compared with their older siblings also born in during the winter season. From the series of results, it was possible to highlight the dominant role of both parents and the development of allergy, with a significance level of 1 pro mile. Although most newborns have very low or minimally detectable levels of IgE in umbilical blood, we concluded that high levels of umbilical IgE and a positive family history are

grounds for preventive measures through manipulating GIT microbial flora. It is known that IgE status is under genetic control with production beginning in the liver and lungs of the human foetus at 11 weeks and in the spleen at 21 weeks gestation [23, 18]. Other authors have mentioned [19] predictive values IgE in umbilical cord blood as a risk factor for newborns and the development of early atopy. Matsumura *et al.* concluded that the best predictor of allergy in newborns is a positive family history and an elevation of umbilical IgE.

They also noted the type and initiation of allergy. They indicated that allergy developed in 29 % of children that had a positive family history of allergy. From these, 23 % of children were diagnosed with an allergy at one year of age. 40 % were breastfed. As in our study, it was suggested that umbilical IgA is a contaminant from the mothers blood.

The first versions of probiotics were mentioned by Mečnikov [24], who highlighted the importance of intestinal microflora and its important role in immune defence. The possibility of influence and manipulating intestinal flora with probiotics is presented in other works [1-3, 22, 25, 26-28].

Probiotics must meet a variety of criteria. The actual gene typing has been performed for only three types of probiotics. These are *E.coli* type Nissle and *E.coli* type O83/preparate Colinfant/, and *Lactobacillus casei spec. Rhamosus-Lactobacillus GG* and *Saccharomyces boulardii*. But the last type is not of human origin and thus does not belong to the true probiotics. So far the only side-effect of therapy with non-pathogenic *E.coli* has been meteorism. In our Colinfant treated children only one child had reported flatulence and a rash which had disappeared on completion of the treatment course. In this particular child there was a problem with the family's storage of the probiotic. The ability of probiotics to influence intestinal permeability and the association with food allergy has been studied [29]. It should be noted in this context that adult type intestinal microflora is well established around 2 years of age [30]. It is well known that allergy is manifested in the first three years by gastrointestinal symptoms, atopic eczema and respiratory problems [29 31, 32]. There is conflicting evidence regarding the positive effects of probiotics on the incidence, severity and duration of respiratory diseases. For example, although one study did not find an improvement in allergic asthma, another clearly demonstrated a reduction of allergic rhinitis in toddlers and pre-school age children. Another study monitored the effects of a variety of probiotics on respiratory infections and found a shortening of the duration and severity of illness, though not on disease incidence. A similar situation is described for atopic eczema [15, 33, 34, 35].

In 2003 a group used Colinfant as a preventive measure in very low birth weight children against

necrotising enterocolitis, and again in 2010 [3]. A support for some hypotheses is provided by studies, e.g. on benefits of early exposure to cow milk in terms of protection against IgE [16]. Assuming that the mothers did not breastfeed their infants in the first 4 months of life, a hypoallergenic formula was recommended (Beba HA). Children that clearly benefitted from the application of probiotics were those with IgE-mediated allergy [19]. Probiotics are known to facilitate the balance between Th1 and Th2 through regulatory cells, the increased production of IgA and IL-10, and the suppression of pro-inflammatory cytokine production. Several works have described the possibilities of influencing intestinal microflora with probiotics [2, 30, 34, 36, 37].

Matsamura *et al.* reported about a Czech strain, produced in the past by the Institute of Serums and Vaccines [9]. This strain has high adhesiveness and represents a group of bacteria which are part of normal intestinal microflora. The rationale for treatment with probiotics is to redirect the immunologic response from Th2 phenotype to Th1 even before an immune response to antigens from the surrounding environment can be initiated. The immune system [38] in early childhood is insufficient and immature and upon contact with microbes and allergens, tends to deviate towards a Th2 type cascade. Furthermore, there is probably a mechanism to induce immunological tolerance to 2-3 years of age. IgE values modestly correlated with total IgE and greater tendency to sensitization. Correlation was small [39]. Correlation was stronger where adolescents in the first years of age were not in contact with domestic animals. Others used 4 bacterial strains in 1223 pregnant women before childbirth and in their children up to 6 months of age [27]. At 2 years of age there was significant reduction of IgE-related allergic diseases. Apart from the hygiene hypothesis, it is necessary to mention the hapten hypothesis which justifies increased atopy through mechanisms of nonspecific immunity due to repeated subliminal exposure of the organism to new molecules, especially at the age critical for induction of immunological tolerance, i.e. to 2 years of age. Due to immaturity of the immune system, newborns have decreased formation of interferon gamma as a result of decreased function of T1 helper cells. The repeated contact with pathogens induces failure of immunity in them [23, 19, 40, 29, 11, 12, 41, 42]. In the last work, we aimed at determination of di-

agnostic and therapeutic procedures. The diagnostic part was then performed to a large extent, the rest we examined in the following period. For this second part of the work, we selected newborns from families with positive family history and valued of umbilical IgE exceeding the range of normal values. We must point out the long-term nature of this study and development of medical perspectives with regard to clinical outcome. We want to emphasize the immense technical complexity of laboratory examination of children of the given age period. We started to monitor this and to examine it in detail anamnesticly and in laboratory after indicated treatment with Colinfant on the values of IgE, IgA, IgG. In families, where there was an older sibling, we recorded all diseases of non-treated sibling through targeted questions on medical history. Immunoglobulin values in neonates, at one year and at three years of age were presented graphically and subjected to statistical processing. Untreated siblings were also evaluated thoroughly for allergy and sickness rates.

Our original questions during check-ups were directed towards the occurrence of allergy in order to ascertain the effects of Colinfant, and to determine IgE values. Therefore, we first examined children at one year of age by laboratory methods. The standardization of IgE values in the given groups after treatment occurred in 91.3 % and 87.7 % of patients.

At that time, we did not monitor closely sickness rate by laboratory methods yet, therefore, only after repeated information from parents that these children are almost never sick even during disease of the whole family, we averaged the collected IgG values at one year of age in the treated patients. We were surprised by normal IgG values practically in all subjects, even at three years of age. The corresponding laboratory values in the control group of healthy children were higher and concurred with amnestically gained information about patient health from the parents.

In contrast to the above mentioned foreign authors, we point out that we used a physiological *E.coli* bacterial strain from the 10<sup>th</sup> day of life; it performed much better than other probiotics, based on the family positive allergic history, resulting from increased values of umbilical IgE and subsequent clinical and laboratory controls in future

years. We did not get from questionnaires but from ambulatory controls.

The other possibilities, such as status of nutrition with hypoallergenic milk and reduction of risk of developing of allergic disease, did not produce clear effects. However, there is accepted variant of the use of hypoallergenic milk /HA/ until 4<sup>th</sup> month of life in predisposed individuals. A rational for the use of HA milk may be rather in the treatment of allergy. Administration of milk has been recommended already in 2008 ESPGHAN [1]. On the other hand, the authors [43] state that results were inconclusive. In the Colinfant treated group HA Beba formula was given at least until 4<sup>th</sup> month of age.

In the 2009-2012 cohort, we monitored IgE in umbilical cord blood, but also IgG and IgA at one year and three years of age. Data of children treated with Colinfant and their non-treated siblings in terms of allergy and sickness rates were presented in the pie charts. The differences are very noticeable and also confirm the numerous original data of family history of parents.

## CONCLUSIONS

1. The results of our study reaffirm and concur with previous studies that demonstrated a clear and strong association between a positive family history and childhood allergy; the first symptoms of allergic disease occurring in the first year of life. A clear seasonal predisposition was also found.
2. Treatment of risk children with Colinfant proved a valid and useful preventive strategy, as demonstrated by the significant reduction of sickness rates, and reflected by clear correlations of IgE and IgA values.
3. As practically no negative adverse effects of treatment were observed in this large study, we recommend the wide-spread use of similar probiotic preparations in all risk children during their neonatal stage of life.

## ABBREVIATIONS

Th1	=	Lymphocytes
Th2	=	Lymphocytes



IgE	=	Immunoglobulin
IgG	=	Immunoglobulin
IgA	=	Immunoglobulin
IL4	=	Interleukin 4
IFN	=	Interferon Gama
TGF	=	Beta cytokinin

### CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the members of obstetrics-gynecology department, led by Z. Kestřánek, M.D., for their cooperation. At the same time, authors thank Užičář, D.V.M. and colleagues, co. Dyntec, Terežín for providing Colinfant.

The authors thank doc. Petr Panzner, M.D. et PhD., Head of Clinical Immunology and Allergology Department of the University Hospital in Plzeň, for his valuable guidance.

Individual results of the work were repeatedly presented on the paediatric congresses in the Czech Republic and Slovakia with international participation in 2000, 2001, 2002, 2006 and 2008 and on Europaediatrics Congress in 2008 in Istanbul.

### REFERENCES

- [1] ESPGHAN Committee on Nutrition: Supplementation on Infant Formula with Probiotics and/or Prebiotics: A Systematic Review and Comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition *JPGN* 52, 2011, 238-250.
- [2] Björksen B. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25(3-4): 257-70.
- [3] Desphande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotising enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 2010; 125(5): 921-30.
- [4] Henker J, Laass M, Blokhin BM, *et al.* The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917/EcN/ stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 311-8.
- [5] Hrdý J, Žizka J, Olga N, *et al.* Cytokine expression values in cord blood cells and cytokines in the prenatal and early postnatal period of kids with healthy and allergic mothers. *Vox Pediatr* 2007; 10(8): 32.
- [6] Lin JS, Chiu YH, Lin NT, *et al.* Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: A double-blind, randomized, controlled study. *Vaccine* 2009; 27(7):1073-9.
- [7] Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-8.
- [8] Lodinová-Žádníková R. Effect of peroral colonisation with non-pathogenic *E. coli* after birth on intestinal microflora, immunological effects and the incidence of nosocomial infections in term and preterm children. *Č Pediatr* 1999; 6: 268-73.
- [9] Matsamura T, Kuroume T, Iwasaki I, *et al.* Congenital sensitization to food in humans. *Excerpta Med* 1967; 144: 67.
- [10] Thomas DW, Greer FR, American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Collaborators: Bhatia JJ, Abrams SA, Daniels SR, *et al.* Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126: 1217-31.
- [11] Valsecchi A, Marseglia A, Ricci A, *et al.* Probiotics demonstrate immunomodulatory effects in atopic pediatric patients by increasing the TH1 immune response which counterbalances the dominant TH2 immune response. *Pediatr Med Chir* 2008; 30; 4: 197-203.
- [12] De Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, *et al.* Probiotic bacteria reduce the duration and severity of common cold episodes. *Vaccine* 2006; 24(44-46): 6670-4.
- [13] Brouwer M, Wolt-Plompen SA, Dubois AE, *et al.* No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: A randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 899-906.
- [14] Kalliomaki, M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo - controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9.
- [15] Kalliomaki, M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow up a randomised placebo - controlled trial. *Lancet* 2003; 361(31): 1869-71.
- [16] Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, *et al.* Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 192-8.
- [17] Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parenteral history and the risk for childhood asthma? Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 176-81.
- [18] Penna FJ, Péret LA, Vieira LQ, Nicoli JR. Probiotics and mucosal barrier in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 640-4.
- [19] Bosquet J, Ménardo JL, Viala JL, Michel FB. Predictive value of cord serum IgE determination the development of "early onset" atopy. *Ann Allergy* 1983; 51: 291-5.

- [20] Tlaskalová-Hogenová H, Tuckova L, Mestecky J, *et al.* Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scan J Immunol* 2005; 62 Suppl 1: 106-13.
- [21] Shah PS, Wegienka G, Havstad S, Johnson CC, Ownby DR, Zoratti EM. The relationship between cord blood immunoglobulin E levels and allergy-related outcomes in young adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 106(3): 245-51.
- [22] Liška J, Holeček V. The importance of assessment of immunoglobulin E in cord serum from the aspect of family history of allergy. *Alergie* 2012; 25-32.
- [23] Blumenthal MN, Yunis E, Mendell N, Elston RC. Preventive Allergy: genetics of IgE-mediated diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 962-8.
- [24] Metchnikoff E. The prolongation of life. *Optimistic Studies* London: G. P. Putnam and Sons 1907.
- [25] Čadová L. New trends in using probiotics. *Pediatr Praxi* 2012; 113: 60-2.
- [26] Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998; 42: 39-44.
- [27] Kuitunen M, Kukkonen K, Juntunen-Backman K, *et al.* Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean delivered children. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 23(2): 335-41.
- [28] Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, *et al.* Probiotics in the treatment of atopic eczema. *Allergy* 2005; 60: 494-500.
- [29] Rautava, S., *et al.*: Lactobacillus rhamnosus GG and Bifidobacterium lactis are safe and effective in reducing early otitis media and antibiotic use and the risk of respiratory infections during the first year of life. *Br J Nutr* 2009; 101: 1722-6.
- [30] Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: A novel target in allergic disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14 (14): 1368-75.
- [31] Lee J, Seto D, Bielory L, *et al.* Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1): 116-21.
- [32] Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armańska M, Mikolajczyk W. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. *J Pediatr* 2001; 138(3): 361-5.
- [33] Katz Y, Rajuan N, Goldberg MR, *et al.* Early exposure to cows milk protein is protective against IgE-mediated cows milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 77-82.
- [34] Abrahamsson T, Jakobsson T, Böttcher MF, *et al.* Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(5): 1174-80.
- [35] Taylor AJ, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high risk children: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(1): 184-91.
- [36] Saavedra JM. Use of probiotics in paediatrics: ratio mechanism of action and practical aspects. *Nutr Clin Pract* 2007; 22(3): 351-65.
- [37] Shah PD, Wegienka G, Havstad S, Johnson CC, Ownby DR, Zoratti EM. The relationship between cord blood immunoglobulin levels and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 106(3): 245-51.
- [38] Perrier C, Corthésy B. Gut permeability and food allergies. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 20-8.
- [39] Businco L, Marchetti F, Pellegrini G, Perlini R. Predictive value of cord blood IgE levels in 'at risk' newborn babies and the influence of type of feeding. *Clin Allergy* 1983; 13: 503-8.
- [40] Sochorova V. Application and effects of Colinfant in preterm children. *Vox Pediatr* 2003; 7: 26.
- [41] Vliagoftis H, Kouranos VD, Betsi GI, Falagas ME. Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 570-9.
- [42] Vouloumanou, EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(3): 197.e1-10.
- [43] Novák J, Novotná B. Allergy and asthma. *GRADA* 2012; 132-48.

# Significance of immunoglobulin E in umbilical blood in relation to an allergic family history, it's relation to seasonality, immunity and the possibility of postnatal consequences. The remarkable subsequent effects of altering gastrointestinal flora in treated newborns.

Jiří Liška, Konrad Siala, Václav Holeček, Štěpánka Sobotová, František Šefrna  
Mulačova Hospital, Faculty Hospital Plzeň, Czech Republic

### Conclusions

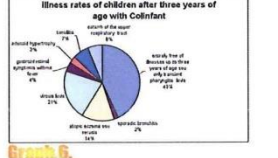
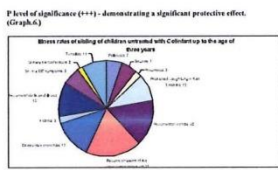
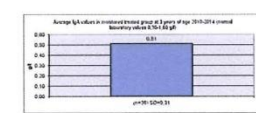
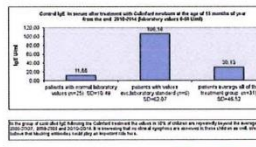
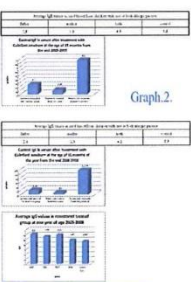
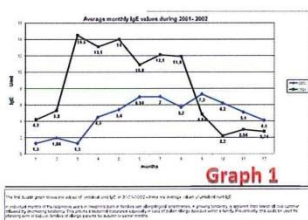
I am Head of Children's Ward at Mulačova Hospital in Plzeň in the Czech Republic. I am responsible for the newborn section. In this area I have been working for 18 years in the field of clinical immunology research. We examined 3912 samples of umbilical blood in relation to an allergic family history. The research just started in 1998. We found out according to the results, that among parents, where are both with allergy, their children will be probably about 70% allergic, as well. Immunoglobulin E has an important role in allergic reaction as a main allergic factor.

During certain period of time we continued and the values of IgE in newborns, where birth in particular month of year differed. Every year we found that higher value of IgE was in newborns coming into being in spring and summer (Graph 1). The autumn or winter months could be used as a prevention of planning birth a baby in families of allergic parents. We began as follows: clinical study newborns, where the value of IgE of cord serum was very high. New-borns were divided into 3 groups 2005-2007, 2008-2009, 2010-2015.

High values of umbilical IgE, together with a positive family history of allergy were an indication for inclusion of patients into treated groups. Newborns during the years 2005-2015 were treated with Colifant, a hypobifid non-pathogenic strain of E. coli. We tried to find the value of IgE, IgG and subsequently IgA in blood and to influence by treatment. We found in 99% of results that values of IgE and IgG were in normal. Graph 2, 3, 4, 5.

Only in the Graph 2 and 4 you can see a very interesting thing. There is a group for 6 patients, where the rates of IgE didn't go down, there were even higher. It is interesting that as clinical symptoms are observed in these children too. We suppose that blocking antibodies could play an important role here.

The results also corresponded with an entirely negligible subsequent morbidity of the monitored group of children up to 4 years of life when compared with the control group (see Graph 6). 95% of treated children with Colifant by the age of 3-4 years were minimally ill. The use of antibiotics among these children was exceptionally rare. Statistical significance was reached at the level of 1 per mil or 1 per cent.



**Introduction**  
Because the occurrence of allergic diseases in the Czech Republic, continue to rise especially the use of prophylactic and therapeutic methods are gaining increased significance. Exposure of TH1 and TH2 cytokines in umbilical blood is associated with an increased risk of allergy. The combination of TH1 and TH2 cytokine production and number of the gastrointestinal tract epithelium. It was suggested that any agent that may improve the function of the intestinal epithelium may be a possible point of therapy. For example, child's future immunomodulation. The allergic phenotype may already be present in umbilical blood. Identifying systems to modulate antigen is considered an important factor, that contributes to the development of allergy.

In our previous work we presented the results of a 12 year study (1998-2010) 3912 samples of umbilical cord blood were examined. We reached several conclusions from which it was also clear that allergy was significantly associated with a positive family history (statistical significance at 1% level). We also detected differences in seasonality, especially with regard to pollen allergy. High levels of umbilical IgE and positive family history were found to be grounds for prophylactic intervention by influencing the microbial flora of the gastrointestinal tract (GIT).

**Method**  
Mantel-Haenszel's test was used to evaluate the results in our study. We used the Mantel-Haenszel's test, the test adapted from English biologist. New study is dominated by Mantel-Haenszel's test. We used the Mantel-Haenszel's test. Rank correlation - Spearman and Kendall. Eventually it is possible to use the Rank Correlation Test was applied because the hypothesis about seasonality was rejected by using a test of Chi-square and Fisher's.

**Biological Material**  
Umbilical cord blood was collected without anticoagulant agents at birth. Venous blood was collected without anticoagulant agents in the first and third year of life. Determination of IgE was performed using ELISA. In ELISA, calibration range 0.4-1600 IU/ml exposed values under 3 years less than 70 IU/ml. Determination of IgA was performed using immunoelectrophoresis. In IgA, calibration range 0.2-20 g/l. Determination of IgG was performed also using immunoelectrophoresis. In IgG, calibration range 0.2-20 g/l. In IgG, calibration range 0.091-39 g/l. Exposed values up to 1 year of age 5.5-14.5 IU/ml to 15 years 5.5-14.5 IU/ml.

**Colifant Newborn - No Formal Vaccine - A. probifida**  
This is a live parent vaccine containing hypobifid non-pathogenic E. coli. This strain is able to replace colonization of intestinal tract by pathogenic strains. It is originally patented by the Institute of Serum and Vaccines. One source of 12 vial batches was derived from the present manufacturer, Czech company in Terras. Each vial contains *Escherichia coli* serotype O83: K24: H10 (minimum 0.8 x 10<sup>10</sup> CFU) and representative group of bacteria that are part of the normal intestinal microflora. The vaccine was registered at the State Institute for Drug Control in 1997 under registration number 20-36237C. Use of the strain and preparation of the vaccine were patented in 1989 under number 204772Z. E. coli, from which the live vaccine is prepared, are a nonpathogenic strain with the above mentioned serotype. It is used in the collection of type strain number 603H16.

**Results**  
The first double graph shows the values of umbilical cord IgE in 2001-2002- these are average values of umbilical cord IgE in individual months of the respective years in newborns born in families with allergic-allergics (Graph 1).

Already during years 2005-2008-2009 we treated children with Colifant Newborn (a hypobifid non-pathogenic strain of E. coli). Normalization of IgE was seen in 106 from 116 patients in first group and 86 from 98 patients at the age 15 months. Also average IgE values in monitored treated group at one year of age 2005-2009 are in normal values. The results of IgE and IgG were compared. (Graph 2.)

On the other Graphs we have average IgE values in monitored treated group 2010-2014 at one year of age and at 3 years of age (Graph 3). Control IgE in serum after treatment with Colifant newborn at the age of 15 months of year from the end 2010-2014 (Graph 4.) Average IgA values in monitored treated group at 3 years of age 2010-2014 are normalized. (Graph 5.)

Statistical processing of results of IgE, IgG, IgA, in the following years in patients with high umbilical IgE, treated after birth and their controls in the first year and in the third year of age in comparison to control group of healthy children.

P < 0.001 statistical significance was reached at the level of 1 promille, i.e. a significant protective effect, increased IgE and IgA. A significant decrease in IgE in line with the decreased illness rates in these patients. The development in time at controls was not tested for a small number of complete pairs of measurements.

At 1 year of age in sick patients, there were statistically significantly correlates between IgE and IgA at a significance level of 1%, correlation was positive and directly proportional.

At 1 year of age, the umbilical IgE correlates with all serum immunoglobulins, the most with IgG and IgA.

Level of significance at 1 promille (\*\*\*), and 1% (\*) and 10% (\*\*) and reflects the positive clinical and laboratory status of the children.

At 3 years of age, there were statistically significant correlates between IgE and IgA at a significance level of 1%.

## RESEARCH ARTICLE

## Umbilical IgE and Advanced Glycation Products in Association with Allergies in Childhood

Liška Jiří<sup>1,\*</sup>, Holeček V.<sup>2</sup>, Siala K.<sup>1</sup>, Sobotová Š.<sup>2</sup>, Trefil L.<sup>3</sup>, Racek J.<sup>3</sup>, Sýkora J.<sup>4</sup> and Šefrna F.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mulac Hospital, Newborn Department, Pilsen, Czech Republic; <sup>2</sup>Mulac Hospital, Department of Clinical Chemistry, Pilsen, Czech Republic; <sup>3</sup>Charles University, Faculty of Medicine, Faculty Hospital, Department of Clinical Chemistry and Haematology, Pilsen, Czech Republic, Pilsen; <sup>4</sup>Charles University, Faculty of Medicine, Faculty Hospital, Department of Paediatrics, the Czech Republic, Pilsen; <sup>5</sup>Department of Health Accounting and Statistics, University Hospital Pilsen, Czech Republic

**Abstract: Background:** Little is known regarding the possibility of predicting allergy in genetically susceptible individuals.

**Objective:** We endeavored to measure the levels of IgE, IgA and advanced glycation end products (AGEs) in the umbilical blood of newborns of allergic parents.

**Method:** We collected two groups of newborns, the first group of 20 subjects with non-atopic parents, and the second with 20 subjects with a history of allergy in one or both parents.

**Results:** Neonates born to parents with allergies had increased levels of AGEs in their umbilical cord blood.

**Conclusion:** This causes increased oxidative stress and an increased probability of allergy and asthma in a child's future. We therefore propose that such children should be followed with the aim of lowering AGEs and IgE throughout life.

## ARTICLE HISTORY

Received: June 12, 2016  
Revised: August 29, 2016  
Accepted: October 08, 2016

DOI:  
10.2174/1871522216666161018145  
434

**Keywords:** Advanced glycation end products, allergy, oxidative stress, immunoglobulin E, and umbilical blood.

## INTRODUCTION

Free radicals are important factors involved in allergic reactions. These free radicals negatively influence the incidence and prognosis of allergy. Advanced glycation end-products (AGEs) activate receptors (RAGE) and cause long lasting inflammation, followed by free radical production. RAGE activate NF kappaB formation and activate intracellular oxidative stress. Furthermore they repress some endogenous autoregulatory functions leading to many diseases, including allergy [1]. Oxidative stress increases the inflammatory reac-

tion in asthma and allergies. Supplementation with antioxidants decreases the inflammatory reaction in asthma and allergy, however these supplements do not prevent the formation of these diseases. To our knowledge, there are no published articles regarding AGEs responses, or the relationships between AGEs and IgE in newborns of allergic parents. We collected two groups of newborns, the first without allergy in parents (controls B) and the second with a history of allergy in one or both parents. The objective of this experiment was to test the levels of IgE, IgA and AGEs in umbilical blood in the two groups.

## MATERIAL AND METHODS

The data collection took place from January to February 2015. 40 neonates were enrolled into the

\*Address correspondence to this author at the Mulac Hospital, Newborn Department, Pilsen, Czech Republic;  
Tel: 0042377101111; E-mail: [mud.jiri.liska@seznam.cz](mailto:mud.jiri.liska@seznam.cz)

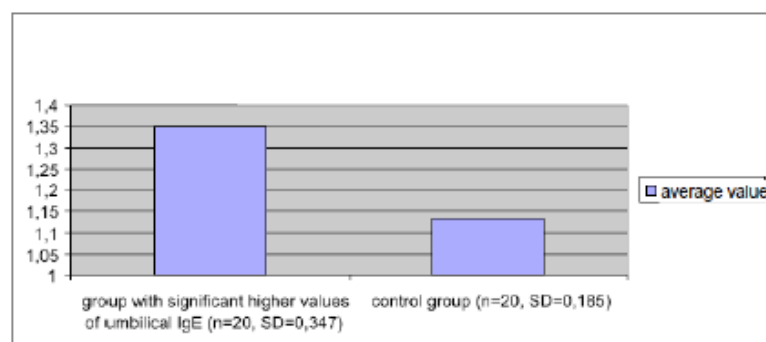


Fig. (1). Levels of advanced glycation end products in cord blood serum in newborns of allergic parents and controls. Results are expressed in fluorimetric units.

study and divided into two groups (A and B). Group A consisted of children born to parents with a positive history of allergy. Group B, the control group, consisted of children born to parents without allergies. Inclusion criteria for Group B children was low IgE measured at birth. IgA was measured in both groups to exclude the possibility of mixed maternal blood. In both groups we measured levels of IgE, IgA and AGEs. Glucose was measured in all mothers because high levels can negatively influence the levels of AGEs in umbilical blood.

### BIOLOGICAL MATERIAL

AGEs were estimated fluorimetrically according to Henle (2) *et al.* (1999); in brief, sera samples were diluted 1:30 with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), wavelength for excitation 370 nm, emission 440 nm, results were expressed in fluorimetric units (FU). Measurements were performed using a Cary Eclipse fluorimeter (Varian Australia Pty Ltd, 679 Springvale Rd., Mulgrave Victoria, Australia).

Umbilical cord blood collected without anticoagulant agents (at birth), venous blood collected without anticoagulant agents in the first and third year of life stability 1 week at  $+4 \pm 8$  °C, tests were performed always within 24 hours of collection.

Determinations of IgE up to the year 2010 was performed by ELISA kits f. RADIM, calibration range 0,4 -1000 IU/mL, from the year 2011 determinations are performed by chemiluminescent immunoassay kits on Total IgE Beckman Coulter,

the immunoassay analyzer Access 2, calibration range 0,25–3000 IU/mL, expected reference values under 5 years less than 75 IU/mL.

### Determination of IgA

Immunoturbidimetric determination of immunoglobulin A by kits IgA K-Assay IgG Beckman Coulter, on the analyzer AU 480 Beckman Coulter, calibration range 0,2-8 g/L expected reference values in children under 1 month of age 0,08-0,89 g/L. Newborn children do not have registrable IgA unless there is mixing of maternal blood.

### Determination of IgG

Immunoturbidimetric determination of immunoglobulin G by kits IgG Beckman Coulter, on the analyzer AU 480 Beckman coulter, calibration range 0,004-30g/L, expected reference values in children under 1 month of age 2,2-11,2 g/L, up to 1 year of age 5,5-14,7 g/L.

### Determination of Glucose

Estimation of glucose by the kit of ERBA LACHEMA with glucooxidase on the instrument Beckman Counter AU 480.

### STATISTICAL ANALYSES

Data are presented as means±standard error (SD). The Wilcoxon test and the Spearman's correlation analysis were performed for the statistical evaluation of the group data with SPSS software.

A probability value of less than 0.05 was considered statistically significant in all analyses.

The study was performed in accordance with the National Ethic Committee and in agreement with the non-invasive examination of newborn children. This article has not been published elsewhere.

## RESULTS

The results of the group of test group patients (n=20) and the control group (n=20) are presented in Figure 1. There are significant differences between the two groups in the levels of IgE ( $3.441 \pm 0.785$  versus  $0.273 \pm 0.099$  IU/mL,  $p < 0.001$ ) and AGEs ( $p < 0.01$ ). These results suggest that the newborns of allergic parents had significantly higher levels of AGEs. There was no difference in the blood glucose concentrations in mothers at the time of parturition. In neither newborns of allergic subjects ( $r = -0.1398$ ,  $p = 54.2$ ) nor controls ( $r = 0.1968$ ,  $p = 51.4$ ) there were no correlations between IgE levels and AGEs.

## DISCUSSION

The results of our study suggest that there is a significantly higher level of AGEs in newborns of allergic parents. This may be due to the fact that newborns already have an inborn predisposition to the development of allergy. The results indicate that predisposition to allergy may probably arise during intrauterine life. To the author's best knowledge this is the first survey to demonstrate such findings. The strength of our study is that our children were clinically healthy term-babies. Another strength is that all blood samples were collected at the same point in time in the two groups.

Oxidative stress decreases immunity, the diminution of IL-1, IL-6 and influence expression of cytokines TNF- $\alpha$  [3]. The relationships are complicated and we cannot exclusively state, that oxidative stress causes immunodepression and conversely that antioxidant therapy results in immunostimulation. Activated phagocytes produce free radicals which are able to kill bacteria, viruses, yeasts and parasites. Furthermore, T-killer-cells kill tumor cells. Allergens and autoimmune diseases contain numerous free radicals. Free radicals oxidize or peroxidize proteins, lipoproteins, DNA

etc. and thus change their properties. Intake of antioxidants during pregnancy may decrease the risk of allergies [4, 5] due to the decline of free radicals. Zinc and selenium through Fenton's reactions may participate in autoimmune states. AGEs are formed both outside and inside the body. They are formed by the linkage of glucose usually to lysine residues. Other reactions may arise (Amadori, Schiff, Maillard products) where AGEs increase vascular permeability, inhibit vascular dilatation by blocking nitric oxide (NO), oxidize LDL-cholesterol, support cytokine production and increase oxidative stress [6].

AGEs are seen as speeding up oxidative damage to cells and in altering their normal behavior. Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) is found on many cells, including endothelial cells, smooth muscle, cells of the immune system from tissues such as lung, liver, and kidney. RAGE is expressed on T-lymphocytes, monocytes and macrophages. This receptor, when binding AGEs, contributes to allergy [7]. Determination of advanced oxidation products of proteins (AOPP) is a marker of oxidative stress. Significantly high levels of AOPP is associated with allergic rhinitis. AGEs cumulate during aging. The connection between AGEs and allergy is beyond the scope of this discussion. Patela and Lorenzo et al have described this most admirably [8, 9]. Mast cells produce AGE-binding protein, receptor to AGE (RAGE). Glycated albumin supports the extracellular release of superoxides from mitochondria, and thus damages calcium homeostasis [10]. Apoptosis of mast cells contributes to the formation of inflammation [11]. Some AGEs have innate catalytic oxidative capacity. Stimulation of NAD(P)H oxidase through the activation of RAGE and damage to mitochondrial proteins leads to mitochondrial dysfunction and induces oxidative stress. As part of diabetic complications, AGEs agglomerate in proteins with a long half-life, and result in damage of retina, myelin, glomerular membrane and the vascular endothelium. AGEs generate reactive oxygen species (ROS) and activate inflammatory signaling cascades. In our previous work, we presented the results of a 12-year study, in which we examined 3600 samples of umbilical cord blood. We reached several conclusions from which it was clear that allergy was significantly associated with a positive family history [12].

The creation of glycated proteins is inhibited by phosphopyridoxal, guanidine, acetylosalicylic acid and D-lysine, though glycation of lysine is cancerogenic. Creation of AGE is faster than their degradation, which progresses after binding to RAGE. AGEs cause lipoperoxidation, cross-bonds, inactivate nitric oxide, stimulate the formation of cytokines, support free radical creation, cellular proliferation, and support coagulopathy. Studies in rats and mice have found that natural phenols such as resveratrol and curcumin can prevent the negative effects of the AGEs [13].

Early estimation of unbalanced oxidant-antioxidant and DNA damage may protectively influence the health of children [14, 15]. In contrast with healthy children, those with allergies have been found to have increased fractional exhaled nitric oxide (FeNO). Supplementation with vitamin E and selenium was observed to increase total antioxidant capacity - though only in asthmatics [16]. Further larger scale studies are needed to test the use of AGE and sRAGE as biomarkers for the prediction of allergy in children.

## CONCLUSION

Our results suggest that newborns of allergic parents with higher levels of IgE have increased values of AGE in umbilical blood. We believe that the probability of future allergic reactions in children, whose mothers have allergy, may be higher when the level of AGE and IgE in umbilical cord blood is significantly increased. Because the levels of glucose between the two groups did not differ significantly we can conclude that the potentially allergic children have increased oxidative stress. This study has provided insights into new aspects of AGE in newborns and afforded important clues for further well-designed studies whether the increased level of free radicals can be diminished by administration of antioxidants.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

## REFERENCES

- [1] Bengmark, S.: Advanced glycation and lipoxidation and products-amplifiers of inflammation: the role of food. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2007, 31 (5), 430-440.
- [2] Henle, T.; Deppisch, R.; Beck, W.; Hergessell, O.; Hänsch, G.M.; Ritz, E.: Advanced glycated end products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol. Dial. Transplant*, 1999, 14(8), 1968-1975.
- [3] Hrdý, J.; Žižka, J.: Expression of cytokines in cells of cord blood in the neonatal period of healthy and allergic mothers. *Vox. Paediatricae*, 2007, 10(8), 32.
- [4] Nwaru, B.I.; Erkkola, M.; Ahonen, S.; Kaila, M.; Kronberg-Kippila, C.; Ilonen, J.; Simell, O.; Knip, M.; Veijola, R.; Virtanen, S.M.: Intake of antioxidants during pregnancy and the risk of allergies and asthma of the offspring. *Eur.J.Clin.Nutr.* 2011, 65(8), 937-43.
- [5] Matés, J.M.; Pérez-Gómez, C.; Blanca, M.: Chemical and biological activity of free radical "scavengers" in allergic diseases. *Clin.Chim.Acta* 2000, 296, 1-15.
- [6] Vistoli, G.; DeMaddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G.: Advanced glycoxidation and lipoxidation and products (AGEs and ALEs) : an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic.Res.* 2013, 47 (12), Suppl 1, 3-27.
- [7] Aksoy, F.; Demirhan, H.; Veyseller, B.; Yildirim, Y.S.; Ozturan, O.; Basinoglu, T.: Advanced oxidation protein products as an oxidative stress marker in allergic rhinitis. *Kulal Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2009, 19 (6), 279-284.
- [8] Patella, V.; Incorvaia, C.; Minciullo, P.L.: Oxidative stress markers in patients with hymenoptera venom allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2015, 36, 9-13.
- [9] Di Lorenzo, G.; Minciullo, P.L.; Leto-Barone, M.S.; La Piana, S.; La Porta, G.; Saija, A.; Gangemi, S.: Differences in the Behavior of Advanced Glycation End Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients With Allergic Rhinitis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2013, 36, 101-106.
- [10] Yoshimaru, T.; Suzuki, Y.; Inoue, T.; Nishida, S.; Ra, C.: Extracellular superoxide released from mitochondria mast cell death by advanced glycation end products. *Biochim.Biophys.Acta* 2008, 1783 (12), 2332-2443.

- [11] Yan, SF.; Ramasamy, R.; Schmidt, AM.: Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetic complications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2008, 4(5), 285-293.
- [12] Liška, J.; Siala, K.; Holeček, V.; Sobotová, Š.; Kepková, M.; Šefrna, F.: Effect of early treatment of newborns by peroral colonization by non-pathogenic *E. coli* on development of their immuno-allergic system. *Bentham Science Publishers, Clinical Anti Inflammatory & Anti-Allergy Drugs*, 2014, 1, 111-121.
- [13] Mohammed, A. Hussein.; Hussein Abd El -Maksoud: Biochemical effects of Resveratrol and Curcumin combination on obese diabetic rats. *Molecular & Clinical Pharmacology* 2013, 4(1), 1-10.
- [14] Chiavaroli, V.; Giannini, C.; De Marco, S.; Chiarelli, F.; Mohn, A.: Unbalanced oxidant -antioxidant status and its effect in pediatric diseases. *Redox Rep.* 2011, 16(3), 101-107.
- [15] Zeyrek, D.; Cakmak, A.; Atas, A.; Kocyigit, A.; Erel, O.: DNA damage in children with asthma bronchiale and its association with oxidative measurements. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2009, 20(4), 370-376.
- [16] Motreno-Macias, H.; Romieu, I.: Effects of antioxidant supplements and nutrients on patients with asthma and allergies. *J.Allergy Clin. Immunol.* 2014, 133 (5): 1237-1234.



7<sup>th</sup> International Conference on Drug Discovery & Therapy

February 15<sup>th</sup> – 18<sup>th</sup> 2016, University of Sharjah, Sharjah, UAE

**DAY 4: Thursday, February 18,**

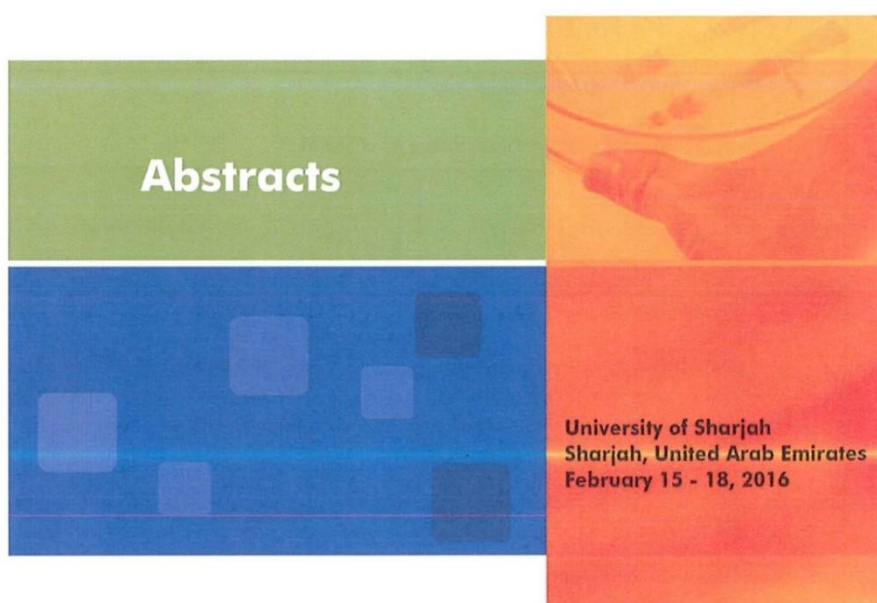
**2016**

**POSTER PRESENTATION**

LOCATION: Poster and Exhibition Area

POSTER PRESENTATION TIME: 9:00 AM – 5:30 PM

Poster Board Reference Number	Name of Presenter	Poster Board Reference Number	Name of Presenter
Poster Board #: 31	<b>Ryszard Mordak</b> The Usefulness of the Intramammary Administration of the Homogenate of the Antlerogenic Stem Cells (MIC -1) in the Therapy of the Subclinical Mastitis in Dairy Cows During Lactation	Poster Board #: 46	Asma Mahmoud Fikri <b>Metabolomics in a potential animal model for Metabolic Syndrome and Type-Two Diabetes Mellitus</b>
Poster Board #: 32	<b>Radwan El-Haggar</b> Synthesis of Some Novel 8-Substituted-7-Benzoyloxy -6-Nitro-Coumarin Derivatives, <i>In-Vivo</i> Evaluation and Molecular Docking Studies for their Anti-Inflammatory Activity	Poster Board #: 47	<b>Faïza Diaba</b> Synthesis of the Tetracyclic ABCD core of Madangamines D, E and F.
Poster Board #: 33	<b>Jiří Liška</b> Significance of Immunoglobulin E in Umbilical Blood in Relation to an Allergic Family History, it's Relation to Seasonality, Immunity and Possibility of Pre- and Postnatal Consequences. The Remarkable Subsequent Effects of Altering Gastrointestinal Flora in Treated Newborns	Poster Board #: 48	<b>Hatice Demiray</b> A New Cycloartane from Euphorbia Anacampseros BOISS var. Tmolea, an Endemic Plant of Bozdağ (İzmir, Turkey)



ORGANIZERS



POSTERS

**PO-33** SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL

CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS

**Jiří Liška, Konrad Siala, Václav Holeček, Štěpánka Sobotová and František Šefrna**  
Jiří Liška, Konrad Siala, Václav Holeček, Štěpánka Sobotová and František Šefrna  
Mulačova Hospital, Faculty Hospital, Plzeň, Czech Republic; E-mail:  
mudr.jiri.liska@seznam.cz

From 1998-2012 we examined 3912 samples of umbilical blood taken from children born into families with a positive history of allergy in one or both parents. The results revealed that allergy is strongly linked with family history ( $p \leq 0.0001$ ). We also detected differences in seasonality, especially with regards to pollen allergies. High values of umbilical IgE, together with a positive family history of allergy an indication for inclusion of patients into the treated group, which, during the years of 2011-2015 were treated with Colinfant Newborn (a lyophilized non-pathogenic strain of *E. coli*).

Normalisation of IgE was seen in 90% of patients with previously increased levels. IgG and IgA at the first and the third year of life were also normalized ( $p \leq 0.0001$ ). This also corresponded with an entirely negligible subsequent morbidity of the monitored group of children (up to 4 years of life) when compared with the control group.



## **Drug Discovery and Therapy World Congress 2016**

**(4th in the Series)**

**(August 22nd - 25th, 2016, Boston, MA, USA)**

Dr. J. Liška

Faculty Hospital Pilsen

Sukova 32, 30100 Pilsen,

Pilsen

Czech Republic

**Subject: DRUG DISCOVERY & THERAPY WORLD CONGRESS 2016**

**August 22 – 25, 2016 (Boston, USA)**

Dear Dr. Liška

Bentham Science Publishers is an exhibitor and Track sponsor of the conference entitled "**Drug Discovery and Therapy World Congress 2016**" to be held from August 22 - 25, 2016, in Boston, USA, with Prof. Ferid Murad, *Nobel Laureate* and Prof. Atta-ur-Rahman, *FRS* as the Co-Presidents of the conference. This four-day event will feature recent findings from leading industrial, clinical and academic experts in the field, in the form of lectures and posters. A number of Nobel Laureates will deliver keynote lectures at the conference. For details, please visit the website [www.ddtwc.com](http://www.ddtwc.com)

The organizers of this event have requested us for support in disseminating information about this conference to researchers associated with us. In addition, Bentham Science Publishers can also nominate a limited number of participants to receive a special 20% discount on the prevailing registration fee.

In view of your contribution as an Editorial Advisory Board of the Journal "Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs" we would like to nominate you to participate as a speaker (Invited/Session) in one of the following tracks.

**Significance of immunoglobulin E in umbilical blood in relation to an allergic family history, it's relation to seasonality, immunity and possibility of pre- and postnatal consequences. The remarkable subsequent effects of altering gastrointestinal flora in treated newborns.**

J. Liška, K. Siala, V. Holeček, Š. Sobotová, F. Šefrna  
Mulačova Hospital, Faculty Hospital Plzeň, Czech Republic

We have examined 4312 samples of umbilical blood taken from children born into families with a positive history of allergy in one or both parents from 1998-2014. Newborn were divided into 3 groups: 2005-2007, 2008-2009, 2010-2014. The results revealed that allergy is strongly linked with family history ( $p \leq 0.0001$ ). We also detected differences in seasonality, especially with regards to pollen allergies. High values of umbilical IgE, together with a positive family history of allergy an indication for inclusion of patients into the treated group, which, during the years of 2005-2014 where treated with Colinfant Newborn (a lyophilized non-pathogenic strain of E.coli). Normalisation of IgE was seen in 90% of patients with previously increased levels. IgG and IgA at the first and the third year of life were also normalized ( $p \leq 0.0001$ ). This also corresponded with an entirely negligible subsequent morbidity of the monitored group of children (up to 4 years of life) when compared with the control group.

sp.zn.sukls21908/2012

## SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU

### 1. NÁZEV PŘÍPRAVKU

COLINFANT NEW BORN  
prášek pro perorální suspenzi

### 2. KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ SLOŽENÍ

Jedna dávka obsahuje Escherichia coli cryodesiccata (O83:K24:H31) v počtu  $0,8 \times 10^8$  až  $1,6 \times 10^8$  bakterií.

Pomocné látky se známým účinkem: 100 mg sacharosu, 150 mg odtučněného sušeného mléka.

Úplný seznam pomocných látek viz bod 6.1.

### 3. LÉKOVÁ FORMA

Prášek pro perorální suspenzi.

Lyofilizát je bělavá až slabě nažloutlá porézní hmota uložená v převážně většině v kompaktním celku na dně lahvičky. Po rozpuštění vznikne bělavá, slabě zakalená tekutina.

### 4. KLINICKÉ ÚDAJE

#### 4.1 Terapeutické indikace

COLINFANT NEW BORN je určen pro novorozence a kojence do 1 roku věku a pro nedonošené děti především k preventivnímu podání a to:

- k prevenci gastrointestinálních infekcí, především nosokomiálních, na novorozeneckých odděleních a v kojeneckých ústavech,
- k preventivnímu osídlování střeva na odděleních intenzivní péče u nedonošených či rizikových novorozenců zvláště ohrožených nosokomiálními infekcemi, často nekojených, po léčbě antibiotiky, která narušují přirozené složení střevní mikroflóry,
- individuálně ve všech případech, kde lze předpokládat narušení střevní mikroflóry (po selektivní dekontaminaci, po ozařování, po podávání antibiotik).

#### 4.2 Dávkování a způsob podání

##### Dávkování

Dávka je 1 ml, tj. obsah jedné lahvičky.

Podává se 1krát denně před jídlem, 3krát týdně po dobu 4 týdnů.

Je určena pro novorozence a kojence do 1 roku věku a pro nedonošené děti.

##### Způsob podání

Přípravek se podává perorálně.

Obsah jedné lahvičky se rozpustí přidáním 1 ml sterilní destilované vody, sterilní injekční stříkačkou, přičemž se zátku lahvičky po odstranění hliníkového uzávěru propíchnou jehlou. U novorozenců a nedonošených dětí se roztok aplikuje stříkačkou bez injekční jehly přímo na kořen jazyka tak, aby je dítě vypilo, a dá se zapít čajem. Je-li nedonošené dítě dosud na parenterální výživě, je aplikace

prováděna žaludeční sondou. U dětí od 1 týdne do 1 roku života se obsah stříkačky přeneso do lahvičky s 5-10 ml čaje a dá dítěti vypít.

#### **4.3 Kontraindikace**

Přecitlivělost na léčivou látku nebo na kteroukoli další složku tohoto přípravku uvedenou v bodě 6.1.

#### **4.4 Zvláštní upozornění a opatření pro použití**

U pacientů s imunodeficiencí je doporučena zvýšená pozornost lékaře.

Před a po podání přípravku se má provést bakteriologické vyšetření stolice pro kontrolu uchycení kmene *Escherichia coli*.

Pacienti se vzácnými dědičnými problémy s intolerancí galaktózy, fruktózy, vrozeným nedostatkem laktázy, malabsorpcí glukózy a galaktózy nebo sacharózo-izomaltázové deficiencí by tento přípravek neměli užívat.

Tento přípravek obsahuje méně než 1 mmol (23 mg) sodíku v jedné dávce, tj. v podstatě je „bez sodíku“.

#### **4.5 Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce**

Kmen *Escherichia coli* obsažený v přípravku je citlivý na běžná antibiotika, je tudíž bezúčelné jej podávat souběžně s antibiotiky.

#### **4.6 Fertilita, těhotenství a kojení**

Není relevantní. Přípravek je určen pro podávání dětem do jednoho roku věku.

#### **4.7 Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje**

Není relevantní. Přípravek je určen pro podávání dětem do jednoho roku věku.

#### **4.8 Nežádoucí účinky**

První den podávání přípravku se mohou v ojedinělých případech vyskytnout častější a řídkší stolice. Jiné nežádoucí účinky nejsou známy.

#### Hlášení podezření na nežádoucí účinky

Hlášení podezření na nežádoucí účinky po registraci léčivého přípravku je důležité. Umožňuje to pokračovat ve sledování poměru přínosů a rizik léčivého přípravku. Žádáme zdravotnické pracovníky, aby hlásili podezření na nežádoucí účinky na adresu:

Státní ústav pro kontrolu léčiv

Šrobárova 48

100 41 Praha 10

Webové stránky: <http://www.sukl.cz/nahlasit-nezadouci-ucinek>

#### **4.9 Předávkování**

Není známo. Pokud by k němu došlo, mohla by následovat 1-2 dny řídkší častější stolice a poté spontánní úprava.

### **5. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI**

#### **5.1 Farmakodynamické vlastnosti**

Farmakoterapeutická skupina: Imunopreparát.  
ATC kód: A07FA

#### Mechanismus účinku

Mechanismus účinku je komplexní. Významná je snadná adherence kmene *Escherichia coli* k receptorům sliznice, kterou umožňuje přítomnost tl fimbrií.

V klinické studii, v níž bylo nahrazeno přirozené, náhodné osídlení střeva u zdravých novorozenců cíleným, kontrolovaným osídlením kmenem *Escherichia coli*, sérotyp O83:H24:K31, kmen přetrvával ve střevě v naprosté převaze po dobu 14-16 týdnů i déle a jeho přítomnost stimulovala lokální i celkovou imunitní odpověď, významnou zvláště u nekojených dětí.

Preventivní osídlení u nedonošených a rizikových dětí bylo použito v širší klinické praxi.

Snížovalo počet nosokomiálních infekcí, počet patogenů ve střevě i jinde, nutnost použití antibiotik a mortalitu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Celkem bylo osídleno více než 2000 dětí.

V rámci přípravy podkladů pro registraci přípravku COLINFANT NEW BORN byla provedena klinická studie na oddělení nedonošených dětí, jejímž cílem bylo prokázat, že účinek přípravku obsahující kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31 je plně srovnatelný s účinkem nativního přípravku připravovaného ze suspenze nepatogenního kmene *Escherichia coli*, sérotyp O83:K24:H31.

U dětí, kterým byl podán přípravek, byl významně nižší počet izolovaných patogenů i jejich druhů než u dětí léčených antibiotiky, kde po skončení léčby docházelo k vzestupu počtu patogenů i jednotlivých druhů. Antibiotika sice odstranila klinické projevy infekce, nikoliv však osídlení střeva patogeny.

Při a po aplikaci přípravku nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky.

## **5.2 Farmakokinetické vlastnosti**

Kmen *Escherichia coli* obsažený v přípravku COLINFANT NEW BORN je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflóry. Velmi dobře osídluje střevní trakt (pravděpodobně pomocí tl fimbrií, které umožňují snadnou adherenci k receptorům sliznice střevní a jinými komplexními mechanismy). Dlouhodobá přítomnost kmene ve střevě stimuluje tvorbu specifických a nespecifických protilátek, a to jak lokálně, ve střevě a ve slinách, tak sérových. Má příznivý vliv na složení střevní mikroflóry, brání osídlení patogeny a vytlačuje enteropatogenní kmeny již přítomné (enteropatogenní *Escherichia coli*, klebsielly, *Pseudomonas aeruginosa* a v některých případech i salmonely). Příznivě působí u nosičů enteropatogenních kmenů.

## **5.3 Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti**

Účinnost a neškodnost kmene byly zkoušeny na bezkolostrálních, bezmikrobních selatech, kde osídlení tímto kmenem zabránilo u 100 % zvířat následně experimentální infekci enteropatogenním kmenem *Escherichia coli* a uhytnutí zvířat.

U SPF-ICR myší byla hodnota LD<sub>50</sub> titru bakterií 10 na 9/1 ml. Při intraperitoneální aplikaci 0,5 ml přežívalo 100% myší.

#### Posouzení rizika pro životní prostředí

Přípravek nemá vliv na životní prostředí.

## **6. FARMACEUTICKÉ ÚDAJE**

### **6.1 Seznam pomocných látek**

Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, chlorid amonný, sacharóza, odtučně sušené mléko.



## **6.2 Inkompatibility**

Studie kompatibility nejsou k dispozici, a proto nesmí být tento léčivých přípravek mísen s jinými léčivými přípravky.

## **6.3 Doba použitelnosti**

2 roky.

Po otevření a rekonstituci se přípravek musí ihned spotřebovat.

## **6.4 Zvláštní opatření pro uchovávání**

Uchovávejte v chladničce (2 °C – 8 °C). Uchovávejte v původním obalu a v krabici, aby byl přípravek chráněn před světlem a vlhkostí.

## **6.5 Druh obalu a obsah balení**

Skleněná lahvička, gumová zátka, hliníková pertle, krabička.

### Velikost balení

1 x 12 lahviček.

## **6.6 Zvláštní opatření pro likvidaci přípravku**

Veškerý nepoužitý léčivý přípravek nebo odpad musí být zlikvidován v souladu s místními požadavky.

## **7. DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI**

DYNTEC spol. s r.o.  
Klučovská 1280, 282 01 Český Brod, Česká republika  
E-mail: [dyntec@dyntec.cz](mailto:dyntec@dyntec.cz)

## **8. REGISTRAČNÍ ČÍSLO**

59/762/97-C

## **9. DATUM PRVNÍ REGISTRACE/PRODLOUŽENÍ REGISTRACE**

Datum první registrace: 10. září 1997  
Datum posledního prodloužení registrace: 6.5.2015

## **10. DATUM REVIZE TEXTU**

6.5.2015

Dear Dr. Liška,

We are pleased to note that your excellent article *Effect of Early Treatment of Newborns by Peroral Colonization Using Non-pathogenic E. coli on the Development of Their Immuno-allergic System* has been published recently in **Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs**.

We will be happy to promote your article by preparing an electronic color flyer in which your article will be highlighted provided that (a) you plan to participate in some major international conferences in the near future, and (b) that you are prepared to print multiple copies of it on a color printer and distribute it.

Please let us know if you are interested in this offer and let us know names, dates and venue of conferences you are attending. We will then design a suitable flyer and email to you.

We really look forward to hear from you.

Please contact [marketing@benthamscience.org](mailto:marketing@benthamscience.org)

Yours Sincerely

Kind regards,

Madiha Hussain

Marketing Manager

Bentham Science Publishers

#### Zahraniční ohlasy

Dear Mr. Jiří Liška,

Your work entitled "SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES: THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN "TREATED NEWBORNS" caught our attention during a search at Biotechnology World Congress. I am Mihaela Melnic from the editorial team of Omniscryptum Publishing Group. We publish academic books and would be honored to evaluate your works in this field.

Your research could be of interest to a wider audience and we would like to consider publishing it as a printed book and marketing it worldwide.

Mr. Jiří Liška, would you agree to receive more information?

I am looking forward to hearing from you.

Sincere regards,

**Mihaela Melnic**

Acquisition Editor  
e: m.melnic@lap-publishing-house.com  
w: www.lap-publishing.com

19. 2. 2016, 12:45:48

*"Science Stays True Here"*

## *Biological and Chemical Research*

ISSN 2312-0088

Dear Jiří Liška,

This is Biological and Chemical Research (ISSN 2312-0088, USA).

We are glad to know you have submitted a paper named "**SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS**" in **7th International Conference on Drug Discovery & Therapy and the 4th Biotechnology World Congress**, February 15-18, 2016, Sharjah, UAE.

We are very interested in your research, if the paper mentioned has not been published in other journals or you have other unpublished papers in hand and have the idea of making our journal a vehicle for your research interests, please feel free to send electronic version to us.

22. 2. 2016, 7:54:42

### *From Knowledge to Wisdom*

#### **Journal of Pharmacy and Pharmacology**

ISSN 2328-2150 DOI: 10.17265/2328-2150

Frequency: monthly

Dear Jiří Liška,

This is *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (ISSN 2328-2150), a professional journal published across the United States by David Publishing Company.

We have learned your paper entitled SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS from The 7th International Conference on Drug Discovery & Therapy, 2016.

We are very interested in your papers and would like to publish your paper in our journal. If you have the idea of making our journal a vehicle for your research interests, please send the electronic version of your **papers or books** to us in MS word format via email attachment. Expect to get your reply soon.

Currently, we are trying to invite some scholars who are willing to join our editorial board or be our reviewers. If you are interested in our journal, please send your CV to us. Hope to keep in touch by email and publish some papers or books for you and your friends. As an American academic publishing group, we wish to become your friends if we may.

Best Regards,

Sabrina Jones  
Editorial Office  
Journal of Pharmacy and Pharmacology  
David Publishing Company  
pharmacy@davidpublishing.com ; pharmacy@davidpublishing.org ;  
pharmacypc@davidpublishing.com  
26. 2. 2016, 10:03:51

March 2, 2016

Dear Dr. Liška,

This is with reference to your article entitled “**Effect of early treatment of newborns by peroral colonization using non-pathogenic *E. coli* on the development of their immuno-allergic system**” to one of the previous issues of “*Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs (CAIAAD)*” which is sincerely valued.

We do hope that you will continue publishing your review articles and thematic issues in the journal. It is a great pleasure to invite you once again to contribute a **review/research article or special issue to Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs (CAIAAD)**. If contribution of a new article is not possible at this stage, you may update the article with the new literature recent developments and scientific references published during previous years and submit it for consideration for publication in the journal. The Publishers are delighted to extend the following offers to the contributors of the journal:

**Special Offers:**

- Quick processing and publication of the submitted papers.
- The first issue of each volume is available as “Open Access”.
  - Guest Editors of thematic issues will receive complete editorial support, which will entail extending invitations to prominent people in the field; seeking contributions from existing and previous authors for the planned thematic issue; announcing the forthcoming thematic issues on the websites to attract submissions, list and details for the preparation of manuscript, etc.

If you wish to submit your work to the journal, please provide us the title and an abstract (up to 250 words) of your review/research article or brief proposal of special issue by email to [caiaad@benthamscience.org](mailto:caiaad@benthamscience.org) for the Executive Editor's approval.

I look forward to a successful working collaboration.

Sincerely,  
Prof. Giovanni Passalacqua  
Editor-in-Chief  
Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs

2. 3. 2016, 10:25:27

Dear Dr. Liska,

I am writing you as editor-in-chief of the journal *Clinical Immunology Endocrine Metabolic Drugs (CIEMD)*, Bentham Science Publishers). I really enjoyed your poster “Significance of immunoglobulin E in umbilical cord...” during the 7th International Conference on Drug Delivery (Sharjah, UAE February 15-18 2016). I would be very pleased whether you may wish to contribute a review article on the above topic to CIEMD in the next few months. Looking forward to receiving your positive reply, I remain  
With My Personal Best Regards  
Emilio Jirillo

Emilio Jirillo, M.D.  
(Professor of Immunology,  
University of Bari, Bari, Italy)

2. 3. 2016, 16:44:14

Re-discover the finer facets of Metabolomics Research  
**5<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Metabolomics**  
May 16-18, 2016 | Osaka, Japan  
[REGISTER](#) | [ABSTRACT SUBMISSION](#)

---

Dear Dr. Jiří Liška ,

The purpose of this letter is to invite you to be a speaker at the upcoming “**5<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Metabolomics**” (Metabolomics Congress 2016) on May 16-18, 2016.

This conference will be held at Hyatt Regency Osaka, Japan.

[Click here](#) to view the Scientific Program

Metabolomics Congress 2016 is a specially designed cluster conference. The main theme of the conference is “Fifty Shades of Metabolomics and Methodological Development” which covers a wide range of critically important sessions. Metabolomics Congress 2016 would lay a platform for the interaction between experts around the world and aims in accelerating scientific discovery

Our conference assets are **Ramon Cacabelos** (EuroEspes Biomedical Research Center (CIBE), Spain),

**Petras Dzeja** (Metabolomics NMRS Core, Mayo Clinic, USA),

**Choon Nam ONG** (NUS Environmental Research Institute (NERI), Singapore),

**Ashkan Emadi** (Director, Hematology & Medical Oncology Fellowship, University of Maryland School of Medicine, USA),

**Max Torres** (The Ecuadorian Society of Metabolic and Bariatric Surgery (SECBAMET) who will discuss their novel research on Metabolomics and Biomedical Research

**Workshop** on “NMR-based Metabonomics Analysis of 2D with 3D (Spheroids) of breast cancer cells” by Bjoern Riefke Bayer Pharma AG, Germany

**Special Session** on “Translational Research in Targeting Glucose or Glutamine Dependency in Solid and Hematologic Neoplasms” by Ashkan Emadi, University of Maryland School of Medicine, USA

### Confirmed Speakers Including

Jian Zhi Hu, Pacific Northwest National Laboratory, USA  
Darby Tien-Hao Chang, National Cheng Kung University, Taiwan  
Jose Castro-Perez, Waters Corp, USA  
Eugenia Trushina, Mayo Clinic, USA  
Yoshiro Fujii, Shin Kobe Dental Clinic, Japan  
Kazuhiro Ogata, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Japan  
Andrea Armirotti, Istituto Italiano di Tecnologia, Italy  
Woo Duck Seo, National Institute of Crop Science, Republic of Korea  
Vladimir Shulaev, University of North Texas, USA  
Loeffler Jean Philippe, INSERM, France  
Shrikant Mane, Yale University School of Medicine, USA  
Simon Lytton, SeraDiaLogistics Munich, Germany  
Piotr Mlynarz, University of Technology (WUT), Poland  
Benedetto Grimaldi, Istituto Italiano di Tecnologia, Italy  
Yashwant Pathak, University of South Florida Health, USA  
Dietmar Plattner, University of Freiburg, Germany  
Brijesh Pandey, Amity University Lucknow, India  
Chia-Lin Hsu, National Yang-Ming University, Taiwan  
Tiina Karu, ILIT RAS, Russia  
And many more...

Please do not hesitate to contact or mail me if I can be of further assistance.  
We appreciate your time and look forward to hearing from you.

We anticipate your presence at our event.

Sincerely,  
Isaac Samuel  
Program Manager  
Metabolomics Congress 2016  
Ph: 1-702-508-5200 Ext:8033  
worldmetabolomics@conferenceseries.net

*4. 4. 2016, 14:42:56*

***Journal of Food Science and Engineering, USA***

ISSN 2159-5828 (Print); 2164-5795 (Online)

DOI: 10.17265/2159-5828

---

Dear Dr. Jiří Liška,

This is *Journal of Food Science and Engineering* (ISSN 2159-5828). We have learned your paper named "SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS" from the **4th Biotechnology World Congress**.

We are very interested in your research, if the paper **has not been published in other journals** or you have **other unpublished papers** in hand, and have the idea of making our journal a vehicle for your research interests, please feel free to send electronic version to us. The journal also publishes reviews and books. If you are interested in our journal, we also want to invite some people to be our reviewers. You can send your CV to us.

Best Regards,  
Rebecca Swift

*Journal of Food Science and Engineering*  
Print ISSN 2159-5828; Online ISSN 2164-5795, USA  
[food@davidpublishing.org](mailto:food@davidpublishing.org); [jfse\\_food@hotmail.com](mailto:jfse_food@hotmail.com)  
**David Publishing Company**  
Tel: 1-323-984-7526 Fax: 1-323-984-7374

8. 4. 2016, 11:14:14

Invitation for Jiří Liška from Journal of Materials Science and Engineering

## Call for Papers

Dear Jiří Liška,

We are *Journal of Materials Science and Engineering A* (ISSN: 2161-6213, USA) and *Journal of Materials Science and Engineering B* (ISSN: 2161-6221, USA), which are new editions of *Journal of Materials Science and Engineering* (ISSN 1934-8959, USA, 2007). We have learned your abstract entitled “SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT’S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS” from 2016-7th International Conference on Drug Discovery & Therapy.

This study of yours is very interesting to us, if it has not been published or **other unpublished papers** of yours are looking for a vehicle for bringing in these or other advanced ideas, science and technology, please feel free to contact us (Please reply to this mail instead of creating a new one, in case we lost track of your mail).

Below is a brief introduction of our journals (The previous issues and individual papers are available on our new official website at: <http://www.davidpublisher.com/>):

### Description

**JMSE** (ISSN: 1934-8959, USA), **JMSE-A** (ISSN: 2161-6213, USA) and **JMSE-B** (ISSN: 2161-6221, USA) are collected and indexed by the Library of U.S Congress (<http://catalog.loc.gov>). Our journals can be searched with the serial number (e.g., ISSN: 1934-8959) in this on-line inquiry. And so as the following renowned databases:

1. Cambridge Science Abstracts (CSA)
2. Ulrich’s Periodicals Directory
3. Database of EBSCO, USA
4. Chinese Scientific Journals Database, VIP Corporation, Chongqing, China
5. Chinese Database of CEPS, American Federal Computer Library center (OCLC), USA
6. Chemical Abstracts Service (CAS)
7. Norwegian Social Science Data Services (NSD)
8. ProQuest
9. Google Scholar (the published individual papers can be searched at: [scholar.google.com](http://scholar.google.com))

The *Journal of Materials Science and Engineering* is an international peer-reviewed journal, published periodically since 2007 by David Publishing Company USA.

Best regards!

Taylor C.

J. Materials Science and Engineering A & J. Materials Science and Engineering B

David Publishing Company

<http://www.davidpublishing.org>

E-mail: [materials@davidpublishing.com](mailto:materials@davidpublishing.com); [materials@davidpublishing.org](mailto:materials@davidpublishing.org);

[materials.davidpublishing@gmail.com](mailto:materials.davidpublishing@gmail.com)

Fax: 1-323-9847374; 1-323-908-0457 (USA)

19. 4. 2016, 5:54:09



*From Knowledge to Wisdom*  
**Journal of Life Sciences, USA**

Print ISSN: 1934-7391 Online ISSN: 1934-7405  
DOI: 10.17265/1934-7391

Dear Jiří Liška,

This is *Journal of Life Sciences* (ISSN 1934-7391), a professional journal published across the United States by David Publishing Company, USA.

Recently, we found one of your papers, titled "SIGNIFICANCE OF IMMUNOGLOBULIN E IN UMBILICAL BLOOD IN RELATION TO AN ALLERGIC FAMILY HISTORY, IT'S RELATION TO SEASONALITY, IMMUNITY AND POSSIBILITY OF PRE- AND POSTNATAL CONSEQUENCES. THE REMARKABLE SUBSEQUENT EFFECTS OF ALTERING GASTROINTESTINAL FLORA IN TREATED NEWBORNS".

" in 7<sup>th</sup> International Conference on Drug Discovery and Therapy 2016. We found it may help us achieve our goals in this research field. This would make a really positive contribution to our work. The abstract makes your paper sound very interesting.

We are very interested in your research fields and would like to publish the full text of your **unpublished** paper in our journal. If you have the idea of making our journal a vehicle for your research interests, please send the electronic version of your papers or books to us in MS word format via email attachment.

The past issues and other related information can be found from. Also welcome to visit my academic website: [independent.academia.edu/LifeSciences](http://independent.academia.edu/LifeSciences). I'm glad to become your friend and facilitate our mutual understanding and academic exchanges.

Expect to get your reply soon.

Best Regards,

Amanda Forbes  
Editorial Office  
Journal of Life Sciences

**Description**

The *Journal of Life Sciences*, a monthly and peer reviewed professional academic journal, is striving to provide the best platform for researchers and scholars worldwide to exchange their latest findings and results.

**Current Columns Involve**

Bioengineering, Biotechnology, Botany, Zoology, Microbiology, Cell biology, Molecular biology, Life science education, Toxicology, Neurobiology, Immunology, Developmental biology, Neuroscience, Genetics, Genomics, Biomedical science, Biochemistry, Bioinformatics, and Proteomics, and other topics on life sciences.

The journal is indexed by the well-known databases as follows:

- ★ Database of EBSCO, Massachusetts, USA
- ★ InfoBase Index
- ★ Chemical Abstracts Service (CAS), USA
- ★ Database of Cambridge Science Abstracts (CSA), USA
- ★ Database of Hein Online, New York, USA
- ★ Ulrich's Periodicals Directory, USA
- ★ Universe Digital Library S/B, Proquest

- ★ Chinese Database of CEPS, American Federal Computer Library center (OCLC), USA
- ★ China National Knowledge Infrastructure, CNKI, China
- ★ Chinese Scientific Journals Database, VIP Corporation, Chongqing, China
- ★ Index Copernicus, Index Copernicus International S.A., Poland
- ★ Google Scholar (scholar.google.com)
- ★ Polska Bibliografia Naukowa (PBN), Poland
- ★ J-Gate
- ★ Electronic Journals Library (EZB)
- ★ Publicon Science
- ★ CiteFactor (USA)
- ★ INNO SPACE
- ★ CrossRef Search

2009 impact factor of Journal of Life Sciences calculated by CEPS database are 3.30.

2011 impact factor calculated by Index Copernicus are 5.19.

2014 points in Polska Bibliografia Naukowa (PBN) are 8.

IBI Factor of Journal of Life Sciences for the year 2015 is 3.36, as rated by InfoBase Index.

Google Scholar Metrics: h5-index = 5, h5-median = 6.

#### **Requirements**

1. The manuscript should be original, be translated into English, and has not been published previously. Please don't submit material that is currently being considered by another journal.
2. Manuscripts may be 3,000-8,000 words or longer if approved by the editor, including abstract, text, tables, footnotes, appendixes, and references. The title should not be exceeding 15 words, and abstract should not be exceeding 200 words. 3-8 key words or key phrases are required.
3. The manuscript should be in MS Word format, submitted as an email attachment to our email address.
4. Authors of the articles being accepted are required to sign the Transfer of Copyright Agreement form.
5. Author will receive 1 copy of the journal containing their articles.
6. It is not our policy to pay for authors. We will charge some fee if the paper is published in our journal.

#### **Submitting of Manuscripts**

All manuscripts submitted will be considered for publication. Please visit our website at <http://www.davidpublisher.org/Home/Journal/JLS> for our automatic paper submission systems or as an email attachment to [life-sciences@davidpublishing.org](mailto:life-sciences@davidpublishing.org), [life-sciences@hotmail.com](mailto:life-sciences@hotmail.com). Also welcome to visit my academic website: [independent.academia.edu/LifeSciences](http://independent.academia.edu/LifeSciences).

26.7.2016