

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Otakar Dušek

Podíl mikroorganismů a dalších faktorů v procesu autoimunitní uveitidy

The role of microorganisms and other factors in the process of autoimmune uveitis

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jarmila Heissigerová, Ph.D., MBA

Konzultant: prof. MUDr. Petra Svozílková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 30.6.2021

OTAKAR DUŠEK

Podpis

Identifikační záznam

DUŠEK, Otakar. *Podíl mikroorganismů a dalších faktorů v procesu autoimunitní uveitidy. [The role of microorganisms and other factors in the process of autoimmune uveitis]*. Praha, 2021. 87 s., 4 přílohy dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Oční klinika. Školitel Hessigerová, Jarmila.

Poděkování

Na úvod bych velmi rád poděkoval mé školitelce prof. MUDr. Jarmile Heissigerové, Ph.D., MBA za umožnění stát se součástí vědecké skupiny věnující se výzkumu uveitid na experimentálním modelu, za profesionální vedení, ochotu, trpělivost, rady, entuziasmus a motivaci k pracovnímu nasazení.

Dále jsem vděčný a děkuji i své školitelce-konzultantce prof. MUDr. Petře Svozílkové, Ph.D., která přispěla významným dílem k organizaci a navrhování pokusů. Velmi si cením jejich připomínek, nápadů a užitečných korektur, ať už se jednalo o samotný průběh pokusů či prezentaci našich výsledků.

Děkuji za skvělou spolupráci i své kolegyni MUDr. Anetě Klímové, Ph.D., která mě naučila práci s experimentálním modelem, strávila se mnou mnoho času při práci v laboratoři, diskutovali jsem často o dané problematice, o možnostech zefektivnění práce, navíc mi uměla vždy poradit a podpořit.

Za poskytnutí prostor a laboratorního vybavení k provádění experimentů bych velmi rád poděkoval prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, Ph.D., přednostovi Farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Velké poděkování patří i laborantce Janě Plačkové za zajištění chovu myší ve zvěřinci, aplikace probiotik, za velice vstřícný přístup a pomoc při organizaci experimentů. Dále bych rád poděkoval i MUDr. Nikolíně Kutinové Canové, Ph.D. za pomoc s realizací experimentů.

Děkuji doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D., přednostovi Ústavu histologie a embryologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, který nám umožnil histologické zpracování vzorků tkání, jejich fotodokumentaci a byl vždy ochotný poradit jak po technické stránce, tak při hodnocení výsledků experimentů. Poděkování náleží i laborantce Elišce Boučkové za zajištění histologického zpracování vzorků a ochotu pomoci.

Velmi rád bych poděkoval za pomoc s designem experimentů, mikrobiologickou a imunologickou analýzou, vyčerpávající nasazení a velké množství nápadů MUDr. Miloslavu Kverkovi, Ph.D. a prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. z Laboratoře buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického ústavu AV ČR. Děkuji jejich celému týmu za pomoc s realizací našeho společného projektu experimentů.

Rád bych zde poděkoval i svým rodičům za podporu během mého studia.

Experimenty byly prováděny za finanční podpory grantů AZV MZ ČR 17-31248A, SVV UK 260367 a SVK UK 260516.

OBSAH

Seznam zkratk	7
Abstrakt a klíčová slova	9
Abstract and key words	10
1 ÚVOD	11
1.1 Definice, epidemiologie, klasifikace a etiopatogeneze uveitid	12
1.2 Imunologie oka	14
1.3 Autoimunitní onemocnění	17
1.4 Vliv mikroorganismů u uveitid	19
1.5 Model EAU	22
1.6 Léčba uveitid	23
1.6.1 Léčba infekčních uveitid	23
1.6.2 Léčba neinfekčních uveitid	23
1.6.3 Chirurgická léčba	24
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	25
3 MATERIÁL A METODY	27
3.1 Experimentální zvířata	28
3.2 Indukce EAU	28
3.3 Klinické hodnocení EAU	29
3.4 Histologické hodnocení EAU	31
3.5 Podávání antibiotik u EAU	32
3.6 Imunohistochemický průkaz lymfocytů a makrofágů	34
3.7 Podávání probiotik u EAU	35
3.8 Analýza populací lymfocytů v lymfatických uzlinách	36
3.9 Analýza produkce cytokinů ve střevě	37
3.10 Analýza regulačních genů ve střevě	38
3.11 Analýza kolonizační schopnosti probiotik	38
3.12 Tvorba a kultivace makrofágů odvozených z kostní dřeně	39
3.13 Statistická analýza	39

4	VÝSLEDKY	40
4.1	Efekt metronidazolu u EAU na stupeň zánětu	41
4.2	Vliv metronidazolu na infiltraci sítnice T-lymfocyty a makrofágy	44
4.3	Schopnost probiotik EcN a EcO kolonizovat střevo	46
4.4	Vliv živých probiotik EcO a EcN na intenzitu EAU	47
4.5	Účinek autoklávovaných probiotik EcN u EAU na stupeň zánětu	52
4.6	Analýza populací lymfocytů v lymfatických uzlinách a jejich aktivity po stimulaci pomocí TCR a IRBP	55
4.7	Analýza produkce cytokinů a exprese antimikrobiálních peptidů v Peyerových plátech	57
4.8	Analýza myeloidních buněk a B-lymfocytů v lymfatických uzlinách	59
4.9	Analýza imunitní odpovědi v počáteční fázi rozvoje EAU	60
5	DISKUZE	63
6	ZÁVĚR	70
7	LITERATURA	73
	Seznam příloh	87

Seznam zkratek

ACAID	imunitní odchylka spojená s přední komorou (anterior chamber associated immune deviation)
aEcN	autoklátovaná <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
APC	antigen-prezentující buňky (antigen-presenting cells)
BMDM	makrofágy odvozené z kostní dřeně (bone marrow-derived macrophages)
CD	membránové struktury leukocytů (cluster of differentiation)
CFA	kompletní Freundovo adjuvans (complete Freund's adjuvant)
CFU	jednotky tvořící kolonie (colony-forming units)
cLN	cervikální lymfatické uzliny (cervical lymph nodes)
CMV	cytomegalovirus
CSF	kolonie stimulující faktor (colony-stimulating factor)
DAMP	molekulární vzory asociované s poškozením (damage-associated molecular pattern)
DM	diferenciační médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAU	experimentální autoimunitní uveitida
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EcO	<i>Escherichia coli</i> O83
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
ELISA	enzymová imunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	průtoková cytometrie (fluorescent-activated cell sorting)
FasL	Fas ligand
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ILC	přirozené lymfoidní buňky (innate lymphoid cells)
iLN	inguinální lymfatické uzliny (inguinal lymph nodes)
IMID	imunitně podmíněné zánětlivé choroby (immune-mediated inflammatory diseases)
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
IRAK	kinázy asociované s receptorem pro interleukin

	(interleukin receptor associated kinases)
IRBP	interfotoreceptorový retinoid-vázající protein (interphotoreceptor retinoid-binding protein)
JAK	Janusova kináza
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
mLN	mezenteriální lymfatické uzliny (mesenteric lymph nodes)
mRNA	mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
NK buňky	přirození zabíječi (natural killers)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PT	pertusový toxin
RPE	retinální pigmentový epitel
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids)
Tc	cytotoxické T-lymfocyty
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
TEFI	topické endoskopické zobrazování fundu (topical endoscopy fundus imaging)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocné (helper) T-lymfocyty
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nekrotizující tumor (tumor necrosis factor)
Treg	regulační T-lymfocyty

Abstrakt

Cílem této práce bylo získat nové poznatky o vlivu a mechanismech působení mikroorganismů v procesu autoimunitní uveitidy. K dosažení cílů byl využit myší model experimentální autoimunitní uveitidy (EAU), u kterého byl testován vliv perorálně podávaného širokospektrého antibiotika metronidazolu, dále vliv probiotických bakterií *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO) a *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) podávaných v preventivních a terapeutických režimech. Stupeň zánětlivé aktivity byl hodnocen klinicky *in vivo* a histologicky *post mortem*. V pokusech s probiotiky byla provedena imunologická analýza lymfatických uzlin a Peyerových plátů střevní sliznice. Zhodnocení efektu metronidazolu prokázalo signifikantní snížení zánětlivé aktivity v případě zahájení jeho podávání 1 a 2 týdny před indukci. V případě probiotik byl prokázán protektivní efekt pouze u živé EcN, a to jen v případě podávání 2 týdny před indukci či od indukce EAU. Preventivní účinek EcN byl doprovázen snížením odpovědi T-lymfocytů specifických pro interfotoceptorový retinoid-vázací protein ve spádových lymfatických uzlinách místa imunizace 7 dní od indukce a cervikálních uzlinách, jakmile byly patrné klinické projevy nitroočního zánětu. EcN navíc zvýšila protizánětlivou odpověď v Peyerových plátech tenkého střeva, vedla ke zvýšení exprese střevních antimikrobiálních peptidů a snížení produkce indukovatelné syntázy oxidu dusnatého v makrofázích. Získané výsledky dokazují významný vliv mikrobiomu v imunitní regulaci procesů v oku. Příznivý vliv vykazuje jak podávání metronidazolu, tak probiotika EcN, i když oba ovlivňují mikrobiom odlišným mechanismem. Další výzkum v této oblasti by mohl přinést nové terapeutické možnosti, a tím přispět ke snížení výskytu slepoty u pacientů s uveitidou.

Klíčová slova: antibiotika, metronidazol, probiotika, *Escherichia coli* Nissle 1917, mikrobiom, mikrobiota, experimentální autoimunitní uveitida

Abstract

The aim of this work was to gain new knowledge about the influence and the mechanisms of the effect of microorganisms in the process of autoimmune uveitis. A mouse model of experimental autoimmune uveitis (EAU) was used and the influence of oral broad-spectrum antibiotic, i.e. metronidazole, as well as probiotic bacteria *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO) nad *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) were tested in preventive and therapeutic regimens. The grade of inflammation was assessed clinically *in vivo* and histologically *post mortem*. Immunological analysis of lymph nodes and Peyer's patches were performed. Evaluation of the effect of metronidazole proved significant reduction of inflammatory activity in both regimes - initiation 1 week or 2 weeks before the EAU induction. In case of probiotics, protective effect was proved only in case of live EcN administered 2 weeks before or from the time of EAU induction. Its protective effect was accompanied with decreased interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific T-lymphocyte response in the sentinel lymph nodes of the site of immunization 7 days after the induction of EAU and cervical lymph nodes as soon as there were apparent clinical signs of intraocular inflammation. Moreover, EcN led to increased antiinflammatory response in Peyer's patches and gut antimicrobial peptide expression and decrease of the inducible nitric oxide synthase in macrophages. The achieved results show significant influence of microbiome in the immune regulation of processes in the eye. Both metronidazol and probiotics EcN prove to have a beneficial effect, even though both of them influence microbiome through different mechanisms. The following research in this field could bring new therapeutic possibilities and thus reduction of incidence of blindness of patients with uveitis.

Key words: antibiotics, metronidazole, probiotics, *Escherichia coli* Nissle 1917, microbiome, microbiota, experimental autoimmune uveitis

Kapitola 1

ÚVOD

1 ÚVOD

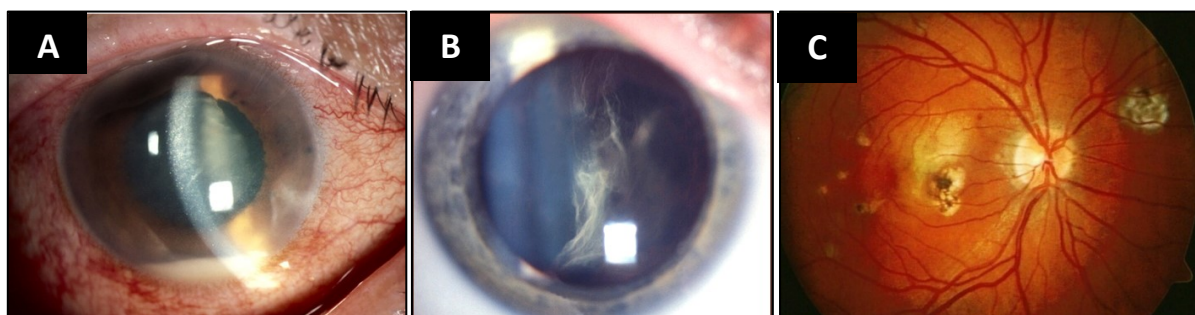
1.1 Definice, epidemiologie, klasifikace a etiopatogeneze uveitid

Uveitida je nescifické označení pro nitrooční zánět postihující střední vrstvu oka, tj. uveu (živnatku), která se skládá z duhovky, řasnatého tělesa a cévnatky. Zánět může následně přecházet i na okolní tkáň (rohovku, skléru, sítnici a terč zrkového nervu), a tím vést k závažnému poškození oka s ohrožením zrakových funkcí (Heissigerova 2018, Jabs et al. 2005, Kuchynka 2016, Rihova 2009). Uveitidy se i přes veškerou dostupnou léčbu podílejí až na 10 % celosvětové slepoty (Miserocchi et al. 2013).

Prevalence a klinický obraz různých typů uveitidy závisí na mnoha faktorech, např. věku, pohlaví, rase, geografické poloze, vlivu prostředí, genetických faktorech a sociálních návycích (Chang and Wakefield 2002, 2005).

Uveitida postihuje především populaci v mladém a středním věku (mezi 20-50 lety) (Rothova et al. 1992). Dle dostupných zdrojů se odhaduje prevalence uveitid 38-714/100 000 obyvatel a roční incidence 17-52/100 000 obyvatel (Darrell et al. 1962, Dandona et al. 2000, Gritz and Wong 2004, Paivonsalo-Hietanen et al. 1997, Tran et al. 1994, Vadot, 1992).

Uveitidy se dělí dle anatomických projevů zánětu na přední (postihující duhovku a přední část řasnatého tělesa s projevy na předním očním segmentu, zejména v přední komoře oka), intermediální (s postižením periferní sítnice včetně cév, zadní části řasnatého tělesa s projevy zejména ve sklivci), zadní (se změnami na zadním očním segmentu, tj. cévnatce, sítnici a zrkovém nervu) a panuveitidy (neboli difúzní typ s postižením obou očních segmentů) (Obr. 1) (Heissigerova 2018, Kuchynka 2016, Rihova 2009).



Obr. 1: Klinický obraz jednotlivých typů uveitid. A: akutní přední uveitida s buňkami, fibrinem a hypopyon v přední komoře; B: Intermediální uveitida se zánětlivým zkalením sklivce; C: Zadní uveitida se žluto-bělavými ložisky na očním pozadí.

Z epidemiologického hlediska představují přední uveitidy nejčastější formu nitroočního zánětu, následují uveitidy zadní a difúzní, nejméně často se vyskytují uveitidy intermediální (Paivonsalo-Hietanen et al. 1997, Tran et al. 1994).

Dle příčiny se uveitidy dělí na infekční (virové, parazitární, bakteriální a mykotické) a imunitně podmíněné, kam patří autoimunitní či autoinflamatorní onemocnění. Do této skupiny patří samostatné klinicky definované jednotky a nitrooční záněty asociované se systémovými chorobami (např. ankylózní spondylitidou, sarkoidózou, roztroušenou sklerózou mozkomíšní). Přibližně u 40 % případů se příčina nepodaří objasnit, označují se tedy jako idiopatické. Také tzv. uveální maskující syndromy se manifestují klinicky obdobně jako uveitidy. Jedná se však o skupinu nezáánětlivých benigních či maligních očních onemocnění (Heissigerova 2018, Kuchynka 2016, Rihova 2009).

Mezi časté infekční příčiny v rozvojových zemích patří toxoplazmóza, tuberkulóza, onchocerkóza, cysticercóza, lepra, herpetické infekce, leptospiróza a jiná parazitární onemocnění. V rozvinutých zemích, tedy v západním světě, se z infekčních příčin nejčastěji vyskytuje toxoplazmóza a herpetické infekce. V rozvinutých zemích převažují imunitně podmíněné uveitidy, např. s lidským leukocytárním antigenem B-27 (HLA-B27) asociovaná uveitida, Fuchsova heterochromní iridocyklitida, sarkoidóza, Vogt-Koyanagi-Haradova nemoc, sympatická oftalmie, birdshot choroidopatie, multifokální choroiditida, serpiginózní choroidopatie a morbus Behcet (Tsirouki et al. 2018).

Dle průběhu se uveitidy rozdělují na akutní (s náhlým nástupem a trváním méně než 3 měsíce), chronické (s protrahovaným průběhem a trváním déle než 3 měsíce) a recidivující (s opakujícími se epizodami, kdy období remise bez léčby je delší než 3 měsíce) (Heissigerova 2018, Jabs et al. 2005, Kuchynka 2016, Rihova 2009).

Dále je možné uveitidy charakterizovat i dle histopatologických projevů na granulomatózní a ngranulomatózní nebo dle lateralitý na unilaterální či bilaterální. Dle Pracovní skupiny pro standardizaci nomenklatury uveitid (SUN - Standardization of Uveitis Nomenclature Working Group) by mělo určení typu uveitidy zahrnovat anatomické zařazení a typ průběhu (Jabs et al. 2005, Trusko et al. 2013).

Celá řada vědeckých skupin se věnuje výzkumu patogeneze autoimunitních onemocnění včetně uveitid. Předpokládá se, že infekce může být spouštěcím faktorem v jejich rozvoji, a to zejména u geneticky predisponovaných jedinců (Hewagama and Richardson 2009).

U imunitně podmíněných uveitid může hrát významnou roli infekční proces, kdy odpovědí na něj může být aktivace vrozené imunity s cytolýzou a dysregulovanou odpovědí, která pokračuje i po odeznění infekce. Příkladem může být např. mykobakteriální infekce (vzhledem k tomu, že až 1/3 celosvětové populace je promořena), která může vést k výrazné imunitní reakci. Napadené buňky v tomto případě podléhají buněčné smrti a mohou se stát lokálním adjuvans pro buňky vrozené imunity interagujícími s autoreaktivními T-lymfocyty,

kteřé poté vedou k rozvoji sekundární imunitní reakce. U některých uveitid byla zjištěna kombinace přítomnosti perzistentních, nereplikujících se mikroorganismů a reziduálního mikrobiálního antigenu. Jedná se např. o Fuchsovu heterochromní iridocyklitidu (rubeola), vaskulitidu (rickettsie) a přední uveitidu způsobenou cytomegalovirem (CMV) (Forrester et al. 2018).

U myši byl popsán mechanismus vzniku uveitidy aktivací autoreaktivních T-lymfocytů komenzální střevní mikrobiotou. Střevní mikrobiota pravděpodobně může napodobovat endogenní sítnicový antigen či může sloužit jako adjuvans k posílení aktivace vrozených imunitních mechanismů (Horai and Caspi 2019).

V poslední době se stále více pozornosti věnuje roli mikrobiomu a jeho změn v procesu autoimunitních onemocnění.

1.2 Imunologie oka

Povrchové struktury oka, tj. rohovka, spojivka a skléra, díky svým vlastnostem představují mechanickou bariéru proti průniku cizorodých látek ze zevního prostředí do nitra oka. Ve spojivce se nacházejí složky vrozené (makrofágy, buňky tzv. přirození zabíječi – NK buňky) i získané imunity (lymfatický systém s germinálními centry s různě zralými formami lymfocytů). B-lymfocyty zde produkují sekreční imunoglobulin A (IgA).

Povrch oka je pokryt a chráněn slzným filmem, který obsahuje složky nespecifické imunity, např. lysozym, laktoferrin, defenziny, muciny, složky komplementu (Kraus 1997, Kuchynka 2016).

Spojivka obsahuje lymfatické cévy, kterými je lymfa drénována do spádových, tj. submandibulárních a preaurikulárních lymfatických uzlin. Naopak v rohovce lymfatické i krevní cévy chybí, stejně tak se ani uvnitř oka nesetkáváme s lymfatickými cévami, tudíž dochází k transportu antigenu rozpuštěného v komorové tekutině cestou trámčiny komorového úhlu do episklerálních vén a subkonjunktiválních lymfatických cév, dále do systémové cirkulace a cílových orgánů – thymu, jater a sleziny. Přesný způsob transportu signálů a buněk mezi přední oční komorou, lymfatickými uzlinami, krevní cirkulací, thymem a slezinou není znám (Forrester et al. 2008, Molzer et al. 2020).

Rohovka se vzhledem k avaskularitě, nízkému zastoupení antigen-přezentujících buněk (APC), sekreci protizánětlivých cytokinů, např. interleukinu 10 (IL-10), transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), expresi pro-apoptického Fas ligandu (FasL) molekuly membránových struktur leukocytů 95 (CD95) řadí mezi tzv. imunologicky privilegované tkáně (Kraus 1997).

Koncept imunologického privilegia byl popsán Medawarem v roce 1961. Imunologické privilegium bylo považováno za jedinečnou vlastnost určitých orgánů s omezenou schopností sebeobnovy, kam řadíme oko, mozek a testes. Jedná se o způsob ochrany zmíněných orgánů před poškozením imunitním systémem. Při umístění cizího antigenu do těchto orgánů nedocházelo k rozvoji běžné imunitní odpovědi, což bylo prokázáno na nízkém počtu rejekcí alogenních štěpů rohovky oproti štěpům kožním i přes absenci systémové imunosupresivní terapie. Týká se to však pouze indikací ve specifických případech, např. keratokonu či vybraných rohovkových dystrofií. Při rozvoji zánětu rohovky tuto vlastnost rohovka ztratila, došlo k rozvoji vaskularizace a vymizel rozdíl v míře rejekcí oproti jiným vaskularizovaným orgánům. Stejně tak úroveň imunologického privilegia uvey se neliší proti jiným vaskularizovaným orgánům, tudíž přední oční segment vykazuje vyšší náchylnost k rozvoji zánětu a přední uveitida je jeho nejčastějším typem (Molzer et al. 2020).

Imunologické privilegium bylo prisuzováno sekvestraci vlastních tkáňových antigenů před imunitním systémem za bariérou v daném orgánu, absenci krevních cév, lymfatické drenáže, APC, vysoké koncentraci imunosupresivních cytokinů a aktivitě regulačních T-lymfocytů (Treg) (Caspi et al. 1987, Forrester et al. 2018, 2010, Hamrah and Dana 2007, Zhou and Caspi 2010). Dále byla popsána další vlastnost imunologického privilegia, tzv. „odchylka imunity spojená s přední oční komorou“ (ACAID - anterior chamber-associated immune deviation), kdy po podání cizího antigenu do přední komory oka nedochází k běžné imunitní odpovědi, ale rozvíjí se i systémová odchylka, která brání reakci proti tomuto antigenu při jeho prezentaci běžným způsobem. Jedná se o experimentálně prokázaný proces, jehož fyziologický význam není zatím plně objasněn. Narozdíl od vlastního imunologického privilegia, kdy se jedná o vlastnost určitého orgánu a modifikaci jeho imunitní odpovědi. V případě ACAID se jedná o odpověď systémovou, která vede k indukci supresorových T-lymfocytů/Treg na periferii (Streilein 1992).

Původní koncept imunologického privilegia se pravděpodobně vztahuje zejména k sítnici, která obsahuje jen malé množství tkáňových buněk odvozených z myeloidních buněk kostní dřeně a je oddělena od krevní a mízní cirkulace tzv. hemato-retinální bariérou. Rozlišujeme 2 složky bariéry: 1) fyzikální, tedy mechanickou - pomocí tzv. těsných spojů (tight junctions) mezi buňkami endotelu cév (vnitřní bariéra) na jedné straně a retinálního pigmentového epitelu sítnice (RPE) (zevní bariéra) na straně druhé; 2) imunologickou - tvořenou buňkami neurovaskulární jednotky, kam řadíme endotelie, imunomodulační pericyty, rezidentní perivaskulární makrofágy, mikroglie, výběžky gliových/Müllerových buněk tvořících limitující membránu, dále regulačních mikroglíí a neuronálních dendritů (Forrester et

al. 2008, 2018). Bariéra za normálních okolností zpočátku chrání proti poškození sítnice zánětem, ale za určitých podmínek může být překonána, např. u experimentální autoimunitní uveitidy (EAU).

Současné teorie naznačují, že se s určitým stupněm imunologického privilegia setkáváme u všech orgánů a jejich tkání v závislosti na jejich typu. Úroveň imunologického privilegia je určena charakterem a integritou tkáňové bariéry proti průniku patogenu, což určuje výsledek reakce a tíži poškození. Bariéry jsou komplexní struktury obsahující fyzické, chemické, molekulární, buněčné a imunologické složky specifické pro danou tkáň. I přes popisovaný vysoký stupeň imunologického privilegia jsou oční tkáně náchylné k rozvoji zánětu a infekce. Vzhledem k tomu, že se oko skládá z různých typů tkání, může zánět postihnout jednu či více tkání samostatně či současně. Při zánětu parenchymu očních obalů (skleritida, keratitida, uveitida) dochází k zánětlivému poškození uveálního traktu a jeho krevních cév, ale zánět v těchto oblastech obvykle nepostihne sítnicové cévy. Naopak zánět sítnice téměř vždy zasáhne cévy žilnatky (Molzer et al. 2020).

V imunitní reakci proti cizorodým i vlastním antigenům se jako první uplatňují buňky nespecifické, vrozené imunity (granulocyty, monocyty/makrofágy, NK buňky a buňky dendritické) a některé z nich jsou schopny fagocytózy, zpracování a prezentace antigenu buňkám specifické, získané imunity (T- a B-lymfocyty). Jedny z prvních jsou makrofágy, které po stimulaci produkují svůj hlavní cytokin, tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), a aktivují buňky specifické imunity. Dendritické buňky se účastní imunitní reakce jako hlavní APC. Sídlí v tkáních, kde dochází k setkání s antigenem, po stimulaci antigenem migrují do lymfatických tkání, prezentují antigen T-lymfocytům, což vede k jejich aktivaci, dozrávání a klonální expanzi. T-lymfocyty jsou pravděpodobně nejdůležitějšími buňkami účastnicími se nitroočního zánětu autoimunitní povahy. Dle povrchových markerů dělíme T-lymfocyty na cytotoxické (Tc, CD8+), zneškodňující cizorodý materiál/buňky přímým kontaktem, a pomocné (Th, CD4+), zajišťující interakci mezi buňkami imunitního systému pomocí cytokinů a navozující imunologickou paměť.

Dle typu produkovaných cytokinů je dělíme T-lymfocyty na:

- Th1 s produkcí IL-2, IL-6, IFN- γ a TNF- α
- Th2 produkující IL-4, IL-5 a IL-13
- Th17, které produkují IL-17, IL-22 a IL-23
- Treg produkující IL-10, TGF- β a IL-35

Th1 a Th17 lymfocyty mají prozánětlivý účinek. Proti nim působí Treg, které naopak zánět tlumí. B-lymfocyty a NK buňky jsou v oblasti autoimunitních zánětů oka zatím předmětem výzkumu (Horejsi 2017, Kuchynka 2016).

1.3 Autoimunitní onemocnění

O autoimunitních onemocněních hovoříme v případě, kdy autoimunitní reakce, tj. reakce vůči vlastním antigenům (autoantigenům), vede k poškození tkání.

Autoimunitní reakce může být humorálního typu s tvorbou autoprotilátek, většinou izotypu IgG, které se na tkáňovém poškození podílejí buď cytotoxickými mechanismy nebo tvorbou a ukládáním imunokomplexů (II. a III. typ imunopatologické reakce). V některých případech způsobuje autoprotilátka funkční změny buňky nebo proteinu, na který se váže. Dále rozlišujeme autoimunitní reakce buněčného typu s poškozujícím zánětem způsobeným Tc a Th1 lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů (IV. typ imunopatologické reakce), které způsobují převážnou většinu autoimunitních uveitid.

Vzhledem k tomu, že zánět je hlavním rysem autoimunitních chorob, používá se v současné době pro tyto stavy častěji označení imunitně podmíněné zánětlivé choroby (IMID - immune mediated inflammatory disorders).

Autoimunitní onemocnění vzniká jako důsledek selhání mechanismů tolerance. Vzniká na podkladě působení vnitřních faktorů (genetických - např. asociace s HLA, polymorfismy genů pro cytokiny, pro regulaci apoptózy, pro T-buněčný receptor (TCR) a H řetězce protilátek, faktorů hormonálních, monogenních poruch, dále na podkladě asociace s imunodeficity) a vnějších faktorů (infekce, stres, léky, chemikálie a UV záření).

Infekci je přisuzován největší podíl na indukci autoimunity. U geneticky vnímavého jedince infekční agens způsobuje aktivaci imunitních pochodů s dysregulací a selháním mechanismů tolerance.

Mechanismy působení infekce: 1) odkrytí nedostupného (kryptického) autoantigenu, 2) ektopická exprese histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy s prezentací nepřístupných peptidů, 3) exprese kostimulačních molekul se stimulací autoreaktivních T-lymfocytů, 4) „molekulární mimikry“, tzn. podobnost některých mikrobiálních antigenů s vlastními, což vede k tvorbě autoprotilátek, 5) polyklonální aktivace T-lymfocytů („bakteriální superantigeny“) (Horejsi 2017).

Fáze vzniku autoimunitního onemocnění: (Horejsi 2017)

1. Vnímavost - na základě genetické predispozice dochází k poruše tolerance a snížení prahu pro vznik onemocnění
2. Iniclace - jedná se o tzv. „autoimunitní laboratorní syndrom“, kdy dochází ke zvýšení zánětlivých markerů, ale pacient je bez klinických projevů
3. Propagace - rozvíjí se zánět, dochází k poškození orgánů s klinickými projevy
4. Regulace - aktivují se regulační mechanismy, dochází ke spontánnímu či terapií navozenému útlumu autoimunitního onemocnění
5. Rezoluce - zánět spontánně ustoupí (remise) nebo dojde k selhání regulace zánětu s progresí poškození
6. Progrese - rozvíjí se výrazná reakce cílená proti více autoantigenům („determinant spreading“)
7. Ireverzibilní poškození - zánět vyhasíná, dochází k vazivové přeměně poškozených nefunkčních tkání a orgánů či dokonce selhávají životní funkce

Autoimunitní onemocnění klasifikujeme dle rozsahu a mechanismů poškození na systémová (např. systémový lupus erythematosus) a orgánově specifická (např. roztroušená skleróza mozkomíšni) či lokalizovaná (např. idiopatické střevní záněty) (Horejsi 2017).

Celková prevalence autoimunitních onemocnění v populaci je kolem 5 %.

Cílem terapie je předcházení vzniku ireverzibilního poškození. V terapii autoimunitních onemocnění se uplatňují imunosupresivní látky, např. kortikoidy, azathioprin, cyklofosfamid, metotrexát nebo mykofenolát mofetil. Při převažujícím poškození autoreaktivními T-lymfocyty se často používá cyklosporin A, eventuálně jiná imunosupresiva, např. rapamycin, takrolimus, v těžších případech protilátky proti T-lymfocytům (anti-CD4, cedelizumab) a B-lymfocytům (anti-CD20, rituximab). Velkého úspěchu doznala terapie namířená proti některým hlavním mediátorům zánětu, např. inhibitory TNF solubilního receptoru pro TNF- α (etanercept) či monoklonální protilátky proti TNF- α (infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab) (Horejsi 2017).

Uveitida se řadí mezi orgánově specifická autoimunitní onemocnění. V její etiopatogenezi se uplatňují zejména autoreaktivní T-lymfocyty (Th1, Th17, Tc).

Stran rizikových faktorů vzniku se setkáváme s asociací s HLA haplotypy či určitými alelami, např. s HLA-B27 u přední uveitidy bez/s přítomností ankylózní spondylitidy. Dalšími rizikovými haplotypy jsou např. HLA-A29 (birdshot choroidopatie), HLA-B51 (morbus Behcet) a další (Feltkamp 1990).

Stav tolerance vůči vlastním antigenům je dosažen 2 mechanismy, tj. centrální a periferní tolerancí, které na sebe navazují a při selhání jedné či druhé může dojít k rozvoji autoimunity. Centrální tolerance probíhá v thymu, kde vznikají a vyžívají nové T-lymfocyty se specificitou vůči širokému spektru antigenů. Během tohoto procesu podléhají T-lymfocyty s vysokou afinitou vůči autoantigenům apoptóze (negativní selekce autoreaktivních T-lymfocytů), zatímco T-lymfocyty se střední afinitou mohou projít konverzí v přirozené Treg. Náchylnost k rozvoji autoimunitní uveitidy může být zčásti regulována úrovní exprese patogenních antigenů v thymu. Proces centrální tolerance je sám o sobě nedostatečný k eliminaci všech autoreaktivních T-lymfocytů, proto zde hraje následně roli i tolerance periferní. Buňky uniklé centrální toleranci mohou být pod dohledem tolerance periferní. Při setkání se známým antigenem v tkáni bez přítomnosti kostimulačních signálů může dojít k tzv. imunologické paralýze (anergii), tedy ztrátě schopnosti proti němu reagovat, či dochází ke konverzi v Treg.

Pro omezenou dostupnost tkáňových antigenů unikátních pro oko, resp. chybění jejich exprese mimo oko, které jsou sekvestrovány za hemato-retinální bariérou, nemusí periferní tolerance v případě oka fungovat dostatečně. V krvi zdravých jedinců cirkuluje velké množství T-lymfocytů specifických vůči sítnicovým antigenům, ale tyto naivní autoreaktivní T-lymfocyty ve většině případů nezpůsobují rozvoj uveitidy, protože pravděpodobně potřebují další aktivační procesy k průniku do cílového orgánu. Při předchozí aktivaci *in vitro* či expresi transgenního TCR specifického receptoru pro interferoreceptorový retinoid-vázající protein (IRBP) mohou bariérami proniknout (Heissigerova et al. 2016, Horai and Caspi 2019).

Mikrobiální stimul by mohl být zahrnut v procesu spuštění zánětu. Vzhledem k tomu, že mikrobiální stimuly (např. kompletní Freundovo adjuvans - CFA) vrozené imunity mohou vést ke změně tkáňově specifických T-buněk v patologický efektorový typ, byla studována role komenzálních mikrobiot jako spouštěčů uveitidy. Toto bylo potvrzeno pokusy, kdy u myši s redukcí mikrobiální nálože kombinací širokospektrých antibiotik či v bezmikrobním prostředí došlo k výraznému oslabení projevů onemocnění (Heissigerova et al. 2016, Horai and Caspi 2019).

1.4 Vliv mikroorganismů u uveitid

Mikroorganismy, zejména střevní mikrobiota (dříve označovaná jako střevní mikroflóra), hrají významnou roli ve vývoji imunitního systému a dalších fyziologických funkcí, předpokládá se tedy jejich podíl na individuální náchylnosti k rozvoji infekčních onemocnění či IMID (Kverka and Tlaskalova-Hogenova 2017).

Střevní mikrobiota tvoří složitý ekosystém, který zahrnuje velké množství bakterií, virů, plísní a parazitů. Skládá se z více než 1000 druhů bakterií a počet všech jejích genů (mikrobiom) převyšuje 100krát počet genů v lidském organismu (Tlaskalova-Hogenova 2019).

V poslední době se díky pokrokům v molekulární biologii (zejména sekvenace genu pro bakteriální 16S ribozomální ribonukleové kyseliny - rRNA) stále více laboratoří věnuje studiu složení mikrobioty, její aktivity a mechanismů působení na hostitele (Tlaskalova-Hogenova 2019).

Vzhledem k nálezům změn složení mikrobioty u různých chorob a možnostem její manipulace (např. použitím antibiotik, změnou diety, doplněním bakteriálních metabolitů – prebiotik, probiotik či fekální transplantací) se stále více medicínských oborů zabývá úlohou mikrobioty ve vývoji zdravého jedince a v etiopatogenezi IMID (Young 2017).

Kvalitativní a kvantitativní změny mikrobioty, její metabolické aktivity a lokální distribuce se označují termínem dysbióza, jejíž různé stupně byly prokázány u IMID, např. diabetu mellitu 1. typu, roztroušené sklerózy mozkomíšní, autoimunitní hepatitidy, revmatoidní či reaktivní artritidy, obezity, aterosklerózy, alergií, idiopatických střevních zánětů, celiakie, psoriázy a nádorů (Albenberg and Wu 2014, Holzapfel et al. 1998, Nayyar et al. 2020, Tlaskalova-Hogenova 2019, Li et al. 2018, Opazo et al. 2018). Charakteristickými rysy dysbiózy jsou ztráta různorodosti (snížení diverzity), zvýšený výskyt potenciálně patogenních bakterií (patobiontů) nebo naopak chybění prospěšných bakterií. Stále není jasné, zda je dysbióza příčinou, asociací nebo důsledkem patologického stavu (Kverka and Tlaskalova-Hogenova 2017).

Některé výše zmíněné systémové choroby, jako např. idiopatické střevní záněty, ankylozující spondylitida, roztroušená skleróza mozkomíšní, mohou být spojené s uveitidou. Dle nedávno vydaných studií může být uveitida, např. při roztroušené skleróze mozkomíšní, morbus Behcet, Vogt-Koyanagi-Haradově nemoci, doprovázena změnami střevního mikrobiomu (Kalyana Chakravarthy et al. 2018, Oezguen et al. 2019, Ye et al. 2018, 2020).

Při fekální transplantaci stolice od pacientů s morbus Behcet myším náchylným k rozvoji autoimunitní uveitidy došlo ke zvýšení zánětlivé aktivity, což poukazuje na možnou kauzální souvislost mezi střevní dysbiózou a neinfekční uveitidou (Ye et al. 2018).

Narůstá počet vědeckých skupin věnujících se studiu role mikroorganismů v etiopatogenezi lidských zánětlivých nemocí včetně neinfekční uveitidy. K tomu využívají experimentální zvířecí modely daných nemocí. Stěžejní význam hrálo použití bezmikrobních (germ-free) či cíleně kolonizovaných (gnotobiotických) myší. Díky tomu bylo prokázáno, že

mikrobiota hraje zcela zásadní roli v regulaci imunitních procesů hostitele i vývoji IMID (Hrncir et al. 2008, Sterzl et al. 1987, Tlaskalova-Hogenova et al. 2011).

V minulých experimentech náš tým prokázal, že u bezmikrobního stavu se u většiny experimentálních zvířat EAU nerozvinula, což bylo provázeno nižší infiltrací sítě makrofágy, snížením počtu T-efektorových lymfocytů a vzestupem Treg ve spádových lymfatických uzlinách (Heissigerova et al. 2016).

V případě experimentální uveitidy perorální, ale ne intraperitoneální podávání širokospektrých antibiotik (ampicilin, metronidazol, neomycin a vankomycin) vedlo ke změnám střevního mikrobiomu, snížení stupně zánětu u EAU, zvýšení počtu Treg a redukcii efektorových T-lymfocytů (Th1 a Th17) a prozánětlivých cytokinů (Nakamura et al. 2016).

Některá antibiotika (např. metronidazol) mohou mít dle literatury kromě antimikrobiálních účinků i účinky imunomodulační. To vede ke snížení hladin některých cytokinů, leukocytů a také jsou schopna stimulovat či inhibovat proliferaci lymfocytů a produkci protilátek (Shakir et al. 2011).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA - short chain fatty acids; acetát, butyrát, propionát) neboli produkty fermentace na vlákninu bohaté stravy střevními bakteriemi mohou vést k redukcii zánětu u EAU. Jsou popisovány 2 možnosti účinku: 1) zvýšení počtu Treg v kolon a cervikálních lymfatických uzlinách (cLN), 2) redukce transportu efektorových lymfocytů mezi střevem a slezinou (Lin 2019).

Další možností manipulace s mikrobiomem je využití probiotik. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které jsou prospěšné pro zdraví hostitele, pokud jsou užívána v přiměřeném množství (WHO 2001).

S myšlenkou použití probiotik pro jejich příznivý vliv na zdraví přišel poprvé v roce 1908 Elie Metchnikoff (Metchnikoff 1908). Poté byla v roce 1917 úspěšně izolována *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) a použita pro léčbu pacientů se shigelózou (Islam 2016). V klinické praxi byl účinek probiotik prokázán v případě gastrointestinálních onemocnění, např. k udržení remise ulcerózní kolitidy, u syndromu dráždivého tračníku, akutních průjmů u kojenců a batolat, nekomplikované divertikulózy tlustého střeva (Henker et al. 2007, Kruis et al. 2012, Scaldaferrri et al. 2016).

Pozitivní účinky EcN byly prokázány i experimentálně u myších modelů roztroušené sklerózy mozkomíšní (EAE - experimental autoimmune encephalomyelitis) a v prevenci závažné formy alergického astmatu (Secher et al. 2017, 2018). V případě modelu astmatu měla protektivní efekt i probiotická bakterie *Escherichia coli* O83 (EcO) (Hrdy et al. 2018, Lodinova-Zadnikova et al. 2003, Zwicker et al. 2018).

Kombinace 3 týdnů perorálně podávaných probiotik IRT-5 (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus Thermophilus*) s 5denním předchozím podáváním kombinace širokospektrých antibiotik (ampicilin, vankomycin, metronidazol) měla protektivní efekt u EAU s redukcí efektorových T-lymfocytů (T_e) na řezech myších bulbů, ale nedošlo ke změnám v počtu Treg (Kim et al. 2017).

Pro výše zmíněný vliv mikroorganismů bylo naším záměrem otestovat vliv vybraných probiotik EcO a EcN u myšího modelu EAU.

1.5 Model EAU

Vzhledem k relativně vzácnému výskytu a vysoké heterogenitě onemocnění je velmi obtížné provádět klinické studie s cílem hledání nových možností léčby uveitid, proto byly vytvořeny zvířecí modely onemocnění. Tyto modely nám umožňují studium etiopatogeneze a testování nových terapeutických možností (Caspí 2006, Xu et al. 2008).

Modelovými zvířaty pro uveitidu jsou morče, potkan, myš, opice a králík. Modely dělíme na spontánní a indukované imunizací retinálními autoantigeny. Mezi tyto antigeny řadíme proteiny, např. IRBP, arrestin (S-antigen), rhodopsin, opsin, recoverin, phosducin, melanin, endotoxin, myelin, membránové komponenty RPE a čočkový protein. Na základě typu zvířecího kmene a použitého imunizačního protokolu, resp. použitého autoantigeny, může být klinický průběh akutní, postihující přední i zadní oční segment imitující lidskou panuveitidu nebo chronický, mírný, s postižením zadního segmentu a napodobením lidské zadní uveitidy (Caspí 2006, Klimova et al. 2016, Xu et al. 2008).

Nejrozšířenějším a nejlépe popsáním se stal model EAU zavedený v roce 1988. Jedná se o myší model mírné chronické zadní uveitidy, u kterého se zánět indukuje subkutánní injekcí IRBP v emulzi s CFA s usmrcenými mykobakteriemi a intraperitoneálně se aplikuje pertusový toxin (PT), který způsobí stimulaci vrozených imunitních mechanismů a napodobuje zánětlivý stimul u pacientů s uveitidou. Výhodami modelu jsou velmi podobné rysy zánětu jako u lidské zadní uveitidy (zánětlivé infiltráty ve sklivci a sítnici s postupnou atrofizací fotoreceptorů i dalších vrstev sítnice), kvalitní vizualizace změn na očním pozadí díky minimální aktivitě na předním očním segmentu při biomikroskopickém vyšetření a chronický průběh zánětu k dobrému hodnocení dynamiky onemocnění a efektu léčby (Avichezer et al. 2000, Xu et al. 2008).

1.6 Léčba uveitid

Léčebnou strategii uveitid ovlivňuje mnoho faktorů. Roli hrají příčina (infekční či neinfekční), anatomické projevy (typ uveitidy), lateralita (unilaterální nebo bilaterální) zánětu a současná přítomnost celkového onemocnění (Barry et al. 2014).

Cílem léčby je minimalizovat až úplně potlačit zánětlivou aktivitu, předcházet rozvoji zrak ohrožujících komplikací spojených s uveitidou (katarakta, sekundární glaukom a cystoidní makulární edém), zachovat centrální zrakovou ostrost a ulevit pacientovi od subjektivních obtíží (Svozilkova 2009).

1.6.1 Léčba infekčních uveitid

V případě zjištěné infekční příčiny uveitidy používáme terapii specifickou, cílenou, tedy kauzální vůči danému agens, tj. antivirotika, antibiotika, antimykotika, antituberkulotika, antihelmintika, a to samostatně nebo spolu s terapií protizánětlivou (Svozilkova 2009).

1.6.1 Léčba neinfekčních uveitid

Při vyloučení infekce předpokládáme spíše imunitně podmíněnou etiologii uveitidy, tudíž se uplatňuje terapie protizánětlivá s cílem ovlivnění regulačních mechanismů zánětu a potlačení zánětlivé aktivity.

Imunitní systém lze ovlivnit neselektivně užitím kortikoidů (prednison, metylprednisolon) či antiproliferačních látek (metotrexát, mykofenolát mofetil, azathioprin, cyklofosfamid), dále selektivně ovlivněním T-lymfocytů (cyklosporin A, takrolimus), inhibicí prozánětlivých cytokinů (anti-TNF- α – infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab) či podáním imunomodulačních cytokinů (interferon α). Pro odlišné působení jednotlivých imunosupresiv je možné a vhodné některé z nich kombinovat s dosažením posílení účinku (Ríhova 2009, Svozilkova 2009).

Léčbu většinou zahajujeme kortikoidy. Imunosupresiva přidáváme ke kortikoidům u těžších zrak ohrožujících zánětů s cílem snížit výskyt nežádoucích účinků kortikoidů a při nemožnosti snížit jejich dávky pro aktivitu zánětu (Svozilkova 2009).

Biologická terapie využívá k modulaci zánětu většinou monoklonální protilátky, jejichž cílem jsou molekuly – zánětlivé mediátory – cytokiny, dále se může jednat o využití interferonů, inhibitorů signalizačních kaskád apod. Jedná se o další možnost léčby při nedostatečné kontrole zánětu kortikoidy a běžnými imunosupresivy.

Přehled možností biologické léčby:

- **anti-TNF- α** : infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab, etanercept
- **anti-IL1 β** : anakinkra, canakinumab
- **anti-IL2**: daclizumab
- **anti-IL-6**: tocilizumab, sarilumab
- **anti-IL-17A**: secukinumab
- **anti-IL-12/IL23**: ustekinumab
- **anti-CD20**: rituximab
- **anti-CD28**: abatacept
- **IFN**: IFN- α 2 α , IFN- α 2 β , IFN- β
- **inhibitory Janusovy kinázy (JAK)**: tofacitinib, baricitinib
- **intravenózní Ig**: polyspecifický IgG

V multicentrických klinických studiích probíhá testování širokého spektra monoklonálních protilátek zaměřených na blokádu cytokinů, adhezivních a kostimulačních molekul, které se uplatňují v etiopatogenezi uveitidy (Ferreira et al. 2021).

Nověji se setkáváme s imunoterapií s využitím autologních Treg v léčbě uveitid (Foussat et al. 2017).

1.6.3 Chirurgická léčba

Operační metoda - pars plana vitrektomie – neboli odstranění sklivce s řešením změn sítnice se používá v kombinaci s konzervativní terapií uveitid a je indikována v případě endoftalmitid a komplikací uveitid (Becker and Davis 2005). Z diagnostických důvodů lze na začátku výkonu odebrat vzorky sklivce, dále je možné navíc na závěr výkonu aplikovat léky do sklivcového prostoru (Svozilkova et al. 2011).

V současnosti se pozornost stále více upírá ke změnám střevního mikrobiomu u IMID včetně uveitid a testují se způsoby ovlivnění mikrobiomu, a tím ovlivnění imunitního systému a snížení poškozující zánětlivé imunitní reakce.

Tato dizertační práce se bude zabývat výzkumem zcela nových přístupů léčby a možnostmi ovlivnění autoimunitní uveitidy, a to cestou ovlivnění mikrobiomu na experimentálním modelu u myši.

Kapitola 2

CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem naší práce bylo studium vlivu mikroorganismů a dalších faktorů v procesu autoimunitní uveitidy. Byl testován vliv širokospektrého antibiotika metronidazolu a kolonizace střeva dvěma vybranými probiotiky EcO a EcN. Poté byl hodnocen efekt 2 typů živých probiotik (u jednoho navíc v autoklávované formě) podávaných v různých režimech u myšního modelu EAU. Byla porovnáвана intenzita zánětlivé aktivity uveitidy klinicky *in vivo* a histologicky *post mortem*. V případě experimentů s metronidazolem byly provedeny imunohistochemické analýzy infiltrace myších bulbů T-lymfocyty a makrofágy. Dále byly v probiotických experimentech provedeny imunologické analýzy spádových lymfatických uzlin, Peyerových plátů a střevního obsahu. Byly provedeny stimulace lymfocytů z lymfatických uzlin u myši s probiotikem.

Cíle práce:

Na myším modelu EAU bylo cílem zjistit:

1. zda metronidazol v monoterapii vede ke snížení intenzity zánětu
2. vliv metronidazolu na infiltraci sítnice T-lymfocyty a makrofágy
3. efekt živé probiotické bakterie EcO a EcN
4. efekt autoklávované probiotické bakterie EcN
5. rozdíly populací lymfocytů a jejich aktivity po stimulaci pomocí TCR a IRBP v lymfatických uzlinách po podávání EcN
6. rozdíly v produkci cytokinů a antimikrobiálních peptidů v Peyerových plátech při podávání EcN
7. změny v počtu myeloidních buněk a B-lymfocytů v lymfatických uzlinách při podávání EcN
8. typ imunitní odpovědi v počáteční fázi rozvoje zánětu

Kapitola 3

MATERIÁL A METODY

3 MATERIÁL A METODY

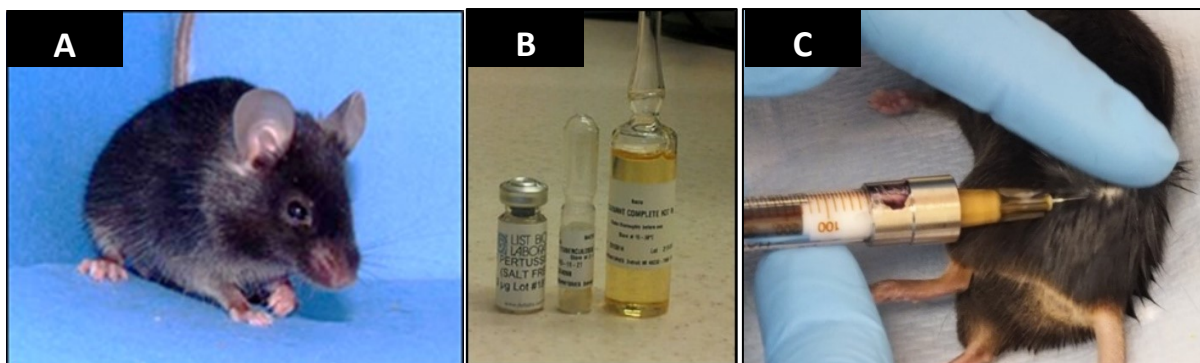
3.1 Experimentální zvířata

K našim pokusům byly použity myši samice inbredního kmene C57BL/6J ve věku 6 až 8 týdnů (Obr. 2A), které byly získány z chovu Centra pro experimentální biomodely 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Myši byly umístěny v konvenčním zvířecím zařízení Farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Myši byly pro každý experiment dodány ve velké skupině a poté byly náhodně rozděleny do jednotlivých klecí. Myši, u kterých byly zjištěny kongenitální vady, např. mikroftalmus či katarakta, byly vyřazeny z experimentů. Odborná komise pro práci s pokusnými zvířaty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy schválila použití laboratorních zvířat pro projekt. Studie byla provedena v souladu s doporučeními etických norem/směrnic definovaných legislativou Evropské unie týkající se využití pokusných zvířat (2010/63/EU), českého zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 419 z roku 2012 o ochraně pokusných zvířat a na základě osvědčení Ministerstva zemědělství o odborné způsobilosti k navrhování pokusů. Protokoly byly schváleny Radou pro práva zvířat 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Ministerstvem školství, mládeže a sportu (MŠMT 9993/2017-2).

3.2 Indukce EAU

EAU byla u samic myšního kmene C57BL/6J indukována dle standardního protokolu (Avichezer et al. 2000) subkutánní injekcí 500 µg IRBP (1-20 [Homo sapiens] H2N-GPHTLHFQPSLVLDMAKVLLD-OH, New England Peptide, Gardner, MA, USA) v emulzi v poměru 1:1 s CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) obsahujícím 3,3 mg/ml teplem usmrcené bakterie *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA). Suspenze byla aplikována standardně subkutánně do obou zadních končetin (Obr. 2B,C). Současně bylo intraperitoneálně aplikováno 1,2 µg PT rozpuštěného ve fosfátovém pufru (PBS).

IRBP byl před emulzifikací v CFA rozpuštěn dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, USA).



Obr. 2: Indukce EAU. A: Samice myši kmene C57BL/6; B: Reagencie k indukci: PT, IRBP, CFA; C: Subkutánní aplikace emulze IRBP s CFA do zadní končetiny.

3.3 Klinické hodnocení EAU

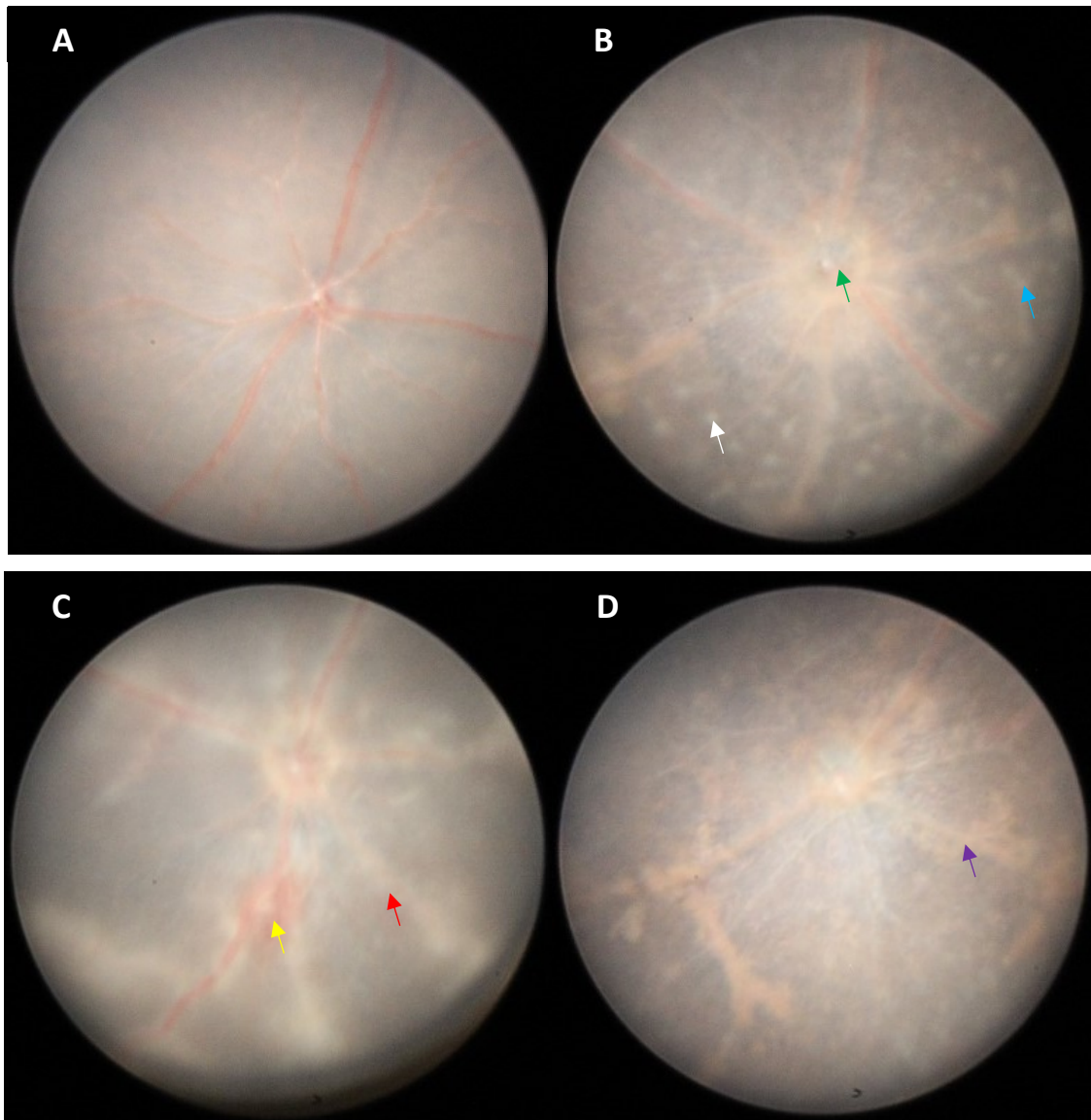
21. a 27./28. den po indukci EAU byla *in vivo* během klinického hodnocení (biomikroskopie fundu) pomocí topického endoskopického zobrazování fundu (TEFI) pořízena digitální fotografie centrální části sítnice zadního pólu každého oka (Obr. 3) Pro zvětšení obrazu byla mezi fotoaparát a otoskop vložena spojná čočka o optické mohutnosti +4,0 dioptrie. Pro klinické hodnocení byly myši uvedeny intraperitoneální injekcí do celkové anestezie (ketamin 80 mg/kg a xylazin 5 mg/kg, obě anestetika – Bioveta, Ivanovice na Hané, Česká republika). Fotografie fundu byly pořízeny v arteficiální mydriáze (tropicamid, Unitropic 1 % oph. gtt., Unimed Pharma, Bratislava, Slovensko a phenylephrin, Neosynephrin-POS 10 % oph. gtt., Ursapharm, Praha, Česká republika). Na rohovku byl pro přiložení otoskopu aplikován viskózní oční gel (Vidisic gel, Bausch and Lomb, Praha, Česká republika). Zánětlivé změny v centrální části sítnice obou očí byly zhodnoceny dle standardních kritérií (Xu et al. 2008) zvláště pro terč zrakového nervu, sítnicové cévy a vlastní sítnici (Tab. 1, Obr. 4). Dva zkušební oftalmologové nezávisle zhodnotili všechny fotografie. V případě subjektivního rozdílu v hodnoceních byl následně po diskuzi na základě shody určen výsledný stupeň zánětu. Na základě publikovaných kritérií klinického hodnocení byl pro každé oko stanoven výsledný stupeň zánětu 0 (fyziologický nález) až 4 (závažný nález). V pokusech s probiotiky byla změněna metodika. Stanovili jsme celkové hodnocení pro každou myš jako aritmetický průměr nálezu na obou očích.



Obr. 3: Klinické hodnocení EAU pomocí fotoaparátu napojeného na otoskop.

Stupeň zánětu	Sítňicové infiltráty	Infiltrace terče zrakového nervu	Změny sítňicových cév	Strukturální změny sítňice
1	1-4 malé léze nebo 1 lineární léze	minimální	rozšířené cévy bez perivaskulárního opouzdření	zánět či atrofie na < ¼ plochy sítňice
2	5-10 malých lézí nebo 2-3 lineární léze	mírná	rozšířené cévy a 1-4 mírná opouzdření	zánět či atrofie na ¼ až ¾ plochy sítňice
3	> 10 malých lézí nebo > 3 lineárních lézí	střední	> 4 mírná opouzdření nebo 1-3 středně těžká opouzdření	panretinální atrofie s < 3 lineárními lézemi (jizvami)
4	splývající lineární léze	závažná	> 3 středně těžká opouzdření nebo > 1 těžké opouzdření	panretinální atrofie s > 3 lineárními lézemi (jizvami)

Tab. 1: Klinické hodnocení – skórovací tabulka.

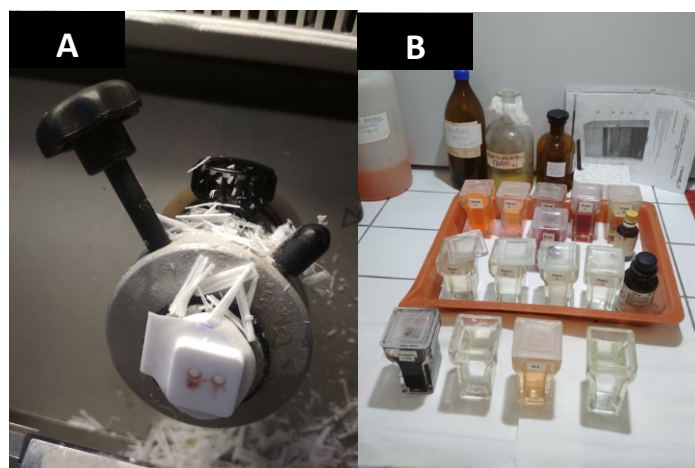


Obr. 4: Klinické hodnocení – fotografie fundu: A: Fyziologický nález; B: Typické změny při EAU: šipky ukazují malý sítnicový infiltrát (bílá), lineární lézi (modrá), střední infiltraci terče zrakového nervu (zelená); C: výrazné opouzdření sítnicové cévy, tj. vaskulitidu (červená), krvácení při vaskulitidě (žlutá); D: atrofickou sítnici s uzavřenými cévami (fialová).

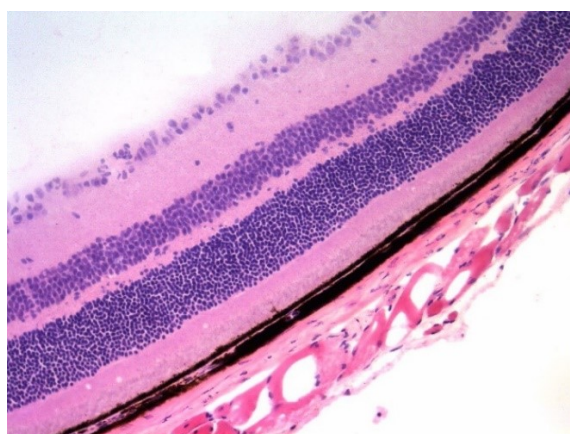
3.4 Histologické hodnocení EAU

28./35. den po indukci byly myši usmrceny, myší bulby enukleovány a hned poté ponořeny do Tissue-TEK O.C.T. COMPOUND (Sakura Finetek, USA, Inc., Torrance, CA, USA) a zamraženy v 2-methylbutanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v tekutém dusíku. Vzorky byly dále uchovávány v teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do přípravy histologických preparátů. Bulby byly poté nakrájeny na kryostatu (Leica CM 1850, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Německo) při teplotě $-17\text{ až }-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ na řezy o tloušťce $7\text{ }\mu\text{m}$, které byly vedeny ve 3 úrovních: v obou periferiích a centrálně v oblasti zrakového nervu. Poté byly řezy nabarveny

metodou hematoxylin-eosin (Obr. 5). Následně vzorky vyhodnotili 2 zkušení oftalmologové s využitím standardního systému hodnocení stupně zánětu (Tab. 2) (Obr. 6 a 7) (Heissigerova et al. 2016). Na základě publikovaných kritérií histologického hodnocení byl pro každé oko stanoven výsledný stupeň zánětu 0 (fyziologický nález) až 4 (závažný nález). V případě probiotik jsme změnil metodu (viz klinické hodnocení), tj. hodnocení pro každou myš bylo stanoveno jako aritmetický průměr nálezu na obou očích.



Obr. 5: Zpracování mražených bulbů. A: Krájení zamražených bulbů na kryostatu; B: Barvení metodou hematoxylin-eosin.



Obr. 6: Histologické hodnocení – fyziologický nález na řezu bulbem bez EAU.

3.5 Podávání antibiotik u EAU

Myším bylo podáváno širokospektré antibiotikum metronidazol 500 mg/l (B. Braun, Praha, Česká republika), který byl rozpuštěn v pitné vodě. Myším v kontrolní skupině byla podávána pitná voda bez metronidazolu. Voda byla myším vyměňována každé 3 dny k prevenci

kontaminace (Klimesova et al. 2013, Zakostelska et al. 2016). Podávání metronidazolu bylo zahájeno buď 1 nebo 2 týdny před indukcí s pokračováním do konce pokusu.



Obr. 7: Histologické hodnocení – typické změny při EAU: šipky ukazují buněčnou infiltraci sklivce (modrá), cévní stěny při vaskulitidě (oranžová), retinální záhyby, tzv. foldy (zelená), atrofii fotoreceptorů (žlutá).

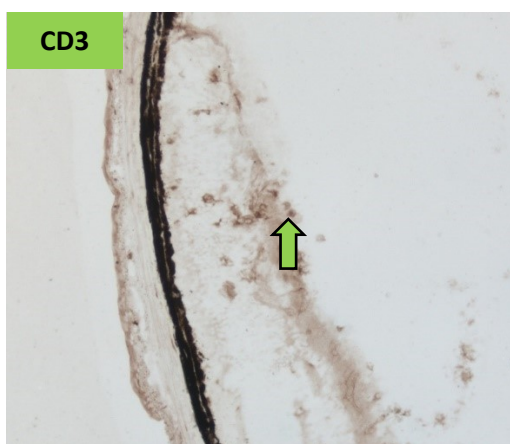
Stupeň zánětu	Infiltrace sítnice	Vaskulitida	Vitritida	Retinální záhyby	Ložiska sítnice	Ztráta fotoreceptorů
0.5	mírná v řasnatém tělesu/sítnici/cévnatce	-	-	-	-	-
1	-	místa/mírná	mírná	místa	-	-
2	buňky v přední komoře	2 a více cév	mírná/střední	2	1-2	mírná/střední
3	-	10-50 %	výrazná	> 2	> 2	těžká (> 60 %)
4	subretinální exsudát	> 50 %	závažná	rozsáhlé nebo odchlípení	> 2	těžká (> 60 %)

Tab. 2: Histologické hodnocení – skórovací tabulka.

3.6 Imunohistochemický průkaz lymfocytů a makrofágů

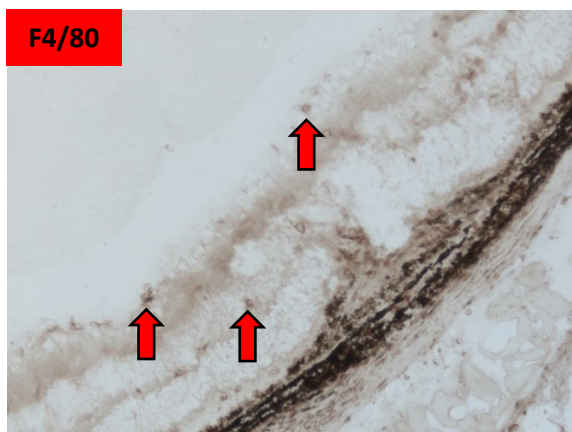
Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno pouze v pokusech s metronidazolem. Pro tuto analýzu byly náhodně vybrány 3 myši z každé skupiny. Přítomnost T-lymfocytů (CD3 molekula) na mražených řezech sítnice myši s EAU z bulbů odebraných *post mortem* 35. den jsme prokazovali třístupňovou imunoperoxidázovou reakcí. Pomocí CD3 protilátky (Rabbit Polyclonal Anti-Human CD3, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko) v ředění 1:200 v PBS a 1,5% normálním kozím séru byly za vizualizace pomocí sekundární biotinylované králičí protilátky (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko) a soupravy Vectastain Elite ABC HRP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) detekovány CD3 pozitivní buňky (obr. 8).

Pozitivními kontrolami byly řezy sleziny s primární i sekundární protilátkou, negativními kontrolami řezy sleziny bez primární protilátky.



Obr. 8: Imunohistochemický průkaz T-lymfocytů (zelená šipka) na řezu sítnicí s EAU.

K imunohistochemickému průkazu makrofágů byla v imunoperoxidázové reakci použita protilátka F4/80 (Rat Monoclonal [BM8] Anti-Mouse F4/80, Abcam, Cambridge, Velká Británie) v ředění 1:100 v PBS a 1,5% normálním kozím séru (obr. 9). Vizualizace vazby byla provedena pomocí sekundární biotinylované krysí protilátky (Abcam, Cambridge, Velká Británie) a soupravy Vectastain Elite ABC HRP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).



Obr. 9: Imunohistochemický průkaz makrofágů (červená šipka) na řezu sítnicí s EAU.

3.7 Podávání probiotik u EAU

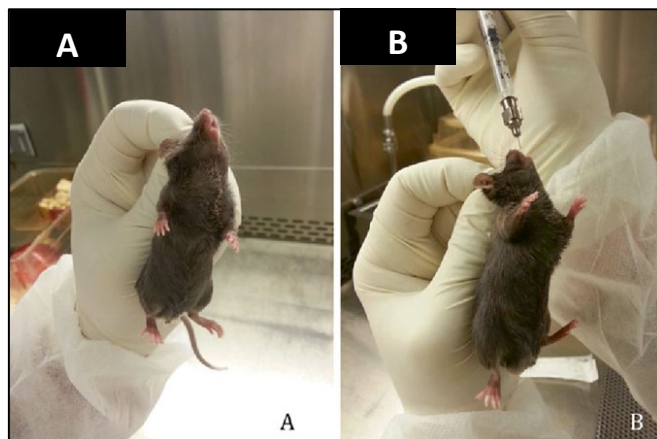
Probiotické živá bakterie EcO (sérotyp O83:K24:H31; Dyntec spol. s.r.o., Terežín, Česká republika) nebo živá či autoklávovaná (121 °C, 30 min, 0,12 MPa) EcN (sérotyp O6:K5:H1; Ardeypharm GmbH, Herdecke, Germany) byly použity pro naše experimenty. Obě bakterie (EcN, EcO) byly kultivovány v Lennoxově verzi bujónu Luria Bertani (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Na spektrofotometru byly v 600 nm (A_{600}) změřeny optické denzity pro zjištění růstových křivek specifických pro kmen, poté byly denzity porovnány počítáním jednotek tvořících kolonie (CFU) po 24hodinové kultivaci na 0,5% agarových destičkách připravených ze stejného bujónu. Dále byly čerstvé bakteriální suspenze rozpuštěny ve sterilním fyziologickém roztoku (0,9% NaCl; ARDEAPHARMA, a.s., Ševětín, Česká republika) k dosažení cílové koncentrace 10^{10} ml^{-1} . Myším jsme podávali dávku o objemu 100 μl (10^9 bakterií) této suspenze. Pravidelně jsme monitorovali životnost zmíněných bakterií kultivací na agarových půdách. Alivóty s probiotiky byly uchovávány při teplotě 4–8 °C po dobu maximálně 2 týdnů. Přímo před vlastní aplikací probiotik byl obsah alivót rozmíchán pomocí sterilního fyziologického roztoku. Probiotika byla podávána gaváží orogastrickou sondou 3krát týdně (Obr. 10) s využitím jednoho ze čtyř typů pokusných režimů a kontrolám byl podáván fyziologický roztok (Obr. 11): (a) dva týdny před EAU indukcí s pokračováním do konce experimentu (kombinace prevence a terapie, 18 dávek); (b) pouze dva týdny před EAU indukcí (prevence, 6 dávek); (c) od 1. dne po EAU indukci až do konce pokusu (časná a pozdní terapie, 12 dávek); (d) poslední dva týdny pokusu (pozdní terapie, 7 dávek). Kontrolní skupině bylo podáváno 100 μl fyziologického roztoku (placebo/sham). Pro studium vlivu EcN na imunitní systém před rozvojem příznaků EAU byl proveden pokus v režimu podávání probiotik v kombinaci prevence a terapie s ukončením a usmrcením myši 7 dní po EAU indukci (9 dávek).

3.8 Analýza populací lymfocytů v lymfatických uzlinách

Po indukci EAU byl proveden odběr mezenteriálních (mLN), inguinálních (iLN) mizních uzlin a cLN, poté byly připraveny suspenze jednotlivých buněk (Kostovcikova et al. 2019). Dále byly 7 dní po indukci EAU provedeny odběry: 2 cm ilea bez Peyerových plátů s následnou izolací buněk z lamina propria mucosae mechanickou dezintegrací a enzymatickým natrávením dle dříve uveřejněných protokolů (Cossarizza et al. 2017, Qiu et Sheridan 2018). Průtoková cytometrie (FACS) byla provedena dle následujícího postupu: buněčná suspenze byla omyta v PBS, označena ve fixačním barvivu Fixable Viability Dye (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA), dále fixována a permeabilizována pomocí eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific). Nespecifické barvení bylo blokováno 10% myším sérem a protilátkou anti-CD16/CD32 (Fc receptory) a suspenze byla nabarvena buď pomocí markerů na T buňky nebo monocyty a makrofágy s využitím fluorescenčně značených protilátek.

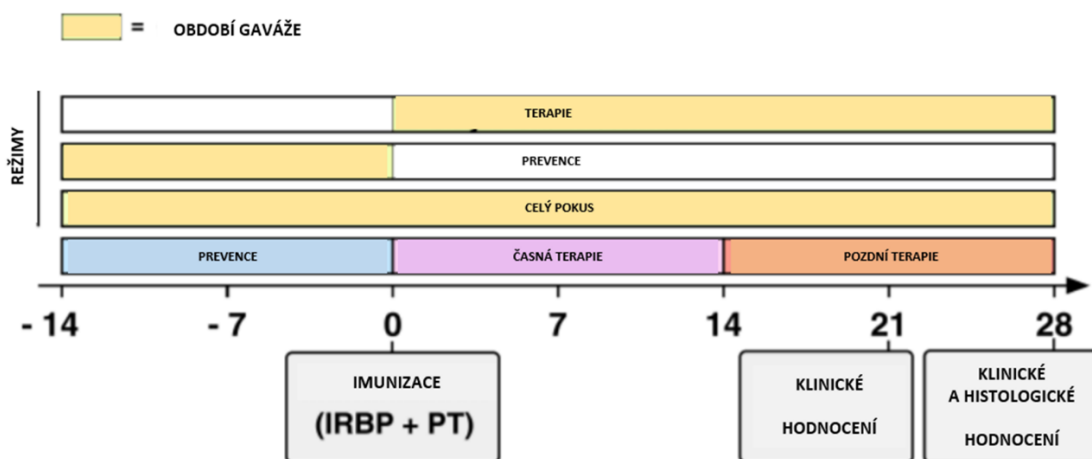
Buňky byly definovány:

- Monocyty/makrofágy: CD45+CD11c-B220-CD3-CD49b-Ly-6G-SSClo
- Neutrofilní granulocyty CD45+CD11c-B220-CD3-CD49b-Ly-6G+
- B-lymfocyty CD45+CD11c-B220+
- Makrofágy CD45+F4/80+CD11b+CD11b+, M1 (CD38+Erg2+) a M2 (CD38-Erg2+), markery byly zvoleny dle dříve publikovaných dat.



Obr. 10: Postup podávání probiotik. A: Technika manipulace s myší; B: Aplikace probiotik gaváží orogastrickou sondou.

(foto převzato z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Delivery-of-the-Porcupine-Inhibitor-WNT974-in-Mice.-Zhang-Lum/a99879140af43b1289719c8867e49f0e9e42e22f/figure/2>)



Obr. 11: Režimy podávání probiotik včetně časové osy průběhu experimentů.

Pro analýzu intracelulární produkce cytokinů byly buňky (2×10^5 buněk v kompletním RPMI) inkubovány 18 hodin na destičce s navázaným $5 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 ϵ a $4 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28 (obě z Biolegend) nebo 40 hodin s $20 \mu\text{g/ml}$ IRBP a směs $3 \mu\text{g/ml}$ Brefeldinu A a $2 \mu\text{mol}$ Monensinu (obě od ThermoFisher Scientific) byla přidána k posledním 4 hodinám inkubace.

Buňky byly poté omyty, dále označeny s fixační barvou Fixable Viability Dye (ThermoFisher Scientific), fixovány a permeabilizovány pomocí eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (ThermoFisher Scientific), blokovány pomocí protilátek anti-CD16/CD32 a nabarveny pro CD3, CD4, CD8 (vše Biolegend), IFN- γ , IL-17 a TNF- α (vše ThermoFisher Scientific). Data z FACS byla získána s využitím LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a zanalyzována využitím programu FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

3.9 Analýza produkce cytokinů ve střevě

Po indukci byly provedeny odběry vzorků střeva: 3 Peyerovy pláty distální části tenkého střeva a jedna tří-milimetrová punch biopsie distální části tlustého střeva (Kverka et al. 2011). Vzorky byly poté zváženy a kultivovány v $500 \mu\text{l}$ kompletního RPMI média (Merck; Cat# R0883) obsahujícího 10% tepelně inaktivované fetální bovinní sérum (Biochrom GmbH, Berlin, Germany; Cat# S 0115) a 1% antibioticko-antimykotický roztok (Merck) ve zvlhčeném inkubátoru (37°C , 5% CO_2) po dobu 48 hodin. Poté byly odebrány supernatanty a uchovány do analýzy při teplotě -20°C . Následně bylo provedeno měření cytokinů ve tkáňové kultuře supernatantů s využitím odpovídajících enzymových imunoassayových (ELISA) setů pro myši TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-33 a S100A8 (vše Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA; Cat# DY410, DY406, DY401, DY3626 and DY3059) dle instrukcí výrobce.

3.10 Analýza regulačních genů ve střevě

Při ukončení experimentu, tj. 28. den po indukci, byly provedeny biopsie kolon a ilea, které byly uchovány v RNALater (Qiagen, Hilden, Germany) při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do další analýzy. Dále byla provedena homogenizace tkáně pomocí keramických kuliček v Lysing Matrix D na FastPrep-24 (obě MP Biomedicals, Solon, OH, USA) a byla provedena extrakce celkové RNA pomocí TRI reagent (Zymo Research, Irvine, CA, USA). RNA byla následně zpracována pomocí TURBO deoxyribonukleové kyseliny-free (DNA-free) Kitu (ThermoFisher Scientific) k odstranění DNA. Dále byla změřena koncentrace a kvalita RNA ve vzorku pomocí NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Všechny vzorky byly potom naředěny do stejné koncentrace RNA a 500 ng RNA bylo transkribováno do komplementární DNA (cDNA) pomocí SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (ThermoFisher Scientific), Oligo(dT) 12-18 primerů (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, Česká republika) a rekombinantního inhibitoru ribonukleázy RNaseOUT™ (ThermoFisher Scientific). Byla provedena kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR) s pomocí gp SG PCR Master Mix (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a specifickými primery na LightCycler® 480 Real-Time PCR systému (Roche, 2019) k určení změn v expresi mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA). Parametry PCR byly následující: 3 minuty při teplotě $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 39 cyklů 30 sekund při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 sekund při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 1 minuta při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Data byla normalizována dle referenčního genu pro eukaryotický elongační faktor 2 (Eef2) a relevantní kontrolní skupiny. Změny v genové expresi byly spočítány dle metody delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

3.11 Analýza kolonizační schopnosti probiotik

Probiotické bakterie EcN nebo EcO byly podávány gaváží myším kmene C57BL/6J (jedna dávka = 10^9 živých bakterií na jednu myš ve 100 μl fyziologického roztoku; EcN n = 5; EcO n = 4) ke zhodnocení jejich schopnosti kolonizovat střevo myši. K prevenci možné kontaminace mezi skupinami myši s jednotlivými probiotiky byly myši s EcN a EcO chovány odděleně. Po 48 hodinách od gaváže probiotik byly myši usmrceny a byl odebrán střevní obsah z ilea, céka a kolon. Poté proběhlo vážení jednotlivých vzorků, izolace DNA pomocí MasterPure DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI, USA) a dosažení koncentrace 5 ng/ μl . Sériová ředění vzorku DNA z 5×10^8 CFU originálních suspenzí byla použita jako standardy. Dále byly 4 μl tohoto templátu smíchány s gb SG PCR Master Mix (Generi Biotech s.r.o.) a specifickými primery. Parametry PCR byly: 4 minuty při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 cyklů po 30 sekundách při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sekund při $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 60 sekund při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Počty probiotik byly upraveny na CFU na gram vzorku a statisticky zanalyzovány.

3.12 Tvorba a kultivace makrofágů odvozených z kostní dřeně

U myší kmene C57BL/6J ve věku 10 týdnů byl proveden odběr kostní dřeně z femuru. Dle dříve popsaného postupu byly následně připraveny suspenze jednotlivých buněk (Zhang et al. 2008). Poté byly buňky 6 dní kultivovány v diferenciacním médiu kostní dřeně (DM) s pasážováním/výměnou kultury každé 4 dny. DM se skládá z kompletního RPMI média (Merck) obsahujícího 10% teplem-inaktivované fetální bovinní sérum (Biochrom GmbH), 1% antibioticko-antimykotický roztok (Merck), 50 μmol 2-merkaptoetanolu (Merck) a bylo obohaceno o L929 buněčně (ATCC CCL-1) podmíněné médium. L929 buněčně podmíněné médium obsahuje kolonie-stimulující faktor 1 (CSF-1) a bylo vyrobeno 10denní kultivací L929 buněk v kompletním RPMI médiu trvající 10 dní. 6. den kultivace byly adherující buňky odebrány a pasážovány na 96F-well destičky v množství 1×10^6 buněk/ml a inkubovány přes noc, aby měly buňky čas adherovat ke stěně destičky. Následující den byly makrofágy odvozené z kostní dřeně (BMDM) stimulovány lyzátem probiotické bakterie o koncentraci 1, 10, 100 nebo 1000 $\mu\text{g/ml}$ buď EcN, nebo EcO ve zvlhčeném inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) po dobu 24 hodin. Každý lyzát byl připraven průchodem 3krát French Presseem, poté byl lyofilizován, re-suspendován v kompletním RPMI médiu a testován pro sterilitu.

3.13 Statistická analýza

K analýze dat z klinického a histologického hodnocení stupně zánětu jsme použili počítačový program GraphPad Prism (verze 8.1.1.; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). V pokusech s metronidazolem jsme prováděli analýzu skupin očí. U probiotických pokusů jsme změnili metodiku a prováděli analýzu skupin myší. Zde jsme u každé myši získali výslednou hodnotu aritmetickým průměrem obou očí. Ke zhodnocení rozdílů mezi skupinami s podávaným placebem a antibiotiky/probiotiky byl použit neparametrický test Mann-Whitney. K otestování rozdílů mezi lyzáty s EcO a EcN na BMDM byl použit 2-way ANOVA s Bonferroniho metodou násobného testování a za signifikantní p-hodnotu (p-value) bylo považováno $p < 0.05$. Data jsou zobrazena formou jednotlivých bodů s mediánem v pokusech s metronidazolem a aritmetickým průměrem klinických a histologických stupňů zánětu v pokusech s probiotiky, jako geometrický průměr (úsečka) nebo geometrická standardní odchylka (chybová úsečka) u dat ukazujících expresi regulačních genů a jako aritmetický průměr (úsečka) nebo standardní odchylka (chybová úsečka) u ostatních grafů.

Kapitola 4

VÝSLEDKY

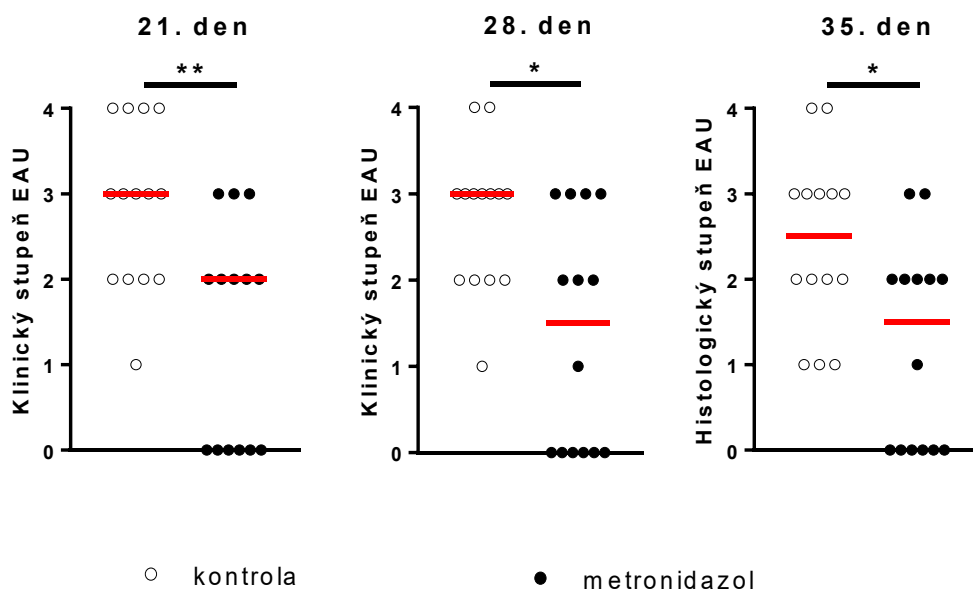
4 VÝSLEDKY

4.1 Efekt metronidazolu u EAU na stupeň zánětu

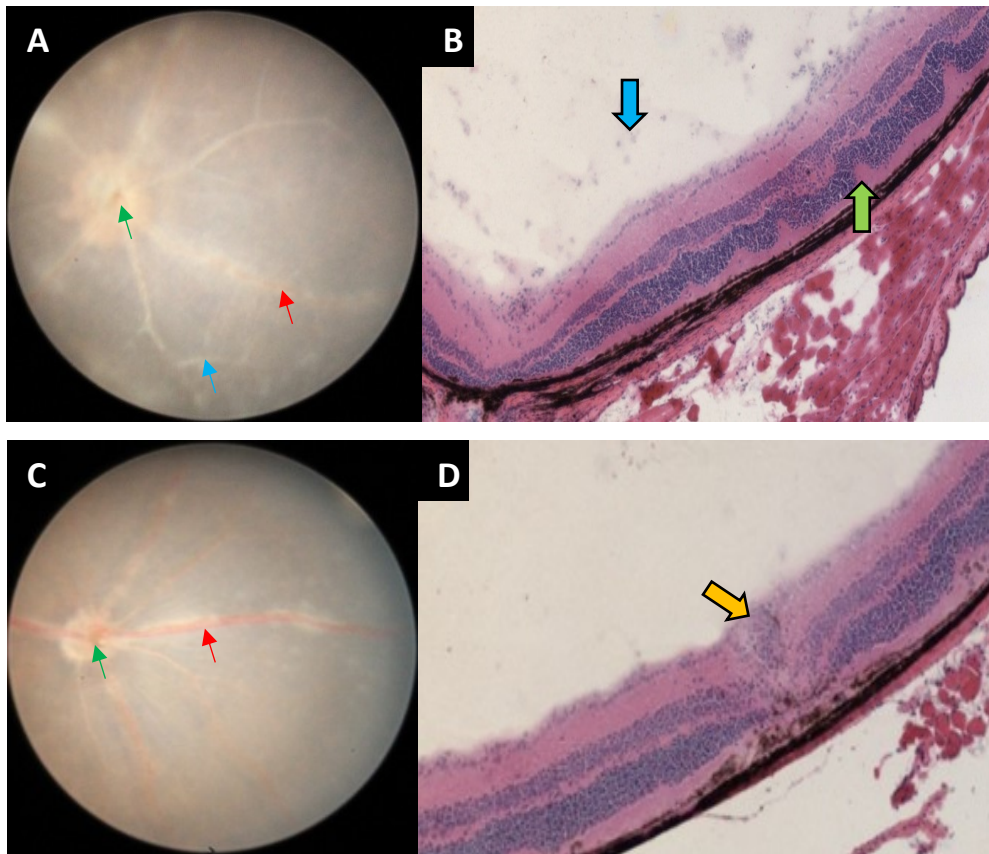
Metronidazol, širokospektré antibiotikum, který byl myším podáván perorálně v pitné vodě, vedl k signifikantnímu snížení stupně zánětu u myšího modelu experimentální uveitidy klinicky i histologicky, jak při zahájení podávání 1 týden před indukcí (Graf 1), tak i při zahájení 2 týdny před indukcí (Graf 2) s pokračováním do konce pokusu oproti kontrolní skupině s pitnou vodou bez antibiotika.

Při klinickém hodnocení 21. i 28. den bylo patrné snížení stupně zánětu ve skupině myší s metronidazolem oproti kontrolám.

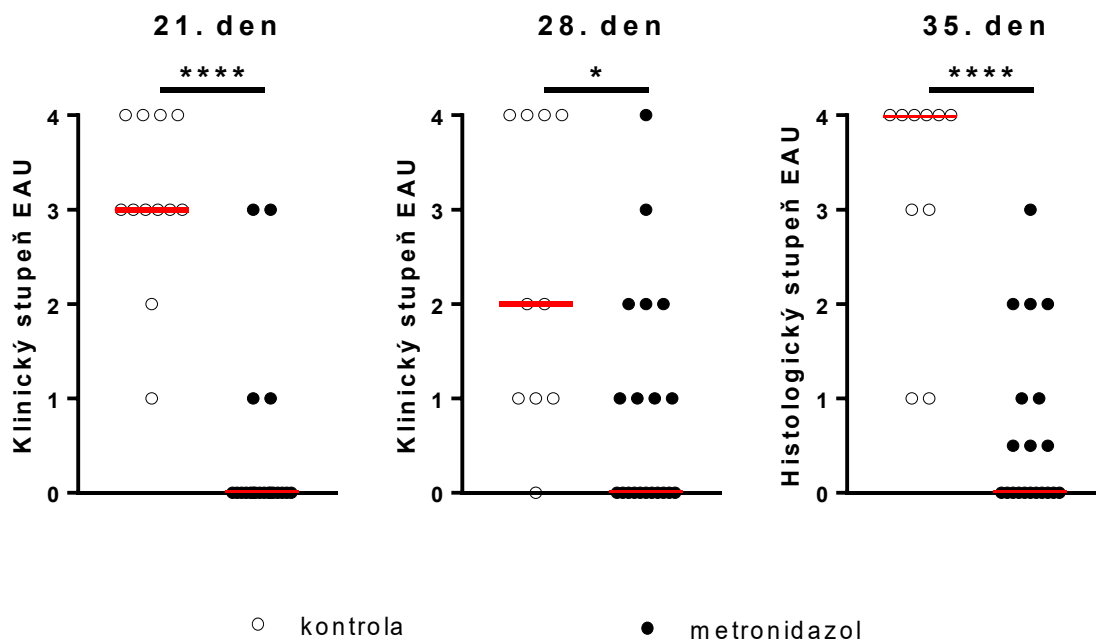
Histologické vyšetření ukázalo 35. den pouze minimální či žádné známky zánětu ve skupině s metronidazolem oproti skupině kontrolní, kde byl zánět vysokého stupně (Obr. 12 a 13).



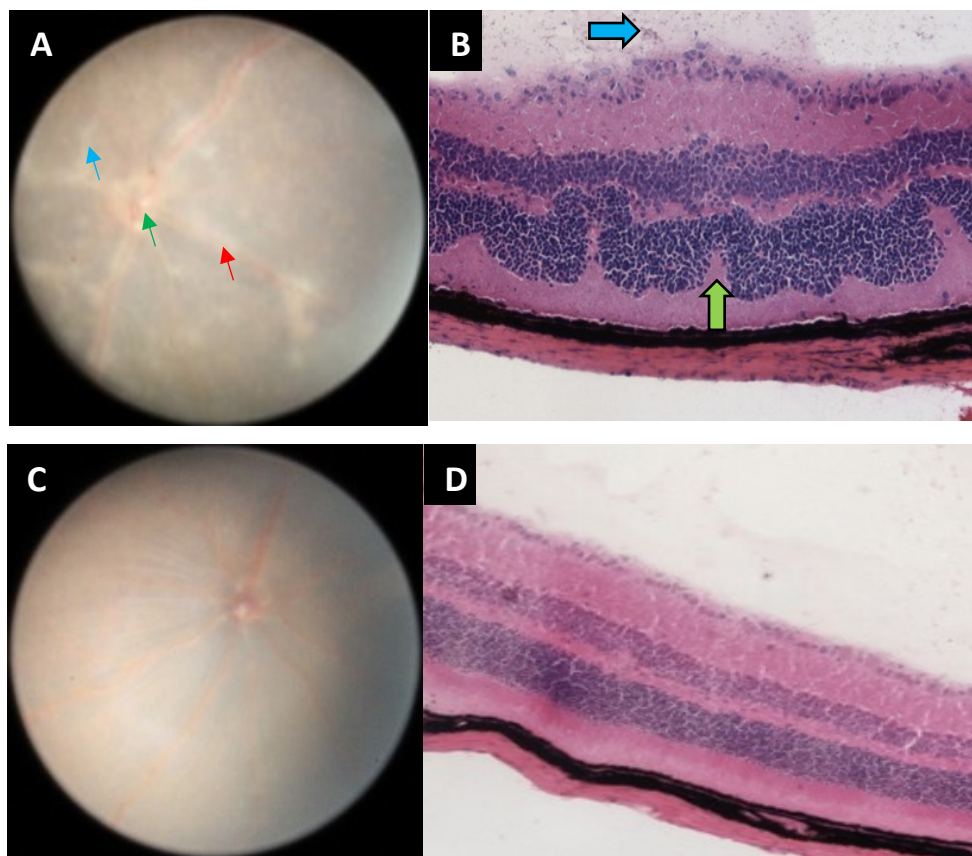
Graf 1: Vliv metronidazolu na stupeň zánětu u EAU. Antibiotická léčba byla zahájena 1 týden před indukcí. Klinické hodnocení 21. a 28. den od indukce, histologické hodnocení 35. den od indukce (metronidazol 14 očí, kontroly 14 očí). Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$). Červeně je zobrazen medián.



Obr. 12: Klinické a histologické hodnocení u myší léčených metronidazolem se zahájením 1 týden před indukcí EAU a u kontrol. A: Foto fundu 28. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. výraznější infiltraci terče zrakového nervu (zelená), lineární lézi (modrá) a výraznější opouzdření cév (červená); B: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u kontrolní skupiny, na němž větší šipky ukazují vitritidu (modrá) a četné retinální záhyby (zelená); C: Foto fundu 28. den u skupiny, kdy byl myším podáván metronidazol, kde šipky označují mírnou infiltraci terče zrakového nervu (zelená), dále rozšířené a mírně opouzdřené cévy (červená); D: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u myší léčených metronidazolem, na němž větší šipky ukazují vaskulitidu a infiltraci sítnice (oranžová).



Graf 2: Vliv metronidazolu na stupeň zánětu u EAU. Antibiotická léčba byla zahájena 2 týdny před indukcí. Klinické hodnocení 21. a 28. den od indukce, histologické hodnocení 35. den od indukce (metronidazol 20 očí, kontroly 12 očí). Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$) a **** ($p < 0,0001$). Červeně je zobrazen medián.

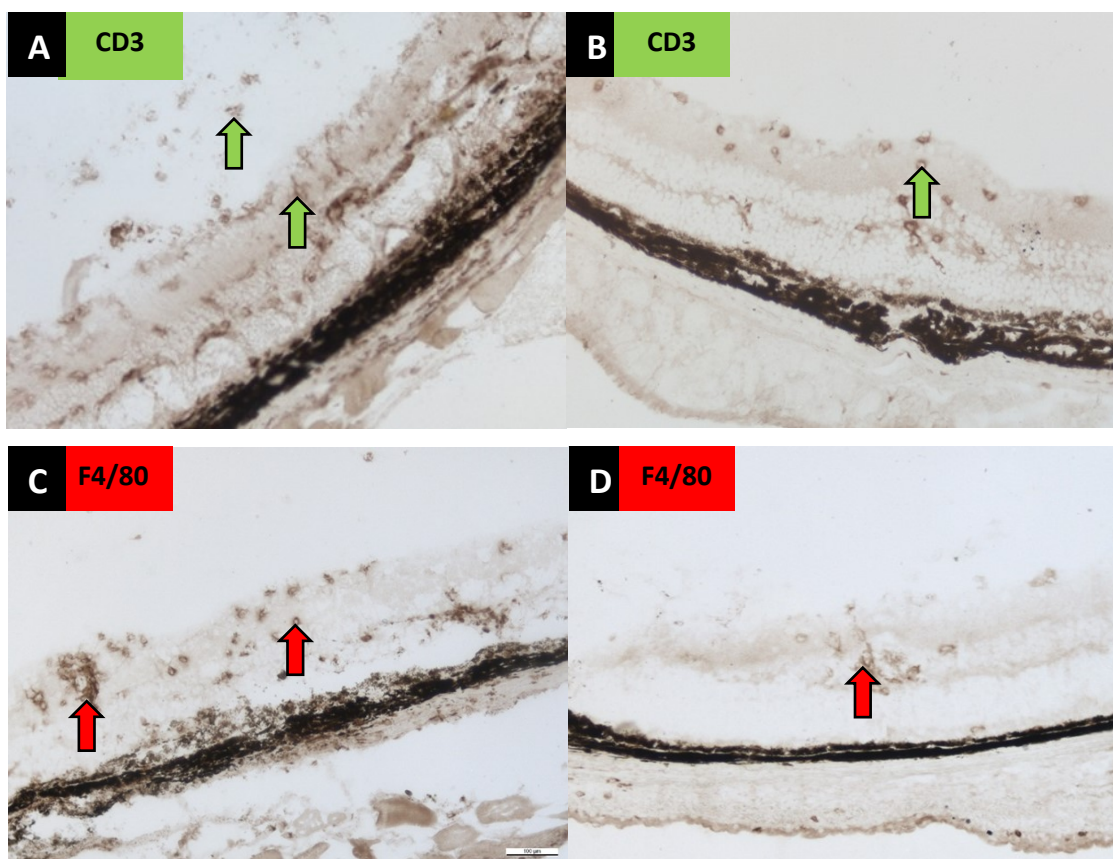


Obr. 13: Klinické a histologické hodnocení u myší léčených metronidazolem se zahájením 2 týdnů před indukcí EAU a u kontrol. A: Foto fundu 28. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. infiltraci terče zřetivého nervu (zelená), lineární léze (modrá) a výraznější opouzdření cév (červená); B: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u kontrolní skupiny, na němž větší šipky ukazují vitritidu (modrá) a četné retinální záhyby (zelená); C: Foto fundu 28. den u skupiny, kdy byl myším podáván metronidazol, kde je nález bez zánětlivých změn; D: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u myší léčených metronidazolem, kde je nález bez zánětlivých změn.

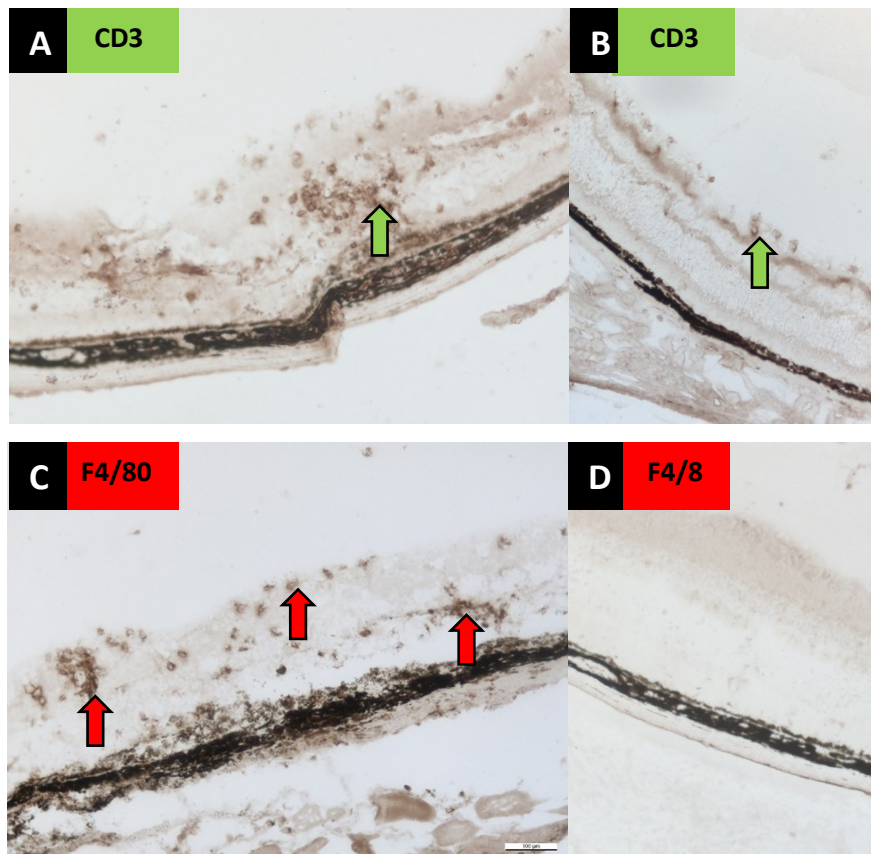
4.2 Vliv metronidazolu na infiltraci sítnice T-lymfocyty a makrofágy

Imunohistochemické vyšetření očí 35. den od indukce prokázalo 11% snížení počtu CD3+ T-lymfocytů a 35% snížení počtu F4/80+ makrofágů u myší, u kterých bylo zahájeno podávání metronidazolu 1 týdnů před indukcí ve srovnání proti kontrolní skupině (Obr. 14).

V případě zahájení podávání metronidazolu 2 týdnů před indukcí byl rozdíl ještě výraznější, tj. 83% pokles počtu CD3+ T-lymfocytů a 81% pokles F4/80+ makrofágů (Obr. 15). Data byla získána spočítáním jednotlivých buněk na histologických preparátech.



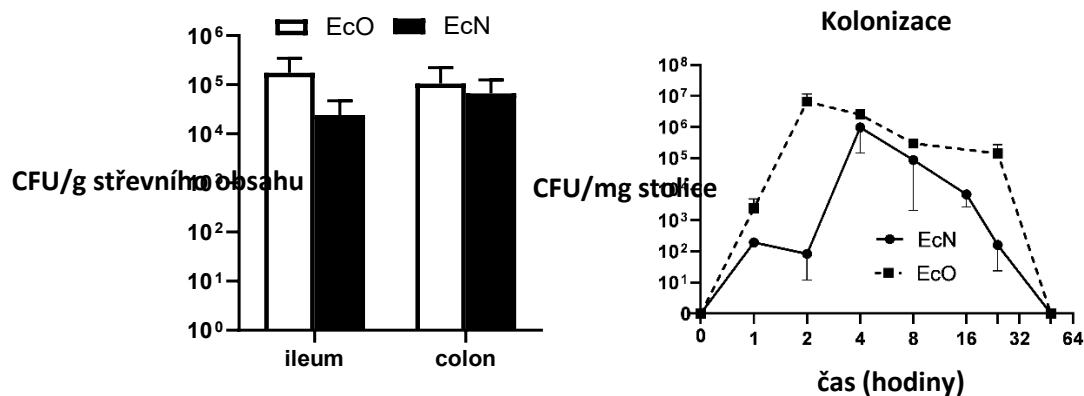
Obr. 14: Imunohistochemický průkaz T-lymfocytů (CD3⁺) a makrofágů (F4/80⁺) v sítnici myši léčených metronidazolem 35. den od indukce oproti kontrolám. Léčba antibiotiky byla zahájena 1 týden před indukcí EAU. A: Imunohistochemický preparát s průkazem T-lymfocytů (zelené šipky) v kontrolní skupině; B: Ve skupině s metronidazolem došlo ke snížení infiltrace sítnice T-lymfocyty (zelené šipky); C: Imunohistochemický preparát průkazu makrofágů (červené šipky) v kontrolní skupině; D: Ve skupině s metronidazolem došlo ke snížení infiltrace sítnice makrofágy (červené šipky); Zmíněné buňky se vyskytují ve sklivci, dále ve formě shluků či jednotlivých buněk ve vrstvách sítnice.



Obr. 15: Imunohistochemický průkaz T-lymfocytů ($CD3^+$) a makrofágů ($F4/80^+$) v sítnici myši léčených metronidazolem 35. den od indukce oproti kontrolám. Léčba antibiotiky byla zahájena 2 týdny před indukcí EAU. A: Imunohistochemický preparát s průkazem T-lymfocytů (zelené šipky) v kontrolní skupině; B: Ve skupině s metronidazolem došlo ke snížení infiltrace sítnice T-lymfocyty (zelené šipky); C: Imunohistochemický preparát průkazu makrofágů (červené šipky) v kontrolní skupině; D: Ve skupině s metronidazolem došlo k významnému snížení infiltrace sítnice makrofágy.

4.3 Schopnost probiotik EcN a EcO kolonizovat střevo

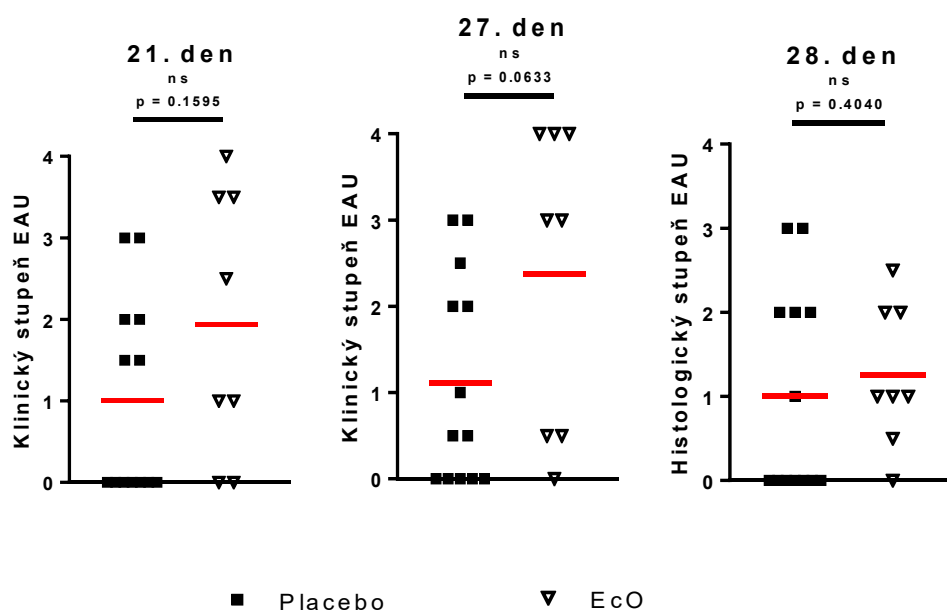
Prokázali jsme, že obě probiotické bakterie EcN i EcO kolonizují střevo. Nacházíme je u kolonizovaných myší ve vzorcích z ilea, céka a kolon v podobném množství až 48 hodin po podání probiotik (Obr. 16). Proto by podávání živých probiotik každé dva dny mělo vést k jejich trvalému působení. Po 5 dnech již nebylo možné zachytit přítomnost EcO, ani EcN ve střevěch myší, což ukazuje, že ani jedno ze zmíněných probiotik nekolonizuje tenké nebo tlusté střevo po delší dobu.



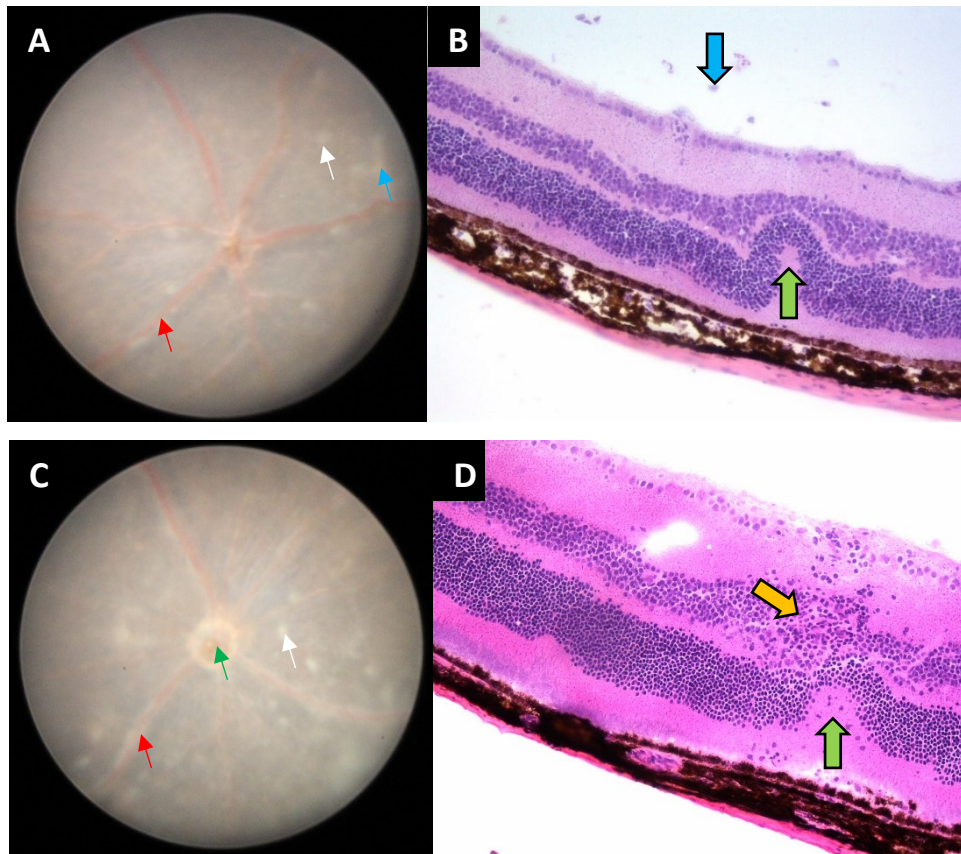
Obr. 16: Kolonizace střeva probiotiky EcO a EcN – obě bakterie přetrvávají ve střevě v ileu a kolon alespoň 48 hodin od jejich podání.

4.4 Vliv živých probiotik EcO a EcN na intenzitu EAU

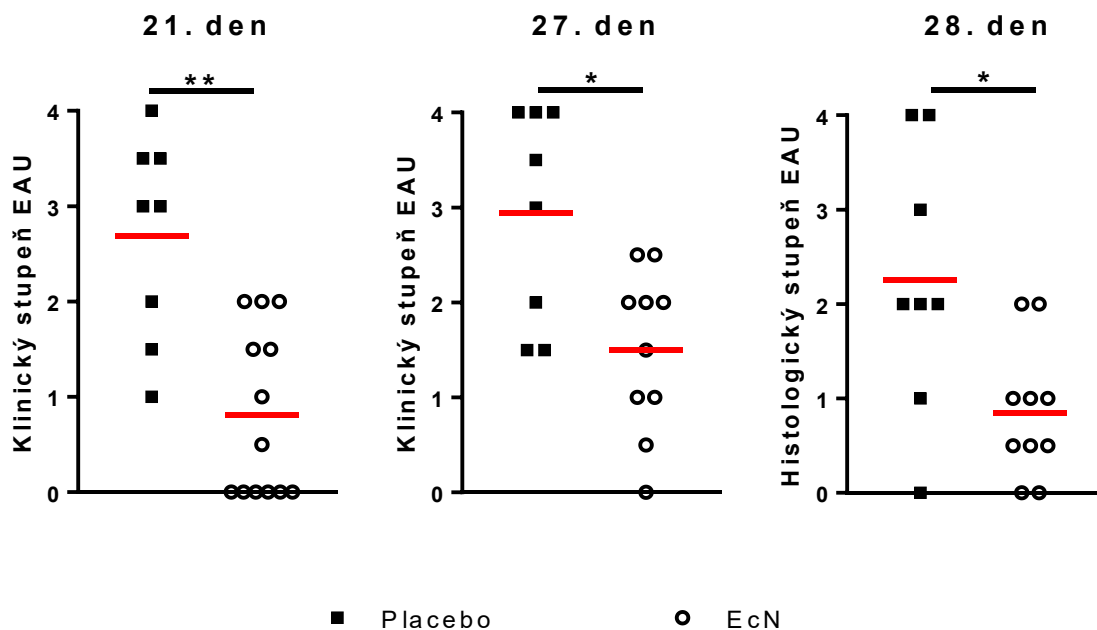
Kolonizace probiotikem EcO neměla protektivní účinek u EAU, dokonce vykazovala tendenci ke zvýšení stupně zánětu a navíc vedla u myši k vysoké mortalitě (55,6 %)(Graf 3, Obr. 17). Naopak při podávání živého probiotika EcN se zahájením 2 týdny před indukcí či od indukce došlo k významnému snížení stupně zánětu jak klinicky, tak histologicky oproti kontrolní skupině s podávaným fyziologickým roztokem (Graf 4-6, Obr. 18). V případě zahájení podávání EcN 2 týdny po rozvoji zánětu, tj. režim pozdní terapie, kdy jsou již patrné známky rozvoje uveitidy, nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami v klinickém ani v histologickém hodnocení (Graf 7).



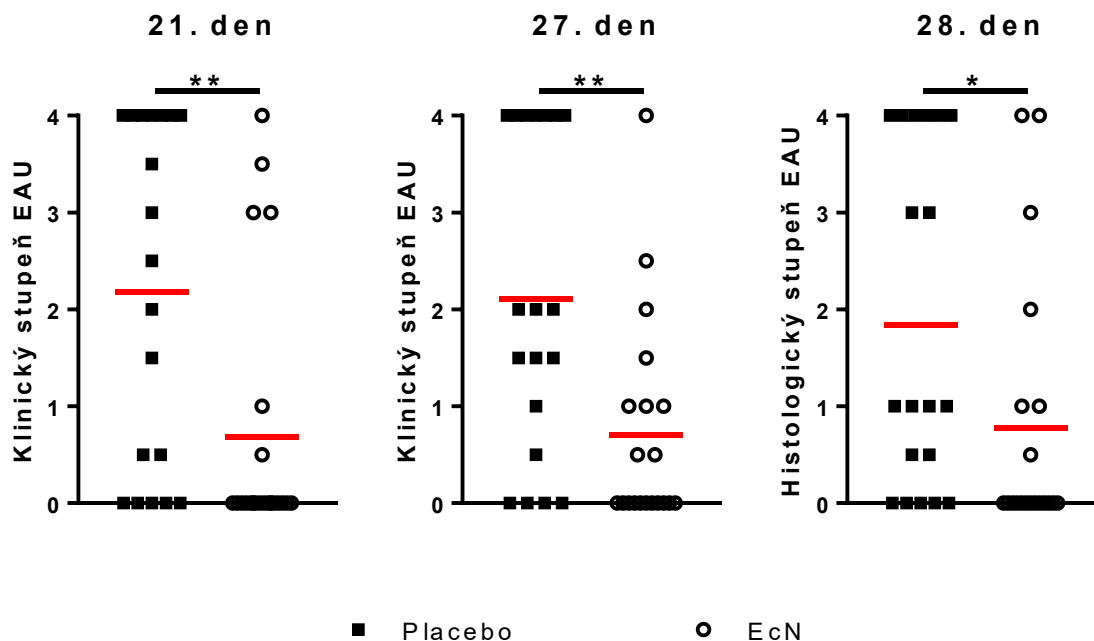
Graf 3: Vliv živé probiotické bakterie EcO na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 2 týdny před indukcí s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu celý pokus.



Obr. 17: Klinické a histologické hodnocení u myší, kterým byla podávána perorálně živá probiotická bakterie EcO. Podávání probiotik bylo zahájeno 2 týdny před indukcí EAU s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu celý pokus. A: Foto fundu 27. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. sítnicové infiltráty (bílá), mírné opouzdření cév (červená), lineární lézi (modrá); B: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u kontrolní skupiny, na němž větší šipky ukazují mírnou vitritidu (modrá) a retinální záhyb (zelená); C: Foto fundu 27. den u skupiny, kdy bylo myším podáváno probiotikum, kde malé šipky ukazují mírnou infiltraci terče zrakového nervu (zelená), výraznější opouzdření cév (červená) a více sítnicových infiltrátů (bílá); D: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u myší léčených probiotikem, kde šipky ukazují retinální záhyb (zelená) a buněčnou infiltraci vnitřních vrstev sítnice (oranžová).

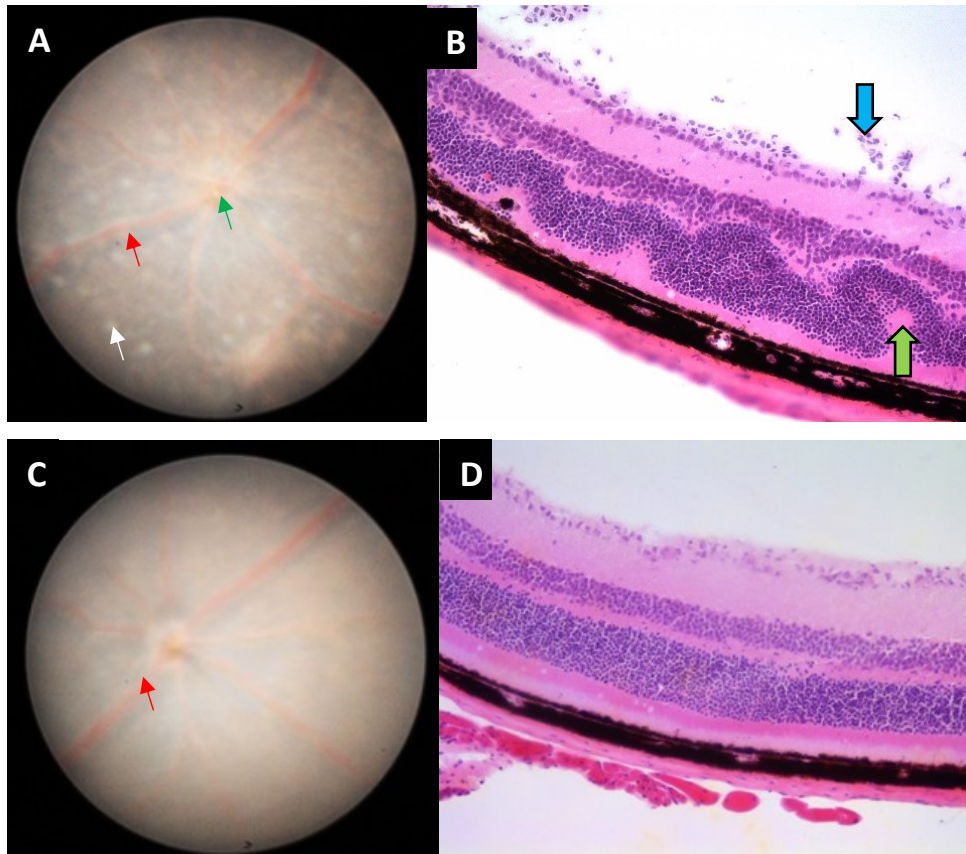


Graf 5: Vliv živé probiotické bakterie EcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 2 týdny před indukci s pokračováním do indukce, tj. v režimu prevence. Klinické hodnocení 21. a 27. den od indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 8 myši, EcN 13 myši, 2 pokusy). Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,01$) a ** ($p < 0,005$). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.

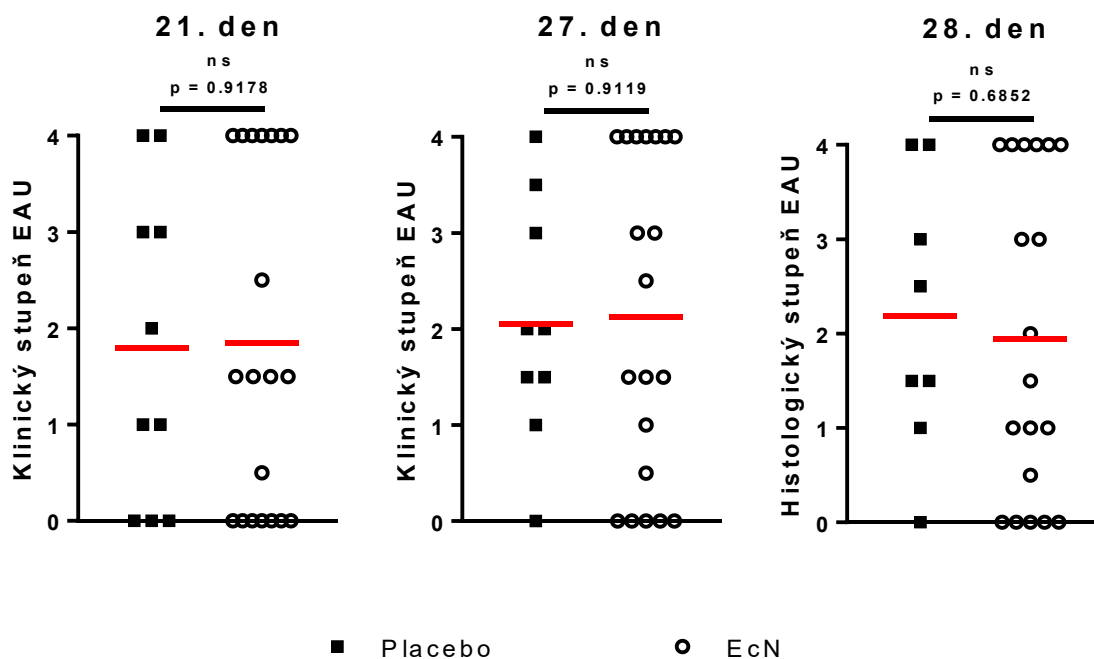


Graf 6: Vliv živé probiotické bakterie EcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 1. den po indukci s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu časná + pozdní

terapie. Klinické hodnocení 21. a 27. den od indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 19 myší, EcN 22 myší, 3 pokusy). Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,01$) a ** ($p < 0,005$). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.



Obr. 18: Klinické a histologické hodnocení u myší, kterým byla podávána perorálně živá probiotická bakterie EcN. Podávání probiotik bylo zahájeno 2 týdny před indukcí EAU s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu celý pokus. A: Foto fundu 27. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. sítnicové infiltráty (bílá), výraznější opouzdření cév (červená) a mírnou infiltraci terče zřakového nervu (zelená); B: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u kontrolní skupiny, na němž větší šipky ukazují mírnou vitritidu (modrá) a retinální záhyb (zelená); C: Foto fundu 27. den u skupiny, kdy by myším podáváno probiotikum, kde malé šipky ukazují minimální opouzdření cév (červená); D: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u myší léčených probiotikem, kde je fyziologický nález.

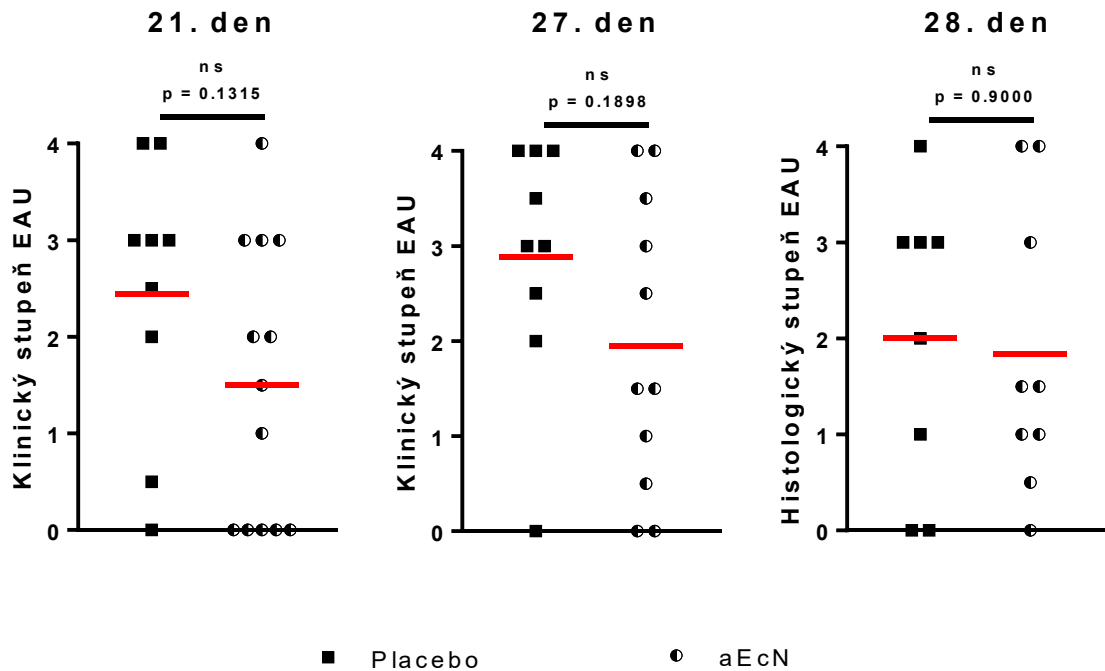


Graf 7: Vliv živé probiotické bakterie EcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 2 týdny po indukci s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu pozdní terapie. Klinické hodnocení 21. a 27. den od indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 10 myší, EcN 20 myší, 1 pokus). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.

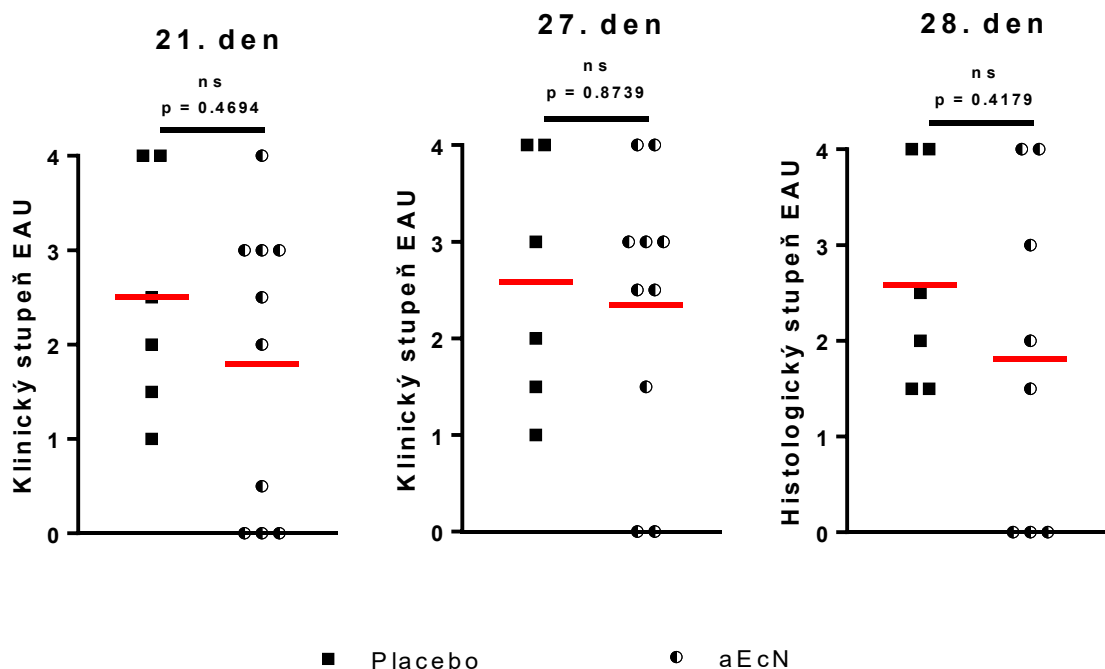
4.5 Účinek autoklávovaných probiotik EcN u EAU na stupeň zánětu

Při podávání autoklávované EcN (aEcN) nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami klinicky ani histologicky ve všech režimech podávání (Graf 8-10, Obr. 19).

Z toho vyplývá, že protektivní účinek je závislý na živých probiotických bakteriích.

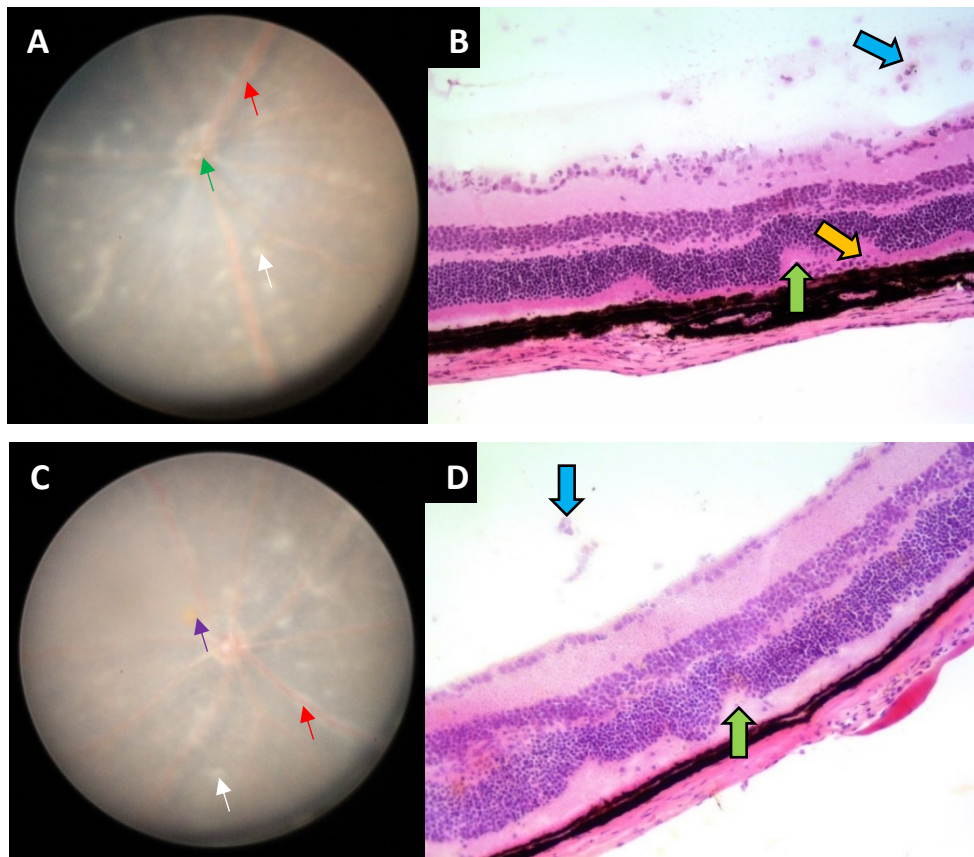


Graf 8: Vliv aEcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 2 týdny před indukcí s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu celý pokus. Klinické hodnocení 21. a 27. den od indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 9 myší, aEcN 13 myší, 2 pokusy). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.

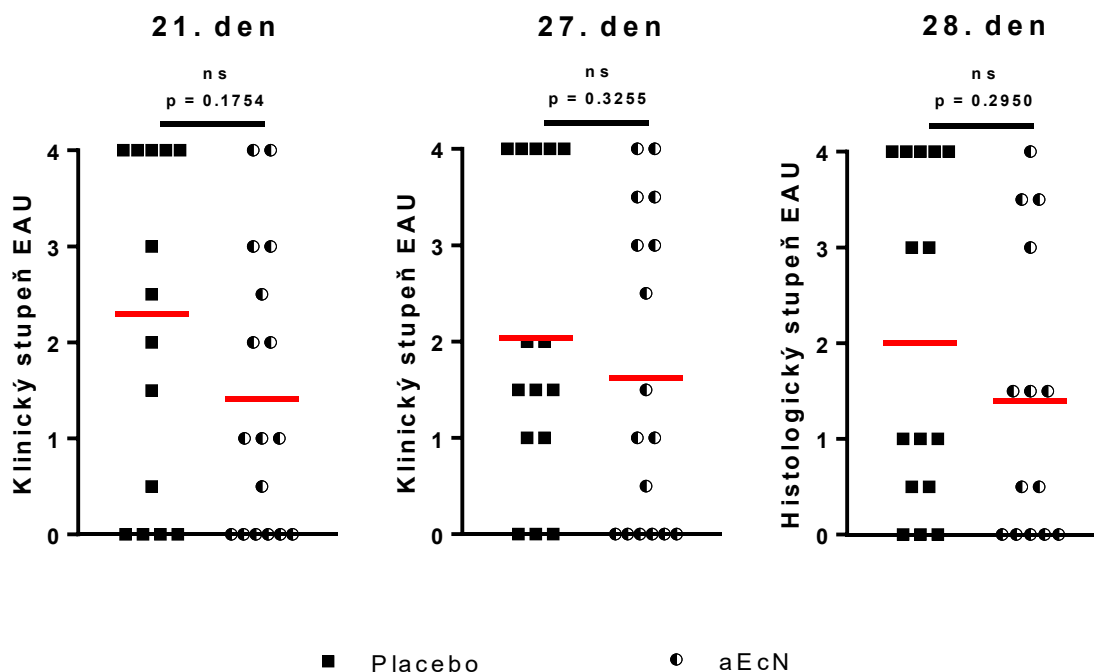


Graf 9: Vliv aEcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 2 týdny před indukcí s pokračováním do indukce, tj. v režimu prevence. Klinické hodnocení 21. a 27. den od

indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 6 myší, aEcN 10 myší, 1 pokus). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.



Obr. 18: Klinické a histologické hodnocení u myší, kterým byla podávána perorálně aEcN. Podávání probiotik bylo zahájeno 2 týdny před indukcí EAU s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu celý pokus. A: Foto fundu 27. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. sítnicové infiltráty (bílá), mírné opouzdření cév (červená) a minimální infiltraci terče zrakového nervu (zelená); B: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u kontrolní skupiny, na němž větší šipky ukazují mírnou vitritidu (modrá), retinální záhyb (zelená), buněčnou infiltraci v zevních vrstvách (oranžová) a atrofii fotoreceptorů; C: Foto fundu 27. den u skupiny, kdy by myším podáváno probiotikum, kde malé šipky ukazují minimální opouzdření cév (červená), fibrózu před terčem zrakového nervu (fialová) a místy sítnicové infiltráty (bílá). D: Histologický preparát barvený metodou hematoxylin-eosin 35. den u myší léčených probiotikem, kde šipky ukazují vitritidu (modrá), více retinálních záhybů (zelená) a drobnou infiltraci v zevních vrstvách sítnice.



Graf 10: Vliv aEcN na stupeň zánětu u EAU. Podávání probiotik zahájeno 1. den po indukci s pokračováním do konce pokusu, tj. v režimu časná a pozdní terapie. Klinické hodnocení 21. a 27. den od indukce, histologické hodnocení 28. den od indukce (placebo 15 myší, aEcN 17 myší, 2 pokusy). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.

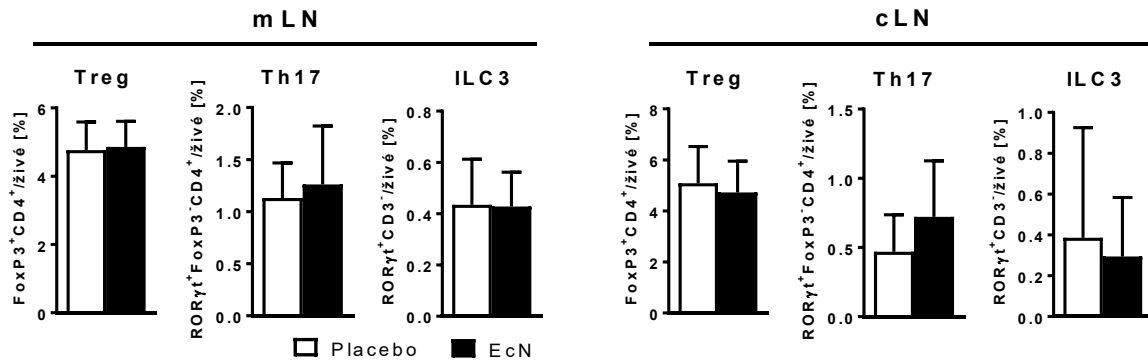
4.6 Analýza populací lymfocytů v lymfatických uzlinách a jejich aktivity po stimulaci pomocí TCR a IRBP

Perorálně podávaná EcN nevedla u myší k významným rozdílům v zastoupení Treg, Th17 a přirozených lymfoidních buněk typu 3 (ILC3) v mLN ani cLN, což naznačuje, že ani jeden typ těchto buněk nehraje roli v protektivním účinku probiotické bakterie EcN (Graf 11).

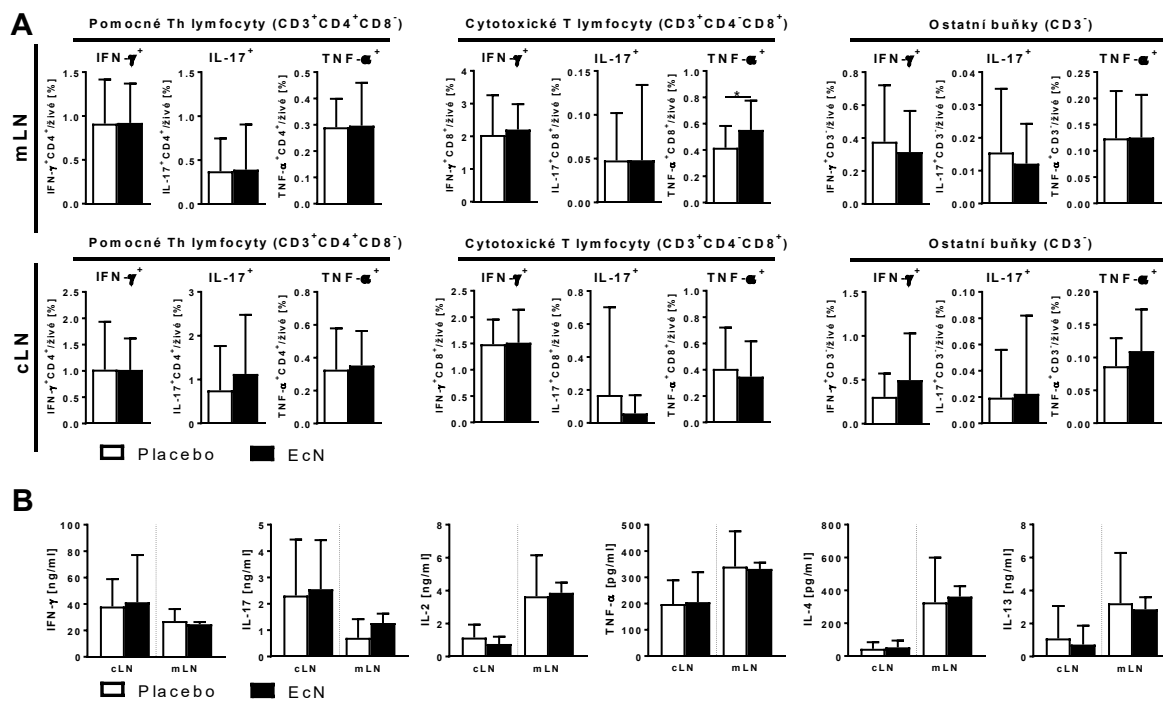
Po stimulaci buněk izolovaných z mLN a cLN od myší s EcN a kontrol pomocí anti-CD3/anti-CD28, tj. TCR stimulantem, vykazovaly obě skupiny myší podobnou schopnost produkovat typické prozánětlivé cytokiny. U myší s EcN byl pozorován jen malý vzestup počtu Tc s expresí TNF- α (Graf 12A), ale nebyl doprovázen zvýšením produkce cytokinů (Graf 12B).

Při testování odpovědi na přítomnosti IRBP u buněk izolovaných z iLN, cLN a mLN od myší léčených probiotikem EcN 28. den od indukce bylo zjištěno, že obecně tyto T-lymfocyty méně odpovídají na IRBP stimulaci *in vitro*, což bylo statisticky signifikantní v iLN pro IFN- γ a TNF- α , v mLN pro IFN- γ a v cLN pro IL-17. Vzhledem k tomu, že EcN vede ke snížení odpovědi vůči IRBP *in vitro* u T-lymfocytů po indukci EAU pomocí IRBP a není mezi

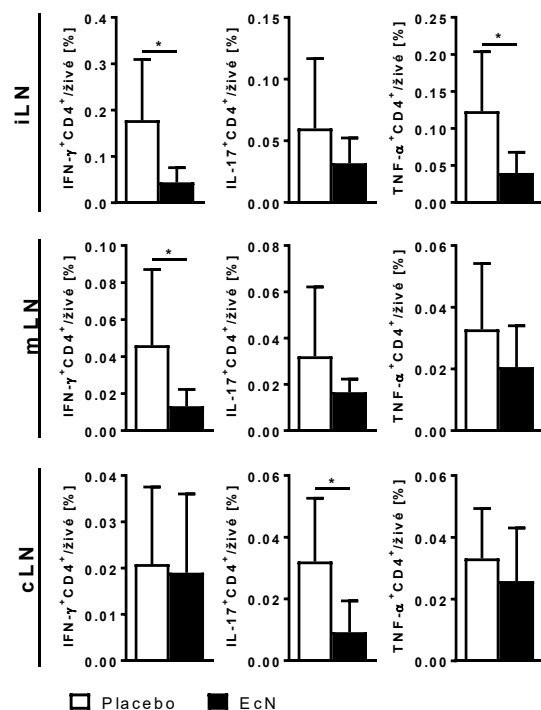
skupinami rozdíl v zastoupení T-lymfocytů, může se jednat vliv antigenní prezentace a primingu T-lymfocytů (Graf 13).



Graf 11: Analýzy počtu T-lymfocytů: Treg, Th17 a ILC3 v mLN a cLN ve skupinách s placebem (22 myši) a probiotikem EcN (23 myši) 28. den po indukci.



Graf 12: A: Analýza exprese prozánětlivých intracelulárních cytokinů pomocí FACS po aktivaci Th nebo Tc v mLN nebo cLN pomocí anti-CD3/CD28; B: Analýza cytokinů v supernatantech aktivovaných T-lymfocytů izolovaných z mLN a cLN pomocí ELISA. Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický test Mann-Whitney. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$). Data vycházejí z výsledků 5 nezávislých experimentů (dohromady 24 myši na skupinu). Data jsou z 28. dne po indukci EAU.



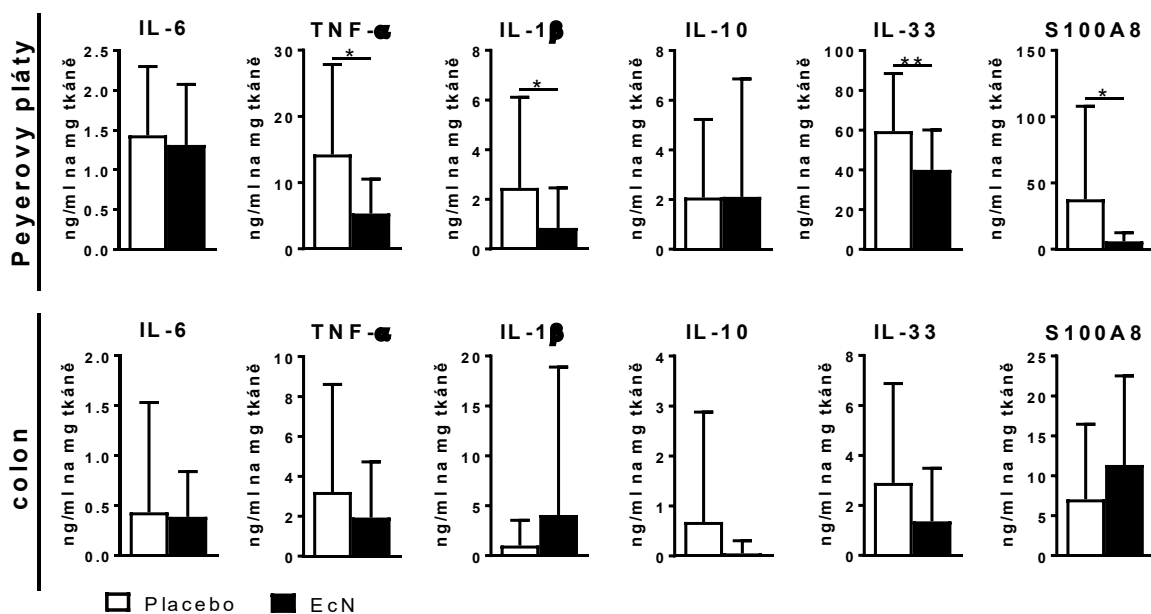
Graf 13: Analýza odpovědi Th na stimulaci antigenem IRBP pomocí FACS v iLN, mLN a cLN 28. den po indukci. Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$) (5-8 myši na skupinu).

4.7 Analýza produkce cytokinů a exprese antimikrobiálních peptidů v Peyerových plátech

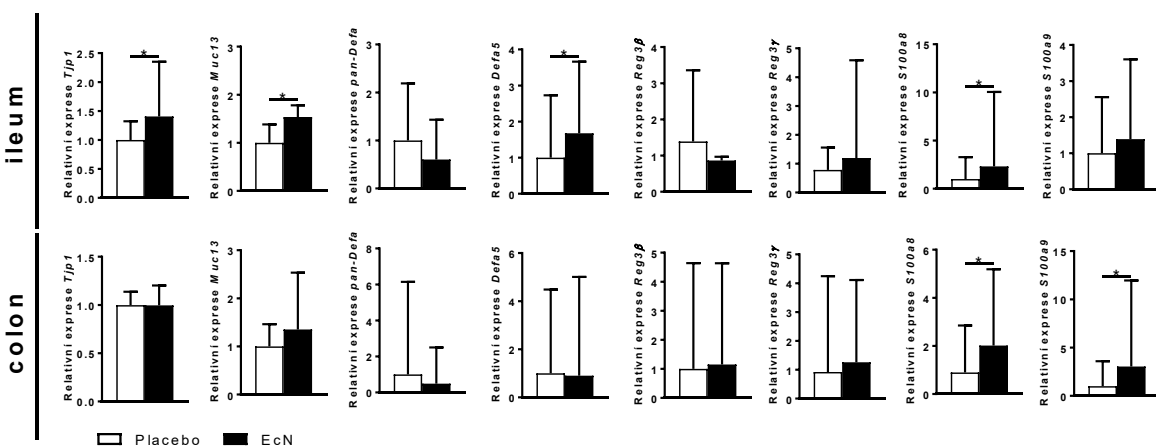
Živá EcN nezměnila produkci prozánětlivých cytokinů v kolon, ale snížila produkci TNF- α , IL-1 β , IL-33 a S100A8 v supernatantech kultivovaných Peyerových plátů (Graf 14).

Živá EcN zvýšila expresi genů antimikrobiálních peptidů Defa5, Muc13 a Tjp v ileu, které mohou mít vliv na integritu střevní bariéry a mohou hrát roli v protizánětlivé ochraně v Peyerových plátech (Graf 15).

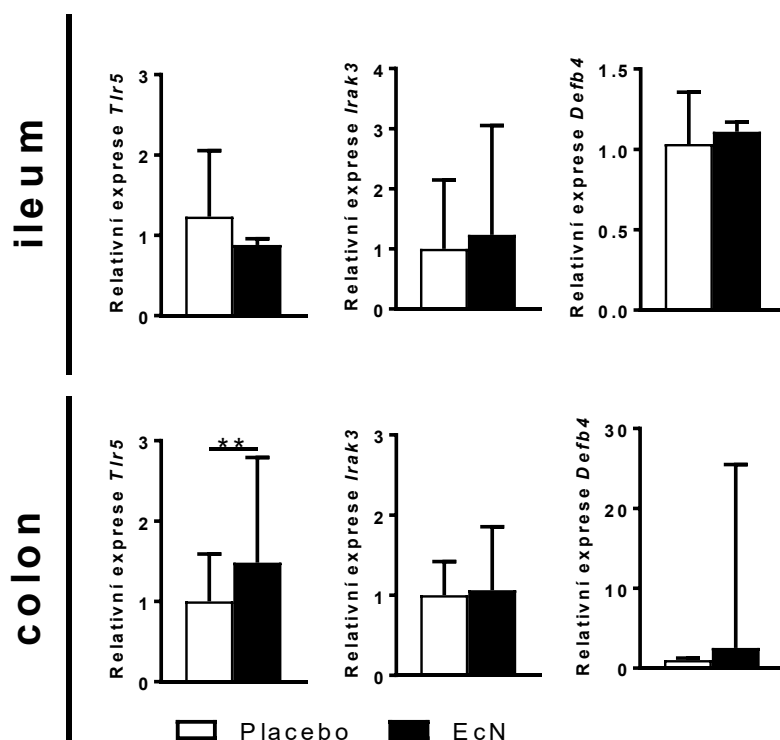
V kolon byl pozorován mírný vzestup exprese toll-like receptor typu 5 (TLR5)(Graf 16).



Graf 14: Analýza proteinů v supernatantech kultivovaných buněk z Peyerových plátů a vzorků colon 28. den po indukci. Data vycházejí z výsledků 5 nezávislých pokusů (dohromady 25 myší). Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).



Graf 15: Analýza exprese genů antimikrobiálních peptidů ve střevě 28. den po indukci. Data vycházejí z výsledků 5 nezávislých pokusů (dohromady placebo 25 myší, EcN 27 myší). Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický test Mann-Whitney. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$).



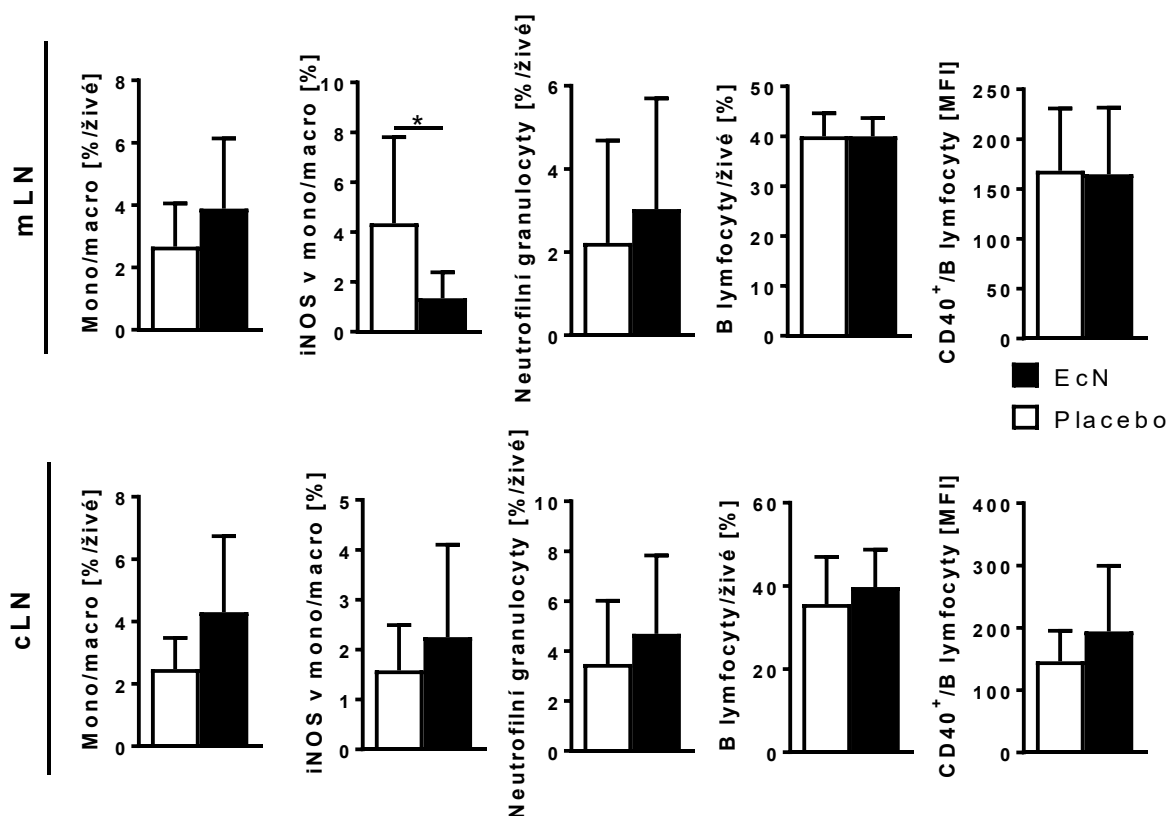
Graf 16: Analýza exprese TLR5 v ileu a kolon 28. den po indukci EAU. Data vycházejí z 5 nezávislých experimentů (skupiny po 3-8 myších) s využitím neparametrického testu Mann-Whitney. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

4.8 Analýza myeloidních buněk a B-lymfocytů v lymfatických uzlinách

V případě podávání probiotik EcN v režimu celý pokus nebyly 28. den po indukci zaznamenány rozdíly mezi skupinami v počtu monocytů/makrofágů v mLN při jejich analýze pomocí FACS.

Bylo však pozorováno snížení počtu makrofágů s indukovatelnou syntázou oxidu dusnatého (iNOS) u myší léčených probiotikem EcN. Tento rozdíl byl zjištěn pouze v mLN, ale ne cLN.

Vzhledem k tomu, že nebyl pozorován rozdíl v zastoupení počtu neutrofilních granulocytů ani B-lymfocytů v lymfatických uzlinách ani v expresi CD40 u B-lymfocytů mezi skupinou s EcN a kontrolami, lze vyvozovat, že B-lymfocyty velmi pravděpodobně nehrají roli v účinku probiotik EcN (Graf 17).



Graf 17: Analýza myeloidních buněk ve mLN a cLN 28. den po indukci. Data vycházejí z výsledků 2 nezávislých pokusů (dohromady 11 myší na skupinu). Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$).

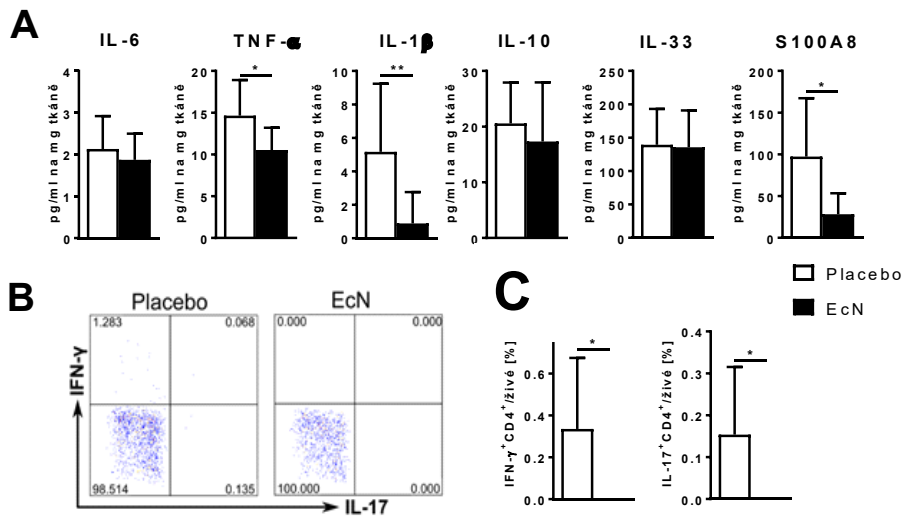
4.9 Analýza imunitní odpovědi v počáteční fázi rozvoje EAU

Živá EcN indukovala protizánětlivé změny ve střevě 7. den podobné těm 28. den. Došlo k signifikantnímu snížení produkce TNF- α , IL-1 β a S100A8 v buňkách kultivovaných Peyerových plátů bez jejich významného snížení v kolon a ileu (Graf 18A).

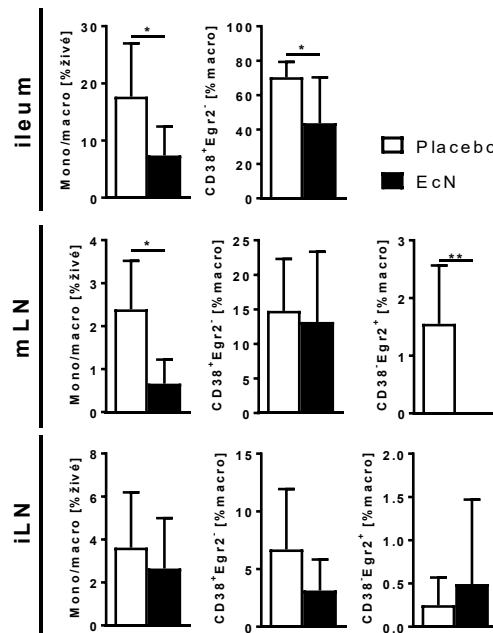
Dále došlo k signifikantnímu snížení zastoupení makrofágů v ileu a mLN u EcN proti kontrolám. Zároveň se v ileu ani jedné skupin ani v mLN EcN léčené skupiny nevyskytovaly žádné M2 makrofágy. T-lymfocyty v lymfatických uzlinách drénujících místo imunizace neprodukovaly IFN- γ a IL-17 v odpovědi na stimulaci IRBP *in vitro* (Graf 18B,C, 19).

EcN lyzát indukoval významně menší produkci IL-1 β než EcO lyzát (Graf 20). Tato data naznačují, že protizánětlivý efekt EcN začíná během prodromálních fází vývoje EAU, kdy dochází k prezentaci antigenu a aktivaci efektorových T-lymfocytů ve spádových lymfatických uzlinách místa imunizace předtím, než efektorové T-lymfocyty překročí hemato-retinální

bariéru a vstoupí do cílového orgánu. Zdá se, že tyto systémové účinky jsou sekundární po primárních účincích EcN v Peyerových plátech.

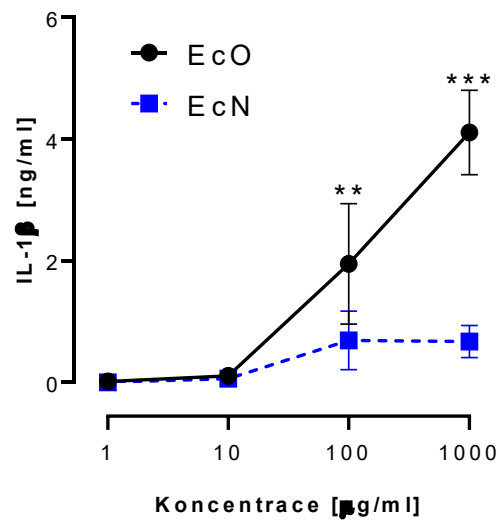


Graf 18: A: Analýza produkce prozánětlivých faktorů v nestimulovaných Peyerových plátech 7. den po indukci pomocí ELISA (placebo 9 myši, EcN 8 myši); B: Analýza produkce IFN- γ a IL-17 stimulovanými Th v iLN na typickém tečkovaném grafu (dot plot) se zaměřením na živé CD3⁺CD4⁺buňky; C: statistická analýza pomocí FACS (placebo 8 myši, EcN 3 myši). Ke kvantifikaci rozdílů byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,05$).



Graf 19: Analýza počtu makrofágů a jejich posunu k M1 7. den po indukci EAU v ileu, mLN a iLN. Rozdíly byly kvantifikovány neparametrickým testem Mann-Whitney. Signifikantní

výsledky jsou označeny jako *($p < 0,05$), **($p < 0,01$). Ileum neobsahovalo čistou M2 populaci.



Graf 20: Analýza produkce IL-1 β v BMDM indukovaná lyzáty EcO a EcN. Rozdíly mezi EcO (4 vzorky) a EcN (4 vzorky) byly analyzovány 2way ANOVA s Bonferroniho testem mnohočetných porovnáání (n=4). Signifikantní výsledky jsou označeny jako ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Kapitola 5

DISKUZE

5 DISKUZE

Vzhledem ke stále neobjasněným mechanismům vedoucím k rozvoji autoimunitních onemocnění včetně uveitid, a popsáním změnám ve složení střevní mikrobioty u některých z nich, se současný výzkum s narůstajícím zájmem věnuje roli mikroorganismů v jejich etiopatogenezi. Střevní mikrobiota hraje významnou roli ve vývoji a regulaci funkcí imunitního systému (Kverka and Tlaskalova-Hogenova 2017). Testují se možnosti manipulace se střevní mikrobiotou s cílem hledání nových možností léčby těchto onemocnění.

V našich minulých pokusech u myšího modelu EAU bylo prokázáno, že bezmikrobní stav či redukce mikrobiální nálože perorální léčbou kombinace širokospektrých antibiotik (metronidazolu s ciprofloxacinem) se zahájením podávání 1 týden před indukci a pokračováním do konce pokusu, vedly k významnému snížení stupně zánětu. U bezmikrobních myší došlo ke snížení infiltrace sítnice T-lymfocyty a redukcí Th1 a Th17 lymfocytů ve spádových lymfatických uzlinách (Heissigerova et al. 2016).

Obdobný protektivní efekt měla kombinace širokospektrých antibiotik (ampicilin, neomycin, vankomycin, metronidazol) v případě perorálního podávání se zahájením 1 týden před indukci a pokračováním do konce pokusu. Intraperitoneální aplikace těchto antibiotik nevedla ke zmírnění uveitidy. Protektivní účinek byl provázen zvýšením počtu Treg v lamina propria mucosae střevní sliznice a extraintestinálních tkáních, dále došlo ke snížení Th1 lymfocytů a prozánětlivých cytokinů (Nakamura et al. 2016).

Naším dalším záměrem bylo otestovat vliv samotného metronidazolu, který kromě svých antimikrobiálních účinků vykazuje dle literatury i přímé imunosupresivní účinky, tj. redukcí počtu různých cytokinů, leukocytů, dále je schopen stimulovat či inhibovat proliferaci lymfocytů a produkci protilátek (Shakir et al. 2011).

Metronidazol byl myším podáván per os v pitné vodě ad libitum se zahájením 1 či 2 týdny před indukci s pokračováním do konce pokusu. Zjistili jsme, že jeho podávání vedlo k významnému snížení stupně EAU při zahájení 1 týden před indukci. Při zahájení podávání metronidazolu 2 týdny před indukci byl rozdíl mezi skupinami více signifikantní. Účinek byl doprovázen sníženou infiltrací sklivce a sítnice T-lymfocyty (CD3+) a makrofágy (F4/80).

Kromě myšího modelu uveitidy byly podobné účinky metronidazolu zaznamenány např. u myšího modelu psoriázy indukovaného imiquimodem, kde ale nebyl pozorován rozdíl v případě bezmikrobního stavu, což poukazuje na účinek metronidazolu cestou změny složení mikrobioty. Protektivní účinek metronidazolu byl u konvenčních myší provázen snížením počtu Th17 lymfocytů ve spádových lymfatických uzlinách (Stehlikova et al. 2019).

U potkaního modelu Crohnovy choroby, tj. indometacinem indukovaného střevního zánětu, vedlo podávání metronidazolu ke snížení tíže zánětu a snížení produkce TNF- α . Zde se předpokládal účinek cestou snížení počtu anaerobních bakterií, a tím produkce TNF- α (Colpaert et al. 2001).

Změny střevního mikrobiomu při podávání metronidazolu byly popsány např. u potkanů, kde došlo ke zvýšení zastoupení bifidobakterií a enterobakterií, navíc se zvýšila tloušťka střevní sliznice (Pelissier et al. 2010). U psů se snížila diverzita střevního mikrobiomu zejména s poklesem zastoupení bakteriálního kmene *Fusobacteria* (Pilla et al. 2020).

V pokusech s myším modelem kolitidy bylo zjištěno, že při provedení fekální transplantace vzorku, který byl pod vlivem metronidazolu, došlo ke zmírnění známek střevního zánětu a prodloužení střeva, zároveň se zvýšilo zastoupení bakterií kmene *Lactobacillus*, což bylo provázeno zvýšenou produkcí protizánětlivého cytokinu IL-10 (Strati et al. 2021).

Z výše uvedeného vyplývá, že terapeutické účinky metronidazolu jsou pravděpodobně spíše způsobeny změnami střevního mikrobiomu než jeho imunosupresivním působením.

V následujících experimentech jsme se zabývali více klinicky relevantním přístupem, tedy manipulací se střevní mikrobiotou pomocí probiotik u myšího modelu EAU. Cílem bylo otestovat vliv vybraných probiotických bakterií, u kterých byly v případě jiných autoimunitních onemocnění či jejich zvířecích modelů, např. idiopatických střevních zánětů, roztroušené sklerózy mozkomíšní a alergického astmatu, prokázány protizánětlivé účinky (Kokesova et al. 2006, Secher et al. 2017, 2018, Zwicker et al. 2018).

Probiotika EcO a EcN byla myším podávána perorálně gaváží 3x týdně. Testovali jsme jak živá, tak autoklátovaná probiotika v různých režimech podávání.

Prokázali jsme protektivní účinek při podávání živé EcN v případě zahájení podávání 2 týdny před indukci či od indukce EAU do konce pokusu. EcO naopak vedla ke zvýšení stupně uveitidy. Navíc její podávání vykazovalo u myší vysokou mortalitu i přesto, že dle literatury bylo její podávání v minulosti bezpečné u zvířecích modelů kolitidy, astmatu, u lidí s alergickým astmatem a nozokomiálních nákaz (Hrdy et al. 2018, Kokesova et al. 2006, Lodinova-Zadnikova et al. 1991, Zwicker et al. 2018). EcO produkuje různorodé faktory virulence (Hejnova et al. 2005). Roli může hrát interakce se střevními mikroorganismy v konkrétním chovném prostředí. Mortalita byla patrná již před indukci EAU, tedy nemohla být způsobena použitím silných adjuvans (CFA a PT).

Ačkoliv jsou vybraná probiotika blízce příbuzná, jejich izoláty mohou mít odlišné mechanismy působení, tudíž můžeme předpokládat, že má každé svůj specifický účinek vůči konkrétní nemoci (Ahmadi et al. 2020, Mahnic et al. 2020).

Vzhledem k tomu, že načasování podávání probiotik může ovlivnit patogenní mechanismy onemocnění, otestovali jsme vliv podávání EcN v preventivních i terapeutických režimech: podávání po dobu celého pokusu (od 14. dne před indukci do 28. dne po indukci), preventivní režim (pouze 14 dní před indukci), podávání od indukce EAU do konce pokusu a terapeutický režim podávání od 14. dne po indukci. K poklesu stupně zánětu došlo, pokud bylo podávání živé EcN zahájeno před indukci či v den indukce zánětu, což naznačuje možný vliv probiotika na počáteční setkání s antigenem a jeho prezentaci T-lymfocytům. Terapeutický režim, tedy podávání probiotika po rozvoji klinických známek zánětu, efekt neprokázal. Roli nehraje menší počet podaných dávek (kumulativní dávka), jelikož stejná dávka v preventivním režimu protektivní účinek měla. Preventivní podávání EcN je v souladu s nedávno zjištěnými výsledky jejího podávání u EAE (Libbey et al. 2020).

Protektivní účinek jsme prokázali pouze u živé probiotické bakterie (nikoliv u autoklávované), což naznačuje, že se na zmírnění zánětu pravděpodobně podílejí termo-senzitivní faktory, delší interakce či jejich produkce probiotikem. Dále se může jednat o přímé lokální ovlivnění imunitní reakce ve střevě či působení probiotika nebo jeho produktů, které vedou k tvorbě např. SCFA či folátu distálně v organismu.

Mezi možné protizánětlivé mechanismy působení probiotik řadíme interakci s ostatními mikroorganismy (kompetice, interakce, inhibice), posílení bariérové funkce střeva (protektce před průnikem mikrobiálních antigenů), ovlivnění slizničního imunitního systému (aktivace protizánětlivého působení buněk imunitního systému) (Furusawa et al. 2013, Ivanov et al. 2008, Mondel et al. 2009, Petnicki-Ocwieja et al. 2009, Secher et al. 2018, Smith et al. 2013).

Probiotika mohou ovlivnit autoimunitní procesy, např. indukci Treg a redukcí Th17 (Kverka et al. 2011, Martin et al. 2014, Round and Mazmanian 2010, Tanabe et al. 2008). V našich pokusech jsme zjistili redukcí IRBP indukovaných $IFN-\gamma^+CD4^+$ a $IL-17A^+CD4^+$ T-lymfocytů v iLN drénujících místo imunizace 7. den po indukci, ale nedošlo k změnám těchto buněk v cLN ani mLN. 28. den jsme zjistili v probiotické skupině snížení IRBP indukovaných Th17 v cLN.

Při perorální terapii kombinací probiotik IRT-5 (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus Thermophilus*) byl protektivní účinek doprovázen vzestupem Treg, redukcí IL-17 a $IFN-\gamma$ Tc v cLN. Zde mohl hrát roli butyrát, který je silným induktorem Treg, ale EcN ho neprodukuje (Bai et Mansell 2020, Kim et al. 2017).

Živá EcN snížila produkci řady prozánětlivých faktorů $TNF-\alpha$, $IL1-\beta$, $IL-33$, S100A8 v Peyerových plátech, které se uplatňují v indukčních funkcích slizničního imunitního systému,

ale v místě efektorových oblastí v kolon k jejich snížení nedošlo. Z toho je patrná kompartmentalizace slizniční imunity, což je důležité pro současnou imunitní regulaci a protekci (Mowat 2003).

Zjištění poklesu hladin IL-1 β , který má významný vliv na setkání T-lymfocytů s antigenem během časných fází rozvoje EAU, odpovídá našim výsledkům, kdy EcN vykazuje protektivní účinek v období časných fází indukce EAU (Zhao et al. 2014).

Snížení produkce S100A8, alarminu odvozeného z myeloidních buněk a uvolňujícího se jako poškozením asociovaný molekulární vzor (DAMP - damage-associated molecular pattern), vede k poklesu aktivace makrofágů, aktivity inflamazomové dráhy a snížené sekreci IL-1 β . Tento účinek způsobuje snížení úrovně antigenní prezentace a odpovědi na IRBP, a tím vede k nižšímu stupni EAU (Wang et al. 2018).

Výše zmíněné výsledky a účinek S100A8 mohou mít význam pro lidskou formu onemocnění, protože cirkulující S100A8/A9 byly nedávno navrženy jako biomarkry nitroočního zánětu u pacientů s uveitidou (Wang et al. 2020). Je otázkou, zda-li pokles produkce S100A8 v Peyeroých plátech vede ke snížení produkce ostatních prozánětlivých cytokinů. Lokálně produkovaný S100A8/A9 je endogenním TLR4 agonistou, který amplifikuje zánětlivou reakci, což vede k udržení vysokých hladin TNF- α a IL-1 β (Ehrchen et al. 2009, Kim et al. 2016).

Střevní dysbióza, změny produkce ileálních defenzinů a zvýšená střevní permeabilita byly prokázány u EAU (Janowitz et al. 2019). EcN zachovala střevní epitel intaktní a dokonce vedla k aktivaci protektivních mechanismů ve střevní sliznici, a tím předešla poškození, které způsobila enterohemoragická nebo uropatogenní *Escherichia coli* (Pradhan and Weiss 2020).

EcN může zlepšit bariérovou funkci střeva indukcí produkce antimikrobiálních peptidů, lidského beta-defenzinu 2, přenosem signálu cestou interakce flagellinu a TLR5, a tím přes signalizační kaskády NF- κ B a AP-1 (Schlee et al. 2007, Wehkamp et al. 2004). Flagellin také indukuje expresi kinázy asociované s receptorem pro IL typu 3 (IRAK3) v kultivovaných střevních epiteliálních buňkách, což je asociováno s indukcí tolerance (Oshima et al. 2010).

Posílení střevní bariéry navozené vlivem mikrobioty může být procesem, který může mít vliv na různé patologické pochody ve střevě a játrech, dokonce by mohl mít svou úlohu v základních procesech, jako většinou podmíněná propustnost střeva (Ahmadi et al. 2020, Cuffaro et al. 2020, Sakai et al. 2020).

Analýzy ileální a kolonické exprese prokázaly zvýšení exprese TLR5 (senzor flagellinu) a S100A8 v kolon a S100A8, Defa5 a Muc13 v ileu myši léčených EcN. Kromě TLR5 byly provedeny i analýzy IRAK3, což je negativní regulátor TLR signalizace, genů pro těsné spoje

ZO-1(Tjp1), Muc13 a dalších antimikrobiálních peptidů, včetně lidského funkčního ortologu beta defenzinu 2, Defb4. Vzhledem k tomu, že nebyly prokázány změny v expresi dalších antimikrobiálních peptidů, tj. defenzinů α , Reg3 β a Reg3 γ , jsou změny v expresi antimikrobiálních peptidů velmi pravděpodobně selektivně specifické (Jia et al. 2000). Spolu s mírným zvýšením ileální exprese Muc13 a Tjp výsledky naznačují zvýšenou protekci střevní sliznice, která nezahrnuje negativní regulaci pomocí IRAK3.

Jinými autory byla prokázána zvýšená exprese S100A8 během EAU, která pravděpodobně chrání střevní bariéru před selháním a EcN zvyšuje ochranu zvýšením produkce antimikrobiálních peptidů (Janowitz et al. 2019).

U mnoha zvířecích modelů lidských onemocnění byl prokázán protektivní efekt EcN na střevní bariéru (Janowitz et al. 2019, Secher et al. 2017, Ukena et al. 2007, Wang et al. 2019). Lze diskutovat o tom, zda perorální podávání EcN posiluje i další bariéry, např. hemato-retinální, kdy těsné spoje (tight-junctions) tvoří jejich základní složku (Bhattarai 2018). Stále nejsou známy konkrétní mikrobiální produkty zodpovědné za tento účinek, může se jednat např. o vezikuly zevní membrány (Alvarez et al. 2016). Naše data odpovídají výsledkům u myšičího modelu alergického astmatu, kdy EcN zabránila selhání slizniční bariéry plic (Secher et al. 2018).

Účinek EcN jak v případě autoimunitního, tak alergického zánětu, může podporovat její nezávislost na T-lymfocytech, což bylo patrné v našich experimentech. Navíc, mikroglie udržuje funkci hemato-retinální bariéry během počátečních fází rozvoje nitroočního zánětu, tedy brání poškození sítnice autoreaktivními T-lymfocyty. Lokální selhání bariéry je důležitou známkou zánětu, tudíž potlačení zánětu u EAU léčbou pomocí EcN naznačuje možné posílení této bariéry. Stále není jasné, zda EcN ovlivňuje hemato-retinální bariéru přímo či nepřímo. Vzhledem k protektivnímu účinku EcN pouze při podání v období kolem indukce EAU předpokládáme, že se jedná o nepřímé ovlivnění.

Živá EcN způsobila pokles produkce iNOS makrofágy v mLN, a tím snížení zastoupení prozánětlivých M1 makrofágů. Tyto výsledky odpovídají datům s prokázanou redukcí IL-1 β a TNF- α u EcN myší, s tím, že oba cytokiny jsou asociovány s polarizací makrofágů k M1 fenotypu (Mantovani et al. 2004).

Výsledky našich pokusů prokazují významný vliv střevní mikrobioty v procesu EAU. Manipulace se střevní mikrobiotou pomocí antibiotik a probiotik vedla ke snížení stupně zánětu u EAU, ale každá ze zmíněných typů manipulace působí na mikrobiotu jiným způsobem. Současný výzkum se soustředí na roli osy střevo-oko a hledají se způsoby regulace imunitní odpovědi cestou manipulace se střevní mikrobiotou.

Terapie autoimunitních uveitid v humánní medicíně by v budoucnu mohla být doplněna cílenou modulací imunitní odpovědi využitím vybraných probiotických bakterií či jejich produktů, např. i na základě individuálních rozdílů ve složení střevní mikrobioty. Tato modifikace by mohla vést k omezení užívaných imunosupresiv či snížení jejich dávek, a tím i sníženému výskytu nežádoucích účinků. Zároveň by hlubší pochopení mechanismů vzniku a regulace imunitní odpovědi pomocí této modifikace mikrobioty mohly vést k cílené a účinné léčebné strategii, a tím i ke snížení rizika ztráty zraku.

Kapitola 6

ZÁVĚR

6 ZÁVĚR

Výsledky našeho výzkumu splnily stanovené cíle práce a potvrdily význam mikroorganismů v procesu autoimunitní uveitidy.

1. Perorální podávání širokospektrého antibiotika metronidazolu v monoterapii vedlo u myšího modelu uveitidy k významnému snížení intenzity zánětu při zahájení 1 týden před indukci. Při zahájení podávání 2 týdny před indukci byl jeho účinek více signifikantní. Pravděpodobně se zde uplatňuje vliv antibiotika metronidazolu na složení střevní mikrobioty, která hraje významnou roli v procesu autoimunitní uveitidy.
2. Imunohistochemická analýza buněčné infiltrace myších očních bulbů ve skupině s metronidazolem prokázala snížený počet T-lymfocytů (CD3+) a makrofágů (F4/80) v sítnici, což naznačuje možný způsob regulace v ose střevo-oko.
3. Živá probiotická bakterie EcO při perorálním podávání gaváží u myši s EAU nevedla ke snížení stupně zánětu, naopak způsobila nesignifikantní mírné zvýšení stupně zánětu, které bylo navíc doprovázeno vysokou mortalitou. Prokázali jsme však protektivní účinek při podávání živé EcN v případě zahájení podávání 2 týdny před indukci či od indukce EAU do konce pokusu. V případě zahájení až po rozvoji klinických známek zánětu, tj. 2 týdny po indukci EAU, probiotikum protektivní účinek nevykazovalo. Pravděpodobně se může jednat o regulaci na úrovni prezentace antigenu T-lymfocytům a indukce zánětu.
4. Zhodnocení efektu autoklávované probiotické bakterie EcN u EAU v různých režimech podávání nevykazovalo významný rozdíl mezi skupinami. Pro protektivní efekt je tedy nutné živé probiotikum a jeho produkty.
5. Při zhodnocení populací lymfocytů (Th17, ILC3 a Treg) v cLN a mLN nebyly při podávání probiotika EcN zjištěny mezi skupinami rozdíly, proto tyto buňky pravděpodobně nehrají významnou roli v účinku EcN. Při stimulaci Th, Tc a ostatních buněk (CD3⁺) pomocí TCR vykazovaly buňky ze skupiny myši léčených EcN podobný potenciál k produkci typických prozánětlivých faktorů jako u kontrolní skupiny. Při IRBP stimulaci těchto buněk, které byly izolovány z lymfatických uzlin, vykazovaly buňky ze skupiny s EcN nižší reaktivitu vůči IRBP *in vitro*.

6. Živá EcN snížila produkci několika prozánětlivých faktorů (TNF- α , IL-1 β , IL-33 S100A8) a zvýšila expresi některých genů pro antimikrobiální peptidy (Defa5, Muc13, Tjp) v Peyerových plátech, což může hrát v roli v integritě střevní bariéry.
7. Živá EcN způsobila pokles produkce iNOS makrofágy v mLN, a tím snížení zastoupení prozánětlivých M1 makrofágů. Nebyly pozorovány rozdíly v počtech neutrofilních granulocytů ani B-lymfocytů mezi skupinami.
8. V našich pokusech jsme zjistili redukci IRBP indukovaných IFN- γ ⁺CD4⁺ a IL-17A⁺CD4⁺ T-lymfocytů v iLN drénujících místo imunizace 7. den po indukci, tj. v počátečních fázích rozvoje EAU, ale nedošlo ke změnám v počtu těchto buněk v cLN ani mLN. 28. den jsme zjistili snížení počtu IRBP indukovaných Th17 v cLN v probiotické skupině. Živá EcN indukuje protizánětlivé změny ve střevě 7. den podobné jako 28. den, tj. snížení produkce TNF- α , IL-1 β a S100A8 v buňkách kultivovaných Peyerových plátů, dále snížení zastoupení makrofágů v ileu a mLN proti kontrolám. T-lymfocyty v lymfatických uzlinách drénujících místo imunizace neprodukují IFN- γ a IL-17 v odpovědi na stimulaci IRBP *in vitro*. Tyto data naznačují, že protizánětlivý efekt EcN začíná během prodromálních fází vývoje EAU.

Dosažené výsledky poukazují na významnou roli střevního mikrobiomu v procesu autoimunitní uveitidy, dále naznačují možné mechanismy regulace osy střevo-oko a otevírají možnosti imunomodulační strategie pro prevenci nitroočního zánětu.

Kapitola 7

LITERATURA

7 LITERATURA

Ahmadi S., Wang S., Nagpal R., Wang B., Jain S., Razazan A. et al.: A human-origin probiotic cocktail ameliorates aging-related leaky gut and inflammation via modulating the microbiota/taurine/tight junction axis. *JCI Insight*. 2020; 5(9).

Albenberg L.G., Wu G.D.: Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*. 2014; 146(6): 1564-1572.

Alvarez C.S., Badia J., Bosch M., Gimenez R., Baldoma L.: Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1981.

Avichezer D., Silver P.B., Chan C.C., Wiggert B., Caspi R.R.: Identification of a new epitope of human IRBP that induces autoimmune uveoretinitis in mice of the H-2b haplotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(1): 127-131.

Bai Y., Mansell T.J.: Production and Sensing of Butyrate in a Probiotic *Escherichia coli* Strain. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(10).

Barry R.J., Nguyen Q.D., Lee R.W., Murray P.I., Denniston A.K.: Pharmacotherapy for uveitis: current management and emerging therapy. *Clin Ophthalmol*. 2014; 8: 1891-1911.

Becker M., Davis J.: Vitrectomy in the treatment of uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2005; 140(6): 1096-1105.

Bhattarai Y.: Microbiota-gut-brain axis: Interaction of gut microbes and their metabolites with host epithelial barriers. *Neurogastroenterol Motil*. 2018; 30(6): e13366.

Caspi R.R.: Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. *Drug Discovery Today*. 2006; 3(1): 3-9.

Caspi R.R., Roberge F.G., Nussenblatt R.B.: Organ-resident, nonlymphoid cells suppress proliferation of autoimmune T-helper lymphocytes. *Science*. 1987; 237(4818): 1029-1032.

Colpaert S., Liu Z., De Greef B., Rutgeerts P., Ceuppens J.L., Geboes K.: Effects of anti-tumour necrosis factor, interleukin-10 and antibiotic therapy in the indometacin-induced bowel inflammation rat model. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001; 15(11): 1827-1836.

Cossarizza A., Chang H.D., Radbruch A., Akdis M., Andra I., Annunziato F. et al.: Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017; 47(10): 1584-1797.

Cuffaro B., Assohoun A.L.W., Boutillier D., Sukenikova L., Desramaut J., Boudebbouze S. et al.: In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells*. 2020;9(9).
Dandona L., Dandona R., John R.K., McCarty C.A., Rao G.N. Population based assessment of uveitis in an urban population in southern India. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84(7): 706-709.

Darrell R.W., Wagener H.P., Kurland L.T.: Epidemiology of uveitis. Incidence and prevalence in a small urban community. *Arch Ophthalmol*. 1962; 68: 502-514.

E. M.: *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. G P Putnam's Sons; New York, NY, USA. 1908: 181.

Ehrchen J.M., Sunderkotter C., Foell D., Vogl T., Roth J.: The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(3): 557-566.

Feltkamp T.E.: HLA and uveitis. *Int Ophthalmol*. 1990; 14(5-6): 327-333.

Ferreira L.B., Smith A.J., Smith J.R.: Biologic Drugs for the Treatment of Noninfectious Uveitis. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2021; 10(1): 63-73.

Forrester J.V., Kuffova L., Dick A.D.: Autoimmunity, Autoinflammation, and Infection in Uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2018; 189: 77-85.

Forrester J.V., Xu H., Kuffova L., Dick A.D., McMenamin P.G.: Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev.* 2010; 234(1): 282-304.

Forrester J.V., Xu H., Lambe T., Cornall R.: Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol.* 2008; 1(5): 372-381.

Foussat A., Gregoire S., Clerget-Chossat N., Terrada C., Asnagli H., Lemoine F.M. et al.: Regulatory T Cell Therapy for Uveitis: A New Promising Challenge. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017; 33(4): 278-284.

Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo T.A., Nakato G., Takahashi D. et al.: Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013; 504(7480): 446-450.

Gritz D.C., Wong I.G.: Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology.* 2004; 111(3): 491-500; discussion 500.

Hamrah P., Dana M.R.: Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy.* 2007; 92: 58-70.

Heissigerova J.: *Oftalmologie*. 1. vydání ed. Praha: Maxdorf; 2018, 2.10.2018.

Heissigerova J., Seidler Stangova P., Klimova A., Svozilkova P., Hrnecir T., Stepankova R. et al.: The Microbiota Determines Susceptibility to Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 5065703.

Hejnova J., Dobrindt U., Nemcova R., Rusniok C., Bomba A., Frangeul L. et al.: Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83 : K24 : H31). *Microbiology (Reading).* 2005; 151(2): 385-398.

Henker J., Laass M., Blokhin B.M., Bolbot Y.K., Maydannik V.G., Elze M. et al.: The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr.* 2007; 166(4): 311-318.

Hewagama A., Richardson B.: The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009; 33(1): 3-11.

Hogenová H.T.: Mikrobiota, imunita a imunologicky mediované choroby. *Vnitřní lékařství.* 2019; 65(2): 98-107.

Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.: Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41(2): 85-101.

Horai R., Caspi R.R.: Microbiome and Autoimmune Uveitis. *Front Immunol.* 2019; 10: 232.
Hořejší. *Základy imunologie.* 6. vydání ed. Praha: Triton; 2017. 304 p.

Hrdy J., Vlasakova K., Cerny V., Sukenikova L., Novotna O., Petraskova P. et al.: Decreased allergy incidence in children supplemented with *E. coli* O83:K24:H31 and its possible modes of action. *Eur J Immunol.* 2018; 48(12): 2015-2030.

Hrncir T., Stepankova R., Kozakova H., Hudcovic T., Tlaskalova-Hogenova H.: Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunol.* 2008; 9: 65.

Chang J.H., Wakefield D. Uveitis: a global perspective. *Ocul Immunol Inflamm.* 2002; 10(4): 263-279.

Islam S.U.: Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(5): e2658.

Ivanov, II, Frutos Rde L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B. et al.: Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008; 4(4): 337-349.

Jabs D.A., Nussenblatt R.B., Rosenbaum J.T.: Standardization of Uveitis Nomenclature Working G. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol.* 2005; 140(3): 509-516.

Janowitz C., Nakamura Y.K., Metea C., Gligor A., Yu W., Karstens L. et al.: Disruption of Intestinal Homeostasis and Intestinal Microbiota During Experimental Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019; 60(1): 420-429.

Jia H.P., Wowk S.A., Schutte B.C., Lee S.K., Vivado A., Tack B.F. et al.: A novel murine beta-defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea. *J Biol Chem.* 2000; 275(43): 33314-33320.

Kalyana Chakravarthy S., Jayasudha R., Sai Prashanthi G., Ali M.H., Sharma S., Tyagi M. et al.: Dysbiosis in the Gut Bacterial Microbiome of Patients with Uveitis, an Inflammatory Disease of the Eye. *Indian J Microbiol.* 2018; 58(4): 457-469.

Kim H.A., Han J.H., Kim W.J., Noh H.J., An J.M., Yim H. et al.: TLR4 Endogenous Ligand S100A8/A9 Levels in Adult-Onset Still's Disease and Their Association with Disease Activity and Clinical Manifestations. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(8).

Kim J., Choi S.H., Kim Y.J., Jeong H.J., Ryu J.S., Lee H.J. et al.: Clinical Effect of IRT-5 Probiotics on Immune Modulation of Autoimmunity or Alloimmunity in the Eye. *Nutrients.* 2017; 9(11).

Klimesova K., Kverka M., Zakostelska Z., Hudcovic T., Hrcir T., Stepankova R. et al.: Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19(6): 1266-1277.

Klimova A., Seidler Stangova P., Svozilkova P., Forrester J.V., Klaska I., Heissigerova J.: The critical points in induction of experimental autoimmune uveitis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016; 160(1): 140-142.

Kokesova A., Frolova L., Kverka M., Sokol D., Rossmann P., Bartova J. et al.: Oral administration of probiotic bacteria (*E. coli* Nissle, *E. coli* O83, *Lactobacillus casei*) influences the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in BALB/c mice. *Folia Microbiol (Praha).* 2006; 51(5): 478-484.

Kostovcikova K., Coufal S., Galanova N., Fajstova A., Hudcovic T., Kostovcik M. et al.: Diet Rich in Animal Protein Promotes Pro-inflammatory Macrophage Response and Exacerbates Colitis in Mice. *Front Immunol.* 2019; 10: 919.

Kraus. *Kompendium očního lékařství.* 1. vydání ed. Praha: Grada; 1997: 341.

Kruis W., Chrubasik S., Boehm S., Stange C., Schulze J.: A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis.* 2012; 27(4): 467-474.

Kuchynka P. *Oční lékařství.* Praha: Grada; 2016; 9.5.2016: 936.

Kverka M., Tlaskalova-Hogenova H.: Intestinal Microbiota: Facts and Fiction. *Dig Dis.* 2017; 35(1-2): 139-147.

Kverka M., Zakostelska Z., Klimesova K., Sokol D., Hudcovic T., Hrcir T. et al.: Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clin Exp Immunol.* 2011; 163(2): 250-259.

Li B., Selmi C., Tang R., Gershwin M.E., Ma X.: The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Cell Mol Immunol.* 2018; 15(6): 595-609.

Libbey J.E., Sanchez J.M.S., Fleming B.A., Doty D.J., DePaula-Silva A.B., Mulvey M.A. et al.: Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through colonisation of the gut with *Escherichia coli*. *Benef Microbes.* 2020; 11(7): 669-684.

Lin P. Importance of the intestinal microbiota in ocular inflammatory diseases: A review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2019; 47(3): 418-422.

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 (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 131(3): 209-211.

Lodinova-Zadnikova R., Tlaskalova H., Bartakova Z.: The antibody response in infants after colonization of the intestine with *E. coli* O83. Artificial colonization used as a prevention against nosocomial infections. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 310: 329-335.

Mahnic A., Auchtung J.M., Poklar Ulrich N., Britton R.A., Rupnik M.: Microbiota in vitro modulated with polyphenols shows decreased colonization resistance against *Clostridioides difficile* but can neutralize cytotoxicity. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 8358.

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M.: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25(12): 677-686.

Martin R., Chain F., Miquel S., Lu J., Gratadoux J.J., Sokol H. et al.: The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis.* 2014; 20(3): 417-430.

Miserocchi E., Fogliato G., Modorati G., Bandello F.: Review on the worldwide epidemiology of uveitis. *Eur J Ophthalmol.* 2013; 23(5): 705-717.

Molzer C., Heissigerova J., Wilson H.M., Kuffova L., Forrester J.V. Immune Privilege: The Microbiome and Uveitis. *Front Immunol.* 2020; 11: 608377.

Mondel M., Schroeder B.O., Zimmermann K., Huber H., Nuding S., Beisner J. et al.: Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol.* 2009; 2(2): 166-172.

Mowat A.M.: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(4): 331-341.

Nakamura Y.K., Metea C., Karstens L., Asquith M., Gruner H., Moscibrocki C. et al.: Gut Microbial Alterations Associated With Protection From Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57(8): 3747-3758.

Nayyar A., Gindina S., Barron A., Hu Y., Danias J.: Do epigenetic changes caused by commensal microbiota contribute to development of ocular disease? A review of evidence. *Hum Genomics*. 2020; 14(1): 11.

Oezguen N., Yalcinkaya N., Kucukali C.I., Dahdouli M., Hollister E.B., Luna R.A. et al.: Microbiota stratification identifies disease-specific alterations in neuro-Behcet's disease and multiple sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37 Suppl 121(6): 58-66.

Opazo M.C., Ortega-Rocha E.M., Coronado-Arrazola I., Bonifaz L.C., Boudin H., Neunlist M. et al.: Intestinal Microbiota Influences Non-intestinal Related Autoimmune Diseases. *Front Microbiol*. 2018; 9: 432.

Oshima N., Ishihara S., Rumi M.A., Aziz M.M., Mishima Y., Kadota C. et al.: A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2010; 159(2): 185-198.

Paivonsalo-Hietanen T., Tuominen J., Vaahtoranta-Lehtonen H., Saari K.M.: Incidence and prevalence of different uveitis entities in Finland. *Acta Ophthalmol Scand*. 1997; 75(1): 76-81.

Pelissier M.A., Vasquez N., Balamurugan R., Pereira E., Dossou-Yovo F., Suau A. et al. Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010; 73(3): 601-610.

Petnicki-Ocwieja T., Hrcir T., Liu Y.J., Biswas A., Hudcovic T., Tlaskalova-Hogenova H. et al.: Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(37): 15813-15818.

Pilla R., Gaschen F.P., Barr J.W., Olson E., Honneffer J., Guard B.C. et al.: Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2020; 34(5): 1853-1866.

Pradhan S., Weiss A.A.: Probiotic Properties of *Escherichia coli* Nissle in Human Intestinal Organoids. *mBio*. 2020; 11(4).

Qiu Z., Sheridan B.S.: Isolating Lymphocytes from the Mouse Small Intestinal Immune System. *J Vis Exp.* 2018(132).

Roche H.M.: Dietary modulation of energy homeostasis and metabolic-inflammation. *Proc Nutr Soc.* 2019; 78(3): 313-318.

Rothova A., Buitenhuis H.J., Meenken C., Brinkman C.J., Linssen A., Alberts C. et al.: Uveitis and systemic disease. *Br J Ophthalmol.* 1992; 76(3): 137-141.

Round J.L., Mazmanian S.K.: Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(27): 12204-12209.

Říhová E. *Uveitidy.* Praha: Grada; 2009. 136.

Sakai Y., Arie H., Ni Y., Zhuge F., Xu L., Chen G. et al.: *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 improves steatohepatitis by maintaining gut permeability. *J Endocrinol.* 2020; 247(2): 169-181.

Scaldaferri F., Gerardi V., Mangiola F., Lopetuso L.R., Pizzoferrato M., Petito V. et al.: Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: An update. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(24): 5505-5511.

Secher T., Kassem S., Benamar M., Bernard I., Boury M., Barreau F. et al.: Oral Administration of the Probiotic Strain *Escherichia coli* Nissle 1917 Reduces Susceptibility to Neuroinflammation and Repairs Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Induced Intestinal Barrier Dysfunction. *Front Immunol.* 2017; 8: 1096.

Secher T., Maillet I., Mackowiak C., Le Berichel J., Philippeau A., Panek C. et al.: The probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 prevents papain-induced respiratory barrier injury and severe allergic inflammation in mice. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 11245.

Shakir L., Javeed A., Ashraf M., Riaz A.: Metronidazole and the immune system. *Pharmazie.* 2011; 66(6): 393-398.

Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T.A., Stange E.F., Fellermann K.: Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun.* 2007; 75(5): 2399-2407.

Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N., Michaud M., Gallini C.A., Bohlooly Y.M. et al.: The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013; 341(6145): 569-573.

Stehlikova Z., Kostovcikova K., Kverka M., Rossmann P., Dvorak J., Novosadova I. et al.: Crucial Role of Microbiota in Experimental Psoriasis Revealed by a Gnotobiotic Mouse Model. *Front Microbiol.* 2019; 10: 236.

Sterzl J., Mandel L., Stepankova R.: The use of gnotobiological models for the studies of immune mechanisms. *Nahrung.* 1987; 31(5-6): 599-608.

Strati F., Pujolassos M., Burrello C., Giuffre M.R., Lattanzi G., Caprioli F. et al.: Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models. *Microbiome.* 2021; 9(1): 39.

Streilein J.W.: Role of anterior-chamber-associated immune deviation in the pathogenesis of uveitis. *Dev Ophthalmol.* 1992; 23: 86-93.

Svozilkova P.: Farmakoterapie uveitid. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2009;23(3):115-119.

Svozilkova P., Heissigerova J., Brichova M., Kalvodova B., Dvorak J., Rihova E. The role of pars plana vitrectomy in the diagnosis and treatment of uveitis. *Eur J Ophthalmol.* 2011; 21(1): 89-97.

Tanabe S., Kinuta Y., Saito Y.: *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. *Int J Mol Med.* 2008; 22(2): 181-185.

Tlaskalova-Hogenova H., Stepankova R., Kozakova H., Hudcovic T., Vannucci L., Tuckova L. et al.: The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011; 8(2): 110-120.

Tran V.T., Auer C., Guex-Crosier Y., Pittet N., Herbort C.P.: Epidemiological characteristics of uveitis in Switzerland. *Int Ophthalmol.* 1994; 18(5): 293-298.

Trusko B., Thorne J., Jabs D., Belfort R., Dick A., Gangaputra S. et al.: The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Project. Development of a clinical evidence base utilizing informatics tools and techniques. *Methods Inf Med.* 2013; 52(3): 259-265, S251-256.

Tsirouki T., Dastiridou A., Symeonidis C., Tounakaki O., Brazitikou I., Kalogeropoulos C. et al.: A Focus on the Epidemiology of Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018; 26(1): 2-16.

Ukena S.N., Singh A., Dringenberg U., Engelhardt R., Seidler U., Hansen W. et al.: Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2007; 2(12): e1308.

Vadot E.: Epidemiology of intermediate uveitis: a prospective study in Savoy. *Dev Ophthalmol.* 1992; 23: 33-34.

Wakefield D., Chang J.H.: Epidemiology of uveitis. *Int Ophthalmol Clin.* 2005; 45(2): 1-13.

Wang S., Song R., Wang Z., Jing Z., Wang S., Ma J.: S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol.* 2018; 9: 1298.

Wang X., Yang S., Li S., Zhao L., Hao Y., Qin J. et al.: Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents. *Gut.* 2020; 69(12): 2131-2142.

Wang Y., Sun L., Chen S., Guo S., Yue T., Hou Q. et al.: The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates irinotecan-induced intestinal barrier dysfunction and gut microbial dysbiosis in mice. *Life Sci.* 2019; 231: 116529.

Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C. et al.: NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* 2004; 72(10): 5750-5758.

WHO.: Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation; Cordoba, Spain 2001.

Xu H., Koch P., Chen M., Lau A., Reid D.M., Forrester J.V.: A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res.* 2008; 87(4): 319-326.

Ye Z., Wu C., Zhang N., Du L., Cao Q., Huang X. et al.: Altered gut microbiome composition in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Gut Microbes.* 2020; 11(3): 539-555.

Ye Z., Zhang N., Wu C., Zhang X., Wang Q., Huang X. et al.: A metagenomic study of the gut microbiome in Behcet's disease. *Microbiome.* 2018; 6(1): 135.

Young V.B.: The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ.* 2017; 356: j831.

Zakostelska Z., Malkova J., Klimesova K., Rossmann P., Hornova M., Novosadova I. et al.: Intestinal Microbiota Promotes Psoriasis-Like Skin Inflammation by Enhancing Th17 Response. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159539.

Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M.: The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008; Chapter 14: Unit 14 11.

Zhao R., Zhou H., Zhang J., Liu X., Su S.B.: Interleukin-1beta promotes the induction of retinal autoimmune disease. *Int Immunopharmacol.* 2014; 22(2): 285-292.

Zhou R., Caspi R.R.: Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep.* 2010; 2.

Zwicker C., Sarate P., Drinic M., Ambroz K., Korb E., Smole U. et al.: Prophylactic and therapeutic inhibition of allergic airway inflammation by probiotic *Escherichia coli* O83. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142(6): 1987-1990 e1987.

SEZNAM PŘÍLOH

1. **Dusek, O.**, Fajstova, A., Klimova, A., Svozilkova, P., Hrnčíř, T., Kverka, M., Coufal, S., Slemín, J., Tlaskalová-Hogenová, H., Forrester, J.V., Heissigerová, J.: Severity of Experimental Autoimmune Uveitis Is Reduced by Pretreatment with Live Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917. *Cells* 2020; 10(1); 23. IF 4,366
2. Seidler Stangová, P., **Dusek, O.**, Klimova, A., Heissigerová, J., Kucera, T., Svozilkova, P.: Metronidazole Attenuates the Intensity of Inflammation in Experimental Autoimmune Uveitis. *Folia Biol. (Praha)* 2019; 65; 265-274. IF 1,073
3. Brichová M., Svozílková P., Klímová A., **Dušek O.**, Kverka M., Heissigerová J.: Mikrobiom a uveitidy. Přijato k tisku v Česk a Slov Oftalmol. 2021.
4. **Dušek, O.**, Fichtl, M., Rezková, L., Dubská, Z., Heissigerová, J., Růžičková, E., Vrablík, M., Špička, I., Svozílková, P.: Akutní elevace nitroočního tlaku u pacienta s hyperlipidemickým myelomem. *Česk a Slov Oftalmol.* 2020; 76(4); 172-180.