

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Podíl mikroorganismů a dalších faktorů
v procesu autoimunitní uveitidy**

MUDr. Otakar Dušek

Praha 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova

Obor: Biologie a patologie buňky
Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.
Školící pracoviště: 1. lékařská fakulta
Školitel: Prof. MUDr. Jarmila Heissigerová, Ph.D., MBA
Konzultant: Prof. MUDr. Petra Svozílková, Ph.D.

Autor: MUDr. Otakar Dušek
Adresa: Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze
U Nemocnice 2
Praha 2
Kontakt: ota.dusek@seznam.cz
+420 728 303 105

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metody	9
4. Výsledky	14
5. Souhrn	20
6. Vybraná použitá literatura	22
Seznam vlastních publikací	24

Velmi rád bych zde poděkoval svým školitelkám prof. MUDr. Jarmile Heissigerové, Ph.D., MBA a prof. MUDr. Petře Svozílkové, Ph.D. za odborné vedení, podporu a motivaci během mého studia.

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 indukcí. V případě probiotik byl prokázán protektivní efekt pouze u živé EcN, a to jen v případě podávání 2 týdny před indukcí či od indukce EAU. Preventivní účinek EcN byl doprovázen snížením odpovědi T-lymfocytů specifických pro interferoreceptorový retinoid-vázající 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

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

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) and *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 metronidazole 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

1. Úvod

Uveitidou označujeme nitrooční zánět postihující duhovku, řasnaté těleso a cévnatku. Jedná se o onemocnění, které postihuje především populaci v mladším a středním věku, tedy jedince v produktivním věku, u nichž může způsobit až ztrátu zraku.

Příčinou uveitidy mohou být infekce, imunitně podmíněné procesy, operace či úrazy oka. 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 nezánettlivých benigních či maligních očních onemocnění. V současné době se stále více pozornosti věnuje roli mikroorganismů v procesu neinfekční uveitidy. Předpokládá se, že mohou spustit zánět autoimunitní povahy. Vzhledem k průkazu změn ve složení střevní mikrobioty (dysbióza) u některých imunitně podmíněných onemocnění včetně uveitidy se testují možnosti manipulace se střevní mikrobiotou, např. změnou diety, antibiotiky, prebiotiky, probiotiky a fekální transplantací. 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. Bezmikrobní stav či redukce mikrobiální nálože u myšího modelu uveitidy vedly ke snížení stupně nitroočního zánětu, tudíž se testují další možnosti manipulace se střevní mikrobiotou, které by mohly být v budoucnu využity v terapii uveitid. Cílem léčby imunitně podmíněných uveitid je minimalizovat až úplně potlačit zánětlivou aktivitu, a tím předcházet rozvoji zrak ohrožujících komplikací spojených s uveitidou, zachovat centrální zrakovou ostrost a ulevit pacientovi od subjektivních obtíží. V současné době se v terapii uplatňují léky inhibující imunitní odpověď na různých úrovních, nejčastěji kortikoidy a imunosupresiva, které mohou způsobit závažné nežádoucí účinky, dále biologická terapie. Výzkum v oblasti uveitid se zaměřuje na získání nových poznatků o mechanismech vzniku uveitid a klade si za úkol vývoj nové

cílené léčby, která by umožnila snížit riziko výskytu nežádoucích účinků a vedla by ke snížení výskytu slepoty vzniklé následkem uveitidy.

2. Cíle 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: *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO) a *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Poté byl hodnocen efekt 2 typů živých probiotik (u jednoho navíc v autoklátované formě) podávaných v různých režimech u myšního modelu experimentální autoimunitní uveitidy (EAU). Byla porovnáována 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, v probiotických experimentech imunologické analýzy spádových lymfatických uzlin, Peyerových plátů a střevního obsahu a u myši s probiotikem stimulace lymfocytů z lymfatických uzlin.

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 autoklátované probiotické bakterie EcN
5. rozdíly populací lymfocytů a jejich aktivity po stimulaci pomocí T-buněčného receptoru (TCR) a interfotoreceptorového retinoid-vázacího proteinu (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

3. Materiál a metody

Experimentální zvířata

K našim pokusům byly použity myši samice imbredního kmene C57BL/6J ve věku 6 až 8 týdnů, které jsme získali z chovu Centra pro experimentální biomodely 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Myši, u kterých byly zjištěny kongenitální vady, např. mikroftalmus či katarakta, byly vyřazeny z experimentů.

Indukce EAU

EAU byla u samic myšího kmene C57BL/6J indukována dle standardního protokolu subkutánní injekcí 500 µg IRBP 1-20 v emulzi v poměru 1:1 s kompletním Freundovým adjuvans (CFA) obsahujícím 3,3 mg/mL teplem-usmrcené bakterie *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Suspenze byla aplikována standardně subkutánně do obou zadních končetin. Současně bylo intraperitoneálně aplikováno 1,2 µg pertussového toxinu (PT) rozpuštěného ve fosfátovém pufru (PBS).

Klinické hodnocení EAU

V celkové intraperitoneální anestezii a po dilataci zornic mydriatiky ve formě kapek, bylo *in vivo* pomocí otoskopu přiloženého na rohovku provedeno biomikroskopické klinické vyšetření očního pozadí myši. K otoskopu byl připojen fotoaparát s předsazenou spojnou čočkou o optické mohutnosti +4 dioptrie. Na rohovku byl pro přiložení otoskopu aplikován viskózní oční gel.

Histologické hodnocení EAU

28./35. den po indukci byly myši usmrceny cervikální dislokací, myší bulby enukleovány *post mortem* a zamrazeny v tekutém dusíku. Zamražené bulby v -70 °C byly poté nakrájeny na kryostatu na řezy o tloušťce 7 µm, které byly vedeny ve 3 úrovních: v obou periferiích a centrálně v oblasti zrakového nervu. Poté byly řezy nabarveny metodou hematoxylin-eosin.

Podávání antibiotik u EAU

Myším bylo podáváno širokospektré antibiotikum metronidazol 500 mg/l, který byl rozpuštěn v pitné vodě. Voda byla myším vyměňována každé 3 dny k udržení účinku. Podávání metronidazolu bylo zahájeno buď 1 nebo 2 týdny před indukci s pokračováním do konce pokusu.

Imunohistochemický průkaz lymfocytů a makrofágů

Přítomnost T lymfocytů (membránové struktury lymfocytů 3 - CD3 molekula) na mražených řezech sítnice myší s EAU jsme prokazovali třístupňovou imunoperoxidázovou reakcí. Pomocí CD3 protilátky v ředění 1:200 v PBS a 1,5% normálním kozím séru byly za vizualizace pomocí sekundární biotinylované králičí a soupravy Vectastain Elite ABC HRP kit detekovány CD3 pozitivní buňky. Pozitivními kontrolami byly řezy sleziny s primární i sekundární protilátkou, negativními kontrolami dále řezy sleziny bez primární protilátky. K imunohistochemickému průkazu makrofágů byla v imunoperoxidázové reakci použita protilátka F4/80 v ředění 1:100 v PBS a 1,5% normálním kozím séru. Vizualizace vazby byla provedena pomocí sekundární biotinylované krysí protilátky a soupravy Vectastain Elite ABC HRP kit.

Podávání probiotik u EAU

Probiotické bakterie živá EcO (sérotyp O83:K24:H31) nebo živá či autoklátovaná EcN (sérotyp O6:K5:H1) byly použity pro naše experimenty. Obě bakterie (EcN, EcO) byly

kultivovány v Lennoxově verzi bujónu Luria Bertani. Myším jsme podávali dávku o objemu 100 μ l (10^9 bakterií) této suspenze. Alikvóty s probiotiky byly uchovávány při teplotě 4–8 °C po dobu maximálně až 2 týdnů. Probiotika byla podávána gaváží orogastrickou sondou 3krát týdně s využitím jednoho ze čtyř typů pokusných režimů a kontrolám byl podáván fyziologický roztok: (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 indukcí až do konce pokusu (časná a pozdní terapie, 12 dávek); (d) poslední dva týdny pokusu (pozdní terapie, 7 dávek). Kontrolní skupině bylo podáváno 100 μ l 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, ale pokus byl ukončen a myši byly usmrceny 7 dní po EAU indukcí (9 dávek).

Analýza populací lymfocytů v lymfatických uzlinách

Po indukcí EAU byl proveden odběr mezenterálních (mLN), inguinálních (iLN) a cervikálních (cLN) mízních uzlin, poté byly připraveny suspenze jednotlivých buněk. Dále byly 7 dní po indukcí EAU provedeny odběry: 2 cm ilea bez Peyerských plátů s následnou izolací buněk z lamina propria mucosae mechanickou dezintegrací a enzymatickým natrávením dle dříve uveřejněných protokolů. Poté byla provedena průtoková cytometrie (FACS) dle následujícího postupu: buněčná suspenze byla omyta v PBS, označena ve fixačním barvivu, dále fixována a permeabilizována. Nespecifické barvení bylo blokováno 10% myším sérem a protilátkou anti-CD16/CD32 (Fc receptory). Suspenze byla poté nabarvena buď pomocí markerů na T buňky nebo monocyty a makrofágy s využitím fluorescenčně značených protilátek. Pro analýzu intracelulární produkce cytokinů byly buňky inkubovány 18 hodin na destičce s navázaným 5 μ g/ml anti-CD3 ϵ a 4 μ g/ml anti-CD28 nebo 40 hodin s 20 μ g/ml IRBP a směs 3 μ g/mL Brefeldinu A a 2 μ mol Monensinu byla přidána k posledním 4 hodinám inkubace. Buňky byly poté omyty, dále označeny s fixační barvou, fixovány a

permeabilizovány a blokovány pomocí protilátek anti-CD16/CD32 a nabarveny pro CD3, CD4, CD8, interferon γ (IFN- γ), interleukin typu 17 (IL-17) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α). Data z FACS byla získána s využitím LSRII a analyzována využitím programu FlowJo software.

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. Vzorky byly poté zváženy a kultivovány v 500 μ l kompletního RPMI média obsahujícího 10% tepelně inaktivované fetální bovinní sérum a 1% antibioticko-antimykotický roztok ve zvlhčeném inkubátoru 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 assayových (ELISA) setů pro myši TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-33 a S100A8.

Analýza regulačních genů ve střevě

Při ukončení experimentu tj. 28. den po indukci byly provedeny biopsie kolon a ilea, které byly uchovány v RNALater při teplotě -20 °C do další analýzy. Dále byla provedena homogenizace tkáně pomocí keramických kuliček a extrakce celkové ribonukleové kyseliny (RNA), která byla dále zpracována k odstranění deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Potom byla změřena její koncentrace a kvalita. Všechny vzorky byly následně naředěny do stejné koncentrace RNA a 500 ng RNA bylo transkribováno do komplementární (cDNA). Byla provedena kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR) k určení změn v expresi informační ribonukleové kyseliny (mRNA). 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 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

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 μ l fyziologického roztoku; EcN n = 5; EcO n = 4) ke zhodnocení jejich schopnosti kolonizovat střevo myši. K prevenci možné kontaminaci 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 a byla provedena PCR. Počty probiotik byly upraveny na jednotky tvořící kolonie (CFU) na gram vzorku a statisticky zanalyzovány.

Tvorba a kultivace makrofágů odvozených z kostní dřene

U myši kmene C57BL/6J ve věku 10 týdnů byl proveden odběr kostní dřene z femuru, následně byly připraveny suspenze jednotlivých buněk. Jednotlivé buňky byly kultivovány a pasážovány. Poté byly makrofágy odvozené z hostní dřene (BMDM) stimulovány lyzátem probiotické bakterie o koncentraci 1, 10, 100 nebo 1000 μ g/ml buď EcN nebo EcO ve zvlhčeném inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) po dobu 24 hodin.

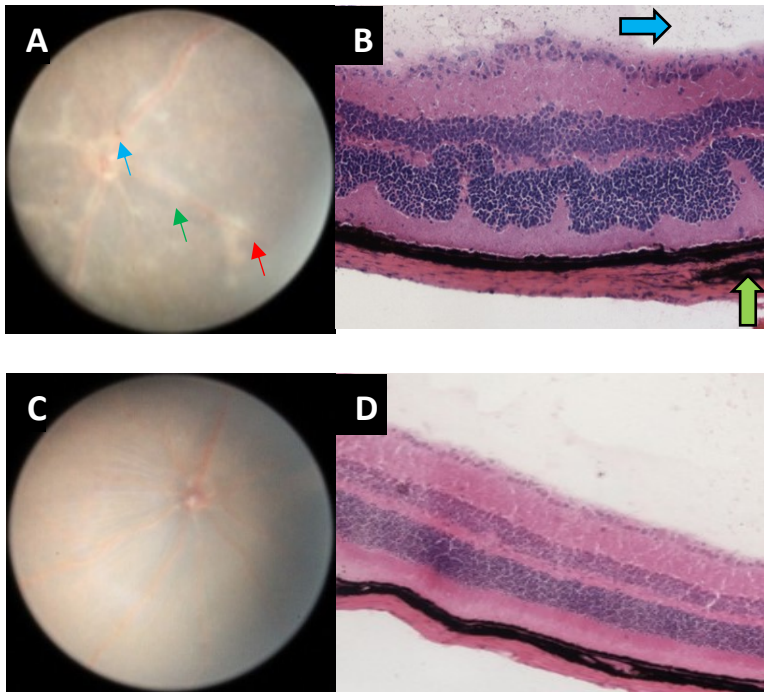
Statistická analýza

K analýze dat z klinického a histologického hodnocení stupňů zánětu myších očí byl použit počítačový program GraphPad Prism verze 8.1.1. 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 $p < 0.05$.

4. Výsledky

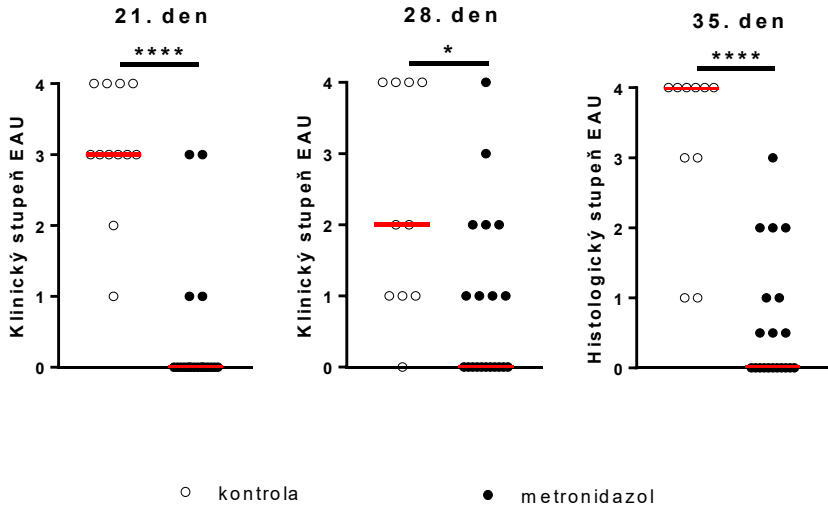
Zhodnocení efektu metronidazolu u EAU

Metronidazol, širokospektré antibiotikum, který byl myším podáván perorálně v pitné vodě, vedl ke signifikantnímu snížení stupně zánětu u myšího modelu EAU klinicky i histologicky, jak při zahájení podávání 1 týden před indukci ($p < 0,05$), tak i při zahájení 2 týdny před indukci s pokračováním do konce pokusu ($p < 0,0001$)(Obr. 1, Graf 1).



Obr. 1: Klinické a histologické hodnocení u myší léčených metronidazolem se zahájením 2 týdny před indukci EAU a u kontrol. A: Foto fundu 28. den u kontrolní skupiny, kde malé šipky ukazují sítnicové změny, tj. infiltraci terče zrakového 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.



Graf 1: Vliv metronidazolu na stupeň zánětu u EAU. Antibiotická léčba byla zahájena 2 týdny před indukci. 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.

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.

Vliv metronidazolu na infiltraci sítnice T lymfocyty a makrofágy

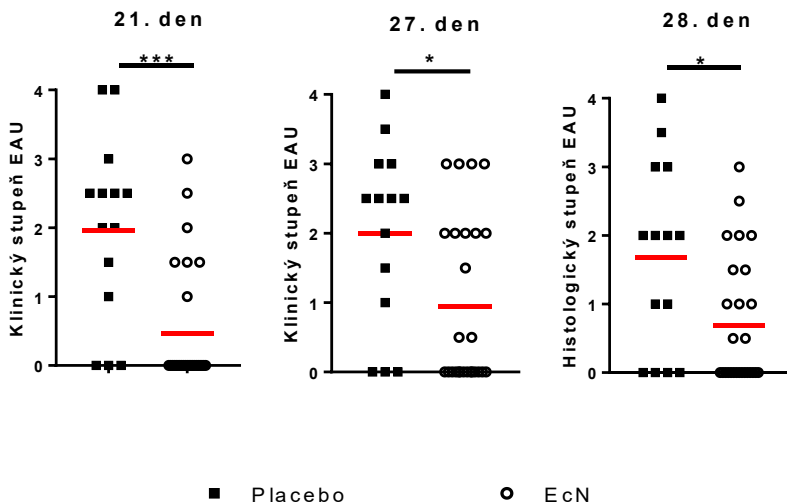
Imunohistochemické vyšetření očí 35. den od indukce prokázalo 11 % snížení počtu CD3+ T lymfocytů a 35% snížení počtu F4/80+ makrofágů u myší, u kterých bylo zahájeno podávání metronidazolu 1 týdný před indukcí ve srovnání proti kontrolní skupině. V případě zahájení podávání metronidazolu 2 týdný před indukcí byl rozdíl více signifikantní, tj. 83% pokles počtu CD3+ T lymfocytů a 81% pokles F4/80+ makrofágů. Data byla získána spočítáním jednotlivých buněk.

Schopnost probiotik EcN a EcO kolonizovat střevo

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. Proto by podávání živých probiotik každé dva dny mělo vést k trvalému vystavení jejich působení. Po 5 dnech již ale nebylo možné zachytit přítomnost jak EcO, tak EcN ve střevech myší, což ukazuje, že ani jedno ze zmíněných probiotik nekolonizuje tenké nebo tlusté střevo po delší dobu.

Zhodnocení vlivu živých probiotik EcO a EcN na intenzitu EAU

Kolonizace probiotikem EcO neměla protektivní účinek u EAU, dokonce vykazovala tendenci ke zvýšení intezity zánětu a navíc vedla u myší k vysoké mortalitě (55,6 %). Naopak při podávání živého probiotika EcN se zahájením 2 týdný před indukcí či od indukce došlo k významnému snížení stupně zánětu jak klinicky ($p < 0,01$), tak histologicky ($p < 0,01$)(Graf 2). V případě zahájení podávání EcN 2 týdný po rozvoji zánětu, tj. v režimu pozdní terapie, když jsou patrné známky rozvoje uveitidy, již nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami jak v klinickém, tak v histologickém hodnocení.



Graf 2: Vliv živé probiotické bakterie EcN 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 26 myši, EcN 28 myši, 5 pokusů). Signifikantní výsledky jsou označeny jako * ($p < 0,01$) a *** ($p < 0,001$). Červeně je zobrazen aritmetický průměr.

Zhodnocení účinku autoklávovaných probiotik EcN u EAU

Při podávání autoklávované EcN (aEcN) nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami jak klinicky, tak histologicky ve všech režimech podávání. Z toho vyplývá, že protektivní účinek je závislý na živých probiotických bakteriích.

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

Perorálně podávaná EcN nevedla u myši k významným rozdílům v zastoupení regulačních T-lymfocytů (Treg), pomocných T-lymfocytů typu 17 (Th17) a vrozených lymfoidních buněk typu 3 (ILC3) v mLN ani cLN 28. den od indukce EAU, což

naznačuje, že ani jeden typ těchto buněk nehraje roli v protektivním účinku probiotické bakterie EcN. Po stimulaci buněk izolovaných 28. den po indukci EAU z mLN a cLN od myši s EcN a kontrol pomocí anti-CD3/anti-CD28, tj. TCR stimulantem, vykazovaly obě skupiny myši podobnou schopnost produkovat typické prozánětlivé cytokiny. U myši s EcN byl pozorován jen malý vzestup počtu cytotoxických T-lymfocytů (Tc) s expresí TNF- α ($p < 0,05$), ale nebyl doprovázen zvýšením produkce cytokinů. Při testování odpovědi na přítomnosti IRBP u buněk izolovaných z iLN, mLN a cLN od myši 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 (vše $p < 0,05$). 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.

Analýza imunitní odpovědi v počáteční fázi rozvoje EAU

Živá EcN indukuje protizánětlivé změny ve střevě 7. den. Dochází k signifikantnímu snížení produkce TNF- α , IL-1 β a S100A8 v buňkách kultivovaných Peyerových plátů ($p < 0,05$) bez jejich významného snížení v kolon a ileu. Dále dochází k signifikantnímu snížení zastoupení makrofágů v ileu a mLN u EcN proti kontrolám ($p < 0,05$). Zároveň se v ileu ani jedné skupiny, dále v mLN EcN léčené skupiny nevyskytují žádné M2 makrofágy ($p < 0,01$). T-lymfocyty v lymfatických uzlinách drénujících místo imunizace neprodukují IFN- γ a IL-17 v odpovědi na stimulaci IRBP *in vitro* ($p < 0,05$). EcN lyzát indukuje významně menší produkci IL-1 β než EcO lyzát ($p < 0,001$). Tyto 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.

Analýza produkce cytokinů a antimikrobiálních peptidů v Peyerových plátech

Živá EcN nemění produkci prozánětlivých cytokinů v kolon, ale snižuje produkci TNF- α , IL-1 β , IL-33 a S100A8 v supernatantech kultivovaných Peyerových plátů ($p < 0,05$, IL-33 $p < 0,01$). Živá EcN zvýšila expresi genů antimikrobiálních peptidů Defa5, Muc13 a Tjp v ileu ($p < 0,05$), které mohou mít vliv na integritu střevní bariéry a mohou hrát roli v protizánětlivé ochraně v Peyerových plátech. V kolon byl pozorován malý vzestup exprese toll-like receptoru typu 5 (TLR5) ($p < 0,01$).

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 myši léčených probiotikem EcN ($p < 0,05$). Tento rozdíl byl zjištěn pouze v mLN, ale ne v 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

7. Souhrn

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 myší 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 autoklátované probiotické bakterie EcN u EAU v různých režimech podávání nevykazovalo významný rozdíl mezi skupinami, je tedy pro protektivní efekt 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.

7. Vybraná literatura

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

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

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

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

Horai R., Caspi R.R.: Microbiome and Autoimmune Uveitis. *Front Immunol*. 2019; 10: 232.

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

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).

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

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.

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.

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.

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.

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.

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 vlastních publikací:

1. **Dusek, O.**, Fajstova, A., Klimova, A., Svozilkova, P., Hrcir, T., Kverka, M., Coufal, S., Slein, J., Tlaskalova-Hogenova, H., Forrester, J.V., Heissigerova, 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 Stangova, P., **Dusek, O.**, Klimova, A., Heissigerova, 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., Svozilková P., Klímová A., **Dušek O.**, Kverka M., Heissigerova J.: Mikrobiom a uveitidy. Přijato k tisku v Česk a Slov Oftalmol. 2021.
4. **Dušek, O.**, Fichtl, M., Rezková, L., Dubská, Z., Heissigerova, J., Růžičková, E., Vrablík, M., Špička, I., Svozilková, P.: Akutní elevace nitroočního tlaku u pacienta s hyperlipidemickým myelomem. *Česk a Slov Oftalmol.* 2020; 76(4); 172-180.