

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie

Studijní obor: N-IMUN



Bc. Martin Mihula

Vliv léčby inhibitory TNF- α na složení mikrobioty a imunitní odpověď u pacientů s
nespecifickými střevními záněty

Effect of TNF- α inhibitors on microbiota composition and immune response in patients with
inflammatory bowel disease

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Jirásková Zákostelská, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2022

Bc. Martin Mihula

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Zuzaně Jiráskové Zákostelské, Ph.D. za její trpělivost, vstřícnost a za její čas, který mi během mého magisterského studia věnovala. Dále bych rád poděkoval Mgr. Dagmar Schierové a Mgr. Štěpánovi Coufalovi, Ph.D. za znalosti a zkušenosti, které mi předali. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také všem kolegům z Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za příjemné pracovní prostředí a své rodině a přátelům za poskytovanou podporu.

Práce vznikla za finanční podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky, číslo grantu NV18-09-00493.

Abstrakt

Inhibitory TNF- α jsou jednou z nejčastěji používaných terapií v léčbě nespecifických střevních zánětů (IBD). Avšak až jedna třetina pacientů s IBD na tuto terapii po nějakém čase z neznámých důvodů přestane odpovídat. Doposud neexistuje ideální biomarker, který by byl schopný předpovědět dlouhodobou odpověď pacienta na tuto terapii. Vzhledem k tomu, že změna ve složení střevní mikrobioty je úzce spjata s patogenezí IBD, tak jsem se v rámci této studie pokusil zjistit, zda dochází ke změnám v jejím složení i v důsledku terapie inhibitory TNF- α . Dále jsem se pokusil popsát, zda v průběhu terapie dochází ke změnám v produkci sérových biomarkerů spojených s poškozením střevní bariéry a imunitní odpovědi v důsledku mikrobiální translokace. Také jsem se zaměřil na imunitní odpověď pacientů s IBD na antigeny běžně se vyskytujících střevních komenzálních bakterií během terapie inhibitory TNF- α . Za tímto účelem jsme v průběhu naší studie odebrali vzorky krve či stolice od 46 pacientů v době před začátkem terapie a v 38. týdnu od zahájení terapie a 39 zdravých kontrol.

Zjistil jsem, že v 38. týdnu terapie TNF- α inhibitory u pacientů s IBD dochází ke zvýšení bakteriální druhové rozmanitosti (α -diverzity) i ke změnám v druhovém složení mezi sledovanými skupinami pacientů (β -diverzity) ve srovnání se vzorky stolice pacientů odebraných před začátkem studie. Po rozdělení pacientů podle odpovědi na terapii v 38. týdnu jsem nenalezl žádný rozdíl v α -diverzitě před terapií a v 38. týdnu terapie u pacientů s IBD. Dále jsem změřil před zahájením a v 38. týdnu terapie u pacientů s IBD hladiny sérového kalprotektinu (sCP), α -defensinu (DEFA)1, proteinu vázajícího lipopolysacharid (LBP), mananu vázajícího lektin (MBL), střevního (I-) a jaterního proteinu vázajícího mastné kyseliny (L-FABP) a molekuly sCD14, které jsem následně porovnal s hodnotami zdravých jedinců. Posléze jsem tyto potenciální biomarkery srovnával před zahájením a v 38. týdnu terapie podle diagnóz (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida) a dle odpovědi na léčbu v 38. týdnu terapie. V porovnání se zdravými jedinci měli pacienti s IBD signifikantně zvýšené hladiny sCP na začátku i na konci studie a DEFA1 na začátku studie. Dalším z výsledků mé práce bylo zjištění, že pacienti, kteří odpovídali na léčbu, měli signifikantně snížené hladiny sCD14 a MBL v 38. týdnu terapie. Prostřednictvím *ex vivo* kultivace mononukleárních buněk periferní krve pacientů s Crohnovou chorobou s bakteriálními lyzáty jsem charakterizoval imunitní buněčnou odpověď na antigeny deseti běžných střevních komenzálních bakterií během terapie TNF- α inhibitory.

I přes omezené množství pacientů v naší studijní skupině tato diplomová práce poukazuje na důležitou úlohu střevní mikrobioty v patogenezi nespecifických střevních zánětů, a to i během anti-TNF- α terapie.

Klíčová slova: nespecifické střevní záněty, biologická léčba, faktor nekrotizující nádory- α , střevní mikrobiom, sérové biomarkery, střevní bariéra

Abstract

One of the most common used therapies in inflammatory bowel diseases (IBD) treatment are inhibitors of a cytokine TNF- α . Nevertheless, up to one third of IBD patients stop respond to this therapy for unknown reason. In these days, there are not any ideal biomarkers which could predict patient's long-term response to anti-TNF- α therapy. Because the gut microbiota composition changes are tightly related to the pathogenesis of IBD, my aim in this thesis was to find out if these changes in composition are happening also due the therapy by inhibitors of TNF- α as well. Moreover, I tried to find out if there are changes in production of serum biomarkers related to the gut barrier damage and to the immune response associated with microbial translocation. Also, I focused on the immune response of IBD patients against common gut commensal bacterial antigens during the anti-TNF- α therapy. In our study, we collected for these purposes stool or blood samples from 46 IBD patients before the therapy and at 38th week from the start of the therapy and 39 healthy controls.

I found that IBD patients had higher bacterial diversity (α -diversity) as well as different bacterial composition across observed groups (β -diversity) at 38th week of the anti-TNF- α therapy than before the therapy. When I divided IBD patients according to their therapy response at 38th week, I did not find any differences in α -diversity before and at 38th week of the therapy in IBD patients. Furthermore, I measured blood serum levels of 7 biomarkers before and at 38th week of therapy. In IBD patients, I measured levels of serum calprotectin (sCP), α -defensin (DEFA)1, lipopolysaccharide binding protein (LBP), mannan-binding lectin (MBL), intestinal (I-) and liver fatty acid-binding protein (L-FABP) and sCD14 molecule. After that, I compared the biomarker levels detected in patients with those in healthy controls. Then I compared levels of these biomarkers before and at 38th week of anti-TNF- α therapy in patients with Crohn's disease and with ulcerative colitis according to their therapy response. Compared to healthy controls, IBD patients had significantly higher levels of sCP before the start as well as at 38th week of the therapy and they had also significantly higher levels of DEFA1 before the start of the therapy. The next result of my diploma thesis was that IBD patients responding to the anti-TNF- α therapy had significantly decreased levels of sCD14 and MBL at 38th week of the therapy. Moreover, I used *ex vivo* cultivation of IBD patients' peripheral blood mononuclear cells with bacterial lysates for characterisation of the immune response against antigens of 10 common gut commensal bacteria during the anti-TNF- α therapy.

Despite of the limited number of patients in our study, results in my diploma thesis show that gut microbiota plays an important role in the pathogenesis of IBD, even during the anti-TNF- α therapy.

Key words: inflammatory bowel disease, biological therapy, tumor necrosis factor- α , gut microbiome, serum biomarkers, intestinal barrier

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Obsah	7
Seznam zkratk	9
Úvod.....	11
Přehled literatury.....	12
1. Stavba a imunitní systém střeva.....	12
1.1. Stavba střevní stěny.....	12
1.2. Imunitní systém střeva	13
2. Střevní mikrobiota.....	14
2.1. Složení střevní mikrobioty	15
2.2. Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu	16
2.3. Vztah střevní mikrobioty a hostitele	17
3. Nespecifické střevní záněty (IBD).....	19
3.1. Patogeneze IBD.....	21
3.2. Biologická léčba IBD	27
Cíle práce	31
Materiál a metodika	32
1. Nábor pacientů a zdravých kontrol	32
2. Analýza složení střevní mikrobioty pacientů s IBD a HC	35
2.1. Izolace DNA ze stolice.....	35
2.2. Amplifikace DNA	35
2.3. Příprava genomové knihovny	36
2.4. Bioinformatická analýza	36
3. Detekce biomarkerů v krevním séru pacientů s IBD a HC	37
3.1. Odebrání krevního séra z periferní krve.....	37
3.2. Detekce biomarkerů	37

4.	Charakterizace odpovědi PBMC pacientů s IBD na mikrobiální antigeny	38
4.1.	Izolace a zamrazení PBMC	38
4.2.	Rozmrazení PBMC	38
4.3.	Příprava bakteriálních lyzátů	39
4.4.	Přidání bakteriálních antigenů k PBMC	40
4.5.	Měření produkce intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie	40
4.6.	Měření produkce cytokinů v supernatantu pomocí metody ELISA	41
5.	Statistická analýza	44
	Výsledky	45
1.	Analýza složení střevní mikrobioty pacientů s IBD	45
2.	Detekce sérových biomarkerů pacientů s IBD	52
3.	Kultivace PBMC pacientů s IBD s bakteriálními lyzáty	63
	Diskuse	66
	Závěr	75
	Seznam použité literatury	76

Seznam zkratek

5-HT	5-hydroxytryptamine	5-hydroxytryptamin
ADA	adalimumab	adalimumab
AMP	antimicrobial peptide	antimikrobiální peptid
ANCOM	analysis of composition of microbiomes	analýza složení mikrobů
ATG16L1	autophagy-related 16-like 1	související s autofagií 16 jako 1
BMI	body mass index	index tělesné hmotnosti
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CD	Crohn's disease	Crohnova choroba
CRP	C-reactive protein	C-reaktivní protein
CSF	colony-stimulating factor	faktor stimulující kolonie
ČO	partial response	částečná odpověď
ČR	Czech Republic	Česká republika
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimethylsulfoxid
DC	dendritic cell	dendritická buňka
DEFA	defensin alpha	α -defensin
DSS	dextran sulfate sodium	dextran sulfát sodný
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
fCP	faecal calprotectin	fekální kalprotektin
FMO	fluorescence minus one	fluorescence minus jedna
GALT	gut-associated lymphoid tissue	lymfoidní tkáň asociovaná se střevem
GI	gastrointestinal	gastrointestinální
GOL	golimumab	golimumab
HBI	Harvey-Bradshaw index	Harvey-Bradshawův index
HC	healthy control	zdravá kontrola
IBD	inflammatory bowel disease	nespecifické střevní záněty
IEL	intraepithelial lymphocyte	intraepiteliální lymfocyt
IFN	interferon	interferon
IFX	infliximab	infliximab
IKEM	Institute of Clinical and Experimental Medicine	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	interleukin	interleukin
ILC	innate lymphoid cell	přirozená lymfoidní buňka
ILF	isolated lymphoid follicle	izolovaný lymfoidní folikul
I-FABP	intestinal fatty-acid binding protein	střevní protein vázající mastné kyseliny
iNKT	invariant natural killer T	invariantní přirozený zabíječ T
IS	immune system	imunitní systém
KS	the end of the study	konec studie

LBP	lipopolysaccharide binding protein	protein vázající lipopolysacharid
L-FABP	liver fatty-acid binding protein	jaterní protein vázající mastné kyseliny
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
MAIT	mucosal associated invariant T-cell	invariantní T buňka asociovaná se sliznicí
MBL	mannan-binding lectin	manan vázající lektin
MDP	muramyl dipeptid	muramyl dipeptid
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
mLN	mesenteric lymph node	mezenterální lymfatická uzlina
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain	nukleotidová vazebná oligomerizační doména
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	mononukleární buňky periferní krve
PBS	phosphate-buffered saline	fyzilogický roztok pufovaný fosfáty
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PLT	platelet	krevní destička
pMayo	partial Mayo index	částečný Mayo index
PO	full response	plná odpověď
RT	room temperature	pokožová teplota
sCD14	soluble CD14	solubilní CD14
SCFA	short-chain fatty acid	masná kyselina s krátkým řetězcem
sCP	serum calprotectin	sérový kalprotektin
SEB	staphylococcal enterotoxin B	stafylokokový enterotoxin B
sIgA	secretory IgA	sekreční IgA
sIgM	secretory IgM	sekreční IgM
sTNF	soluble tumor necrosis factor	solubilní faktor nekrotizující nádory
TAE	tris-acetate-EDTA	tris-acetát-EDTA
TGF	transforming growth factor	růstový transformující faktor
Th	helper T-cell	pomocný T-lymfocyt
TLR	Toll-like receptor	receptor podobný Toll
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-tetrametylbenzidin
tmTNF	transmembrane tumor necrosis factor	transmembránový faktor nekrotizující nádory
TNF	tumor necrosis factor	faktor nekrotizující nádory
Tr1	type 1 regulatory T cell	T-regulační buňka 1. typu
T_{reg}	regulatory T cell	regulační T-lymfocyt
UC	ulcerative colitis	ulcerózní kolitida
WBC	white blood count	počet bílých krvinek
ZS	start of the study	začátek studie
ŽO	no response	žádná odpověď

Úvod

Nespecifické střevní záněty, které zahrnují především Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, jsou závažná onemocnění gastrointestinálního traktu. Jejich typickými projevy jsou bolesti břicha, průjemy a krev ve stolici. V některých případech se nemoc může rozšířit také na další části těla jako na oči či na klouby.

Předpokládá se, že v patogenezi těchto zánětů hrají významnou roli střevní mikroby. Lidské střevo je osídleno velkým množstvím mikroorganismů, které plní mnoho fyziologických funkcí – syntetizují esenciální látky, degradují nestravitelné látky, chrání hostitele před infekcemi a významně se podílí na vývoji a regulaci střevního imunitního systému. U geneticky predisponovaných jedinců však mohou tyto mikroby častěji překonávat střevní bariéru a dostávat se častěji do kontaktu s imunitními buňkami hostitele. Imunitní buňky se následně aktivují a migrují do střevní sliznice, kde neadekvátní produkcí prozánětlivých cytokinů způsobují rozvoj chronického střevního zánětu.

V současnosti je v České republice jedním z nejběžnějších terapeutických přístupů v léčbě IBD terapie monoklonálními protilátkami specifickými pro prozánětlivý cytokin TNF- α . Tyto protilátky zahrnují chimérický infliximab a plně humanizovaný adalimumab. Jejich podávání může vést až k téměř kompletní remisi onemocnění – k zahojení střevní sliznice, k redukci potřeby hospitalizace a k celkovému zlepšení kvality života pacienta. Nicméně, až 30 % pacientů na tuto terapii vůbec neodpovídá a z těch odpovídajících 30 % pacientů do 1 roku odpovídat přestane. Proto je snaha nalézt co nejméně invazivní a spolehlivé ukazatele, které by umožnily předpovědět odpověď na terapii.

Proto jsem se ve své diplomové práci zaměřil na vliv anti-TNF- α terapie na složení střevní mikrobioty, na hladiny sérových biomarkerů souvisejících s funkcí střevní bariéry, s mikrobiální translokací a s imunitní odpovědí na mikroorganismy, a na produkci prozánětlivých cytokinů CD4⁺ T-lymfocyty pacientů s IBD v reakci na antigeny běžných komenzálních bakterií lidského střeva.

Přehled literatury

1. Stavba a imunitní systém střeva

Střevo je součástí gastrointestinálního (GI) traktu, který je důležitý pro trávení a absorpci živin z pozřené potravy. Navazuje na žaludek a pokračuje jako kontinuální trubice, která se anatomicky dělí na střevo tenké a tlusté. Tenké střevo má výrazně menší průměr a je dlouhé 6-7 metrů. Anatomicky ho lze rozdělit na duodenum (dvanáctník), jejun (lačník) a ileum (kyčelník). Na svém konci navazuje na tlusté střevo, které je oproti tomu tenkému znatelně širší a kratší. Je dlouhé přibližně 1,5 metru a má 2 anatomické části: caecum (slepé střevo) a kolon (tračník). Kolon se dále dělí na proximální, transverzní a distální část. Na svém konci ústí do rekta (konečniku), který je zakončen řitním otvorem (anus).

1.1. Stavba střevní stěny

Lumen střeva je od zbytku těla oddělen 4 vrstvami střevní stěny: jednovrstevným epitelem, slizniční vrstvou lamina propria, vrstvou hladké svaloviny a serózou.

1.1.1. Epitelová vrstva

Lumen střeva je ohraničen vrstvou epitelových buněk, které jsou navzájem propojené mezibuněčnými spoji. Ty umožňují buňkám navzájem komunikovat a dělají ze sousedních buněk jednotně pohyblivý a mechanicky odolný celek. Proteiny kladiny a okkludiny tvoří mezi buňkami epitelu těsné spoje, které umožňují jejich polarizaci a zabraňují nekontrolovatelnému průniku látek skrz střevní stěnu.

Životnost epitelových buněk je 4-5 dní. Jsou obnovovány dělením kmenových buněk, které se nacházejí v invaginacích zvaných Lieberkühnovy krypty. Z těchto krypt většina buněk migruje směrem do střevního lumen, během čehož maturuje, aby byla schopná vykonávat své efektorové funkce.

Vrstvu epitelu tvoří několik typů buněk. Dominantním typem jsou v tenkém střevě enterocyty a v tlustém střevě kolonocyty. Obě tyto buněčné populace hrají důležitou roli v příjmu živin. Jiné buňky jsou specializované na sekreci. Pohárkové buňky sekretují hlen (mucus) a Panethovy buňky produkují antimikrobiální peptidy (AMP). V reakci na lumenální obsah sekretují různé mediátory také kartáčové a enteroendokrinní buňky. Dalším typem jsou M buňky, které umožňují transport antigenů skrz epitel.

1.1.2. Ostatní vrstvy

Epitelové buňky jsou obklopeny další slizniční vrstvou zvanou lamina propria. V té se nachází nervová, pojivová a lymfatická tkáň. Nad ní je vrstva hladké svaloviny, obsahující longitudinální a cirkulární svaly umožňující motilitu střeva. Čtvrtou vrstvou je vazivová seróza.

1.2. Imunitní systém střeva

Střevní buňky jsou v neustálém kontaktu s cizími antigeny. Mnohé z těchto antigenů pochází z potravy či z neškodných komenzálních mikroorganismů žijících ve střevě a je tedy důležité, aby imunitní systém (IS) střeva na tyto podněty reagoval přiměřeně. Stejně tak je důležité, aby přiměřeně reagoval na patogenní antigeny. Pravděpodobně kvůli důležitosti této rovnováhy mezi zánětlivou a protizánětlivou imunitní odpovědí se ve střevě a kolem něj vyvinula největší lymfatická tkáň v lidském těle, ve které se nachází největší množství T-lymfocytů, plazmatických buněk a makrofágů. Souhrnně se tato tkáň nazývá lymfoidní tkáň asociovaná se střevem (GALT) (Mowat & Agace, 2014).

GALT je tvořena více či méně organizovanými makroskopickými a mikroskopickými strukturami. Makroskopické struktury představují mezenterální lymfatické uzliny (mLN) a Peyerovy plaky, zatímco struktury mikroskopické představují především izolované lymfoidní folikuly (ILF). V těchto strukturách i mimo ně jsou kriticky důležité buňky přirozeného a adaptivního IS.

1.2.1. Buňky přirozeného IS

Za buňky přirozeného IS můžeme kromě tradičních leukocytů považovat také další buněčné typy. Jednou z prvních bariér mezi průnikem neškodných antigenů i škodlivých mikrobů jsou totiž samotné buňky epitelu. Ty se produkcí slizu, proteinů těsných spojů a AMP zásadně podílejí na mechanické a chemické obraně. Na přirozené imunitě se také podílejí buňky nervového systému, které hojně inervují střevní tkáň a které mohou v reakci na nežádoucí stimuly vyvolat nevolnost. Kromě vlastních buněk jsou v obraně důležité také střevní mikroby, které soupeří s patogeny o prostor a o živiny.

Ve zdravé střevní sliznici jsou dále přítomny leukocyty přirozeného IS. Mezi ně patří hematopoetické buňky jako makrofágy a dendritické buňky (DC) a lymfoidní buňky jako přirozené lymfoidní buňky (ILC), invariantní přirození zabíječi T (iNKT) a invariantní T buňky asociované se sliznicí (MAIT).

Nejpočetnější leukocytární populací ve střevě jsou makrofágy. Ty se podílejí na udržování střevní homeostázi fagocytózou odumřelých tkáňových buněk a mikrobů. Také jsou důležitými producenty protizánětlivého interleukinu (IL)-10, který je důležitý pro udržování populace FoxP3⁺ regulačních T-lymfocytů (T_{reg}) a tolerance vůči střevním komenzálům (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2002).

Druhým významným typem jsou DC, které pohlcují antigeny z lumen střeva a efektivně je prezentují T-lymfocytům. Představují tedy důležitou spojku mezi přirozenou a adaptivní imunitní odpovědí. Kromě konvenční populace se ve střevě nalézají také plazmacytoidní DC, jejichž hlavní úloha není prezentace antigenů, nýbrž produkce interferonů (IFN) 1. typu v reakci na viry (Mowat & Agace, 2014).

Do buněk přirozeného IS se řadí také některé lymfoidní buňky. Ve střevě se nacházejí ILC s fenotypem podobným pomocným T-lymfocytům (Th). Dále se tam nacházejí MAIT, které rozpoznávají bakteriální

metabolity vitamínu B prezentované na MR1. Na bakterie mohou ve střevě reagovat také iNKT. Ty rozpoznávají vlastní i bakteriální glykolipidy prezentované na molekule CD1d (Mowat & Agace, 2014).

1.2.2. Buňky adaptivního IS

Důležitou spojkou mezi přirozeným a adaptivním IS jsou tedy DC. Ty buď vychytávají antigeny sami přímo z lumen střeva nebo k nim antigeny transportují epitelové M buňky. Po fagocytóze antigenu DC migrují do mLN a aktivují specifické T-lymfocyty. Produkci růstového transformujícího faktoru (TGF)- β a vitamínu A podporují především rozvoj T_{reg} buněk. Aktivované T-lymfocyty následně migrují do střevní sliznice, kde vykonávají své efektorové funkce a podílejí se na udržování střevní homeostázi (Kayama & Takeda, 2012).

$CD4^+$ $FoxP3^+$ T_{reg} buňky jsou dominantní T-buněčnou subpopulací ve střevě a společně s méně početnými $CD4^+$ $FoxP3^-$ T-regulačními buňkami 1. typu ($Tr1$) v něm udržují tolerogenní prostředí. Produkují totiž protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- β a tím regulují množství a aktivitu prozánětlivých T-lymfocytů (Kayama & Takeda, 2012; Mowat & Agace, 2014).

Dalšími důležitými populacemi ve střevě jsou $Th1$, $Th17$ $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocyty. Speciálním typem buněk jsou intraepiteliální lymfocyty (IEL), které jsou vmezeřené mezi buňkami epitelu s frekvencí až 10-15 IEL na 100 epitelových buněk. Převážně jde o $\alpha\beta TCR^+$ $CD8^+$ buňky (Kayama & Takeda, 2012).

Kromě T-lymfocytů se ve střevní sliznici nachází velké množství plazmatických buněk. Ty produkují především sekreční formu IgA (sIgA) a méně často sekreční formu IgM (sIgM) protilátek. IgA protilátky neaktivují komplement a jejich hlavní funkcí je opsonizace antigenů v lumen střeva. U lidí jsou 2 izotypy IgA. IgA1 je náchylnější na proteolytické štěpení, včetně štěpení mikrobiálními proteázami, a nachází se především v duodenu a jejunu. Naopak IgA2 je vůči štěpení odolnější a nachází se tedy v prostředí bohatém na mikroby, hlavně v distálním kolonu (Mowat & Agace, 2014).

2. Střevní mikrobiota

Lumen střeva je osídlen velkým množstvím komenzálních mikroorganismů. Udává se, že jejich počet je až 10^{11} - 10^{12} buněk na 1 ml luminálního obsahu (Palmer *et al.*, 2007). Dohromady tyto mikroby tvoří střevní mikrobiotu, se kterou musí neustále interagovat buňky střevního epitelu hostitele. Pro každého jedince je složení střevní mikrobioty specifické a dlouhodobě stabilní (Huttenhower *et al.*, 2012), ačkoli v krátkodobém měřítku může být velmi dynamické (Caporaso *et al.*, 2011).

2.1. Složení střevní mikrobioty

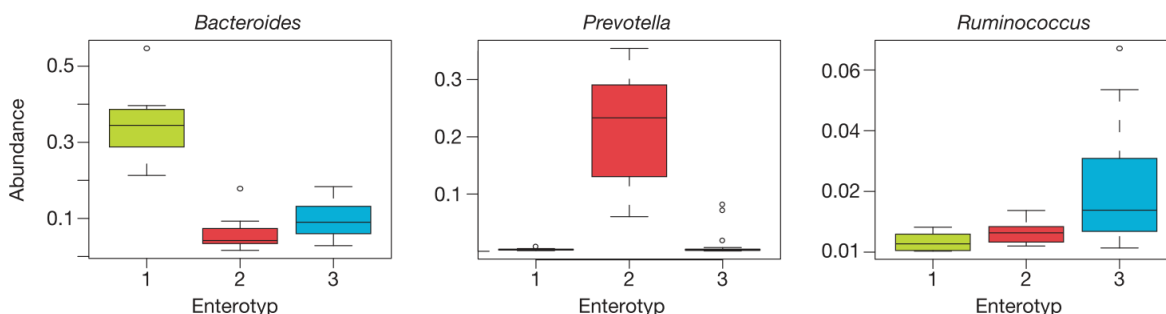
Převládajícím taxonem střevní mikrobioty jsou bakterie. Významné, ačkoliv méně prozkoumané, jsou však také archea, bakteriofágy a jednobuněčné houby a jiná eukaryota. Kromě stálých kolonizátorů se ve střevě nacházejí transientní mikroby, jejichž zdrojem je environmentální prostředí.

2.1.1. Složení bakterií

K osídlení lidského střeva mikroorganismy dochází již v rané fázi života. Po porodu je do té doby sterilní střevo novorozence kolonizováno náhodnými taxony, což je závislé na environmentálních faktorech jako na způsobu porodu či na kojení (Palmer *et al.*, 2007) a tím pádem také na stravě a zdravotním stavu matky (Penders *et al.*, 2006). Postupně začnou dominovat bakterie nejlépe přizpůsobené střevnímu prostředí a již v prvním půl roce života novorozence převládají kmeny *Bacteroides* a *Firmicutes* (Palmer *et al.*, 2007). S věkem postupně roste mikrobiální diverzita a po ukončení kojení a zavedení pevné stravy se již složení střevní mikrobioty podobá té dospělé (Koenig *et al.*, 2011; Nel Van Zyl *et al.*, 2021).

Složení střevní mikrobioty je prvotně nestabilní a variabilní v čase. Ustanovuje se po 3 letech života, kdy již dominují bakteriální kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, následované kmeny *Actinobacteria* a *Proteobacteria* (Arumugam *et al.*, 2011; Zhernakova *et al.*, 2016). V současnosti se uvažuje o existenci 2 základních enterotypů na základě relativní abundance rodů *Bacteroides* a *Prevotella* (Hou *et al.*, 2020; Huse *et al.*, 2012). Dříve se uvažovalo ještě nad třetím enterotypem podle dominance rodu *Ruminococcus* (obr. 1; Arumugam *et al.*, 2011). Enterotypy nejspíše nejvíce ovlivňují dlouhodobé stravovací návyky (Deschasaux *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2020).

Bylo popsáno více než 400 bakteriálních druhů osidlujících lidské střevo (Eckburg *et al.*, 2005). Mezi nejpočetnější stálé kolonizátory patří rody *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Streptococcus* a *Roseburia* (Arumugam *et al.*, 2011; Deschasaux *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2010).



Obr. 1: Tradiční rozdělení enterotypů. Původně byly definovány 3 enterotypy podle relativní abundance rodů *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus*. Dnes se spíše uvažuje pouze nad prvními dvěma zmíněnými. (Převzato a upraveno podle Arumugam *et al.*, 2011)

2.1.2. Další složky střevní mikrobioty

Společně s bakteriemi lidské střevo osidlují archea, bakteriofágy, jednobuněčné houby a protista.

Archeální DNA může tvořit ve střevě až 10 % mikrobiálního genetického repertoáru. Nejpočetnější jsou rody *Methanobrevibacter* a *Methanosphaera*, provádějící anaerobní metanogenezi (Eckburg et al., 2005; J. Y. Kim et al., 2020). Produkci metanu archea ve střevě snižují hladiny vodíku, který je výsledkem bakteriální fermentace. Není však jisté, zda jsou archea stabilními či tranzientními kolonizátory. Například výskyt *Methanobrevibacter* je asociován s konzumací mléčných produktů, ve kterých je tento rod přímo detekovatelný (van de Pol et al., 2017).

Důležitou složkou střevní mikrobioty jsou také bakteriofágy. Ty mohou adherovat na střevní sliznici (Barr et al., 2013) a mohou fungovat jako rezervoáry genetické variability nebo jako predátoři vnímavých bakterií. Bakterie *Enterococcus faecalis* produkuje lytické fágy jako odpověď na zvýšení aminokyselin v prostředí. To jí poskytuje selektivní výhodu vůči vnímavým bakteriím (Duerkop et al., 2012). Jiná studie popsala, že pro úspěch transplantace fekální mikrobioty u infekce bakterií *Clostridium difficile* je u donora důležitá vysoká abundance bakteriofága *Caudovirales* (Zuo et al., 2017).

Další složkou střevní mikrobioty jsou jednobuněčné houby, tedy plísně a kvasinky. Ty společně tvoří mykobiotu. Dominantními kmeny mykobioty jsou Ascomycota a Basidiomycota (Sokol et al., 2017). Její diverzita je značně nižší než diverzita bakterií. Mezi nejvíce početné rody hub patří *Saccharomyces*, *Candida* a *Malassezia*. Není však jasné, jestli jde o stálé střevní kolonizátory (Nash et al., 2017; Raimondi et al., 2019). Mykobiota ve střevě produkuje látky s antibiotickými účinky a tím může ovlivňovat složení bakterií (Mims et al., 2021). Například byla nalezena negativní korelace v četnosti rodu hub *Penicillium* a bakteriálního rodu *Faecalibacterium* (Nash et al., 2017).

Lidské střevo osidlují také jiná jednobuněčná eukaryota neboli protista. Mezi nejpočetnější střevní protista patří rody *Blastocystis* a *Entamoeba* (Lokmer et al., 2019; Nash et al., 2017). Oba tyto rody byly pozitivně asociovány s bakteriální diverzitou. Například přítomnost rodu *Entamoeba* byla spojena s úbytkem bakterie *Bacteroides* (Even et al., 2021). Jakým způsobem protista ovlivňují složení střevní mikrobioty zůstává nejasné. Jedním z možných vysvětlení je predace jiných mikrobů protisty.

2.2. Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu

Složení střevní mikrobioty je ovlivnitelné mnohými vnitřními i vnějšími faktory, například IS hostitele, stresem, infekcemi, stravou či podáváním antibiotik a jiných léčiv. Kvůli jejich rozmanitosti budu v rámci své diplomové práce věnovat pozornost pouze některým z nich.

Složení střevní mikrobioty je ovlivňováno více vlivy vnějšího prostředí než genetikou hostitele. Bylo totiž zjištěno, že nepříbuzní jedinci sdílející jednu domácnost měli podobné složení mikrobioty a naopak příbuzní jedinci z odlišných domácností nikoliv (Rothschild et al., 2018). Významným faktorem, který

na střevní mikroby působí, jsou dlouhodobé stravovací návyky, podle kterých se utváří také samotný enterotyp hostitele. Jedinci stravující se tradičně, tedy stravou chudší na tuky a živočišné proteiny a bohatší na rostlinné polysacharidy, mají vyšší zastoupení bakterie *Prevotella* (De Filippo *et al.*, 2010; Nel Van Zyl *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2011). Naopak jedinci stravující se tzv. západní dietou, tedy dietou bohatou na tuky a živočišné proteiny a naopak chudou na rostlinné polysacharidy, mají vyšší zastoupení *Bacteroides* (Wu *et al.*, 2011; Zimmer *et al.*, 2012).

Často negativně na střevní mikrobiotu působí antibiotika, která mohou vést k eliminaci prospěšných bakterií, a naopak k expanzi těch škodlivých (Antonopoulos *et al.*, 2009; Dethlefsen & Relman, 2011). Typicky po jejich podání dochází k úbytku bakteriální diverzity a k úbytku rodů jako *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (McDonnell *et al.*, 2021; Reyman *et al.*, 2022). Tento efekt ale bývá pouze dočasný a po přerušení podávání antibiotik se složení blíží původnímu stavu (Dethlefsen & Relman, 2011; Nel Van Zyl *et al.*, 2021). U novorozenců je však efekt širokospektrých antibiotik podaných v prvních dnech života měřitelný i ve věku 12 měsíců. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že mikrobiota se nemůže vrátit k žádnému výchozímu složení, jelikož ještě nebylo ustáleno (Reyman *et al.*, 2022).

Na složení střevních mikroorganismů se podílí také IS hostitele. Dominantním izotypem protilátek ve slizniční imunitě je sIgA. Neaktivuje komplement a jeho hlavní funkce je blokování adherence a agregace mikrobů. Tím může ovlivňovat složení střevní mikrobioty (Nakajima *et al.*, 2018). U lidí trpících sIgA deficiencí dochází ke kompenzaci sIgM izotypem. Pacienti s touto deficiencí mají nižší diverzitu střevní mikrobioty, jelikož IgM protilátky mají mnohem méně specifickou schopnost opsonizovat bakterie. Zatímco některé bakterie mohou být silně opsonizovány oběma izotypy protilátek, jiné taxony, konkrétně kmen Proteobacteria, nikoliv. U pacientů s sIgA deficiencí mohou být tedy proteobakterie zastoupeny výrazně více (Catanzaro *et al.*, 2019; Suzuki *et al.*, 2004) a naopak jiné bakterie jako *Prevotella copri* a *Eubacterium bifome* mohou u těchto pacientů téměř chybět (Catanzaro *et al.*, 2019).

2.3. Vztah střevní mikrobioty a hostitele

Střevní mikrobiota je důležitá pro zdraví hostitele. Její genetický repertoár více než stokrát převyšuje repertoár hostitele (Qin *et al.*, 2010) a podílí se významnou měrou na mnoha fyziologických procesech: na produkci esenciálních látek včetně vitamínů a mastných kyselin, na odbourávání nestravitelných živin jako jsou komplexní rostlinné polysacharidy či na regulaci IS a tím na prevenci rozvoje zánětlivých chorob. Díky těmto vlastnostem se někdy střevní mikrobiota označuje za vlastní orgán.

2.3.1. Produkty metabolismu bakterií

Jednou z důležitých vlastností střevní mikrobioty je syntéza pro hostitele esenciálních látek. Mnohé bakterie obývající tlusté střevo, například druhy *Roseburia*, *Faecalibacterium* a *Bacteroides*, fermentují hostitelem nestravitelné polysacharidy a aminokyseliny na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)

(LaBouyer *et al.*, 2022). SCFA mají mastnou kyselinu s 2 až 5 uhlíky a patří mezi ně acetát (C2), propionát (C3) a butyrát (C4). Jejich poměr ve střevě je 3:1:1. Jsou zdrojem energie pro hostitele, konkrétně butyrát je primární energetický zdroj pro kolonocyty (Tsukuda *et al.*, 2021).

Kromě SCFA střevní mikroorganismy produkují také mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, respektive s mastnou kyselinou s 6 až 10 uhlíky. V těle slouží také jako zdroj energie, především při intenzivním cvičení (Sam *et al.*, 2021). Střevní mikrobiota dále produkuje některé aminokyseliny (Soto-Martin *et al.*, 2020) a vitamíny. Je schopná produkovat vitamíny B, jako thiamin, riboflavin, biotin a kobalamin (Arumugam *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Soto-Martin *et al.*, 2020). Také produkuje vitamín C (Arumugam *et al.*, 2011) a vitamín K (Truong *et al.*, 2012).

Další důležitou vlastností střevní mikrobioty je degradace látek. Například bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* odbourávají oxalát, čímž snižují riziko jeho ukládání v ledvinách hostitele (Magwira *et al.*, 2012). Mikrobiota také štěpí pro hostitele nestravitelné rostlinné polysacharidy (Cantarel *et al.*, 2012) a polyfenoly, které degraduje na jednodušší fenoly a jiné molekuly (Rechner *et al.*, 2004). Dále se podílí na metabolismu lipidů a absorpci živin (Bäckhed *et al.*, 2004; Hooper *et al.*, 2001) a na metabolismu léků a xenobiotik (Hooper *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2010).

2.3.2. Regulace imunitního systému

Střevní mikrobiota se zásadně podílí na vývoji IS hostitele. Naopak IS musí být schopný rozlišit neškodné komenzální mikroorganismy od potenciálních patogenů. Pokud tato rovnováha v rozpoznávání selže, může to vést k rozvoji chronického zánětu. Velká část výzkumu interakcí mezi imunitními buňkami hostitele a střevními mikroby byla provedena na myších modelech.

Stimulace imunitních buněk střevní mikrobiotou je důležitá pro správný vývoj střevního přirozeného i adaptivního IS. Například přítomnost bakterie *Lactobacillus reuteri* v mateřském mléce indukuje u myších mláďat formaci ILF, kde dochází k diferenciaci plazmatických buněk produkujících sIgA (Mu *et al.*, 2021). Mikrobiální antigeny ve střevě stimulují také makrofágy, které následně produkují IL-1 β . Tento cytokin pak v ILC3 v ILF indukuje expresi faktoru stimulujícího kolonie (CSF)-2, který je důležitý pro vývoj a diferenciaci buněk myeloidní buněčné linie (Mortha *et al.*, 2014). Kolonizace střevními mikroby u myší vede také k aktivaci a k proliferaci T-lymfocytů v sekundárních lymfoidních orgánech, k migraci aktivovaných T-lymfocytů do lamina propria a ILF (Chung *et al.*, 2012) a k expanzi sIgA produkujících plazmatických buněk do střevní sliznice (Hooper *et al.*, 2001).

Na vývoji a regulaci IS hostitele se kromě vlastní přítomnosti mikrobiota podílí produkcí různých látek. Bakterie ve střevě například produkují SCFA s imunomodulačními, většinou protizánětlivými účinky. Butyrát se váže na receptory na apikální straně buněk a snižuje aktivaci NF- κ B dráhy (Thangaraju *et al.*, 2009). Zvyšuje totiž hladinu inhibičního I κ B proteinu a inhibicí prozánětlivé NF- κ B dráhy snižuje

expresi prozánětlivých cytokinů jako faktoru nekrotizujícího nádory (TNF)- α , IL-6 a IFN- γ (Cox *et al.*, 2009; Segain *et al.*, 2000). Butyrát také podporuje proliferaci T_{reg} buněk a produkci IL-10 díky zvýšené acetylaci *FoxP3* promotoru (Furusawa *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013). SCFA se dále podílejí na diferenciaci Th1 a Th17 lymfocytů (Park *et al.*, 2015).

Střevní mikrobiota se také přímo či nepřímo podílí na migraci Th17 lymfocytů do střevní sliznice. Některé bakterie stimulují DC k produkci IL-23 (Ivanov *et al.*, 2009) nebo invariantní T-lymfocyty k produkci IL-22 (Sanos *et al.*, 2009), což se na této expanzi významně podílí. Th17 lymfocyty mají důležitou fyziologickou funkci. Produkci cytokinu IL-17 atrahují neutrofilů do místa zánětu, zvyšují expresi AMP buňkami epitelu a podporují funkce střevní bariéry (Maxwell *et al.*, 2015).

2.3.3. Další funkce mikrobioty

Mikrobiota má spoustu dalších vlastností prospěšných pro hostitele. Chrání svého hostitele kompeticí o živiny a o prostor s patogeny GI traktu (Chung *et al.*, 2012; Heinken *et al.*, 2014; Ivanov *et al.*, 2009). Například bakterie *L. reuteri* konvertuje glycerol na antimikrobiální faktor reuterin, který inhibuje růst bakterií jako *Salmonella enterica* a *Vibrio cholerae* (Spinler *et al.*, 2008). *Lactobacillus johnsonii* je dokonce u myši protektivní vůči infekci respiračním syncytiálním virem (Fonseca *et al.*, 2021).

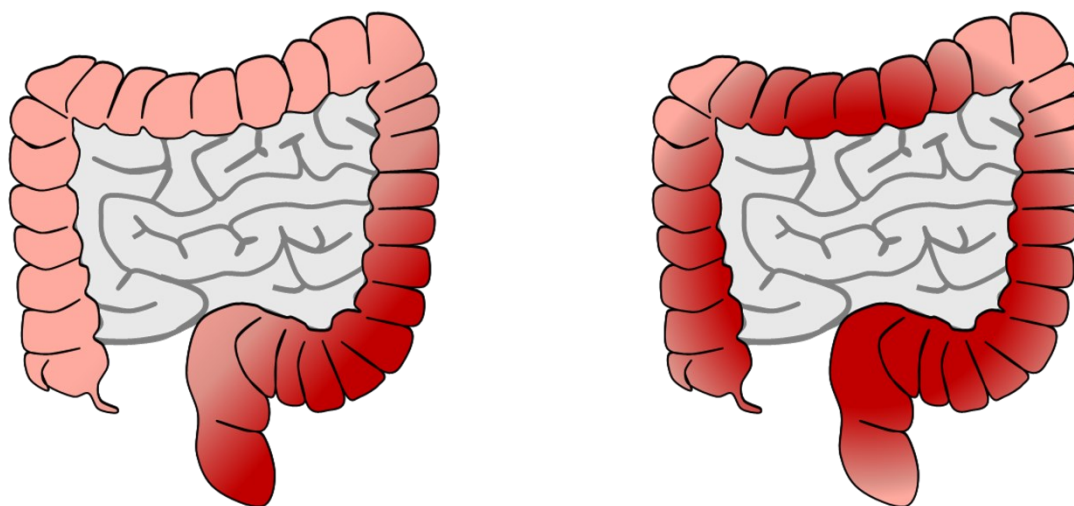
Střevo obsahuje velké množství serotoninu (5-hydroxytryptamin, 5-HT). Až 90 % tělního 5-HT je produkováno specializovanými endokrinními buňkami střeva. Střevní mikrobiota produkcí SCFA indukuje v těchto buňkách expresi enzymu tryptofan hydroxylázy, který je esenciální pro syntézu 5-HT (Reigstad *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2015). 5-HT je neurotransmitter a hormon se spoustou biologických funkcí. Jeho snížené hladiny jsou asociovány například s anorexií (Prochazkova *et al.*, 2021).

SCFA produkované mikroorganismy se dále podílejí na správné funkci střevní bariéry. Zvyšují expresi proteinů těsných spojů (R. Wang *et al.*, 2022) či glukagon-podobného peptidu (Cani *et al.*, 2009), který je produkován enteroendokrinními buňkami a parakrinně stimuluje proliferaci a inhibuje apoptózu buněk epitelu (Tsai *et al.*, 1997). Mikroby také působí na Panethovy buňky, které následně produkují faktory důležité pro vaskularizaci střeva (Stappenbeck *et al.*, 2002).

3. Nespecifické střevní záněty (IBD)

Nespecifické střevní záněty (IBD) jsou zánětlivá střevní onemocnění, která zahrnují především Crohnovu chorobu (CD) a ulcerózní kolitidu (UC). Zánět u CD může postihnout diskontinuálně jakoukoliv část GI traktu, ačkoli nejčastěji postihuje terminální ileum a tlusté střevo. Histologicky se projevuje transmurálním zánětem a granulomy. Oproti tomu zánět u UC postihuje kontinuálně pouze rektum a/nebo tlusté střevo (obr. 2). Zánět je omezen pouze na sliznici a submukózu. Typický je vývoj kryptových abscesů a vředů (Guan, 2019).

V České republice (ČR) je nejčastější formou CD forma ileocekální, která se typicky projevuje ztrátou hmotnosti, zvýšenými teplotami, bolestmi břicha a někdy také průjmem. Téměř polovinu pacientů s CD postihují také mimostřevní projevy nemoci týkající se především kloubů, kůže a očí. Oproti tomu u UC je charakteristickým klinickým obrazem krvavá stolice, průjmy a pocit neúplného vyprázdnění i po defekaci. Oproti CD mají pacienti s UC méně často mimostřevní potíže (Bortlík, 2018).



Ulcerózní kolitida

Crohnova choroba

Obř. 2: Lokality zánětu u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. U ulcerózní kolitidy zánět postihuje kontinuálně rektum a/nebo část nebo celé tlusté střevo. Oproti tomu u Crohnovy choroby může zánět diskontinuálně postihnout jakoukoliv část gastrointestinálního traktu, nejčastěji pak terminální ileum a tlusté střevo. (Převzato a upraveno podle <https://www.upopolis.com/docs/crohns-colitis/>)

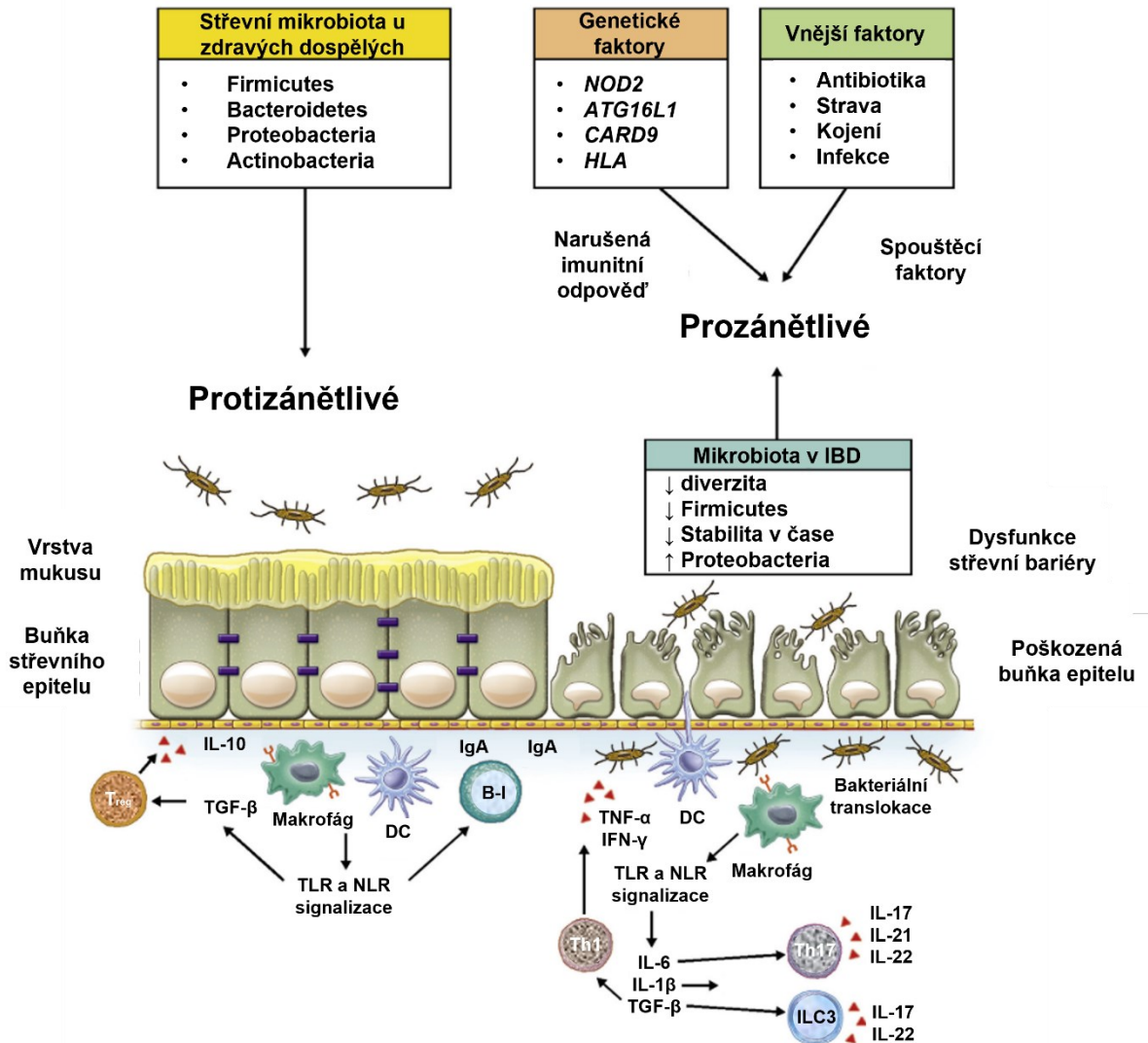
IBD má nejvyšší prevalenci v Evropě a v Severní Americe. Například CD postihuje v Německu 322/100 tis. lidí a UC postihuje 505/100 tis. lidí v Norsku (Ng *et al.*, 2017). V ČR byla prevalence v roce 2015 u CD 205,9/100 tis. lidí a u UC 236,1/100 tis. lidí. Zároveň se v ČR zvyšuje incidence IBD (tab. 1). U CD se z 12,8 v roce 2007 zvýšila na 22,7/100 tis. lidí v roce 2015, zatímco u UC se z 16,6 zvýšila na 27,6/100 tis. lidí (Jarkovský *et al.*, 2017). Zvyšuje se také incidence IBD v pediatrické populaci, která se zvýšila z 3,8/100 tis. v roce 2002 na 14,7/100 tis. lidí v roce 2017 (z 2,9 na 9,8/100 tis. u CD a z 0,9 na 4,0/100 tis. u UC) (Jabandziev *et al.*, 2020). Prevalence i incidence se v posledních desetiletích rapidně zvýšily, nicméně v západním světě se incidence obecně stabilizuje (Ng *et al.*, 2017).

Tab. 1: Vzdělání incidence IBD v České republice podle (Jarkovský *et al.*, 2017) a (Jabandziev *et al.*, 2020).

Diagnóza	Incidence CD [/100 tis. lidí]				Incidence UC [/100 tis. lidí]			
	2002	2007	2015	2017	2002	2007	2015	2017
IBD u dětí	2,9	-	-	9,8	0,9	-	-	4,0
IBD u dospělých	-	12,8	22,7	-	-	16,6	27,6	-

3.1. Patogeneze IBD

V patogenezi IBD hrají důležitou roli genetické a environmentální faktory, dysregulace imunitního systému a dysbióza střevní mikrobioty. Předpokládá se, že u geneticky predisponovaných jedinců může dojít k patologickým změnám funkce střevní bariéry, které mají za následek průnik komenzálních mikroorganismů či jejich částí z lumen skrz střevní stěnu. To má za následek častější kontakt imunitních buněk hostitele s mikrobiálními antigeny, jejich aktivaci a migraci do střevní stěny, kde začnou produkovat prozánětlivé cytokiny způsobující chronický zánět (obr. 3; S. H. Lee *et al.*, 2018).



Obr. 3: Patogeneze nespecifických střevních zánětů (IBD). Za fyziologických podmínek imunitní systém hostitele nevyvolává patologickou zánětlivou reakci vůči střevní mikrobiotě. U geneticky predisponovaných jedinců však může v kombinaci s vnějšími faktory dojít k narušení střevní bariéry a k průniku komenzálních mikrobů z lumen střeva. Dendritické buňky (DC) a makrofágy mikroby rozpoznávají a produkují prozánětlivé cytokiny, které indukují rozvoj pomocných T-lymfocytů (Th)1, Th17 a přirozených lymfoidních buněk (ILC)3 imunitní odpověď. Tyto buňky dále reagují na střevní mikroorganismy a produkují cytokiny, které způsobují patologické změny střevní tkáně. (Převzato a upraveno podle Glassner *et al.*, 2020)

3.1.1. Genetická predispozice

IBD je multifaktoriální onemocnění. Na jeho rozvoji se tedy podílí genetické i environmentální faktory, což potvrzují studie na jednovaječných dvojčatech. Bylo zjištěno, že CD je podmíněno geneticky více než UC. Konkordance CD mezi dvojčaty byla 50 %, přičemž měla nemoc podobný trend vývoje – začala se projevovat ve stejném věku a na stejné lokalitě (Halfvarson *et al.*, 2003). Protože ne u všech dvojčat se nemoc projevila, musí v jejím rozvoji hrát roli také faktory vnějšího prostředí. Jejich význam byl demonstrován v Kanadě, kde je jedna z nejvyšších incidencí IBD. Imigranti zde mají obecně nižší riziko rozvoje nemoci než rezidenti, nicméně děti imigrantů mají již incidenci stejnou jako rezidenti. Imigranti mají vyšší riziko rozvoje IBD, pokud přicestují v mladším věku (Benchimol *et al.*, 2015).

Dnes je známo přibližně 250 nepřekrývajících se rizikových lokusů pro rozvoj IBD. Tyto lokusy se zapojují do udržování střevní homeostázi regulací střevní bariéry a slizniční imunity (Guan, 2019). Nejvýznamnější je polymorfismus v genu pro nukleotidovou vazebnou oligomerizační doménu (*NOD*)2 a v genu pro protein související s autofagií 16 jako 1 (*ATG16L1*).

Polymorfismus v genu *NOD2* je asociován s CD (Ogura *et al.*, 2001). *NOD2* je exprimován především monocyty a jde o intracelulární receptor pro bioaktivní fragment peptidoglykanu, zvaného muramyl dipeptid (MDP). MDP je součástí buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Po jeho navázání na *NOD2* dochází ke konformační změně receptoru a k jeho navázání na adaptorový protein RIP2. Následkem je aktivace NF- κ B dráhy a sekrece prozánětlivých cytokinů (Guan, 2019).

NOD2 protein se také účastní procesu autofagie. V místě vstupu bakterie do hostitelské buňky se *NOD2* akumuluje a navazuje další protein, *ATG16L1*. To vede k autofagii invadující bakterie. S CD je asociována mutace v *NOD2* genu, kvůli které se protein sice akumuluje po vstupu bakterie u cytoplazmatické membrány, ale nenavazuje *ATG16L1* a tudíž nedochází k autofagii (Travassos *et al.*, 2010). *NOD2* deficience je proto spojena s dysbiózou střevní mikrobioty. *NOD2*^{-/-} myši mají jiné mikrobiální složení než myši konvenční, na které je dysbiotická mikrobiota přenositelná při společném chovu (Al Nabhani *et al.*, 2016; Rehman *et al.*, 2011). *NOD2*^{-/-} myši mají navíc v tenkém střevě abnormální expresi AMP a vyšší poměr IEL exprimujících IFN- γ . (Ramanan *et al.*, 2014).

Konvenční myši, které jsou umístěné k *NOD2*^{-/-} nebo *RIP2*^{-/-} myším vykazují vyšší náchylnost ke střevní kolitidě indukované dextranem sulfátem sodným (DSS). Myši po společném chovu abnormálně exprimují molekuly zapojené do funkce střevní bariéry ještě před experimentálním vyvoláním zánětu. Poškození sliznice tedy způsobuje již samotná mikrobiota (Couturier-Maillard *et al.*, 2013).

Pro rozvoj CD je rizikový také polymorfismus v genu *ATG16L1* (Hampe *et al.*, 2007), který způsobuje zvýšené štěpení proteinového produktu. Vyšší štěpení *ATG16L1* kaspázou-3 vede k narušení bazální autofagie a k produkci prozánětlivých cytokinů, které způsobují chronický zánět střeva. Myši s tímto polymorfismem mají defektní odbourávání patogenní bakterie *Yersinia enterocolitica* a zároveň mají

vyšší produkci zánětlivých cytokinů (Murthy *et al.*, 2014). Myši s deletovaným *ATG16L1* genem mají redukované množství T_{reg} buněk v lamina propria a naopak mají vyšší zastoupení Th2 lymfocytů, které reagují proti střevní mikrobiotě indukcí produkce IgG1 a IgA protilátek (Kabat *et al.*, 2016).

S rozvojem IBD je dále asociován polymorfismus v genové oblasti hlavního histokompatibilního komplexu (*MHC*) (Cleyne *et al.*, 2016; Goyette *et al.*, 2015; H.-S. Lee *et al.*, 2018). CD je spojena s polymorfismem v genu *IL2RA* (Huang *et al.*, 2017) a *IL23R* (Duerr *et al.*, 2006) či s větším množstvím kopií genu pro α -defensin (*DEFA*)1 (Jespersgaard *et al.*, 2011). UC je spojena s polymorfismem v genech účastnících se mezibuněčných spojů jako *HNF4A*, *CDH1* a *LAMB1* (Barrett *et al.*, 2009).

3.1.2. Dysregulace imunitního systému

CD a UC se i přes podobné klinické symptomy liší v patofyziologii. Historicky se uvádí, že CD je spojena s Th1/Th17 imunitní odpovědí, zatímco UC s Th2 imunitní odpovědí. Ve skutečnosti je však toto rozdělení velmi zjednodušené a každým rokem dochází k novým poznatkům.

Th17 lymfocyty, ILC3 a neutrofily

V indukci T-buněčné odpovědi na mikrobiální antigeny hrají významnou roli DC, které následně stimulují vývoj Th17 buněk. V patofyziologii IBD je jedním z nejdůležitějších mikrobiálních antigenů flagelin, který je ligandem receptoru podobného Toll (TLR)5. DC po navázání flagelinu na tento jejich povrchový receptor produkují cytokin IL-23, čímž se podílejí na rozvoji Th17 a ILC3 imunitní odpovědi (Kinnebrew *et al.*, 2012; Uematsu *et al.*, 2008). Rozvoj této odpovědi podporují také makrofágy, které po stimulaci lipopolysacharidem (LPS) produkují cytokiny IL-1 β (Kleinschek *et al.*, 2009; McAlindon *et al.*, 1998) a IL-23 (Bauché *et al.*, 2020; Mizuno *et al.*, 2014).

Diferenciované Th17 a ILC3 buňky dále produkují cytokiny IL-17, IL-21, IL-22 a IL-23. Množství těchto buněk je zvýšeno v zanícené tkáni tlustého střeva pacientů s CD (Geremia *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2006) a podobně existuje mnoho prací, které u těchto pacientů popisují změněné hladiny Th17 cytokinů. Nicméně, výsledky takových studií jsou často protichůdné a popisující opačné trendy.

Příkladem kontrastních výsledků může být detekce hladin cytokinů IL-21 a IL-17. Zatímco v jedné studii je popsána vyšší exprese cytokinu IL-21 u pacientů s CD a zároveň jeho spojitost s rozvojem experimentální kolitidy u myši (Holm *et al.*, 2018), jiná studie popisuje u DSS-indukované kolitidy protektivní efekt tohoto cytokinu (Y. Wang *et al.*, 2016). Podobně kontroverzní je také cytokin IL-17. Autoři některých studií popisují jeho zvýšené hladiny ve střevní sliznici pacientů s CD (Hegazy *et al.*, 2017; Wedebye Schmidt *et al.*, 2013) a naopak jiní popisují hladiny snížené (Poholek *et al.*, 2019; Y. Wang *et al.*, 2016). Obecným předpokladem je, že je tento cytokin v případě CD spíše protektivní (Fieldhouse *et al.*, 2020; Ju *et al.*, 2020; J. S. Lee *et al.*, 2015; O'Connor Jr *et al.*, 2009).

Th17 lymfocyty se produkcí cytokinů, především produkcí IL-17, podílejí na chemotaxi neutrofilů do místa zánětu. Bylo demonstrováno, že pacienti s IBD mají v krevní cirkulaci vyšší množství neutrofilů než zdraví jedinci (Langley *et al.*, 2021; Okba *et al.*, 2019).

Th1 lymfocyty, makrofágy a CD8⁺ a invariantní T-lymfocyty

DC po pohlcení mikrobiálních antigenů stimulují během chronického střevního zánětu nejen rozvoj Th17 imunitní odpovědi, ale také Th1. Diferenciované Th1 lymfocyty migrují z místa aktivace, typicky z mLN, do střevní sliznice, kde jsou reaktivovány makrofágy (Laffont *et al.*, 2010; Sakuraba *et al.*, 2009). Pod vlivem IL-23 mohou Th1 buňky vznikat také z Th17 prekurzorů (Harbour *et al.*, 2015).

Pacienti s CD mají zvýšené množství Th1 lymfocytů v krevní cirkulaci (Hegazy *et al.*, 2017) i v tkáni tlustého střeva (O'Connor Jr *et al.*, 2009). V séru mají také zvýšené hladiny chemokinů, které po navázání na receptor CXCR3 atrahují Th1 lymfocyty do střevní sliznice (Singh *et al.*, 2016). Pacienti s CD mají ve střevní tkáni zvýšené množství CD4⁺ CXCR3⁺ T-lymfocytů (Yuan *et al.*, 2001), které mohou produkovat velké množství prozánětlivých cytokinů jako IL-1 β , IL-6, TNF- α a IFN- γ (Laffont *et al.*, 2010; Maerten *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2016).

Další buněčnou populací, která hraje významnou roli v patofyziologii CD, jsou makrofágy. Pacienti s CD mají ve střevní sliznici přítomné CD14⁺ makrofágy, které fagocytují komenzální mikroby a produkují prozánětlivé cytokiny. Například po navázání flagelinu na TLR5 na jejich buněčném povrchu produkují TNF- α (Lodes *et al.*, 2004). Tento cytokin dále působí na T-lymfocyty, které následně produkují další prozánětlivý cytokin, IFN- γ (Kamada *et al.*, 2008; Murch *et al.*, 1993).

Na rozvoji CD se podílejí i další buněčné typy. V lamina propria mají pacienti s CD vyšší zastoupení CD8⁺ T-lymfocytů, které mohou produkovat IFN- γ , cytotoxické mediátory nebo antimikrobiální peptidy rodiny S100A (Jaeger *et al.*, 2021). Pacienti s CD mají v krevní cirkulaci a v mLN také signifikantně větší množství iNKT buněk, které rozpoznávají CD1d a mohou tedy reagovat proti lipidům a jiným metabolitům mikrobů (Rosati *et al.*, 2022).

Th2 lymfocyty, ILC2 a B-lymfocyty

Zatímco CD je spojena především s Th1 a Th17 lymfocyty, s UC je spojena především Th2 imunitní odpověď. Bylo popsáno, že Th2 lymfocyty migrují do střevní tkáně v reakci na střevní komenzální mikroby (Britton *et al.*, 2019), kde produkují cytokiny jako IL-4, IL-5 a IL-13.

Pacienti s UC mají ve sliznici tlustého střeva zvýšené hladiny cytokinu IL-33 i jeho receptoru ST2 (Beltrán *et al.*, 2010). Tento cytokin je produkován především fibroblasty a střevními buňkami epitelu a endotelu (Chan *et al.*, 2019) a působí na Th2 lymfocyty, které stimuluje k produkci IL-5 a IL-13. Cytokin IL-13 může být produkován také ILC2 buňkami, jejichž množství je u pacientů s UC zvýšené

(Mazzurana *et al.*, 2021). IL-13 následně může způsobovat patologické změny střevní tkáně, konkrétně hyperplazii a hypertrofii buněk epitelu (Schmitz *et al.*, 2005).

IL-33 kromě působení na Th2 lymfocyty také stimuluje B-lymfocyty k produkci protilátek (Schmitz *et al.*, 2005). U pacientů s UC i s CD byly popsány B-lymfocyty, které produkují abnormální IgA protilátky. Ty mohou více opsonizovat zdraví prospěšné bakterie a tím jejich množství redukovat, zatímco mohou méně opsonizovat potenciální patogeny a tím umožňovat jejich expanzi ve střevě (Michaud *et al.*, 2022; Timmermans *et al.*, 2016). Nicméně pacienti s CD mají v porovnání se zdravými jedinci redukcii IgA protilátek specifických pro bakterie *Faecalibacterium* a *Bacteroides*. To může být způsobeno silnou T-buněčnou odpovědí vůči těmto mikrobům a tedy k snížení jejich množství, což může mít za následek právě snížení tvorby protilátek (Coufal *et al.*, 2019).

T_{reg} lymfocyty

T_{reg} buňky jsou důležité pro udržení homeostázi na povrchu střeva. Produkují především 2 protizánětlivé cytokiny – IL-10 a TGF-β. IL-10 účinně inhibuje rozvoj Th17 imunitní odpovědi (Chaudhry *et al.*, 2011), zatímco TGF-β působí na makrofágy, které následně zvyšují expresi IL-10 (Rani *et al.*, 2011).

Role T_{reg} v patofyziologii IBD zůstává neobjasněná. Například pacienti s UC mají vyšší množství T_{reg} buněk v krevní cirkulaci než zdraví jedinci, což naznačuje, že nejspíš není defektní jejich počet, ale jejich funkce a homing do střevní sliznice (Baird *et al.*, 2016; Boland *et al.*, 2020).

3.1.3. Dysbióza střevní mikrobioty

Dysbióza střevní mikrobioty je spjata s probíhajícím zánětem i s některými chorobami (Manor *et al.*, 2020; Zhernakova *et al.*, 2016). Například je různou měrou zapojena do různých onemocnění, například kolorektálního karcinomu (Couturier-Maillard *et al.*, 2013), akutní myeloidní leukémie (R. Wang *et al.*, 2022) či metabolického syndromu (Bäckhed *et al.*, 2004). U některých nemocí dochází k invazi zdraví škodlivých bakterií (například kolorektální karcinom) a u některých naopak ke snížení výskytu zdraví prospěšných bakterií (například IBD) (Duvall *et al.*, 2017).

Bakterie

Účast mikroorganismů na patogenezi IBD potvrzují studie, ve kterých antibiotická léčba vedla ke klinickému zlepšení nemoci (Glick *et al.*, 2019). Pacienti s IBD mají v porovnání se zdravými jedinci nižší diverzitu střevní mikrobioty. Mají úbytek relativní abundance bakteriálního kmene Firmicutes a naopak vyšší zastoupení kmene Proteobacteria (Sokol *et al.*, 2017). Pacienti s CD mají zároveň odlišné mikrobiální složení od pacientů s UC (Pascal *et al.*, 2017; Sokol *et al.*, 2017).

Pravděpodobně nejvýznamnější je úbytek bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* u pacientů s CD (Joossens *et al.*, 2011). Tato bakterie je významným producentem protizánětlivého butyrátu a nezávisle

na jeho produkci může také snižovat aktivaci NF- κ B dráhy. Může tedy snižovat produkci prozánětlivých cytokinů a naopak zvyšovat produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Sokol *et al.*, 2008). Existují studie, které popisují asociaci mezi abundancí *F. prausnitzii* a tíží nemoci, popřípadě rizikem relapsu (Sokol *et al.*, 2008; Varela *et al.*, 2013). U pacientů s UC je úbytek této bakterie více kontroverzní (Pascal *et al.*, 2017; Sankarasubramanian *et al.*, 2020; Varela *et al.*, 2013).

Obecně mají pacienti s CD střevní mikrobiotu charakteristickou menší produkcí protizánětlivého butyrátu a naopak vyšší degradací ochranné vrstvy hlenu, což může vést k častější bakteriální translokaci a k vyšší propustnosti střevní bariéry (Joossens *et al.*, 2011). Pacienti s UC mají nižší abundanci prospěšné bakterie *P. copri* (Halfvarson *et al.*, 2017) a naopak vyšší abundanci bakterie *Bacteroides fragilis* (Weng *et al.*, 2019) a rodů *Ruminococcus* a *Clostridium* (Sankarasubramanian *et al.*, 2020). Obecně mají vyšší zastoupení potenciálně patogenních anaerobních taxonů (Lepage *et al.*, 2011).

V úvahu přichází použití probiotik v léčbě IBD. Probiotika mohou měnit složení střevní mikrobioty. Mechanismus účinku probiotik může být buď eliminace škodlivých taxonů, zlepšení funkce střevní bariéry nebo modulace slizniční a systémové imunitní odpovědi (Zákostelská *et al.*, 2011). Opakované podávání bakterie *Lactobacillus casei* vede ke zvýšení relativní abundance některých SCFA-produkujících bakterií, a naopak dochází k úbytku potenciálně škodlivých druhů. Po zastavení podávání probiotik se však střevní mikrobiota vrací k původnímu stavu (Hou *et al.*, 2020).

Probiotická bakterie *L. casei* je schopna adherovat ke střevním epitelovým buňkám a snižovat schopnost invazivní *Escherichia coli* izolované z pacientů s CD adherovat a pronikat do epitelu (Ingrassia *et al.*, 2005). U myši podávání lyzátu z této bakterie vede k protekci před těžkým průběhem DSS-indukované kolitidy. Je zlepšena funkce střevní bariéry, dochází k expanzi T_{reg} buněk do mLN a je snížena produkce prozánětlivých cytokinů jako IL-6 a IFN- γ (Zákostelská *et al.*, 2011). Podobně jiná probiotická bakterie, *L. reuteri*, snižuje expresi TNF- α leukocyty (Christensen *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2008).

Houby a viry

Pacienti s IBD mají také dysbiózu hub a virů. Stejně jako u bakterií, mají sníženou diverzitu mykobioty. Kmen Basidiomycota je více zastoupený, a naopak kmen Ascomycota je zastoupený méně. Mají úbytek druhů *Malassezia sympodialis* a *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* stimuluje buňky k produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 a pozitivně asociuje s některými bakteriemi, které jsou u pacientů s IBD také redukovány (Sokol *et al.*, 2017). Pacienti s CD v aktivní fázi mají specifické protilátky proti *S. cerevisiae* (Walker *et al.*, 2004). V aktivní fázi mají také zvýšené zastoupení houby *Candida albicans* (Sokol *et al.*, 2017), která degraduje muciny, které jsou hlavní složkou hlenu (Colina *et al.*, 1996).

Co se týče virů, pacienti s IBD mají vyšší abundanci bakteriofágů *Caudovirales*. To může být způsobeno buď indukci profágů z komenzálních bakterií nebo introdukcí nových virů vnějšího prostředí.

Bakteriofágy mohou napadat a lyzovat bakterie, které následně uvolňují proteiny, lipidy a nukleové kyseliny do okolí, čímž mohou stimulovat leukocyty k rozvoji zánětu (Norman *et al.*, 2015).

3.2. Biologická léčba IBD

Kromě konvenční léčby, která zahrnuje aminosalicyláty, kortikoidy, imunosupresiva a chirurgickou léčbu, je jedním z majoritních současných terapeutických přístupů v léčbě IBD biologická léčba. První schválené a dosud nejvíce používané jsou protilátky proti cytokinu TNF- α . Dále se v současnosti v ČR používají monoklonální protilátky specifické pro leukocytární intergrinové receptory $\alpha 4\beta 7$ a pro p40 podjednotku společnou pro cytokiny IL-12 a IL-23 (Bortlík, 2018; Bortlík *et al.*, 2019).

3.2.1. Faktor nekrotizující nádory (TNF)- α

TNF- α je prozánětlivý cytokin, který je produkován ve formě transmembránového prekurzoru na buněčném povrchu aktivovaných makrofágů, lymfocytů a dalších buněk. Následně je z povrchu odštěpen metaloproteinázou a jako solubilní cytokin plní své biologické funkce přes 2 typy TNF receptoru. V obou formách jde o homotrimer, skládající se z 26 kDa velkých monomerů v případě transmembránového TNF (tmTNF)- α a ze 17 kDa velkých monomerů v případě solubilního TNF (sTNF)- α . První typ receptoru (TNF-R1) je exprimovaný na téměř všech jaderných buňkách, zatímco typ druhý (TNF-R2) je exprimovaný především endotelovými a hematopoetickými buňkami. Oba typy receptoru jsou homotrimery. Vazba sTNF- α či tmTNF- α indukuje na základě metabolického stavu buňky apoptózu či aktivaci NF- κ B dráhy. tmTNF- α funguje na principu kontakt buňka-buňka a funguje jako ligand i jako receptor přenášející signál do buňky (tzv. reverzní signál) (Mitoma *et al.*, 2018).

3.2.2. Anti-TNF- α terapie

U IBD jsou v ČR v klinické praxi dosud 3 monoklonální protilátky proti TNF- α : infliximab (IFX), adalimumab (ADA) a golimumab (GOL) (obr. 4; Bortlík *et al.*, 2019). Všechny 3 jsou IgG1 izotypu a mají biologický efekt na sTNF i tmTNF a na buňky exprimující Fc receptor (Mitoma *et al.*, 2018). IFX je chimérická protilátka podávající se intravenózně a skládající se ze 75 % z lidské, konstantní části a z 25 % z myší, variabilní části. Zřejmě myší část způsobuje imunogenitu IFX, která vede k tvorbě specifických protilátek. Je schválen také pro léčbu dalších zánětlivých chorob, jako například pro psoriatickou a revmatickou artritidu (Lichtenstein, 2013). Poločas IFX je 8-10 dní (Mitoma *et al.*, 2018).

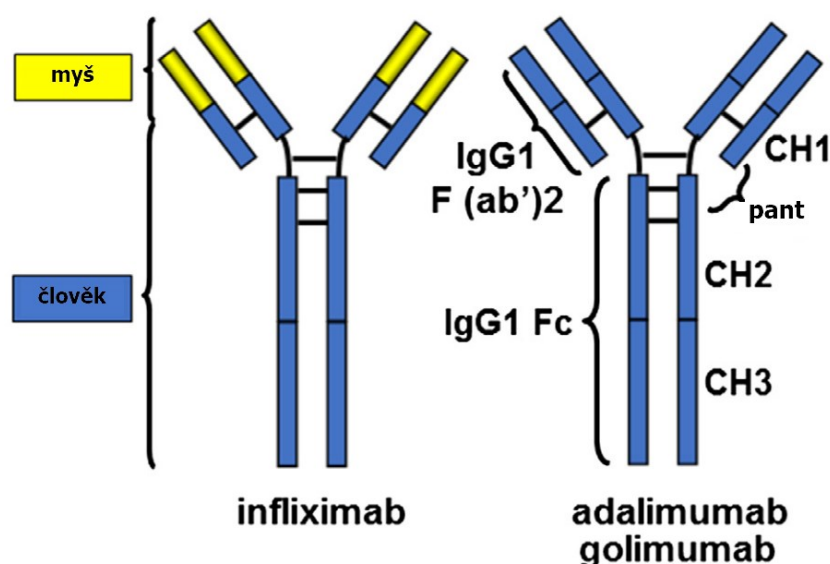
ADA a GOL jsou rekombinantní, plně humanizované protilátky. Obě protilátky si pacienti aplikují sami subkutánně a jsou také schváleny u dalších zánětlivých chorob, jako u psoriatické a revmatoidní artritidy. ADA má poločas 10-20 dní, zatímco GOL 9-15 dní (Mitoma *et al.*, 2018).

Degradace anti-TNF- α protilátek ze systémového oběhu není dosud zcela popsána. Nejspíš je zprostředkována proteolytickým štěpením po receptor-zprostředkované endocytóze. Další mechanismus

by mohl být závislý na neonatálním Fc receptoru, který je exprimovaný na endotelových buňkách a který vyvazuje cirkulující IgG protilátky s navázaným antigenem (Lichtenstein, 2013).

IFX, ADA i GOL vykazují lineární závislost mezi podanou dávkou a jejich hladinou v krevní plazmě (Lichtenstein, 2013). Všechny tři anti-TNF- α protilátky mají podobnou vlastnost vázat a neutralizovat sTNF- α a vázat se na tmTNF- α a tím blokovat tmTNF- α zprostředkovanou buněčnou smrt. Podobně také blokují signalizaci přes TNF receptor. U cílových buněk mohou indukovat na komplementu závislou cytotoxicitu či na protilátce závislou buněčnou cytotoxicitu. IFX a ADA indukují přes reverzní signalizaci u tmTNF- α exprimujících buněk apoptózu a uvěznění v G0/G1 buněčném cyklu, tím tedy způsobují apoptózu a redukují proliferaci aktivovaných T-lymfocytů (Mitoma *et al.*, 2018) a podporují vznik protizánětlivých makrofágů produkujících IL-10 (Lissner *et al.*, 2015).

Anti-TNF- α protilátky jsou v léčbě IBD velice efektivní (Present *et al.*, 1999) a jejich účinek může být posílen ještě kombinací s jinými léky. U CD i u UC je dosaženo lepších výsledků, pokud je IFX kombinován s imunosupresivem azathioprinem (Colombel *et al.*, 2010; Panaccione *et al.*, 2014).



Obr. 4: Struktura infliximabu, adalimumabu a golimumabu. Infliximab je chimérická protilátka skládající se z myší variabilní části a z lidské konstantní části. Adalimumab a golimumab jsou plně humanizované rekombinantní protilátky. (Převzato a upraveno podle Mitoma *et al.*, 2018)

3.2.3. Primární a sekundární neodpovídavost na anti-TNF- α terapii

Ačkoliv může biologická terapie vést téměř až ke kompletní remisi onemocnění, až jedna třetina pacientů s IBD na ni neodpovídá (primární neodpovídavost) a až 30 % reagujících pacientů na ni v průběhu odpovídat přestane (sekundární neodpovídavost). Přitom může být anti-TNF- α terapie doprovázena řadou vážných nežádoucích účinků, jako například vyšší náchylností k infekcím, rozvojem tuberkulózy či kožními projevy jako psoriaziformní dermatitidou (Atreya *et al.*, 2020). Například ve Francii zároveň biologická terapie pacientů s IBD představuje 84 % ekonomických nákladů ve

zdravotnictví na jejich léčbu, přičemž jeden pacient stojí průměrně 15 775 eur ročně. Dražší jsou ti pacienti, kteří jsou v důsledku primární či sekundární neodpovídavosti nuceni měnit dávky, frekvenci či samotný typ anti-TNF- α protilátky (Lawton *et al.*, 2019). V krátkodobém měřítku až dvě třetiny pacientů, kteří na léčbu přestanou reagovat, po optimalizaci opět odpovídat začnou. Více se tedy vyplatí optimalizovat frekvenci podávání a dávky protilátek, než měnit samotný lék (Guberna *et al.*, 2021).

Potenciální biomarkery odpovídavosti

V současnosti není v klinické praxi používán žádný biomarker predikující odpověď na anti-TNF- α terapii. Takový biomarker by měl v ideálním případě být neinvazivní, validovaný, rychle kvantifikovatelný, finančně nenáročný, snadno reprodukovatelný a neovlivnitelný rušivými faktory (Atreya *et al.*, 2020). Ve své diplomové práci uvádím pouze některé z potenciálních biomarkerů.

Nadějnou se zdála být asociace hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) či fekálního kalprotektinu (fCP) s vnímavostí k terapii. CRP je důležitý protein akutní fáze, který je produkován hepatocyty po stimulaci různými cytokiny včetně TNF- α . Jeho vyšší hladiny před zahájením terapie byly spojeny s vyšší odpovídavostí u pacientů s CD. Vysoké hladiny CRP během léčby byly naopak spojeny se sekundární neodpovídavostí a s relapsem nemoci (Jürgens *et al.*, 2011). fCP je antimikrobiální molekula uvolňující se z cytoplazmy neutrofilů. Pacienti s IBD s jeho nižšími hladinami odpovídali na anti-TNF- α terapii lépe, než ti s hladinami vyššími (Guidi *et al.*, 2014). Oba tyto biomarkery jsou však dodnes kontroverzní.

Kontroverzní dosud zůstává také farmakogenomika. Polymorfismus v genu *NOD2*, který je asociován s rozvojem CD, se nezdá být predikujícím odpověď na anti-TNF- α terapii (Mascheretti *et al.*, 2002). Primární neodpovídavost u pacientů s CD je naopak asociována s polymorfismem v genech pro různé komponenty IS. Takovými geny jsou například *IL-1R* a *IL-18R* (Barber *et al.*, 2016) či geny regulující NF- κ B dráhu a TNF- α signalizační dráhu (Bank *et al.*, 2019).

Pacienti s IBD s hladinou vitamínu D (25-hydroxivitaminu D) pod 30 ng/ml před zahájením léčby rychleji anti-TNF- α terapii přerušují, než ti s hladinami vyššími (Zator *et al.*, 2014). Deficience vitamínu D je asociována s výskytem antinukleárních protilátek jak u pacientů s IBD (Santos-Antunes *et al.*, 2016), tak u zdravých jedinců (Ritterhouse *et al.*, 2011). Pacienti s těmito protilátkami před zahájením terapie musejí častěji přerušit léčbu. To může být způsobeno vyšší humorální imunitou, a tedy i produkcí protilátek proti anti-TNF- α protilátkám (Santos-Antunes *et al.*, 2016). Sledování hladin vitamínu D u anti-TNF- α terapie by tedy mohlo být potenciálním biomarkerem úspěšnosti terapie.

Nadějným biomarkerem by mohla být také střevní mikrobiota a metabolom. Například vysoká abundance bakterií *Eubacterium rectale* a *Bifidobacterium* spp. při zahájení anti-TNF- α terapie má spojitost s útlumem střevního zánětu. Abundance těchto a dalších bakterií je prediktivní u vnímavosti na terapii. Zároveň pacienti s vyšší diverzitou a podobností mikrobioty se zdravými jedinci mají ve

3 měsících lepší průběh biologické léčby (Kolho *et al.*, 2015). Pacienti s CD mají redukované množství bakteriálních taxonů Lachnospiraceae a *Roseburia*, což jsou významní producenti SCFA. Vyšší abundance těchto a několika dalších bakterií je asociována s úspěšnou anti-TNF- α terapií (Yilmaz *et al.*, 2019). Odpovídající pacienti mají vyšší hladiny bakterie *F. prausnitzii*, zatímco neodpovídající mají vyšší zastoupení bakterie *Escherichia* (Magnusson *et al.*, 2016; Sanchis-Artero *et al.*, 2021).

In silico analýza ukázala, že pacienti s IBD nedosahující remise po anti-TNF- α terapii mají na začátku léčby narušenou metabolickou výměnu mezi bakteriemi. Neodpovídající pacienti mají nižší výměnu butyrátu a komponentů účastnících se jeho syntézy (Aden *et al.*, 2019). Primární neodpovídavost také koreluje s některými sérovými lipidy, sérovými a fekálními žlučovými kyselinami a histidinem v moči. Pomocí fekálních lipidů jde u pacientů s CD predikovat odpovídavost se senzitivitou 92 % a specificitou 61 %. Neodpovídající pacienti mají vyšší hladiny cirkulujících primárních žlučových kyselin. Ty mění střevní mikrobiota na sekundární, což zdůrazňuje její důležitost v patogenezi IBD (Ding *et al.*, 2020).

Nadějnou se zdá být spousta dalších faktorů, například klasifikace a vážnost nemoci (Atreya *et al.*, 2020), předchozí zkušenost s biologickou terapií (Guberna *et al.*, 2021), délka průběhu nemoci (Barber *et al.*, 2016) či hladiny některých AMP a cytokinů. Například neodpovídající pacienti s UC mají vysoké hladiny AMP a cytokinů IL-12 a IL-17 (Magnusson *et al.*, 2016). Neodpovídající pacienti s UC mají sníženou imunitní reakci na agonisty TLR a také sníženou TNF- α a IL-1 β odpověď v porovnání se zdravými jedinci a odpovídajícími pacienty. Jejich mononukleární buňky v periferní krvi po stimulaci produkují více Th1 cytokinů a méně IL-10. V periferní krvi mají také méně plasmacytoidních DC a naopak více T_{reg} buněk, což naznačuje jejich narušený homing do lamina propria a mLN (Baird *et al.*, 2016).

Cíle práce

Crohnova choroba i ulcerózní kolitida je spojena s dysbiózou střevní mikrobioty a s neadekvátní imunitní odpovědí vůči komenzálním mikroorganismům střeva. V současnosti je jednou z nejčastějších léčebných strategií nespecifických střevních zánětů (IBD) terapie monoklonálními protilátkami blokujícími cytokin TNF- α . Přestože může tato terapie vést až téměř ke kompletní remisi onemocnění, významné procento pacientů na ni neodpovídá nebo na ni v průběhu odpovídat přestane. Mechanismus, který je zodpovědný za vznik neodpovídavosti, zůstává dosud neznámý. Cílem mé diplomové práce proto bylo charakterizovat změny ve složení střevní mikrobioty a charakterizovat imunitní odpověď vůči komenzálním mikrobům během terapie anti-TNF- α protilátkami u pacientů s IBD.

Konkrétní cíle byly:

1. Porovnat změny ve složení střevní mikrobioty u pacientů s IBD před zahájením a v průběhu anti-TNF- α terapie a u zdravých kontrol
2. Porovnat hladiny sérových biomarkerů souvisejících s imunitní odpovědí vůči mikrobům u pacientů s IBD před zahájením a v průběhu anti-TNF- α terapie a u zdravých kontrol
3. Charakterizovat odpověď mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pacientů s IBD na mikrobiální antigeny před zahájením a v průběhu anti-TNF- α terapie

Materiál a metodika

1. Nábor pacientů a zdravých kontrol

Vzorky pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) podstupujících anti-TNF- α terapii jsme odebrali ve spolupráci s gastroenterologickým oddělením Klinického centra ISCARE a. s. (Praha, Libeň). Zdravé kontroly (HC) jsme odebrali ve spolupráci s Institutem Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM; Praha, Krč). HC tvořili pacienti, kteří podstupovali kolonoskopii z jiného důvodu než kvůli střevnímu zánětu. Vzorky jsme sbírali v časovém rozmezí od listopadu 2018 do prosince 2020.

Kritéria, která museli pacienti s IBD a HC splňovat, aby byli zařazeni do studie, byla:

- Věk 18 – 65 let
- Kavkazské etnikum
- Alespoň 3 měsíce bez užívání antibiotické léčby
- Žádné jiné diagnostikované gastrointestinální a/nebo dermatologické onemocnění
- Pacient nesmí být gravidní ani nesmí kojit

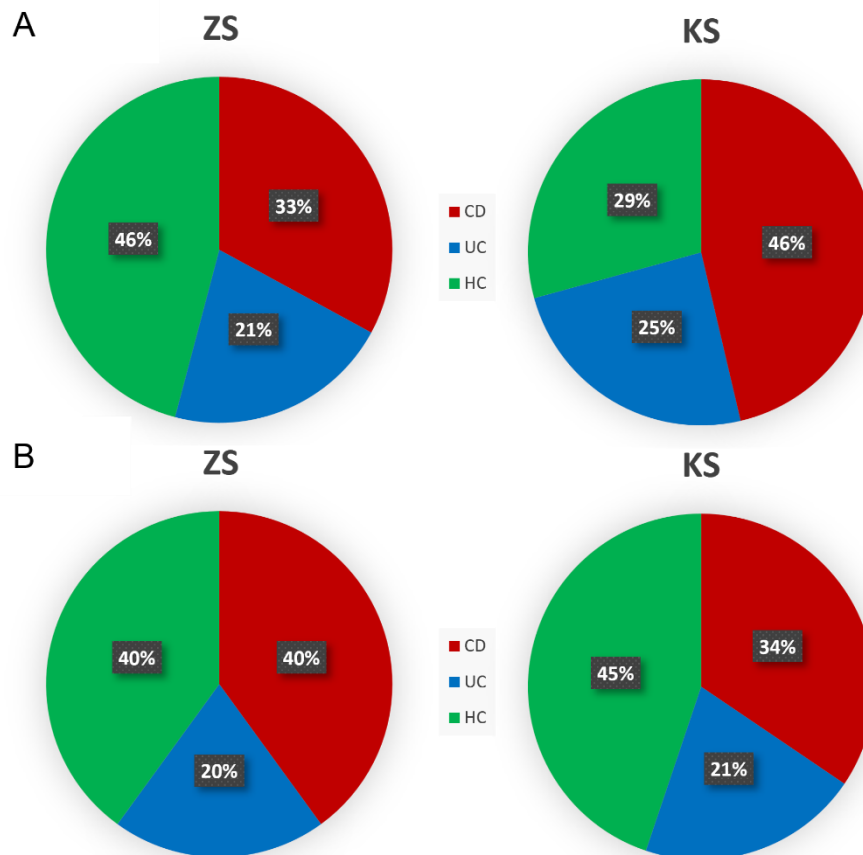
Stolici a krev pacientů s IBD jsme získali v několika časových bodech terapie: před zahájením terapie a v týdnech 2, 8, 14, 20, 26, 32 a 38. 38. týden terapie byl zvolen jako závěrečný bod naší studie, nicméně pacienti s IBD tuto léčbu podstupovali dále. Při každé návštěvě byla závažnost onemocnění hodnocena specializovaným gastroenterologem jako součást rutinního vyšetření. Kromě klinických parametrů k tomu byl využíván Harvey-Bradshawův Index (HBI) pro Crohnovu chorobu (CD; Harvey & Bradshaw, 1980) a částečný Mayo Index (pMayo; Schroeder *et al.*, 1987) pro ulcerózní kolitidu (UC). Pomocí HBI a pMayo a pomocí klinických parametrů, jako pomocí hladin CRP a fCP či pomocí krevního obrazu, gastroenterolog hodnotil odpověď na anti-TNF- α terapii. Hladiny CRP, fCP a dalších klinických biomarkerů byly detekovány v gastroenterologickém oddělení ISCARE a. s.

Stolici a krev HC jsme získali v několika časových bodech, s odstupem mezi prvním a posledním odběrem minimálně 28 týdnů.

Stolici si pacienti s IBD a HC odebírali sami do sterilních zkumavek vhodných pro odběr stolice (FL MEDICAL, Torreglia, Itálie). Odebrané vzorky jsme do dalšího zpracování uložili do -80 °C. V průběhu studie jsme získali stolice 46 pacientů s IBD (28 CD; 18 UC) a 39 HC. Z toho pouze 29 pacientů s IBD (19 CD; 10 UC) a 12 HC dosáhlo konce sledovaného období v rámci naší studie (tab. 2; obr. 5A).

Periferní krev pacientů s IBD a HC odebrala specializovaná zdravotní sestra do 2 zkumavek (DIALAB, Wiener Neudorf, Rakousko) na příslušných pracovištích. Jedna zkumavka obsahovala antikoagulační kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA) a tuto zkumavku jsem použil na izolaci mononukleárních

buněk periferní krve (PBMC). Druhá obsahovala separační gel a použil jsem ji na odběr krevního séra. Z místa odběru jsem krev při pokojové teplotě (RT) transportoval na místo zpracování. Tentýž den jsem z ní odebral sérum a vyizoloval PBMC. Do zpracování jsem krevní sérum uložil do -20 °C a PBMC do -150 °C. Získal jsem krev 38 pacientů s IBD (26 CD; 12 UC) a 26 HC. Z toho pouze 32 pacientů s IBD (21 CD; 11 UC) dosáhlo konce sledovaného období v rámci naší studie (tab. 3; obr. 5B).



Obr. 5: Složení studijní skupiny. (A) Vzorky stolic jsme získali před začátkem anti-TNF- α terapie (začátek studie, ZS) od 28 pacientů s Crohnovou chorobou (CD), 18 pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) a od 39 zdravých kontrol (HC). Na konci studie (KS) terapie jsem vzorky stolic získal od 19 pacientů s CD, 10 pacientů s UC a 12 HC. **(B)** Vzorky krve jsme získali na ZS od 26 pacientů s CD, 13 pacientů s UC a od 26 HC. Na KS jsem vzorky získal od 20 pacientů s CD a 12 pacientů s UC.

V obou případech byla studie schválena lokální etickou komisí institucí ISCARE a. s. (Nr2017/IIa) i IKEM (G 17-06-09). Pacienti a HC potvrdili vstup do studie podepsáním informovaného souhlasu.

Počet pacientů s IBD a HC se mezi začátkem studie (ZS) a koncem studie (KS) lišil z několika důvodů. Jedinci například nedorazili na odběr v daném termínu, nedodali vzorek v daný termín nebo, v případě pacientů s IBD, přerušili nebo změnili medikaci v průběhu sledovaného období.

Tab. 2: Obecná charakteristika pacientů s nespecifickými střevními záněty, od kterých byl získán vzorek stolice na začátku i na konci studie. Zobrazen je medián a první a třetí kvartil. Data s nenormálním rozložením dat byla statisticky hodnocena neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem, data s normálním rozložením dat byla statisticky hodnocena párovým t-testem. Zkratky: BMI (index tělesné hmotnosti); CRP (C-reaktivní protein); WBC (počet bílých krvinek); PLT (krevní destičky); fCP (fekální kalprotektin); ns (nesignifikantní)

	Nespecifické střevní záněty (<i>n</i> = 29)		Δ IBD (<i>p</i> hodnota)
Diagnóza	Crohnova choroba (<i>n</i> = 19)	Ulcerózní kolitida (<i>n</i> = 10)	
Terapie	Infliximab (<i>n</i> = 16)	Adalimumab (<i>n</i> = 13)	
Odpověď na terapii	Ano (<i>n</i> = 22)	Ne (<i>n</i> = 7)	
	Začátek studie	Konec studie	
Věk	31 (25; 41)		
BMI	22,4 (19,84; 24,15)		
CRP	2,6 (1; 4,5)	1,3 (0,65; 3,95)	0,15 (ns)
WBC	7,1 (6; 9,4)	6,2 (5,45; 8,15)	0,17 (ns)
PLT	299 (251; 350)	278 (220,5; 336)	0,14 (ns)
Feritin	31,59 (14; 85,65)	18,63 (12,9; 58,56)	0,41 (ns)
Hemoglobin	130 (123; 143)	133 (125; 136,5)	0,86 (ns)
fCP	598 (265,75; 1661,25)	133 (125; 136,5)	<0.001 (***)

Tab. 3: Obecná charakteristika pacientů s nespecifickými střevními záněty, od kterých byl získán vzorek krve na začátku i na konci studie. Zobrazen je medián a první a třetí kvartil. Data s nenormálním rozložením dat byla statisticky hodnocena neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem, data s normálním rozložením dat byla statisticky hodnocena párovým t-testem. Zkratky: BMI (index tělesné hmotnosti); CRP (C-reaktivní protein); WBC (počet bílých krvinek); PLT (krevní destičky); fCP (fekální kalprotektin); ns (nesignifikantní)

	Nespecifické střevní záněty (<i>n</i> = 32)		Δ IBD (<i>p</i> hodnota)
Diagnóza	Crohnova choroba (<i>n</i> = 21)	Ulcerózní kolitida (<i>n</i> = 11)	
Terapie	Infliximab (<i>n</i> = 16)	Adalimumab (<i>n</i> = 16)	
Odpověď na terapii	Ano (<i>n</i> = 25)	Ne (<i>n</i> = 7)	
	Začátek studie	Konec studie	
Věk	29 (25; 40)		
BMI	22,22 (σ = 19,84; 24,06)		
CRP	2,8 (1; 66,5)	1,25 (0,63; 4,16)	0,04 (*)
WBC	7,1 (5,93; 9,43)	6,15 (5,53; 8,05)	0,08 (ns)
PLT	297 (248,25; 350)	269 (231,25; 310,5)	0,08 (ns)
Feritin	44,16 (15,8; 87,69)	28,08 (13,05; 63,55)	0,17 (ns)
Hemoglobin	130 (125,25; 143,25)	133 (125,75; 140,75)	0,59 (ns)
fCP	687,5 (278,25; 1506)	181 (42; 485,25)	<0.001 (***)

2. Analýza složení střevní mikrobioty pacientů s IBD a HC

2.1. Izolace DNA ze stolice

DNA ze stolic jsem izoloval za sterilních podmínek pomocí kitu ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornie, USA) přesně podle protokolu výrobce. K homogenizaci vzorku jsem použil přístroj FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Irvine, Kalifornie, USA), ve kterém byl vzorek rozmělněn při rychlosti 6 m/s po dobu 60 vteřin – tento krok jsem třikrát opakoval.

2.2. Amplifikace DNA

Přesnou koncentraci DNA ve vzorku jsem měřil na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nebo, v případě nízkých koncentrací DNA vzorku, na přístroji Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Vzorky jsem poté naředil v elučním pufru do jednotné koncentrace 5 ng/μl.

Použité roztoky:

- KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Penzberg, Německo)
- Sterilní PCR H₂O (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Primery (10 μM koncentrace) specifické pro V3V4 oblast 16S rRNA
 - Přímý primer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
 - Reverzní primer (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- Tris-acetát-EDTA (TAE; 1 % roztok; vlastní výroba)
- 1 % agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

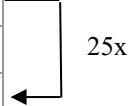
Každý vzorek včetně kontrol (kitom, negativní kontroly a falešné komunity neboli mocky) jsem amplifikoval v triplicátech. Na jamku připadalo 25 μl master mixu:

- 12,5 μl KAPA HiFi polymerázy;
- 1 μl přímého (341F GTCCTACGGGNGGCWGCAG) primeru;
- 1 μl reverzního (806R GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primeru;
- 4 μl templátové DNA;
- 6,5 μl PCR H₂O.

Každá jamka měla specifickou kombinaci primerů s barkody. Polymerázová řetězová reakce (PCR) proběhla při následujících podmínkách (tab. 4):

Tab. 4: Specifika PCR použité na amplifikaci DNA vzorků.

Fáze PCR	Délka trvání [sec]	Teplota [°C]
Iniciace	180	95
Denaturace	30	95
Nasedání primerů	30	55
Elongace	30	72
Finální elongace	300	72



Kvalitu PCR reakce jsem ověřoval buď na gelu nebo na QIAxcel Advanced kapilární elektroforéze (QIAGEN, Hilden, Německo). Gel jsem připravoval v poměru 1,3 g agarózy na 100 ml TAE a na 10 μ l SYBRTM Green Master Mixu. Na každou řadu jsem nanesl žebříček (Marker GeneRulerTM Express DNA Ladder). Pro vizualizaci bezbarvého roztoku jsem použil barvičku (6X DNA Loading Dye). Parametry pro elektroforézu byly 100 V, 300 mA a 30 minut.

2.3. Příprava genomové knihovny

Triplikáty vzorků jsem spojil do jedné destičky. Poté jsem je normalizoval pomocí komerčního kitu SequalPrepTM Normalization Plate Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a koncentroval pomocí vakuového koncentrátoru (Eppendorf® centrifugal vacuum concentrator; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Následně jsem vzorky purifikoval komerčním kitem DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornie, USA) a ligoval s příslušnými sekvenačními adaptory komerčním kitem KAPA HyperPlus Kit (Roche, Penzberg, Německo). Množství připojených adaptorů jsem ověřil pomocí kitu KAPA Library Quantification Kit (Roche, Penzberg, Německo). Nakonec jsem vzorky naředil na koncentraci 4 nM a odeslal do Centrální laboratoře Genomika CEITEC (Brno, Česká republika), kde vzorky osekvenovali prostřednictvím kitu MiSeq Reagent Kit v3 (2 x 300 bp; Illumina, San Diego, Kalifornie, USA).

2.4. Bioinformatická analýza

S bioinformatickou analýzou mi byla nápomocná Mgr. Dagmar Schierová. Získané sekvence jsme filtrovali nástrojem Cutadapt (verze 1.15) a spojili jsme je pomocí Fastq-join (verze 1.3). Pro demultiplexing jsme použili vlastní R skript. Po odstranění šumu a ořezání sekvencí jsme vygenerovali varianty amplicon sekvence prostřednictvím Qiime2 pluginu DADA2. Pro výpočet α - a β -diverzity jsme použili program Qiime2 (verze 2021.2) (Bolyen *et al.*, 2019). Pro stanovení bakteriální taxonomie ve vzorcích jsme použili klasifikátor VSEARCH a databázi SILVA (verze 138). Sekvence byly k taxonům v databázi přiřazeny, pokud sdílely 99 % sekvence.

3. Detekce biomarkerů v krevním séru pacientů s IBD a HC

3.1. Odebrání krevního séra z periferní krve

Periferní krev ve zkumavce se separačním gelem (DIALAB, Wiener Neudorf, Rakousko) jsem stočil (2700 g, 10 °C, 30 min). Oddělené krevní sérum jsem rozdělil do několika alikvot (minimální objem 350 µl na zkumavku) a až do zpracování jsem je zamrazil v -20 °C.

3.2. Detekce biomarkerů

Použité roztoky:

- Fyziologický roztok pufovaný fosfáty (PBS; bez Ca²⁺, Mg²⁺; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA; 1 % roztok v PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Substrátový roztok
 - 3,3',5,5'-tetrametylbendidin (TMB; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
 - Citrát (2 % C₆H₈O₇, 2.94 % C₆H₅Na₃O₇ * 2 H₂O, pH = 4.2; Penta, Praha, Česká republika)
 - H₂O₂ (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- H₂SO₄ (2M roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Biomarkery jsem detekoval pomocí kitů přesně podle protokolu výrobce (tab. 5). Jako substrátový roztok jsem použil 3 ml citrátu + 3 ml TMB + 1,5 µl H₂O₂ na destičku s 96 jamkami. Jako roztok zastavující reakci jsem použil 2M roztok H₂SO₄. K měření optických densit (450 nm, 650 nm) jsem použil přístroj Multiskan Ascent Plate Reader 96/384 a program Ascent (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Tab. 5: Komerční kity použité pro detekci biomarkerů. Zkratky: L-FABP (jaterní protein vázající mastné kyseliny); I-FABP (střevní protein vázající mastné kyseliny); MBL (manan vázající lektin); LBP (protein vázající lipopolysacharid); DEFA1 (α-defensin 1)

Biomarker	Výrobce	Detekční rozsah [pg/ml]
CD14	R&D systems	62,5 – 4 000
L-FABP	Hycult Biotech	102 – 25 000
I-FABP	Hycult Biotech	20 – 5 000
MBL	R&D systems	15,6 – 1 000
LBP	R&D systems	781 – 50 000
Kalprotektin	R&D systems	93,8 – 6 000
DEFA1	R&D systems	500 – 32 000

4. Charakterizace odpovědi PBMC pacientů s IBD na mikrobiální antigeny

4.1. Izolace a zamrazení PBMC

PBMC jsem izoloval z periferní krve ve zkumavce s EDTA ve sterilním prostředí laminárního boxu.

Použité roztoky:

- Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA)
- Sterilní PBS (bez Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Fyziologický roztok (Ardeaelytosol F1/1; 9 g/l; Ardeapharma, a.s., Ševětín, Česká republika)
- Trypanová modř (0,4% roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS; Biochrom, Cambridge, Velká Británie)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; 5% roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Do sterilních 50ml zkumavek s přidanými 15 ml polysacharidu Ficollu jsem opatrně nanesl krev naředěnou 1:1 s PBS (bez Ca^{2+} , Mg^{2+}) předehřátým na 37 °C. Zkumavky jsem stočil (740 g, RT, 30 min) a oddělenou bílou vrstvu nad vrstvou Ficollu (*buffy coat*) jsem přenesl do nové 50ml zkumavky. Aby se předešlo možné kontaminaci vzorku Ficollem, přidal jsem do zkumavky předehřáté PBS do celkového objemu 50 ml. Zkumavku jsem stočil (330 g, RT, 10 min), supernatant jsem slil a peletu jsem jemně resuspendoval. Následně jsem přidal 1 ml RPMI media a zkumavku jsem opět stočil (330 g, RT, 10 min). Podle množství buněk, které jsem počítal 5x naředěné s fyziologickým roztokem a s trypanovou modří v Bürkerově komůrce, jsem připravil adekvátní množství medií, tak, abych buňky naředit na $20 \cdot 10^6$ buněk na 1 ml. Po stočení zkumavky jsem slil supernatant a po resuspendaci pelety jsem přidal medium, obsahující 40 % RPMI a 60 % FBS – oboje předehřáté na 37 °C. Následně jsem pomalu, kapku po kapce, přidal medium obsahující 80 % předehřátého FBS a 20 % DMSO. Buňky jsem ponechal 5 minut v klidu a poté jsem je rozdělil do 1.8ml kryozkumavek (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Ty jsem přes noc vložil do -80 °C v Mr. Frosty kontejneru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a následující den jsem je přeložil do papírového boxu v -150 °C.

4.2. Rozmrazení PBMC

Použité roztoky:

- RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Kompletní RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 - 1 % směs antibiotik a antimykotik (Penicillin-Streptomycin roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 - 10 % FBS (Cytiva HyClone™, Marlborough, Massachusetts, USA)
 - 1 % L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

- Fyziologický roztok (Ardealytosol F1/1; 9 g/l; Ardeapharma, a.s., Ševětín, Česká republika)
- Trypanová modř (0,4% roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Vybrané vzorky jsem vložil na 8 minut do vodní lázně předehřáté na 37 °C. Dále jsem pracoval ve sterilním prostředí laminárního boxu. Buňky jsem přenesl do sterilních 15ml zkumavek. Opatrně, kapku po kapce, jsem přidal 8 ml na 37 °C předehřátého RPMI media. Zkumavky jsem stočil (300 g, RT, 5 min) a supernatant slil. Toto promytí jsem ještě jednou opakovat. Poté jsem pelety resuspendoval v kompletním RPMI mediu. Spočítal jsem množství buněk, které byly 5x naředěné s fyziologickým roztokem a s trypanovou modří v Bürkerově komůrce. Následně jsem vzorky naředil na $2 \cdot 10^6$ buněk na 1 ml, napipetoval po 100 μ l do sterilní 96U destičky (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a do sterilní 96F destičky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a ponechal 2 hodiny v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

4.3. Příprava bakteriálních lyzátů

Bakteriální lyzáty připravil Štěpán Coufal, Ph.D. Bakterie byly kultivované 24 hodin v Laboratoři anaerobní mikrobiologie v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. Následně byly stočeny a pelety byly promyty sterilní vodou. Frakcionace byla provedena na French Pressu (French Pressure Cell Press Model FA-078, SLM Instruments, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) při 1500 psig – tento krok byl opakován třikrát. Následně byly bakterie lyofilizovány pomocí lyofilizátoru (Lyovac GT2, Leybold Heraeus, Kolín nad Rýnem, Německo). Do dalšího použití byly uchovány při -80 °C.

Tab. 6: Bakteriální lyzáty použité na stimulaci PBMC.

Bakterie	Kmen	Gramovo barvení	Kultivační podmínky
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI 548	Bacteroides	-	Anaerobní
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCUG 18363	Actinobacteria	+	Anaerobní
<i>Blautia coccooides</i>	Firmicutes	+	Anaerobní
<i>Escherichia coli</i> K6	Proteobacteria	-	Aerobní
<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 3365	Firmicutes	+	Anaerobní
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	Firmicutes	+	Anaerobní
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 182	Firmicutes	+	Anaerobní
<i>Prevotella ruminicola</i> M384	Bacteroides	-	Anaerobní
<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82	Firmicutes	+	Anaerobní
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Firmicutes	+	Anaerobní

4.4. Přidání bakteriálních antigenů k PBMC

Použité roztoky:

- Brefeldin A (BioLegend, San Diego, Kalifornie, USA)
- Monensin (BioLegend, San Diego, Kalifornie, USA)
- Kompletní RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 - 1 % směs antibiotik a antimykotik (Penicillin-Streptomycin roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 - 10 % FBS (Cytiva HyClone™, Marlborough, Massachusetts, USA)
 - 1 % L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Po 2 hodinách inkubace jsem k buňkám přidal buď 100 μ l stimulu či kompletního RPMI media jako negativní kontroly. Jako pozitivní kontrolu jsem použil stimul CD3/CD28 a stafylokokový enterotoxin B (SEB) o koncentraci 2 μ l/ml, který byl vyizolován z bakterie *Staphylococcus aureus*. Stimuly byly bakteriální lyzáty o koncentraci 20 μ l/ml (tab. 6). Buňky jsem dále inkuboval při 37 °C přes noc (12 hodin). Druhý den jsem k buňkám v 96U desce přidal 50 μ l 200x naředěného Brefeldinu A a Monensinu v kompletním RPMI mediu a ponechal jsem je v inkubátoru po další 4 hodiny. Tento krok sloužil k inhibici intracelulárního transportu proteinů.

4.5. Měření produkce intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie

Použité roztoky:

- FACS-i roztok
 - Brefeldin A (BioLegend, San Diego, Kalifornie, USA)
 - Monensin (BioLegend, San Diego, Kalifornie, USA)
 - PBS (bez Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- FIX/PERM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)
- PERM/WASH (10% roztok v dH_2O ; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)
- Lidský FcR-vázající inhibitor (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Mikrokuličky (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)
- Monoklonální protilátky (viz Tab. 7)
- PBS (bez Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Po 4 hodinách inkubace jsem buňky v 96U destičce stočil (300 g, 4 °C, 5 min) a supernatant jsem opatrně vyklepнул. Do všech vzorků a jednou separátně jsem přidal 10 μ l 200x naředěného FVD. FVD jsem naředil ve FACS-i roztoku, tedy v 1000x naředěném Brefeldinu A a Monensinu v PBS. Destičku jsem následně ponechal 20 minut na ledu a ve tmě. Poté jsem přidal 160 μ l FACS-i na jamku a buňky v destičce jsem stočil (300 g, 4 °C, 5 min) a supernatant jsem vyklepl. Přidal jsem 170 μ l FACS-i na jamku a destičku s buňkami jsem za stejných podmínek stočil a supernatant vyklepl. Buňky jsem následně

opatrně resuspendoval na vortexu a přidal k nim 140 µl FIX/PERM roztoku. Destičku jsem ponechal 45 minut na ledu a ve tmě. Dále jsem ji stočil (350 g, 4 °C, 5 min), supernatant jsem vyklepl a jamky jsem dvakrát promyl 170 µl roztoku PERM/WASH. K buňkám jsem přidal 20 µl 200x naředěného inhibitoru Fc receptorů. Celou destičku jsem opatrně zvortexoval a ponechal 20 minut ve tmě na ledu. Poté jsem přidal 150 µl roztoku PERM/WASH a na příslušné pozice jsem přidal 20 µl kuliček. Destičku s buňkami jsem ponechal přes noc v -20 °C.

Druhý den jsem destičku s buňkami stočil (350 g, 4 °C, 5 min) a supernatant vyklepl. Buňky jsem opatrně resuspendoval na vortexu a přidal k nim 10 µl připravených protilátek (tab. 5). Monoklonální protilátky jsem přidal také do single-stainů a do jamek s fluorescencí minus jedna (FMO), které sloužily pro eliminaci překrývání mezi jednotlivými fluorochromy. Dále jsem destičku s buňkami inkuboval 25 minut ve tmě na ledu. Přidal jsem 160 µl roztoku PERM/WASH, destičku s buňkami jsem stočil (350 g, 4 °C, 5 min) a supernatant jsem vyklepl. Tento krok jsem opakoval se 170 µl roztoku PERM/WASH. Buňky jsem nakonec resuspendoval ve 100 µl PBS.

Tab. 7: Protilátky použité k analýze intracelulárních cytokinů. Zkratky: IL (interleukin); TNF (faktor nekrotizující nádory)

Znak	Fluorochrom	Klon	Výrobce	Ředění
Viabilita	FVD_eF780		eBioscience™	1:200
CD3	FITC	UCHT1	BioLegend®	1:100
CD4	eVolve605	SK3	eBioscience™	1:100
CD8	Alexa Fluor® 700	SK1	BioLegend®	1:100
CD154	Brilliant Violet 421™	24-31	BioLegend®	1:50
IL-2	PE-Cyanine7	MQ1-17H12	eBioscience™	1:50
IL-4	APC	8DE-8	eBioscience™	1:50
IL-17A	PerCP-Cyanine5.5	eBio64DEC17	eBioscience™	1:50
TNF-α	Brilliant Violet 510™	MAB11	BioLegend®	1:50

Měření jsem provedl na průtokovém cytometru FACS LSRII (BD Biosciences, San Jose, Kalifornie, USA) ve Středisku cytometrie a mikroskopie Mikrobiologického ústavu AV ČR v. v. i. za asistence Jana Svobody, PhD. Data jsem zpracoval pomocí BD FACSDiva™ Software (verze 6.0, BD Biosciences, San Jose, Kalifornie, USA; obr. 6) a následně jsem je vyhodnotil v programu FlowJo (verze 7.2.5, Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA).

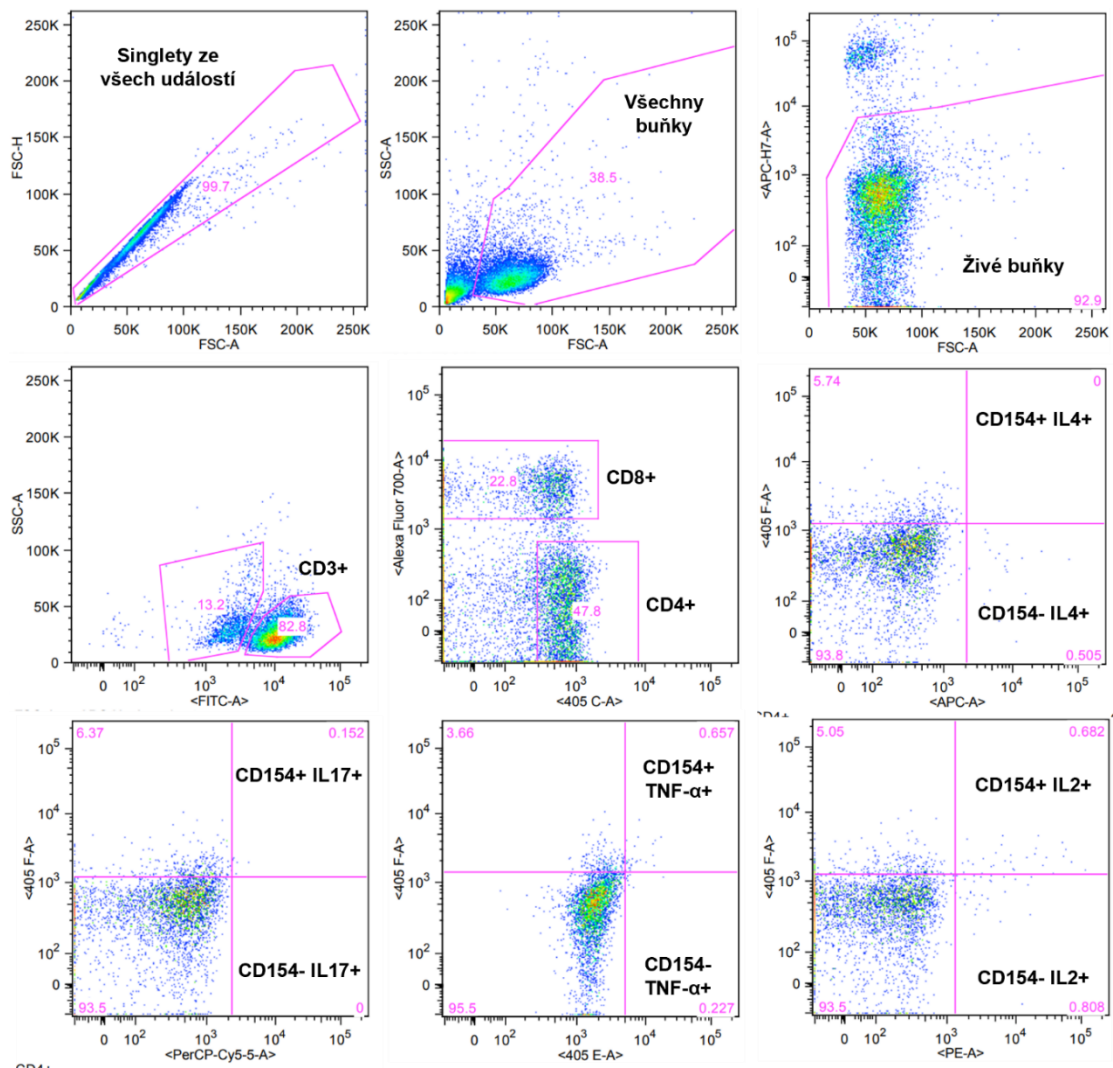
4.6. Měření produkce cytokinů v supernatantu pomocí metody ELISA

Použité roztoky:

- PBS (bez Ca²⁺, Mg²⁺; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

- BSA (1% roztok v PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Substrátový roztok
 - TMB (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
 - Citrát (2 % $C_6H_8O_7$, 2.94 % $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, pH = 4.2; Penta, Praha, Česká republika)
 - H_2O_2 (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- H_2SO_4 (2M roztok; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

PBMC v 96F destičce jsem kultivoval s bakteriálními lyzáty 48 hodin. Následně jsem odebral supernatant a v něm jsem detekoval hladinu cytokinu IL-17 pomocí komerčního kitu (R&D systems, detekční rozsah 15,6 – 1 000 pg/ml). Jako substrátový roztok jsem použil 3 ml citrátu + 3 ml TMB + 1.5 μ l H_2O_2 na destičku s 96 jamkami. Jako zastavující roztok jsem použil 2M roztok H_2SO_4 . K měření optických denzit (450 nm, 650 nm) jsem použil přístroj Multiskan Ascent Plate Reader 96/384 a program Ascent (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).



Obr. 6: Znárodnění použité strategie k vyhodnocení cytometrických dat. Nejprve jsem vybral singlety ze všech událostí. Poté jsem ze singletů vybral všechny buňky. Z buněk jsem vybral jen buňky živé, ty mrtvé byly odlišitelné díky obarvení FVD. Z živých buněk jsem vybral CD3⁺ populaci díky barvení FITC-A. CD3⁺ buněčnou populaci jsem rozdělil na CD8⁺ populaci díky barvení Alexa Fluor[®] 700 a na CD4⁺ populaci díky barvení eVolve605. Z CD4⁺ populace jsem pak vybral populace pozitivní a negativní na CD154 a pozitivní na jeden z cytokinů: interleukin (IL)-2, IL-4, IL-17 a faktor nekrotizující nádory (TNF)- α .

5. Statistická analýza

Pro ověření normálního rozložení dat jsem použil Shapirův-Wilkův test. Rozdíly klinických parametrů jsem při normálním rozdělení dat vyhodnotil párovým t-testem a při asymetrickém rozdělení párovým Wilcoxonovým testem. Rozdíly v α -diverzitě a v koncentracích biomarkerů mezi IBD pacienty a HC jsem vyhodnotil neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem a následným *post hoc* Dunnovým testem. Rozdíly v α -diverzitě, v koncentracích biomarkerů a v produkci cytokinů PBMC mezi časovými body a rozdíly v podobnosti k HC jsem vyhodnotil dvoucestným ANOVA testem s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí. Korelace mezi α -diverzitou / krevním biomarkerem a tíží onemocnění jsem vyjádřil jako neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

K statistické analýze a k vytváření grafů jsem použil program GraphPad Prism (verze 9.4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornie, USA).

Výsledky

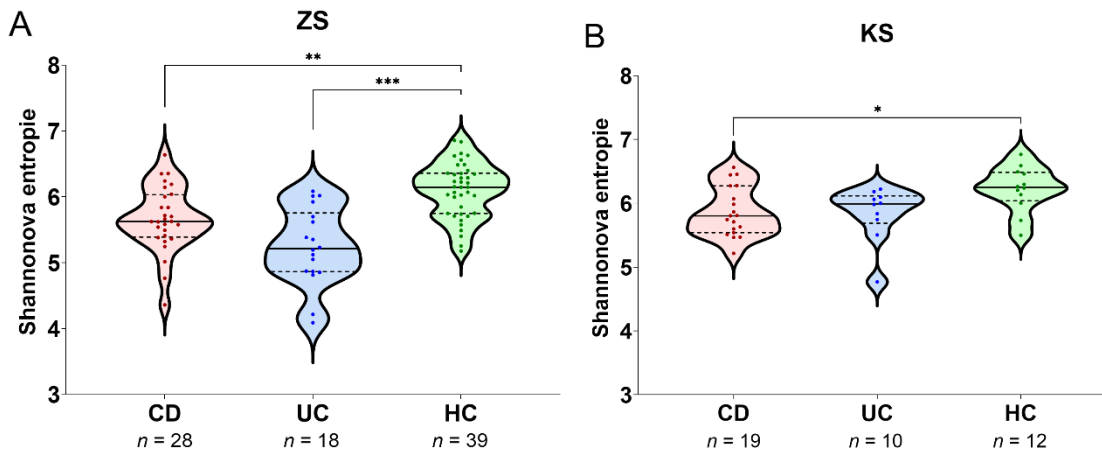
1. Analýza složení střevní mikrobioty pacientů s IBD

Patogeneze nespecifických střevních zánětů (IBD) je spjata s dysbiózou střevní mikrobioty. Pacienti s IBD mají nižší α -diverzitu než zdravé kontroly (HC) (Sokol *et al.*, 2017). V současnosti je častou léčebnou strategií IBD terapie monoklonálními protilátkami blokujícími cytokin TNF- α (Mitoma *et al.*, 2018). Střevní mikrobiota může hrát v účinnosti biologické léčby zásadní roli, což bylo popsáno například u pacientů s melanomem (Gopalakrishnan *et al.*, 2018). O změnách složení střevní mikrobioty během anti-TNF- α terapie u pacientů s IBD je toho však známo málo.

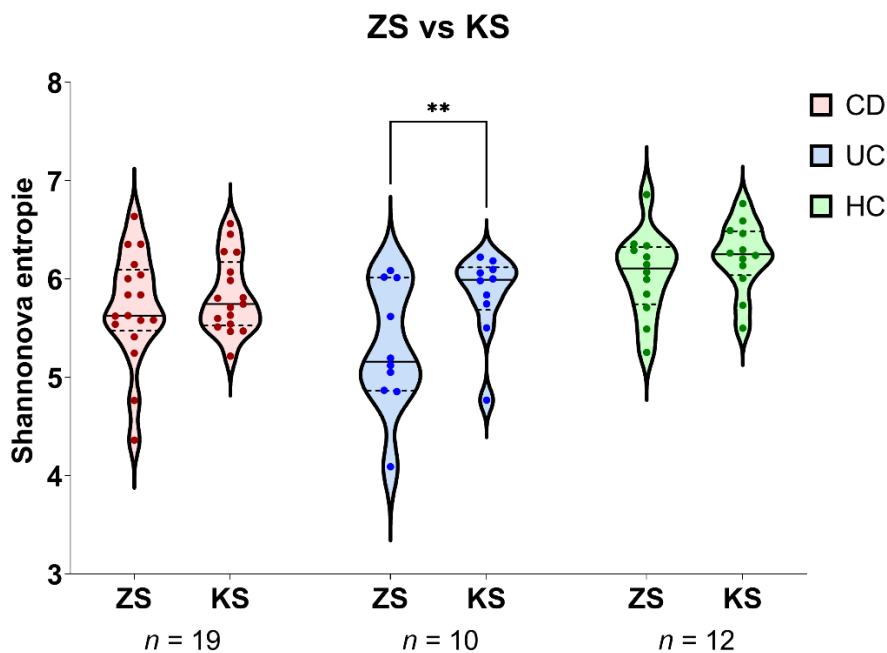
Proto jsme odebrali stolice pacientů s IBD před začátkem terapie (začátek studie, ZS) a v několika časových bodech, až do 38. týdne terapie (konec studie, KS). Získal jsem také vzorky zdravých kontrol (HC), opět v několika časových bodech. Protože někteří pacienti s IBD přerušili či změnili léčbu nebo (i v případě HC) nedodali vzorek v termínu, konečná skupina byla znatelně menší než na ZS. Pro účely mé diplomové práce vycházející z pilotní studie jsem sloučil pacienty léčené protilátkami IFX a ADA.

Ze stolic pacientů s IBD a HC jsem vyizoloval, amplifikoval osekvenoval bakteriální DNA. Následně jsem hodnotil α -diverzitu střevní mikrobioty u pacientů s IBD před začátkem (ZS) a v 38. týdnu (KS) anti-TNF- α terapie a u HC. Jako metriku α -diverzity, která vyjadřuje druhovou rozmanitost v rámci jedné skupiny, jsem použil Shannonovu entropii. Tu jsem zvolil z toho důvodu, že na rozdíl od jiných běžně užívaných indexů (například Chao1 či provozní taxonomická jednotka) bere v potaz jak přítomnost (*richness*), tak i abundanci (*evenness*) taxonů.

Nejprve jsem hodnotil rozdíl v α -diverzitě mezi pacienty s CD a UC a mezi zdravými jedinci před zahájením a v 38. týdnu anti-TNF- α terapie. Pacienti s IBD měli na ZS signifikantně nižší Shannonovu entropii než HC (obr. 7A). Signifikantní rozdíl v 38. týdnu anti-TNF- α terapie (KS) zůstal u pacientů s CD, ale ne u pacientů s UC (obr. 7B). Následně jsem porovnal Shannonovu entropii u pacientů s CD a s UC a u zdravých jedinců před začátkem a v 38. týdnu anti-TNF- α terapie. V souladu s předchozím pozorováním, pacienti s UC měli na v průběhu terapie signifikantně vyšší α -diverzitu než před jejím zahájením. Při porovnání pacientů s CD a HC jsem nepozoroval signifikantní rozdíl v ZS a KS (obr. 8).

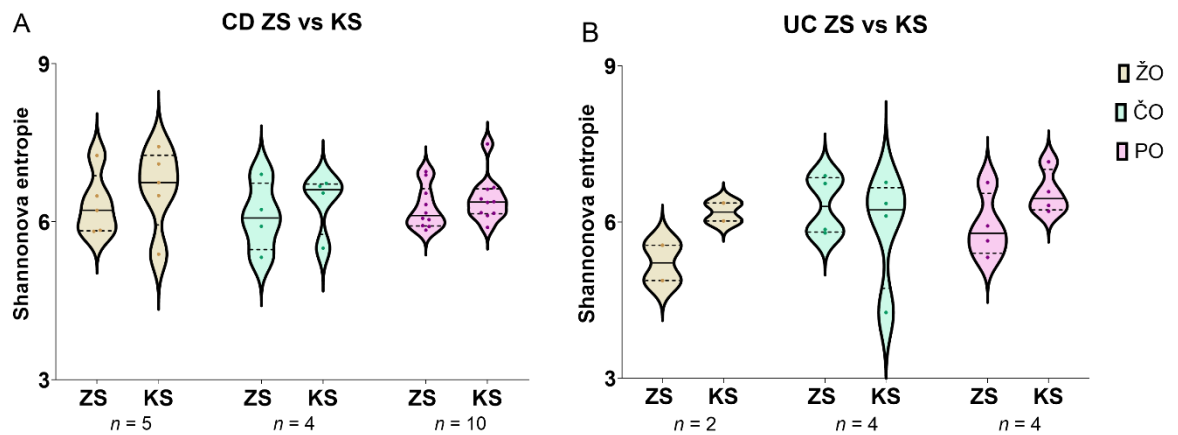


Obr. 7: α -diverzita střevní mikrobioty pacientů s nespecifickými střevními záněty před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie a zdravých kontrol (HC). (A) α -diverzita střevní mikrobioty, vyjádřená jako Shannonova entropie, byla u pacientů s Crohnovou chorobou (CD) a u pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) na ZS signifikantně nižší než u HC. (B) Na KS měli pacienti s CD stále signifikantně nižší α -diverzitu než HC, zatímco pacienti s UC již signifikantně rozdílnou α -diverzitu od HC neměli. V houslových grafech je znázorněn medián a první a třetí kvartil. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem. * $p < 0,033$; ** $p < 0,002$; *** $p < 0,001$



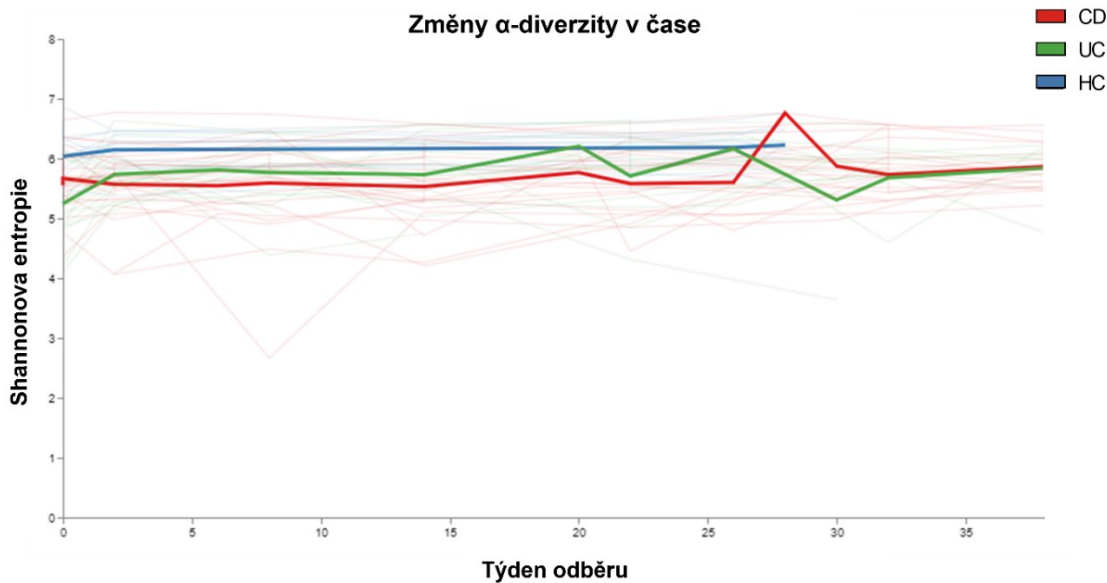
Obr. 8: α -diverzita střevní mikrobioty pacientů s nespecifickými střevními záněty před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie a zdravých kontrol (HC). Pacienti s ulcerózní kolitidou (UC) měli na KS signifikantně větší α -diverzitu, vyjádřenou jako Shannonova entropie než na ZS. Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) a HC neměli signifikantně rozdílnou α -diverzitu na ZS a KS. V houslových grafech je znázorněn medián a první a třetí kvartil. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí. ** $p < 0,002$

Podle typu odpovědi pacientů na anti-TNF- α terapii, kterou pro mé účely stanovil MUDr. Martin Kolář z ISCARE a. s., jsem rozdělil pacienty s IBD na neodpovídající (ŽO), částečně odpovídající (ČO) a plně odpovídající (PO). Poté jsem hodnotil změny α -diverzity na ZS a na KS u pacientů s CD (obr. 9A) a s UC (obr. 9B). U testovaných skupin jsem nepozoroval statisticky významný rozdíl, ačkoliv trend zvyšující se α -diverzity byl pozorovatelný u všech.



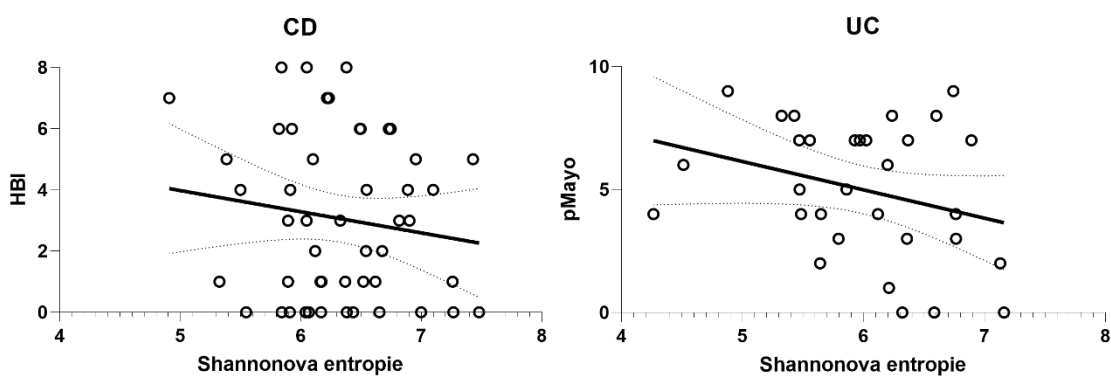
Obr. 9: α -diverzita střevní mikrobioty pacientů s nespecifickými střevními záněty před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie podle odpovědi na léčbu. (A) Po rozdělení na pacienty s žádnou (ŽO), částečnou (ČO) a s plnou (PO) odpovědí nebyl nalezen signifikantní rozdíl v α -diverzitě mezi ZS a KS u pacientů s Crohnovou chorobou (CD) (B) ani u pacientů s ulcerózní kolitidou (UC). V houslových grafech je znázorněn medián a první a třetí kvartil. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí.

Střevní mikrobiota je sice dlouhodobě stabilní (Huttenhower *et al.*, 2012), krátkodobě je však dynamická (Caporaso *et al.*, 2011) a může být ovlivněna různými faktory, například stravou hostitele (Wu *et al.*, 2011). Proto jsem sledoval změny α -diverzity u pacientů s CD a s UC a u HC v čase (obr. 10). Dle grafického znázornění, které zahrnuje hodnoty vzorků odebraných v několika časových bodech, jsem potvrdil relativní stabilitu střevní mikrobioty se zanedbatelnými výkyvy u pacientů s IBD a u HC.



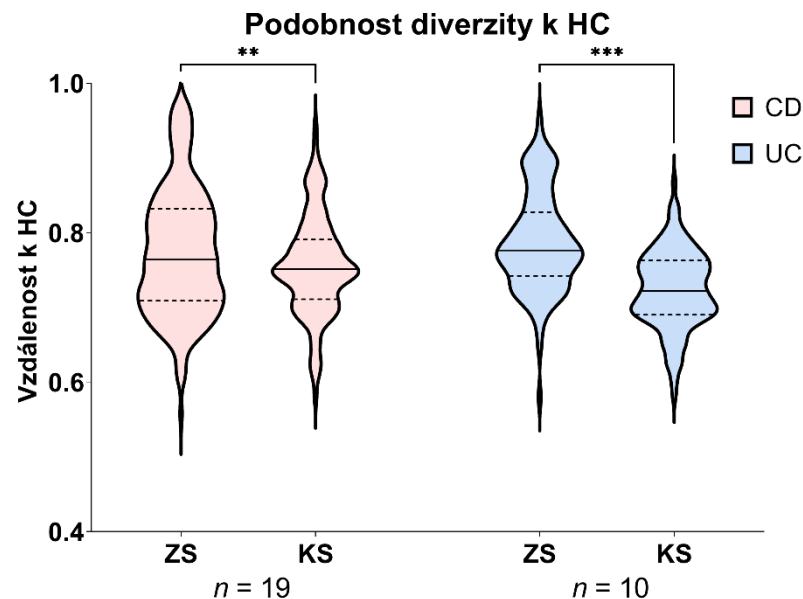
Obr. 10: α -diverzita střevní mikrobioty a pacientů s nespecifickými střevními záněty v průběhu anti-TNF- α terapie a u HC. Vizuální zobrazení změn Shannonovy entropie u pacientů s Crohnovou chorobou (CD; $n = 19$) a s ulcerózní kolitidou (UC; $n = 10$) a u HC ($n = 12$). Z grafického zobrazení lze odhadnout, že složení střevní mikrobioty je v čase relativně stabilní. Každá čára představuje jednoho pacienta. Tučná čára představuje lokálně váženou regresi dané skupiny s vyplněním intervalu spolehlivosti.

Dále mě zajímalo, jestli α -diverzita střevní mikrobioty koreluje s tíží IBD. Tíže nemoci byla MUDr. Martinem Kolářem z ISCARE a. s. vyjádřena jako HBI u CD a jako pMayo u UC. Nenašel jsem sice žádnou signifikanci, nicméně jsem pozoroval trend negativní závislosti (obr. 11). Se vzrůstající α -diverzitou střevní mikrobioty tedy klesala tíže CD i UC.



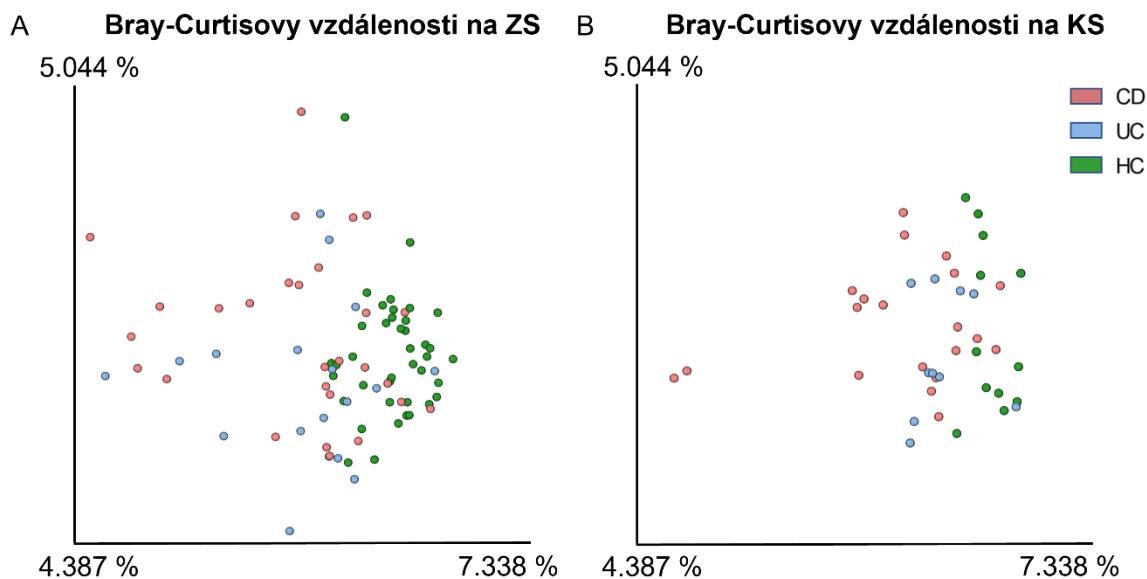
Obr. 11: Korelace mezi tíží onemocnění u Crohnovy choroby (CD) a ulcerózní kolitidy (UC) a α -diverzitou střevní mikrobioty. Nebyla nalezena signifikantní korelace mezi Harvey-Bradshawým Indexem (HBI) pro CD ($p = 0,32$; $r = -0,14$) a částečným Mayo Indexem (pMayo) pro UC ($p = 0,1$; $r = -0,3$) a mezi α -diverzitou vyjádřenou jako Shannonova entropie. Každý bod představuje jednoho pacienta v jednom časovém bodě. V grafu je zobrazen 95 % interval spolehlivosti. Výsledek byl statisticky vyjádřen jako neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

Abych zjistil, jakým způsobem se mění diverzita střevní mikrobioty pacientů s IBD vůči HC během anti-TNF- α terapie, porovnal jsem stupeň β -diverzity na ZS a na KS. β -diverzita vyjadřuje druhovou rozmanitost napříč různými skupinami. Jako metriku β -diverzity jsem zvolil Bray-Curtisovu vzdálenost, která analogicky se Shannonovou entropií bere v potaz jak přítomnost (*richness*), tak abundanci (*evenness*) taxonů. Vypočítal jsem Bray-Curtisovu vzdálenost mezi všemi vzorky a následně jsem použil permutační test pro porovnání vzdáleností vzorků pacientů s IBD k HC na ZS a na KS. Pacienti s CD i s UC měli signifikantně podobnější složení střevní mikrobioty k HC na KS (obr. 12).



Obr. 12: Podobnost složení střevní mikrobioty pacientů s nespecifickými střevními záněty ke zdravým kontrolám (HC) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) i s ulcerózní kolitidou (UC) měli složení střevní mikrobioty signifikantně podobnější HC na KS než na ZS. Jako metrika β -diverzity byla použita Bray – Curtisova vzdálenost. Hodnota 1 znamená, že složení je zcela odlišné od HC a hodnota 0 znamená, že složení je zcela identické s HC. V houslových grafech je znázorněn medián a první a třetí kvartil. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí. ** $p < 0,002$; *** $p < 0,001$

Pozorování, že měli pacienti s IBD na KS složení střevní mikrobioty podobnější HC jsem ověřil PCoA analýzou. Před začátkem terapie nevytvářela mikrobiota pacientů s CD ani pacientů s UC jednotný shluk, zatímco mikrobiota HC ano. Na KS pak pacienti s IBD tvořili také shluk, který byl navíc podobnější HC, a dokonce i mezi CD a UC (obr. 13).



Obr. 13: PCoA analýza složení střevní mikrobioty pacientů s nespecifickými střevními záněty a zdravých kontrol (HC) na začátku studie (ZS) a na konci studie (KS). (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD; $n = 28$) a s ulcerózní kolitidou (UC; $n = 18$) nevytvářeli na ZS jednotný shluk v porovnání s HC ($n = 39$). (B) Na KS pacienti s CD ($n = 19$) i UC ($n = 10$) tvořili shluk, který byl podobný mezi sebou i HC ($n = 12$). Každý bod představuje jeden vzorek. Pro vizualizaci dat byl použit QIIME 2 (verze 2021.2).

Kolegyně Mgr. Dagmar Schierová nakonec provedla analýzu složení mikrobů (ANCOM). Vyšlo jí 13 taxonů u pacientů s CD a 10 taxonů u pacientů s UC, které se svou abundancí lišily na ZS a na KS. Nicméně, kromě bakterie *Ruminococcus*, která byla hojněji zastoupená u pacientů s UC na KS, byla všem ostatním taxonům přiřazena hodnota strukturní nuly, a rozdíl tedy nebyl signifikantní (tab. 8).

Tab. 8: Odlišně abundantní taxony u pacientů s Crohnovou chorobou a s ulcerózní kolitidou před zahájením a v 38. týdnu anti-TNF- α terapie. Odlišnost zastoupení taxonů byla vyhodnocena pomocí analýzy složení mikrobů (ANCOM) 2.1. V tabulce je zobrazena W-statistika a centrované log poměry (clr). Jako hraniční hodnota byla zvolena 0,8W. Zkratky: str. nula (strukturální nula). Tuto část vyhodnotila Mgr. Dagmar Schierová.

Crohnova choroba			Ulcerózní kolitida		
Taxony detekované s hraniční hodnotou 0,8W	W	clr	Taxony detekované s hraniční hodnotou 0,8W	W	clr
<i>Bifidobacterium animalis</i>	str. nula	0,2	<i>Paraprevotella</i> (nekultivovatelná)	str. nula	-0,7
<i>Muribaculaceae</i> (nekultivovatelná)	str. nula	-0,1	<i>Prevotellaceae</i> skupiny NK3B31	str. nula	0
<i>Alloprevotella</i> (nekultivovatelná)	str. nula	0	<i>Prevotellaceae</i> skupiny NK3B31 (nekultivovatelná)	str. nula	-0,1
<i>Catenibacterium</i> (nekultivovatelná)	str. nula	-0,3	<i>Gastranaerophilales</i>	str. nula	-0,1
<i>Enterococcus durans</i>	str. nula	0,4	<i>Asteroleplasma</i> (nekultivovatelná)	str. nula	0
<i>Lactobacillus mucosae</i>	str. nula	0	<i>Lactobacillus mucosae</i>	str. nula	0
<i>Phascolarctobacterium</i>	str. nula	-0,4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	str. nula	0,2
<i>Megasphaera</i>	str. nula	-0,3	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>	str. nula	0
<i>Megasphaera elsdenii</i>	str. nula	-0,1	<i>Ruminococcus</i> (nekultivovatelná)	68	1,4
<i>Enterobacter</i>	str. nula	0	<i>Megasphaera</i> (nekultivovatelná)	str. nula	0
<i>Escherichia-Shigella</i> (nekultivovatelná)	str. nula	0,2			
<i>Morganella morganii</i>	str. nula	0			
<i>Treponema</i> (nekultivovatelná)	str. nula	0			

2. Detekce sérových biomarkerů pacientů s IBD

Pacienti s IBD mají oproti HC pozměněné hladiny některých biomarkerů v krevním séru (Coufal *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2016). Předpokládá se, že důležitým faktorem v patogenezi IBD je zvýšená propustnost střevní bariéry, kterou mohou překonávat střevní mikroby či jejich antigeny (S. H. Lee *et al.*, 2018). Sérové biomarkery v diagnostice IBD zůstávají kontroverzní, stejně jako jejich role v odpovědi pacientů na anti-TNF- α terapii.

Abych zjistil, jakým způsobem se liší funkce střevní bariéry a systémová imunitní odpověď vůči střevní mikrobiotě u pacientů s IBD od HC v průběhu anti-TNF- α terapie a jakým způsobem by tato znalost šla využít k predikování odpovědi pacientů na biologickou léčbu, detekoval jsem hladiny 7 vybraných sérových biomarkerů, které jsou spojeny s funkcí střevní bariéry (I-FABP, L-FABP) a s imunitní odpovědí proti mikrobům a probíhajícím zánětem (sCP, DEFA1, CD14, LBP, MBL). Vzorek krve pro izolaci krevního séra a mononukleárních buněk periferní krve byl pacientům s IBD odebrán na ZS a KS, stejně jako byla odebrán vzorek krve HC.

Pacientům s IBD byla specialistou odebrána krev před začátkem terapie (ZS) a v 38. týdnu terapie (KS). Krev byla odebrána také HC.

U každého biomarkeru jsem nejprve porovnal sérové hladiny mezi jednotlivými skupinami na ZS a na KS. Poté jsem sledoval rozdíl sérových hladin u pacientů s CD a s UC mezi ZS a KS. Tento rozdíl jsem dále hodnotil podle odpovědi pacienta na anti-TNF- α terapii, kterou stanovil MUDr. Martin Kolář z ISCARE a. s. Pacienty jsem podle typu odpovědi rozdělil na neodpovídající (ŽO), částečně odpovídající (ČO) a plně odpovídající (PO). Protože tímto dělením se skupina pacientů značně zmenšila, nejprve jsem pacienty s CD i s UC spojil do jedné skupiny (IBD). Nakonec jsem hodnotil také změny sérových hladin biomarkerů podle odpovědi na terapii u pacientů s CD a s UC zvlášť.

U sérového kalprotektinu (sCP), který je známý také jako dimer S100A8/A9, jsem pozoroval signifikantně vyšší hladiny v krevním séru pacientů s CD i pacientů s UC v porovnání s HC před začátkem i v průběhu anti-TNF- α terapie. Po spojení obou diagnóz mi vyšel téměř statisticky významný rozdíl ($p = 0,07$) v poklesu sCP u plně odpovídajících pacientů na terapii na KS v porovnání s ZS (obr. 14).

Signifikantně vyšší sérové hladiny v porovnání s HC jsem u pacientů s CD a u pacientů s UC na ZS detekoval také u α -defensinu (DEFA)1. Na KS jsem však již nepozoroval rozdíl v těchto hladinách mezi pacienty s UC a HC. Po rozdělení pacientů podle odpovědi na anti-TNF- α terapii se hladina významně nelišila. (obr. 15).

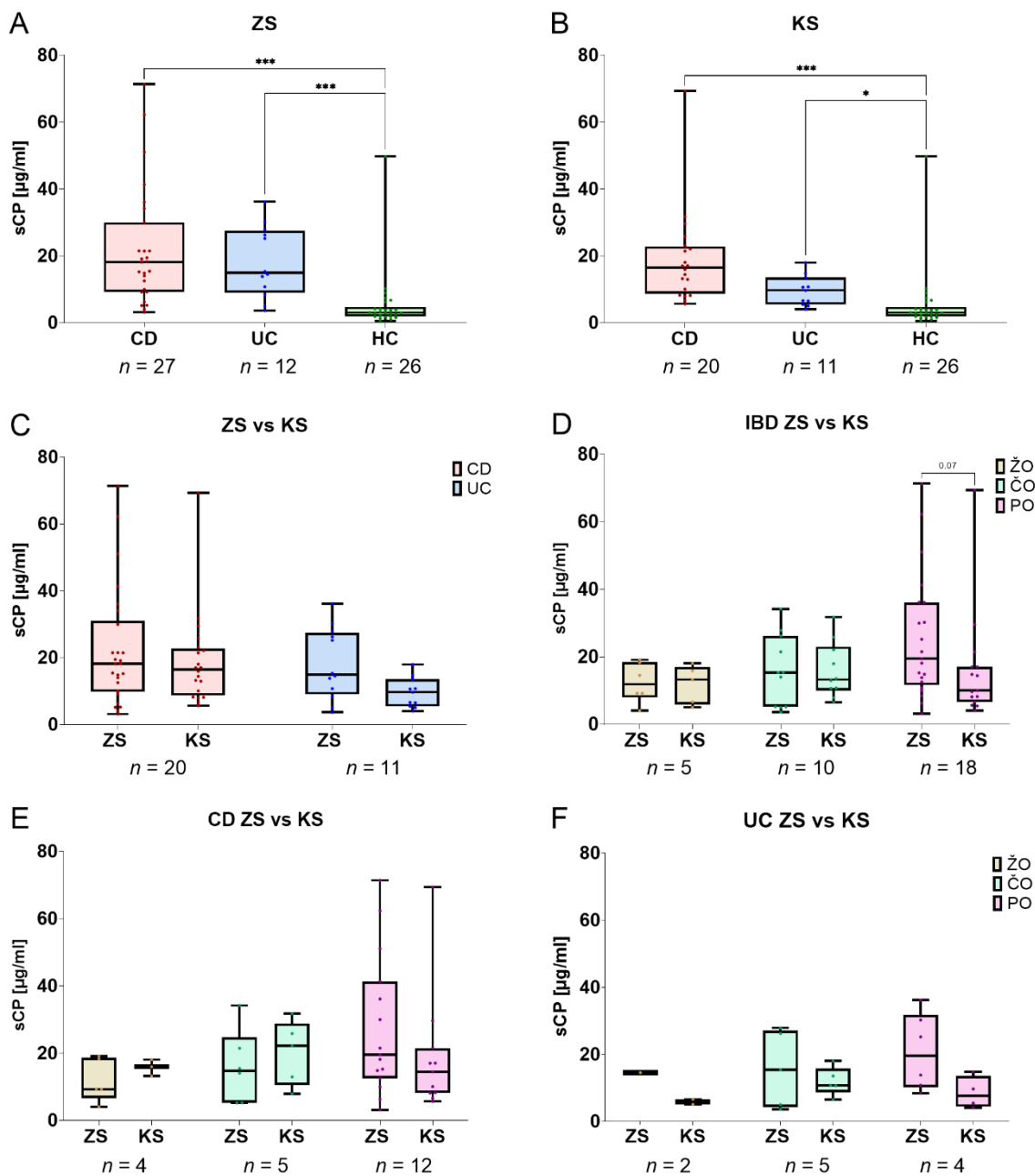
Dále jsem u pacientů s IBD a u HC detekoval solubilní CD14 (sCD14). Zatímco na ZS neměli pacienti s IBD statisticky významné rozdíly v sérových hladinách sCD14, na KS měli pacienti s CD

signifikantně nižší hladiny v porovnání s HC. Tento úbytek byl statisticky významný u pacientů s CD, kteří plně odpovídali na anti-TNF- α terapii (obr. 16).

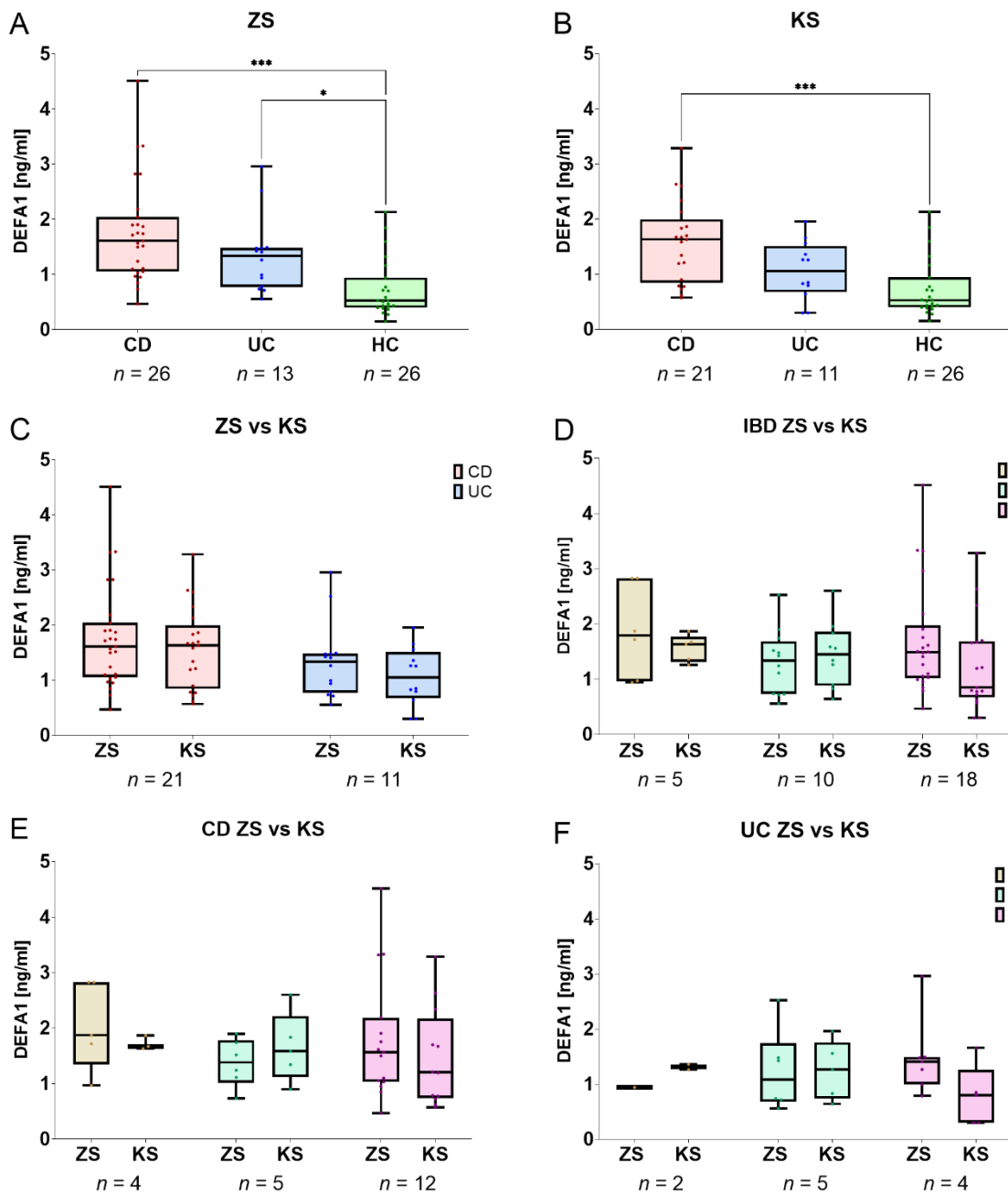
Obdobně jsem pozoroval signifikantně nižší sérovou hladinu proteinu vázajícího lipopolysacharid (LBP) u pacientů s CD v porovnání s HC na KS, zatímco na ZS ani pacienti s CD, ani pacienti s UC neměli signifikantně rozdílné hladiny LBP od HC. Po rozdělení pacientů podle odpovědi na anti-TNF- α terapii a podle diagnózy jsem nepozoroval žádný signifikantní rozdíl (obr. 17)

Dalším detekovaným biomarkerem byl manan vázající lektin (MBL), jehož sérové hladiny se u pacientů s CD a s UC nelišily od HC na ZS ani na KS. Nicméně, po spojení diagnóz a po rozdělení pacientů podle jejich odpovědi na anti-TNF- α terapii mi vyšel signifikantní pokles MBL na KS v porovnání se ZS u pacientů, kteří na terapii plně odpovídali (obr. 18).

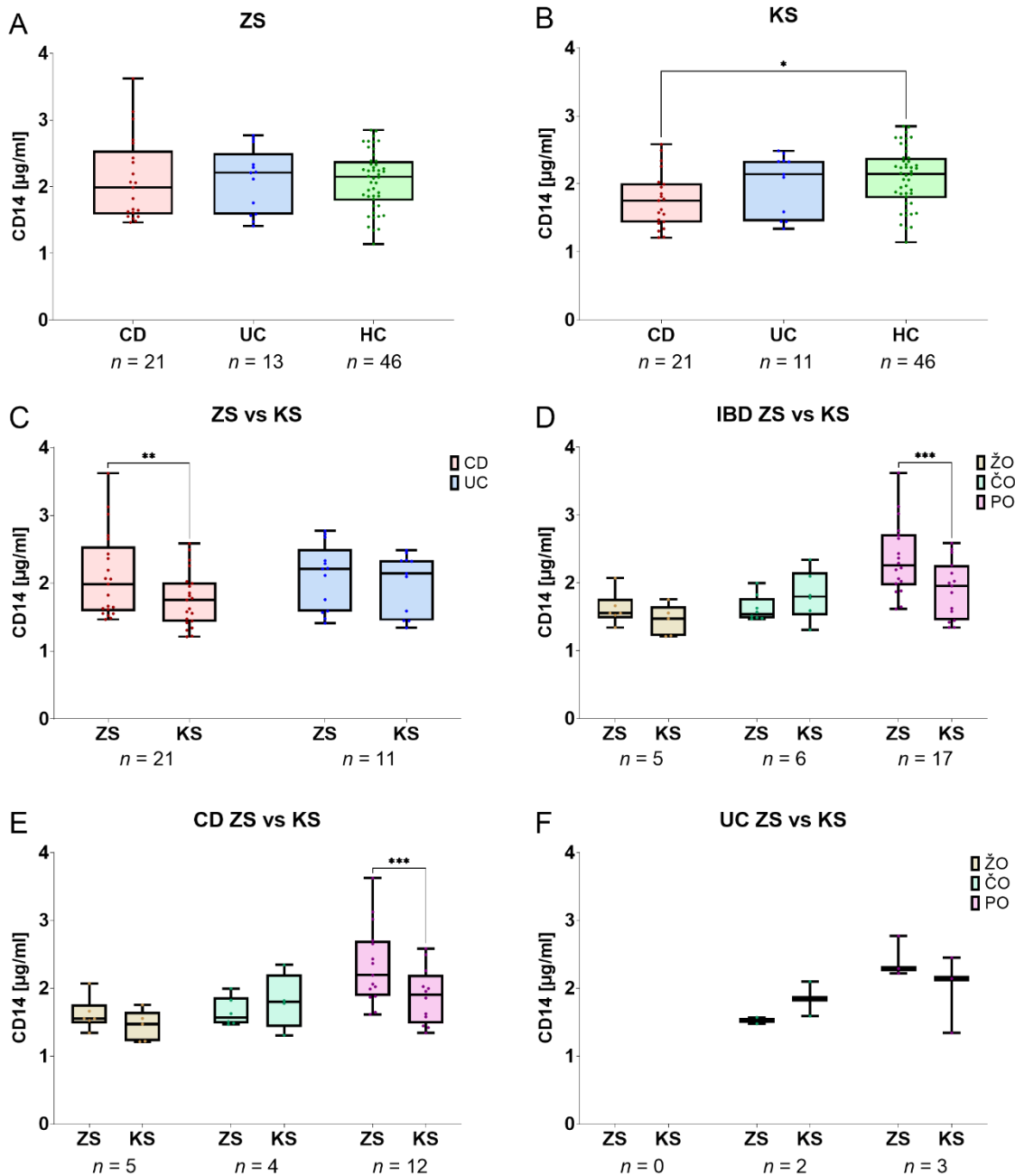
Jako biomarkery funkce střevní bariéry jsem použil střevní (I-FABP) a jaterní protein vázající mastné kyseliny (L-FABP). Ani v jednom případě jsem nedetekoval signifikantně rozdílné sérové hladiny mezi pacienty s CD a s UC a mezi HC na ZS. Na KS jsem pozoroval statisticky významně méně sérového I-FABP u pacientů s UC v porovnání s HC. Po rozdělení pacientů podle odpovědi na anti-TNF- α terapii jsem však nepozoroval žádný významný rozdíl ani u I-FABP (obr. 19) ani u L-FABP (obr. 20).



Obr. 14: Změny sérových hladin kalprotektinu (sCP) u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) a s ulcerózní kolitidou (UC) měli na ZS signifikantně vyšší hladiny sCP než zdravé kontroly (HC). (B) Signifikantně vyšší hladiny, než HC měli pacienti s CD a s UC také na KS. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách sCP mezi ZS a KS. (D) Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani po rozdělení podle odpovědi na anti-TNF- α terapii (IBD) na žádnou odpověď (ŽO), částečnou odpověď (ČO) a plnou odpověď (PO). (E, F) Ani po rozdělení podle diagnózy nebyl pozorován signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin. * p < 0,033; * p < 0,001**

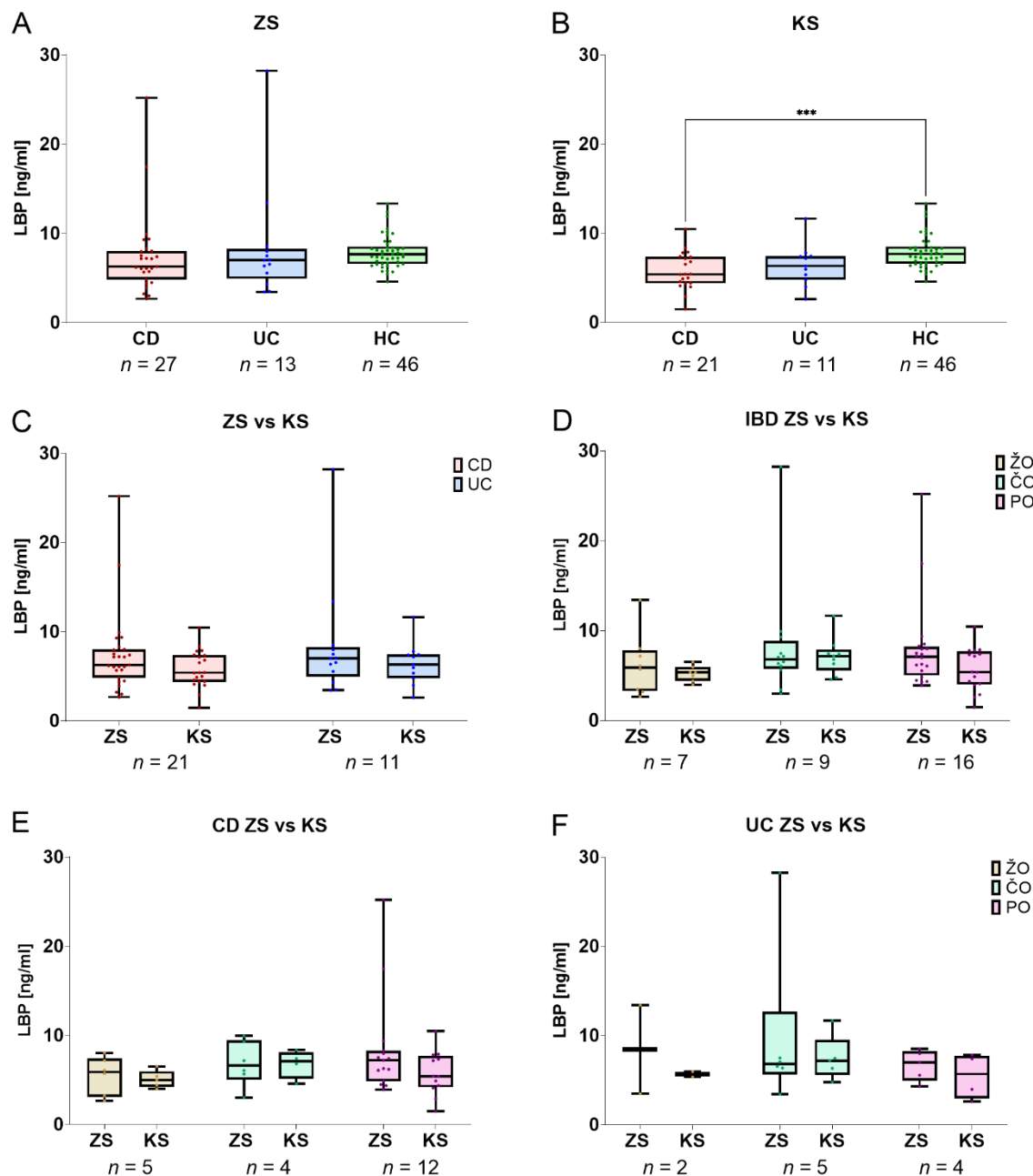


Obr. 15: Změny sérových hladin α -defensinu (DEFA)1 u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) a s ulcerózní kolitidou (UC) měli na ZS signifikantně vyšší hladiny DEFA1 než zdravé kontroly (HC). (B) Signifikantně vyšší hladiny, než HC měli pacienti s CD také na KS, zatímco u pacientů s UC již rozdíl signifikantní nebyl. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách DEFA1 mezi ZS a KS. (D) Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani po rozdělení podle odpovědi na anti-TNF- α terapii (IBD) na žádnou odpověď (ŽO), částečnou odpověď (ČO) a plnou odpověď (PO). (E, F) Ani po rozdělení podle diagnózy nebyl pozorován signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin. * $p < 0,033$; * $p < 0,001$**

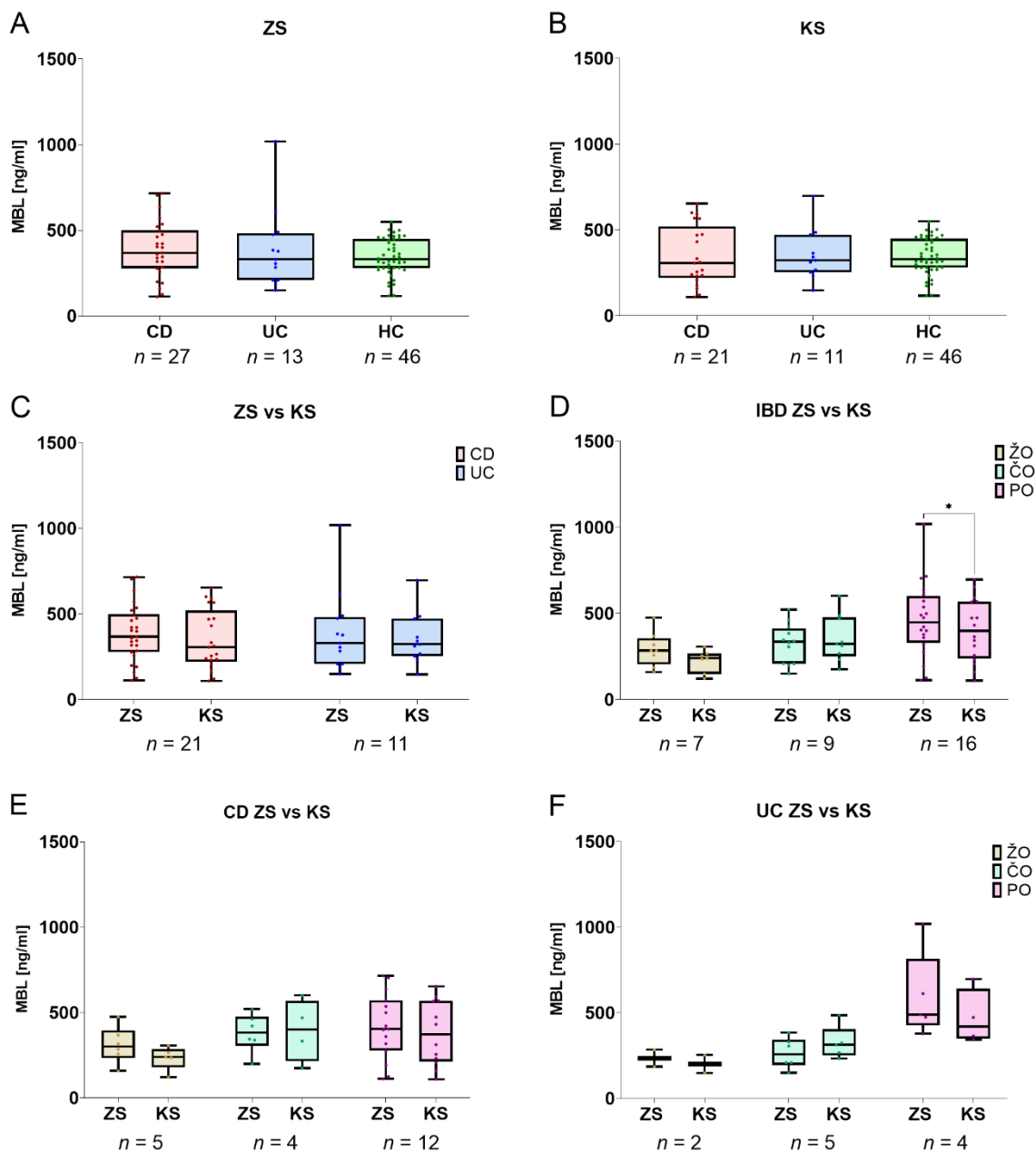


Obr. 16: Změny sérových hladin CD14 u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) ani s ulcerózní kolitidou (UC) neměli na ZS signifikantně rozdílné hladiny CD14 od zdravých kontrol (HC). (B) Na KS měli pacienti s CD signifikantně nižší hladinu CD14 než HC. U pacientů s UC žádný signifikantní rozdíl pozorován nebyl. (C) Pacienti s CD měli signifikantní úbytek v hladinách CD14 mezi ZS a KS. U pacientů s UC žádný signifikantní rozdíl pozorován nebyl. (D) Signifikantní rozdíl byl pozorován pouze u pacientů (IBD), kteří odpovídali na anti-TNF- α terapii plně (PO), zatímco u neodpovídajících (ŽO) či pouze částečně odpovídajících (ČO) rozdíl pozorován nebyl. (E, F) Pozorovaný signifikantní pokles sérové hladiny CD14 byl specifický pro pacienty s CD. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin.

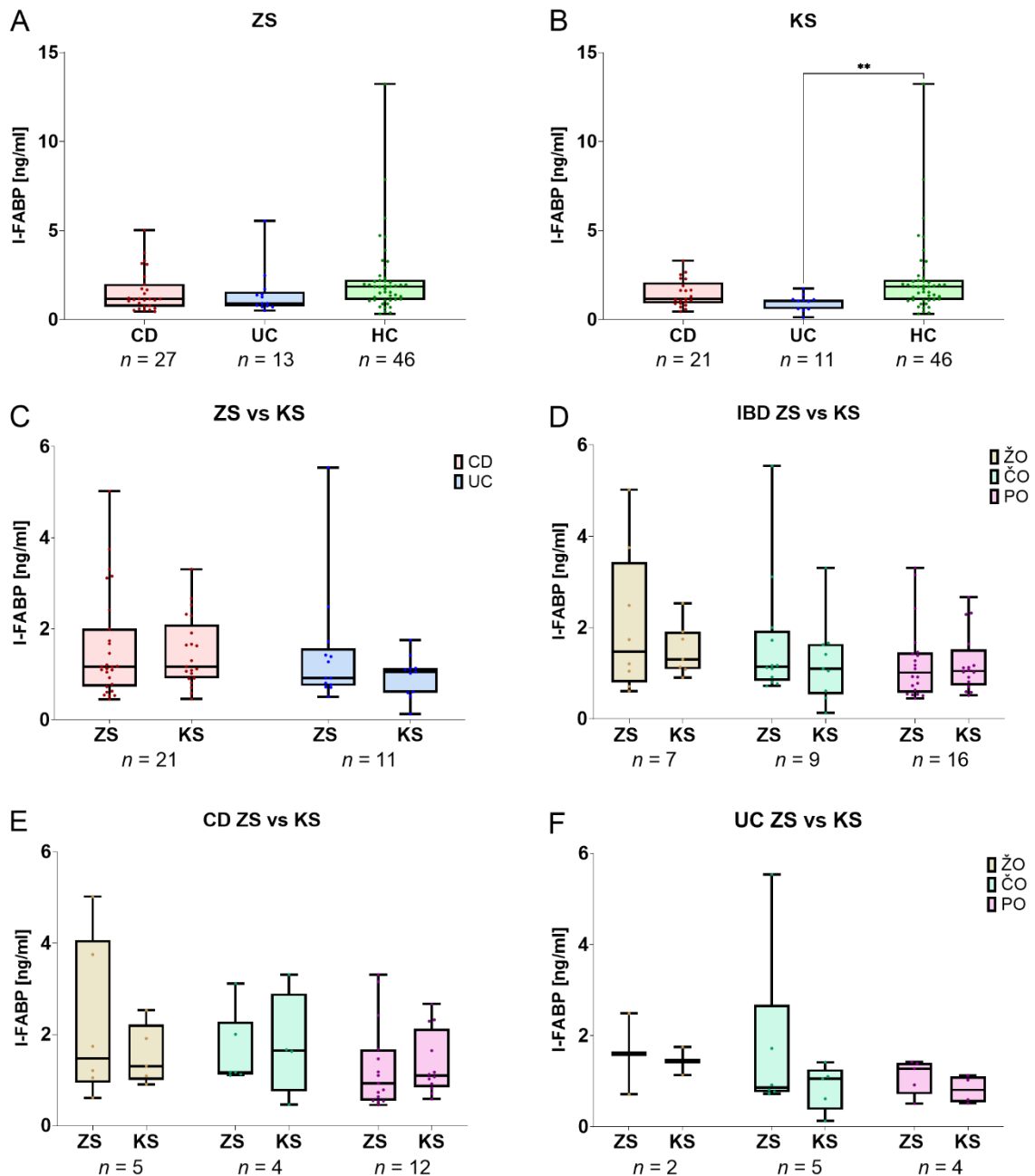
* $p < 0,033$; ** $p < 0,002$; *** $p < 0,001$



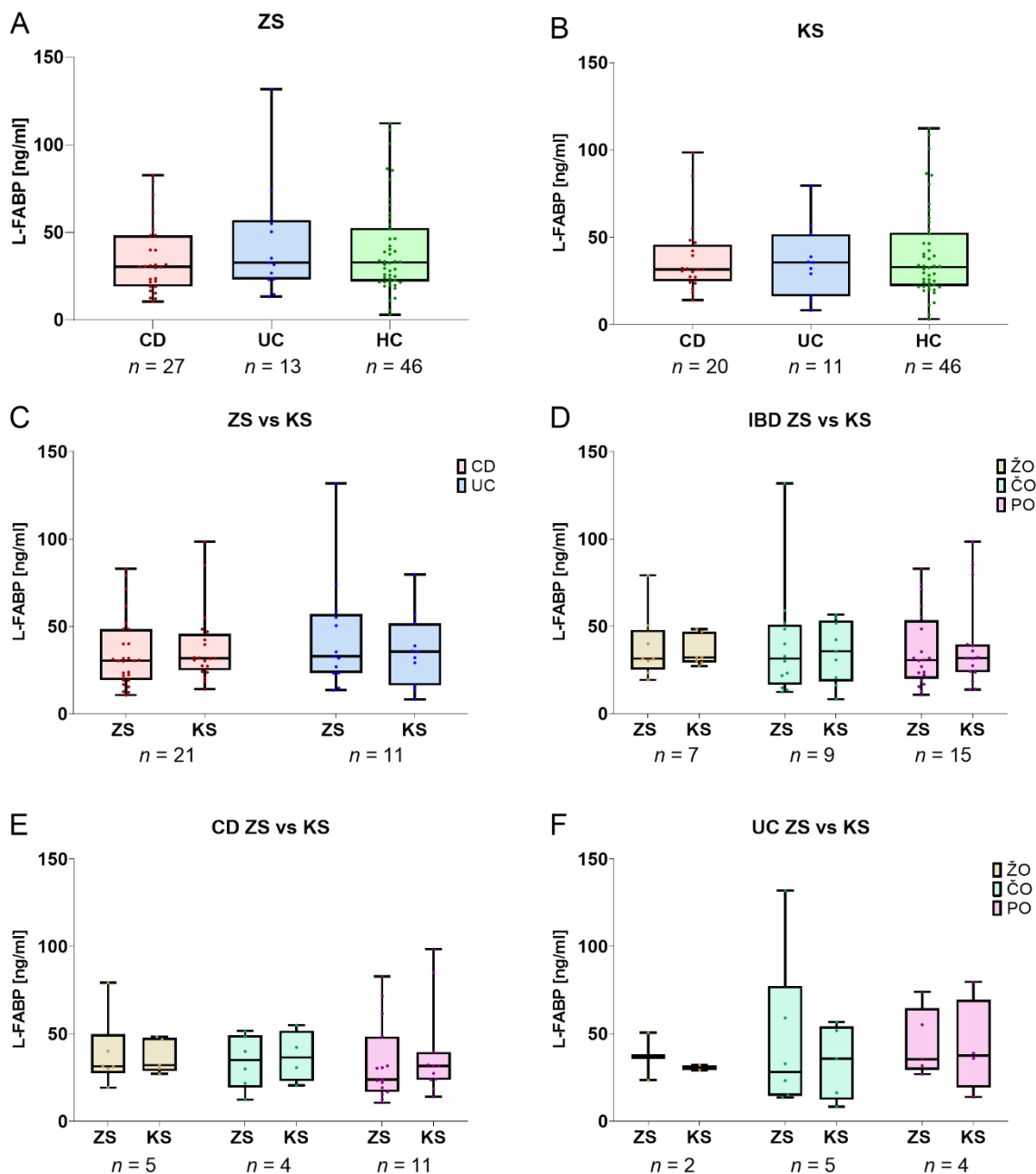
Obr. 17: Změny sérových hladin proteinu vázajícího lipopolysacharid (LBP) u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) ani s ulcerózní kolitidou (UC) neměli na ZS signifikantně rozdílné hladiny LBP od zdravých kontrol (HC). (B) Na KS měli pacienti s CD signifikantně nižší hladinu LBP než HC. U pacientů s UC žádný signifikantní rozdíl pozorován nebyl. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách LBP mezi ZS a KS. (D) Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani po rozdělení podle odpovědi na anti-TNF- α terapii (IBD) na žádnou odpověď (ŽO), částečnou odpověď (ČO) a plnou odpověď (PO). (E, F) Ani po rozdělení podle diagnózy nebyl pozorován signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin. * p < 0,001**



Obr. 18: Změny sérových hladin manan vázajícího lektinu (MBL) u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) ani s ulcerózní kolitidou (UC) neměli na ZS signifikantně rozdílné hladiny MBL od zdravých kontrol (HC). (B) Ani na KS neměli pacienti s IBD signifikantně rozdílné hladiny MBL od HC. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách MBL mezi ZS a KS. (D) Signifikantní úbytek MBL byl pozorován pouze u pacientů (IBD), kteří odpovídali na anti-TNF- α terapii plně (PO), zatímco u neodpovídajících (ŽO) či pouze částečně odpovídajících (ČO) rozdíl pozorován nebyl. (E, F) Po rozdělení podle diagnózy opět nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin. * p < 0,033

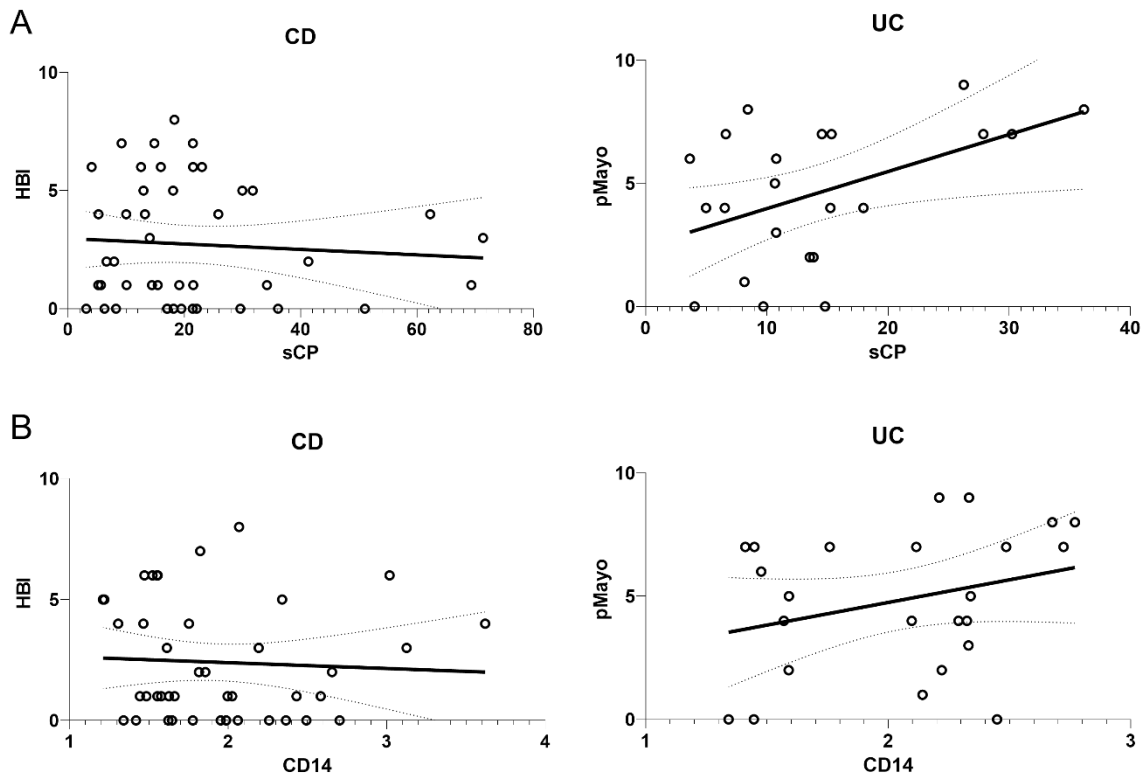


Obr. 19: Změny sérových hladin střevního proteinu vázajícího mastné kyseliny (I-FABP) u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) ani s ulcerózní kolitidou (UC) neměli na ZS signifikantně rozdílné hladiny I-FABP od zdravých kontrol (HC). (B) Na KS měli pacienti s UC signifikantně nižší hladinu I-FABP než HC. U pacientů s CD žádný signifikantní rozdíl pozorován nebyl. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách I-FABP mezi ZS a KS. (D) Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani po rozdělení podle odpovědi na anti-TNF- α terapii (IBD) na žádnou odpověď (ŽO), částečnou odpověď (ČO) a plnou odpověď (PO). (E, F) Ani po rozdělení podle diagnózy nebyl pozorován signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin. ** $p < 0,002$



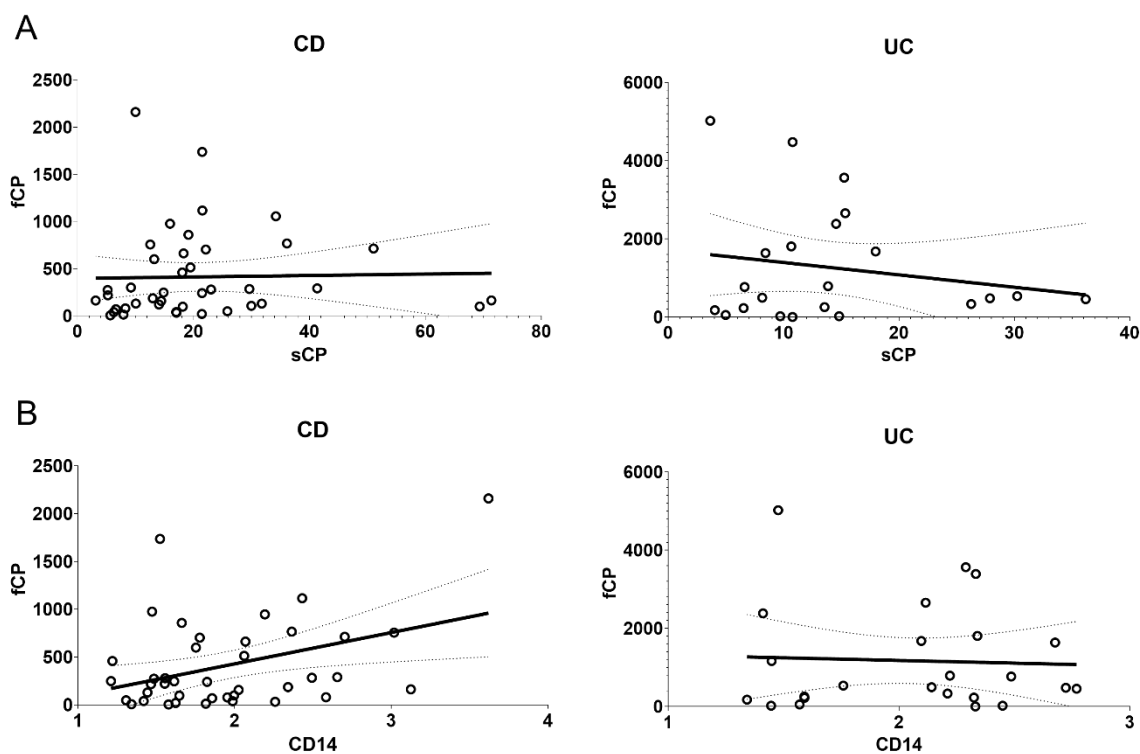
Obr. 20: Změny sérových hladin jaterního proteinu vázajícího mastné kyseliny (L-FABP) u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) před začátkem (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie. (A) Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) ani s ulcerózní kolitidou (UC) neměli na ZS signifikantně rozdílné hladiny L-FABP od zdravých kontrol (HC). (B) Ani na KS neměli pacienti s IBD signifikantně rozdílné hladiny L-FABP od HC. (C) Pacienti s CD a s UC neměli signifikantní rozdíl v hladinách L-FABP mezi ZS a KS. (D) Signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani po rozdělení podle odpovědi na anti-TNF- α terapii (IBD) na žádnou odpověď (ŽO), částečnou odpověď (ČO) a plnou odpověď (PO). (E, F) Ani po rozdělení podle diagnózy nebyl pozorován signifikantní rozdíl. V krabicových grafech je znázorněn medián a směrodatná odchylka. Každý bod představuje jeden vzorek. Ke statistickému vyhodnocení byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test s následným *post hoc* Dunnovým testem pro porovnání skupin na ZS a KS. Dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí byl použit pro porovnání ZS a KS u jednotlivých skupin.

Protože u pacientů s IBD vyšel téměř signifikantní úbytek hladiny sCP a u pacientů s CD vyšel signifikantní úbytek sérové hladiny CD14 v průběhu anti-TNF- α terapie, koreloval jsem hladinu těchto dvou biomarkerů s tíží nemoci. Jako ukazatel tíže nemoci jsem zvolil indexy HBI pro CD a pMayo pro UC. Nepozoroval jsem však signifikantní korelaci ani u sCP (obr. 21A), ani u sCD14 (obr. 21B). P-hodnota u korelace mezi pMayo a sCP se však signifikanci blížila ($p = 0,06$).



Obr. 21: Korelace mezi tíží onemocnění u Crohnovy choroby (CD) a ulcerózní kolitidy (UC) a hladinou sérového kalprotektinu (sCP) a sCD14. (A) Nebyla nalezena signifikantní korelace mezi Harvey-Bradshawým Indexem (HBI) pro CD ($p = 0,64$; $r = -0,07$) a částečným Mayo Indexem (pMayo) pro UC ($p = 0,06$; $r = 0,4$) a hladinou sCP. **(B)** Signifikance nebyla nalezena ani mezi HBI a CD14 ($p = 0,35$, $r = -0,15$) a pMayo a CD14 ($p = 0,11$, $r = 0,33$). Každý bod představuje jednoho pacienta v jednom časovém bodě. V grafu je zobrazen 95 % interval spolehlivosti. Výsledek byl statisticky vyjádřen jako neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

Jelikož indexy HBI a pMayo nemusí odpovídat histologickým změnám ve střevě (D'Amato *et al.*, 1986), koreloval jsem hladiny sCP a sérové hladiny CD14 s hladinami fCP. fCP slouží jako indikátor probíhajícího střevního zánětu a v naší skupině pacientů jsem pozoroval signifikantní pokles tohoto biomarkeru v průběhu anti-TNF- α terapie. Opět jsem však nepozoroval signifikantní korelaci mezi fCP a mezi sCP (obr. 22A) a sCD14 (obr. 22B) a to ani u pacientů s CD, ani u pacientů s UC.



Obr. 22: Korelace mezi hladinou fekálního kalprotektinu (fCP) a mezi hladinou sérového kalprotektinu (sCP) a CD14 u Crohnovy choroby (CD) a ulcerózní kolitidy (UC). (A) Nebyla nalezena statisticky významná korelace mezi fCP a sCP u pacientů s CD ($p = 0,09$; $r = 0,27$) ani u pacientů s UC ($p = 0,63$; $r = 0,11$) a hladinou sCP. (B) Signifikance nebyla nalezena ani mezi fCP a CD14 u pacientů s CD ($p = 0,09$; $r = 0,27$) a u pacientů s UC ($p = 0,82$; $r = 0,05$). Každý bod představuje jednoho pacienta v jednom časovém bodě. V grafu je zobrazen 95 % interval spolehlivosti. Výsledek byl statisticky vyjádřen jako neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

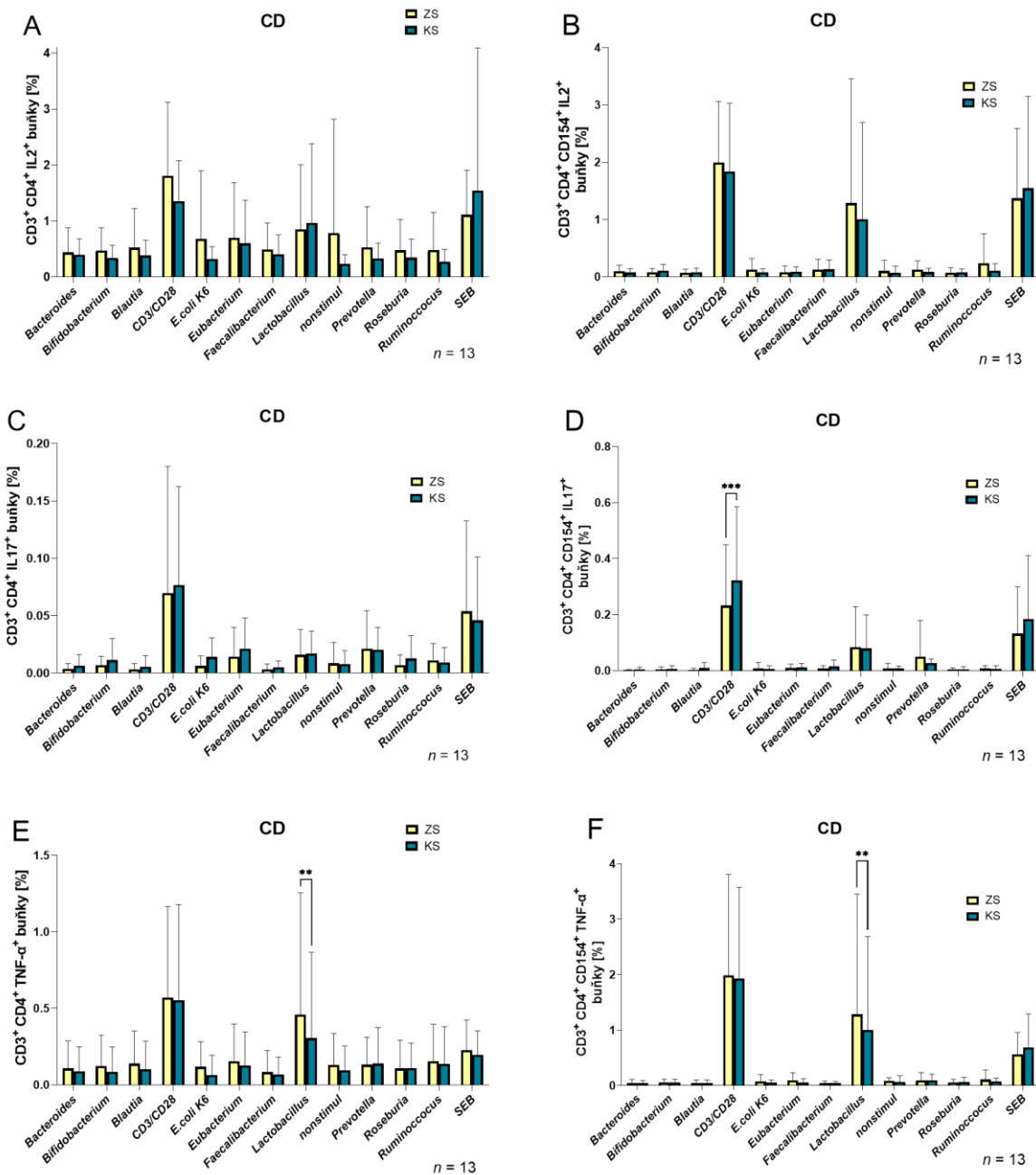
3. Kultivace PBMC pacientů s IBD s bakteriálními lyzáty

Pacienti s IBD mají dysbalanci imunitního systému. Leukocyty neadekvátně reagují na komenzální mikroorganismy ve střevě a produkují prozánětlivé cytokiny, čímž se podílejí na rozvoji a udržování chronického zánětu (Alexander *et al.*, 2021; Uematsu *et al.*, 2008). Málo je však známo, jakým způsobem anti-TNF- α terapie ovlivňuje tuto odpověď imunitních buněk vůči střevní mikrobiotě.

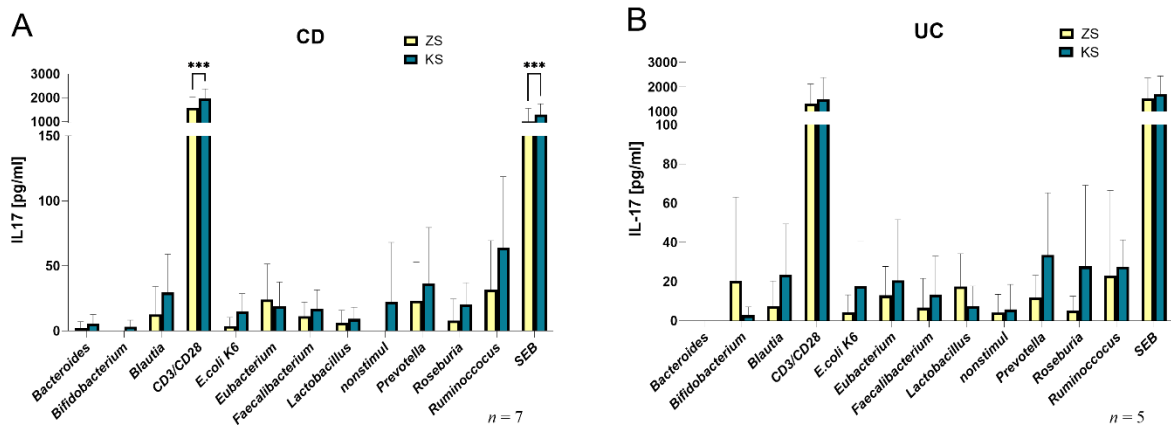
Abych zjistil, jakým způsobem odpovídají mononukleární buňky z periferní krve (PBMC) pacientů s IBD na ZS a na KS na mikrobiální antigeny, kultivoval jsem je s lyzáty 10 běžných komenzálních bakterií lidského střeva (Arumugam *et al.*, 2011; Deschasaux *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2010). Kvůli znatelné redukci studijní skupiny na KS jsem pracoval pouze s PBMC pacientů s CD.

Porovnal jsem produkci 3 Th1/Th17 cytokinů (IL-2, IL-17, TNF- α) pomocí průtokové cytometrie u pacientů s CD na ZS a na KS.

IL-2 je produkován především aktivovanými T-lymfocyty, na které pak působí jako autokrinní růstový faktor (Amado *et al.*, 2013). Nepozoroval jsem žádný signifikantní rozdíl v produkci IL-2 po kultivaci PBMC s bakteriálními antigeny (obr. 23A, B). Podobně jsem nepozoroval ani žádný rozdíl v produkci IL-17 (obr. 23C, D), který se podílí na chemotaxi neutrofilů do místa zánětu a na regulaci střevní bariéry indukcí exprese antimikrobiálních peptidů a proliferace buněk střevního epitelu (Maxwell *et al.*, 2015; Wolk *et al.*, 2004). Produkci tohoto cytokinu jsem jako jediného ověřil také *in vitro* pomocí metody ELISA v supernatantu po kultivaci PBMC s vybranými bakteriálními lyzáty (obr. 24A, B). Třetím detekovaným cytokinem byl TNF- α , který v cílových buňkách může indukovat apoptózu (Mítoma *et al.*, 2018) a může se podílet na narušené funkci střevní bariéry (Ninnemann *et al.*, 2022). PBMC na KS produkovaly signifikantně menší množství tohoto prozánětlivého cytokinu po kultivaci s bakterií *Lactobacillus plantarum* v porovnání se ZS (obr. 23E, F).



Obr. 23: Produkce cytokinů IL-2, IL-17 a TNF- α mononukleárními buňkami periferní krve (PBMC) pacientů s Crohnovou chorobou (CD) před zahájením (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie po kultivaci s bakteriálními antigeny. (A, B) CD⁴⁺ T-lymfocyty pacientů s CD neprodukovaly signifikantně rozdílné množství cytokinu IL-2 po kultivaci s bakteriálními lyzáty. Jako pozitivní kontroly sloužily stimuly CD3/CD28 a stafylokokový enterotoxin B (SEB). (C, D) CD⁴⁺ T-lymfocyty pacientů s CD neprodukovaly rozdílné množství cytokinu IL-17 po kultivaci s bakteriálními lyzáty. (E, F) CD⁴⁺ T-lymfocyty pacientů s CD produkovaly signifikantně menší množství TNF- α po kultivaci s bakterií *Lactobacillus plantarum* na KS než na ZS. Ve sloupcových grafech je znázorněna směrodatná odchylka. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí. ** p < 0,002; * p < 0,001**



Obr. 24: Produkce cytokinu IL-17 mononukleárními buňkami periferní krve (PBMC) pacientů s nespecifickými střevními záněty před zahájením (začátek studie, ZS) a v 38. týdnu (konec studie, KS) anti-TNF- α terapie po kultivaci s bakteriálními antigeny. (A) PBMC pacientů s CD neprodukovaly rozdílné množství cytokinu IL-17 po kultivaci s bakteriálními lyzáty. Jako pozitivní kontroly sloužily stimul CD3/CD28 a stafylokokový enterotoxin B (SEB). (B) Ani PBMC pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) IL-17 neprodukovaly rozdílně. Ve sloupcových grafech je znázorněna směrodatná odchylka. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvoucestný ANOVA test s následnou *post hoc* Šidákovou korekcí. * $p < 0,001$**

Diskuse

IBD je multifaktoriální onemocnění. V současné době se předpokládá, že klíčovou roli v patogenezi IBD hraje narušená střevní bariéra a neadekvátní odpověď imunitních buněk geneticky predisponovaného jedince na střevní mikrobiální antigeny. To vede k rozvoji chronického zánětu (S. H. Lee *et al.*, 2018). Jednou z nejčastějších strategií léčby IBD je biologická terapie monoklonálními protilátkami specifickými pro cytokin TNF- α . Tato terapie může vést k hojení střevní sliznice, ke snížení doby hospitalizace, počtu chirurgických zákroků a ke zlepšení celkové kvality života pacienta. I přes současný pokrok v léčbě IBD nezanedbatelné procento pacientů na anti-TNF- α terapii vůbec nereaguje nebo na ni v jejím průběhu reagovat přestane (Atreya *et al.*, 2020). Proto je snaha nalézt biomarkery, které by umožnily předpovědět odpověď jedince na biologickou terapii a současně tak zamezit vystavení jedince nadbytečné léčbě. Možnost této predikce by umožnila rychlejší volbu správné léčby pacientů s IBD, čímž by se ušetřil čas, peníze a rychleji by se jim zlepšila kvalita života.

Ve své diplomové práci jsem se proto zaměřil na hledání potencionálních biomarkerů, které by odpověď jedince na anti-TNF- α terapii mohly předpovědět. U pacientů s IBD jsem během terapie sledoval změny ve složení střevní mikrobioty, změny v sérových hladinách biomarkerů spojených s poškozením střevní bariéry a mikrobiální translokace a změny v produkci prozánětlivých cytokinů CD4⁺ T-lymfocyty v reakci na mikrobiální antigeny.

Ve své diplomové práci jsem sledoval změny ve složení střevní mikrobioty během anti-TNF- α terapie u pacientů s IBD. Pacienti s CD i s UC měli před zahájením i v průběhu terapie signifikantně nižší α -diverzitu ve srovnání s HC. α -diverzitu jsem vyjádřil jako Shannonovu entropii, která počítá s přítomností i s abundancí jednotlivých taxonů. Toto pozorování bylo ve shodě s většinou podobných prací zabývajících se studiem střevní mikrobioty u pacientů s IBD (Aden *et al.*, 2019; Sankarasubramanian *et al.*, 2020; Sokol *et al.*, 2017). Pascal se svými kolegy však nenalezl signifikantně rozdílnou α -diverzitu u pacientů s UC oproti HC (Pascal *et al.*, 2017). Jedním z důvodů této nesrovnalosti by mohl být rozdílný experimentální design. Pascal ve své práci například používal odlišný postup ve zpracování vzorků a použil odlišné primery cílicí na variabilní úsek *16S rRNA* genu (Pascal *et al.*, 2017).

Studium lidského mikrobiomu je relativně novým odvětvím biologie a dodnes v něm není zavedený žádný standardizovaný postup. Autoři uchovávají vzorky za rozdílných podmínek, využívají různé metody izolace a amplifikace nukleových kyselin či aplikují na získaná data jiné bioinformatické postupy (Brooks *et al.*, 2015). Pro analýzu mikrobioty se zdá být zásadní volba primerů pro amplifikaci bakteriální DNA. Využívají se primery cílicí na gen pro malou ribozomální podjednotku 16S rRNA. Tento gen je u bakterií vysoce konzervovaný, obsahuje však také 9 variabilních úseků (Chakravorty *et al.*, 2007). Primery cílicí na jednotlivé variabilní úseky mohou upřednostňovat amplifikaci různých taxonů (Kong *et al.*, 2017). Já jsem ve své diplomové práci použil primery cílicí na úseky V3V4, zatímco

v jiných studiích byly často použity primery specifické pouze pro úsek V4 (Aden *et al.*, 2019; Pascal *et al.*, 2017).

Jedním z důvodů, proč mají pacienti s IBD nižší α -diverzitu střevní mikrobioty v porovnání se zdravými jedinci, může být narušená homeostáze na střevní sliznici v důsledku narušené imunitní tolerance komezálních mikroorganismů ve střevě. U pacientů s CD byla popsána například zvýšená T-buněčná odpověď na komezální rody *Eubacterium*, *Faecalibacterium* a *Bacteroides*. Zároveň u nich byla popsána snížená produkce IgA protilátek pro rody *Faecalibacterium* a *Bacteroides*. Tento pokles protilátek může být sekundární jev, kdy v důsledku silné buněčné odpovědi dojde k redukci těchto komezálů a tím pádem i k poklesu specifických protilátek (Coufal *et al.*, 2019). Střevní plazmatické buňky pacientů s CD i s UC produkují protilátky abnormálně, čímž dochází k abnormální opsonizaci mikrobů. Některé jsou opsonizovány více, což může vést k jejich redukci, zatímco jiné jsou opsonizovány méně, což může vést k jejich expanzi. To může zásadně přispívat k střevní dysbióze (Michaud *et al.*, 2022).

V průběhu anti-TNF- α terapie jsem u pacientů s UC pozoroval signifikantní nárůst α -diverzity střevní mikrobioty, kdy ji již neměli v 38. týdnu terapie signifikantně rozdílnou od HC. V porovnání s tímto pozorováním, Aden se svými kolegy v průběhu terapie nepozoroval signifikantní nárůst Shannonovy entropie. To mohlo být způsobeno skutečností, že ve své práci pracoval s menší skupinou pacientů a pacienty s IBD nerozlišoval na pacienty s CD a s UC. Pozoroval však nárůst v jiné metrice α -diverzity, v Chao1. Oproti Shannonově entropii však index Chao1 počítá pouze s abundancemi a nepracuje tedy s méně početnými taxony (Aden *et al.*, 2019). Co se týče pacientů s CD, je mé pozorování v souladu s výsledky studie, ve které pacienti s CD měli signifikantně rozdílnou α -diverzitu v porovnání s HC i po 24 týdnech anti-TNF- α terapie (Sanchis-Artero *et al.*, 2021).

Důvodem, proč u pacientů s UC došlo k signifikantnímu zvýšení α -diverzity v průběhu anti-TNF- α terapie a u pacientů s CD nikoliv, může být rozdílná patofyziologie obou nemocí. Historicky se uvádí, že CD je Th1/Th17 a UC Th2 zprostředkovaná choroba. Charakter střevní dysbiózy může být tedy odlišný, stejně jako může být odlišná role prozánětlivého cytokinu TNF- α v průběhu nemoci, a tedy i působení protilátek proti němu. Například bylo pozorováno, že střevní mikrobiota pacientů s CD je v porovnání s UC méně stabilní (Halfvarson *et al.*, 2017; Pascal *et al.*, 2017). Jiným vysvětlením může být odlišná indikace k samotné terapii. V ČR je indikací k zahájení biologické léčby u pacientů s CD těžká forma onemocnění. Mezi konkrétní indikace patří vysoké riziko invalidizujícího průběhu nemoci, komplexní perianální píštěle a mimostřevní projevy. U pacientů s UC je indikací k biologické léčbě střední až těžká forma nemoci, což zahrnuje akutní těžké ataky nemoci a mimostřevní projevy (Bortlík *et al.*, 2019). Mikrobiota pacientů s těžší formou nemoci může na terapii odpovídat pomaleji.

Po rozdělení pacientů s UC podle jejich odpovědi na anti-TNF- α terapii jsem nenalezl žádný rozdíl v α -diverzitě před zahájením a v průběhu terapie. To mohlo být způsobeno malým množstvím pacientů v jednotlivých skupinách, jelikož postupným členěním se studijní skupina zdatelně zmenšila.

Podobně jako v dalších studiích jsem pozoroval, že u pacientů s IBD i u HC bylo složení střevní mikrobioty v čase relativně stabilní (Arumugam *et al.*, 2011; Dethlefsen & Relman, 2011; Huttenhower *et al.*, 2012). Mnohými autory však bylo demonstrováno, že může být krátkodobě ovlivněno různými faktory. Složení mikrobioty tak může být krátkodobě ovlivněno podáním antibiotik, po jejich vysazení se však vrací ke složení podobnému tomu původnímu (Dethlefsen & Relman, 2011). Jiným ovlivňujícím faktorem je příjem potravy, jehož efekt na složení střevní mikrobioty je pozorovatelný již po 24 hodinách. Nicméně, zatímco dlouhodobé stravovací návyky mají zásadní vliv na střevní mikrobiotu, jednorázová konzumace z dlouhodobého hlediska žádný významný efekt nemá (Wu *et al.*, 2011),

Ve své diplomové práci jsem nepozoroval žádný vztah mezi tíží onemocnění a mezi α -diverzitou střevní mikrobioty, ačkoliv jsem u CD i u UC pozoroval trend negativní závislosti. Tento výsledek mohl být způsoben použitím indexů HBI a pMayo pro hodnocení tíže nemoci. Ačkoliv jsou oba indexy v ČR hojně užívány v klinické praxi, jejich výstup je ze své podstaty částečně subjektivní podle úsudku vyšetřujícího lékaře a nekoreluje s kolonoskopickými a histologickými změnami ve střevě (D'Amato *et al.*, 1986). Vzhledem k tomu, že tato práce obsahuje pilotní výsledky našeho pozorování, náš výsledek může být také ovlivněn nízkým počtem pacientů ve sledovaných skupinách.

Složení střevní mikrobioty pacientů s IBD se nicméně před začátkem anti-TNF- α terapie lišilo od HC, na základě PCoA analýzy jsem však nepozoroval, že by se mikrobiota pacientů s CD významně lišila od mikrobioty pacientů s UC. Toto pozorování bylo v souladu s prací, kterou provedl Aden (Aden *et al.*, 2019). V jiné studii však bylo popsáno odlišné složení střevní mikrobioty mezi pacienty s CD a s UC (Sokol *et al.*, 2017), přičemž pacienti s UC měli střevní mikrobiotu podobnější mikrobiotě HC více než pacienti s CD (Sankarasubramanian *et al.*, 2020). Výsledek zjištěný v mé diplomové práci mohl být odlišný z důvodu rozdílné a mnohem menší skupiny pacientů v porovnání s uváděnými pracemi.

Dalším výsledkem mé diplomové práce bylo, že střevní mikrobiota pacientů s CD i s UC se začala v průběhu anti-TNF- α terapie podobat složení střevní mikrobiotě zdravých jedinců. Toto pozorování je v souladu s pracemi dalších autorů (Aden *et al.*, 2019; Sanchis-Artero *et al.*, 2021). Anti-TNF- α terapie má tedy pozitivní efekt na obnovení druhové rozmanitosti střevní mikrobioty. Bylo také prokázáno, že pacienti s podobným složením mikrobioty k mikrobiotě HC měli lepší odpověď na anti-TNF- α terapii (Kolho *et al.*, 2015).

Ve spolupráci s Mgr. Dagmar Schierovou jsme ukázali, že pacienti s UC mají v průběhu anti-TNF- α terapie vyšší zastoupení nekultivovatelné bakterie *Ruminococcus* (Schierova *et al.*, 2021). Práce spojující tento rod s patofyziologií IBD mají často protichůdné výsledky. Podle studie Sokola a jeho

kolegů je rod *Ruminococcus* u pacientů s IBD redukován (Sokol *et al.*, 2017). Bylo také popsáno, že u krys zastoupení střevní bakterie *Ruminococcus* negativně koreluje s hladinou prozánětlivého cytokinu IFN- γ během střevního zánětu (Meng *et al.*, 2022). S ileální CD však byla spojena vyšší abundance druhu *R. gnavus* (Joossens *et al.*, 2011; Pascal *et al.*, 2017), který je producentem prozánětlivých polysacharidů (Henke *et al.*, 2019). V kontrastu s naším výsledkem, Aden ve své práci pozoroval nárůst abundance bakterií *Coprococcus* a *Roseburia* v průběhu anti-TNF- α terapie u pacientů s IBD, a nepozoroval žádné změny v abundanci rodu *Ruminococcus* (Aden *et al.*, 2019).

Ve své diplomové práci jsem tedy popsal, že pacienti s IBD mají odlišné mikrobiální složení ve střevě v porovnání s HC. Tím, že během anti-TNF- α terapie dochází ke snížení střevního zánětu, a tedy i k hojení střevní sliznice, dochází k postupnému obnovení střevní mikrobioty. Ta se opět podobá mikrobiotě zdravého jedince. V budoucích pracích by mělo být pracováno s větší skupinou pacientů, jelikož v této práci vycházející z pilotní studie jsem kvůli postupnému členění pacientů podle typu diagnózy a podle odpovídatosti na terapii pracoval s nízkým počtem pacientů, což mohlo mít za následek často negativní výsledky s obtížnou interpretací.

Anti-TNF- α terapie je častou a účinnou terapií u pacientů s IBD, avšak doposud chybí jakýkoliv jednoduchý a účinný prediktivní biomarker, který by se dal použít v klinické praxi jako indikátor odpovědi na tuto terapii. Z tohoto důvodu jsem se ve své práci zaměřil na hledání sérového biomarkeru, který by byl vhodný k určení budoucí odpovědi na léčbu. U pacientů s IBD jsem detekoval hladiny 7 vybraných biomarkerů souvisejících s funkcí střevní bariéry (I-FABP, L-FABP) a s imunitní odpovědí v důsledku mikrobiální translokace (sCP, DEFA1, CD14, LBP, MBL). Pacienty s IBD jsem rozdělil podle jejich odpovědi na neodpovídající, částečně odpovídající a plně odpovídající léčbu a porovnal jsem jejich sérové hladiny biomarkerů před začátkem terapie a v 38. týdnu anti-TNF- α terapie.

Sérový kalprotektin (sCP), známý také jako dimer S100A8/A9, je prozánětlivý peptid produkovaný především neutrofily a monocyty. Váže se na TLR4 na povrchu neutrofilů, čímž je atrahuje do místa zánětu (Ryckman *et al.*, 2003). Pacienti s IBD mají oproti HC větší množství neutrofilů v krevní cirkulaci (Langley *et al.*, 2021; Okba *et al.*, 2019), což může zásadně přispívat k udržování chronického zánětu. V mé práci jsem pozoroval signifikantně vyšší hladiny sCP před zahájením i v průběhu anti-TNF- α terapie u pacientů s IBD. To je v souladu s dalšími studiemi (Foell *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2019; Veyrard *et al.*, 2022). Vyšší hladiny sCP mohou být způsobeny buď větším množstvím neutrofilů, jejich vyšší aktivací či obojím. Některé studie popisují hladiny sCP jako možný indikátor rozvoje a závažnosti IBD (Foell *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2019; Veyrard *et al.*, 2022). Klinické využití však zůstává nadále kontroverzní, protože hladiny sCP mohou být výrazně zvýšené i při jiných zánětlivých onemocněních. V mé diplomové práci jsem nedospěl k statisticky významnému výsledku, že by anti-TNF- α terapie ovlivňovala hladiny sCP, ačkoliv u pacientů s UC byl pozorovatelný trend poklesu hladin sCP v průběhu terapie. Po spojení diagnóz jsem zjistil téměř statisticky významný ($p = 0,07$)

úbytek sCP u pacientů, kteří plně odpovídali na terapii. Dále jsem koreloval hladinu tohoto biomarkeru s tíží nemoci (HBI pro CD a pMayo pro UC) a s hladinou fekálního kalprotektinu (fCP). Ani u CD, ani u UC jsem nepozoroval statisticky významnou korelaci, ačkoliv u pacientů s UC vyšla téměř signifikantní ($p = 0,06$) pozitivní asociace mezi indexem pMayo a hladinou sCP. Nicméně, malý počet jedinců použitých v mé diplomové práci neumožnil stanovit jednoznačný závěr, zda pokles hladiny sCP souvisel spíše s klinickým zlepšením nemoci, či přímo s anti-TNF- α terapií.

Dále jsem detekoval sérové hladiny antimikrobiálního peptidu α -defensinu (DEFA1). Ten je produkován především neutrofily, a kromě významných antimikrobiálních vlastností může do místa zánětu atrahovat T-lymfocyty. Zvýšená exprese genu *DEFA1* v důsledku vyššího množství genových kopií byla spojena s rozvojem CD i UC (Jespersgaard *et al.*, 2011; Kanmura *et al.*, 2021). Ve své práci jsem pozoroval vyšší sérové hladiny DEFA1 u pacientů s CD i s UC oproti HC před začátkem anti-TNF- α terapie. To je v souladu se studií, ve které byla nalezena zvýšená exprese genu *DEFA1* v zanícené střevní sliznici pacientů s IBD (Cunliffe *et al.*, 2002) a se studií, ve které byla nalezena vyšší hladina DEFA1 v krevní plazmě pacientů s CD (Yamaguchi *et al.*, 2009). Bylo popsáno, že pacienti s IBD mají v porovnání s HC vyšší množství neutrofilů v krevní cirkulaci (Langley *et al.*, 2021; Okba *et al.*, 2019) a že u pacientů s UC neutrofily s více kopiemi genu *DEFA1* po stimulaci LPS produkují vysoké množství tohoto antimikrobiálního peptidu (Kanmura *et al.*, 2021). Zvýšené množství DEFA1 může v lumen střeva díky jeho antimikrobiálním vlastnostem přispívat k dysbióze střevní mikrobioty. Zatímco pacienti s CD měli i v 38. týdnu anti-TNF- α signifikantně vyšší hladinu sérového DEFA1 v porovnání se zdravými jedinci, pacienti s UC v méj diplomové práci neměli signifikantně rozdílné hladiny DEFA1 od HC v průběhu anti-TNF- α terapie. To mohlo být způsobeno celkovým snížením střevního zánětu. Nicméně jsem nepozoroval, že by se hladiny DEFA1 mezi pacienty s IBD lišily podle odpovědi na terapii.

Pro transdukcí signálu po navázání LPS na TLR4 je důležitá molekula CD14, která je konstitutivně exprimována na povrchu makrofágů a buněk epitelu. Na myších bylo demonstrováno, že její exprese ve střevě je závislá na přítomnosti střevní mikrobioty. CD14 může být ve formě membránového receptoru či ve formě solubilní (sCD14), kdy společně s LBP váže a přenáší LPS k cílovým buňkám (Buchheister *et al.*, 2017). V mé diplomové práci jsem nepozoroval statisticky významný rozdíl v hladinách solubilního CD14 v krevním séru pacientů s CD a s UC v porovnání s HC, což je v rozporu se studií, ve které byla pozorována signifikantně nižší hladina sérového CD14 u pacientů s IBD v porovnání se zdravými jedinci (Lakatos *et al.*, 2011). V jiné studii bylo popsáno, že pacienti s IBD mají ve střevní sliznici zvýšenou expresi membránového CD14 (Frolova *et al.*, 2008). Solubilní forma CD14 může kompetovat s membránovou formou a tím může snižovat LPS-závislou produkci prozánětlivých cytokinů (Funda *et al.*, 2001). Výsledek mé práce byl v souladu s recentní prací Coufala a jeho kolegů, ve které se zaměřil na pacienty s IBD v ČR (Coufal *et al.*, 2019). Pozoroval jsem ovšem signifikantní úbytek hladin sCD14 v průběhu anti-TNF- α terapie u plně odpovídajících pacientů s CD. To je

v souladu se studií, ve které byla pozorována nižší hladina sCD14 v krevním séru pacientů s inaktivní CD v porovnání s aktivní CD (Lakatos *et al.*, 2011) a se studií, kde byly hladiny sCD14 v krevní plazmě pacientů s CD popsány jako dobrý biomarker kompletního hojení střevní sliznice (Hosomi *et al.*, 2018). Každopádně navzdory pozorovanému poklesu hladin sCD14 v průběhu terapie, Buchheister se svým kolegy demonstroval jeho protektivní roli v myším modelu s DSS-indukovanou střevní kolitidou (Buchheister *et al.*, 2017). Dále jsem koreloval hladinu tohoto biomarkeru s tíží nemoci (HBI pro CD a pMayo pro UC) a s hladinou fCP. Nepozoroval jsem žádné statisticky významné výsledky. Toto pozorování naznačuje, že pokles sCD14 v průběhu anti-TNF- α terapie je asociován přímo s léčbou než s klinickým zlepšením nemoci. Tento závěr však musí být ověřen ve studii s větší skupinou pacientů.

Na aktivaci makrofágů navázáním LPS na TLR4 se zásadně podílí také protein vázající lipopolysacharid (LBP). Ve své práci jsem nepozoroval statisticky významné rozdíly hladiny LBP v krevním séru pacientů s IBD v porovnání s HC. Někteří autoři sice popsali zvýšené hladiny tohoto biomarkeru, pracovali však s jinou kohortou pacientů, například s pacienty s IBD a endotoxémií v důsledku translokace mikrobů (Rojo *et al.*, 2007) či s pediatrickými pacienty s IBD (Pasternak *et al.*, 2010). Zvýšené hladiny v krevním séru pacientů s CD pozoroval ve své práci Lakatos se svými kolegy. Ten také popsal vyšší hladiny LBP u pacientů s aktivní CD v porovnání s inaktivní (Lakatos *et al.*, 2011). Podobně jsem já pozoroval, že pacienti s CD měli v průběhu anti-TNF- α terapie významně nižší hladinu LBP než HC. Tento úbytek mohl být způsoben přímo blokadou cytokinu TNF- α , který indukuje v hepatocytech produkci LBP (Geller *et al.*, 1993). LBP byl také popsán jako biomarker mikrobiální translokace (Stehle *et al.*, 2012). Proto mohl být úbytek v průběhu terapie u pacientů s CD také způsoben nepřímo zlepšením funkce střevní bariéry, a tedy i nižší bakteriální translokací. Redukce hladin LBP může být u IBD prospěšná, jelikož tento protein indukuje po navázání na makrofágy a monocyty produkci TNF- α (Gutsmann *et al.*, 2001).

Dalším biomarkerem, který jsem detekoval, byl manan vázající lektin (MBL). Ten se váže na cukerné složky mnohých mikroorganismů a díky asociované serinové proteáze aktivuje lektinovou dráhu komplementu. V mé diplomové práci jsem nepozoroval signifikantní změny sérových hladin MBL před ani v průběhu anti-TNF- α terapie mezi pacienty s IBD ani v porovnání s HC. V mnohých studiích je MBL zmiňován v souvislosti s genovým polymorfismem, který způsobuje jeho nižší hladinu, narušenou funkci a zvýšené množství protilátek specifických pro *S. cerevisiae* (Choteau *et al.*, 2016; Rector *et al.*, 2001; Seibold *et al.*, 2007; Sivaram *et al.*, 2011). Bylo popsáno, že pediatrickí pacienti s CD mají nižší hladinu MBL v porovnání se zdravými jedinci, přičemž nízká hladina souvisela s rozvojem ileálního zánětu (Kovacs *et al.*, 2013). Ve stejné práci však bylo zároveň popsáno, že pacienti s CD a s UC nemají odlišné sérové hladiny MBL od HC. Výsledek mé práce byl v souladu s touto a s další studií (Bağ-Romaniszyn *et al.*, 2020; Kovacs *et al.*, 2013). Nicméně, i fyziologické hladiny MBL, který by měl v důsledku mutace narušenou funkci, by mohly přispívat k neadekvátní odpovědi vůči mikrobům, a tedy i k rozvoji IBD.

Jako biomarkery poškozené střevní bariéry jsem použil intestinální (I-) a jaterní protein vázající mastné kyseliny (L-FABP). Rodina FABP zahrnuje intracelulární proteiny podílející se na transportu a metabolismu mastných kyselin. I-FABP se nachází specificky v enterocytech a do krevní cirkulace se dostává pouze při poškození buněk střevního epitelu. Navzdory očekávání jsem nedetekoval jeho rozdílné hladiny u pacientů s IBD před anti-TNF- α terapií a v jejím průběhu jsem dokonce pozoroval nižší hladinu I-FABP u pacientů s UC v porovnání s HC. Tento výsledek je v rozporu s jinými studiemi, ve kterých byly popsány vyšší sérové hladiny u pacientů s CD (Sarıkaya *et al.*, 2015) a s UC (Wiercinska-Drapalo *et al.*, 2008). Vyšší hladiny I-FABP byly pozorovány i v krevní plazmě pediatrických pacientů s CD v porovnání se zdravými jedinci (Logan *et al.*, 2022). Nicméně bylo popsáno, že nemá tento biomarker klinický potenciál, jelikož jeho hladiny v krevní plazmě se neliší mezi pacienty s aktivním IBD a v remisi (Bodelier *et al.*, 2016). V jiné studii byly detekovány vyšší hladiny I-FABP u pacientů s CD a během léčby IFX byl pozorován společně s klinickým zlepšením nemoci a úbytkem cytokinu TNF- α také úbytek tohoto biomarkeru (Al-Saffar *et al.*, 2017). Pozorování, že sérové hladiny I-FABP se nelišili mezi pacienty s IBD a HC, je naopak v souladu s výsledky některých dalších prací (Coufal *et al.*, 2019; Szymanska *et al.*, 2022).

L-FABP se na rozdíl od I-FABP kromě enterocytů nachází také v buňkách jater, ledvinových tubulů, pankreatu a plic (Ho *et al.*, 2020). V diplomové práci jsem nepozoroval žádné signifikantní rozdíly tohoto biomarkeru u pacientů s CD a s UC oproti HC ani žádné změny hladin během anti-TNF- α terapie. To bylo v souladu s prací Coufala a jeho kolegů (Coufal *et al.*, 2019). Dosud existuje pouze málo prací spojujících L-FABP s IBD. U pacientů s UC byla popsána snížená exprese L-FABP v zanícené střevní tkáni (Okahara *et al.*, 2005) a u pacientů s CD byl popsán pokles hladiny L-FABP v moči po výlučné enterální výživě (Ho *et al.*, 2020).

Ve své diplomové práci jsem detekoval 7 biomarkerů v krevním séru pacientů s IBD. Z toho 2 se dle současných studií ukazují, že by mohly mít v budoucnu využití jako ukazatele odpovědi na anti-TNF- α terapii. Hladiny sCP a sCD14 signifikantně klesly v průběhu terapie u plně odpovídajících pacientů. Mé pozorování je ovšem potřeba potvrdit studií s mnohem větší studijní skupinou. Z podstaty věci v 38. týdnu terapie zůstalo do naší studie zařazeno nejvíce plně odpovídajících pacientů, zatímco neodpovídajících a částečně odpovídajících bylo méně. To mohlo mít za následek také nesignifikantní výsledky.

Protože v patogenezi CD hraje významnou úlohu Th1/Th17 imunitní odpověď, porovnal jsem produkci klíčových cytokinů IL-17, IL-2 a TNF- α PBMC pacientů s CD po kultivaci s lyzáty 10 běžných komenzálních bakterií lidského střeva před a v průběhu anti-TNF- α terapie. Z důvodu malého množství odebraných vzorků PBMC nebyl tento *ex vivo* experiment u pacientů s UC možný.

V rámci svých experimentů jsem nepozoroval rozdílnou produkci IL-17 CD4⁺ T-lymfocyty pacientů s CD po kultivaci s bakteriálními antigeny před a v průběhu anti-TNF- α terapie. IL-17 je cytokin

produkovaný především Th17 buňkami a ILC3 buňkami a hraje důležitou roli v udržování střevní homeostázy (Poholek *et al.*, 2019; Sakuraba *et al.*, 2009). Jeho role v patofyziologii CD je dvojitá. Zdá se, že zatímco ve fyziologických hladinách je kriticky důležitý pro správné fungování střevní bariéry (J. S. Lee *et al.*, 2015), ve vysokých hladinách se může zásadně podílet na rozvoji a udržování chronického střevního zánětu (Wedebye Schmidt *et al.*, 2013). Většina prací popisuje u pacientů s CD vyšší produkci IL-17 imunitními buňkami v porovnání se zdravými jedinci (Fujino *et al.*, 2003; Hegazy *et al.*, 2017; Sakuraba *et al.*, 2009). Coufal s kolegy ve své práci pozoroval zvýšenou produkci tohoto cytokinu CD4⁺ T-lymfocyty po kultivaci s bakterií *Eubacterium* v porovnání s buňkami zdravých jedinců (Coufal *et al.*, 2019). Můj výsledek byl v souladu s jinou studií, kde nebyla nalezena změněná exprese IL-17 u pacientů s CD v průběhu anti-TNF- α terapie (Katz *et al.*, 2014). Nicméně, ve své diplomové práci jsem s bakteriálními lysáty kultivoval PBMC izolované z periferní krve pacientů a mé pozorování tedy odpovídalo spíše systémové imunitní odpovědi než lokální imunitní odpovědi ve střevě.

Podobně jako v případě IL-17 jsem nepozoroval změnu v produkci cytokinu IL-2 po kultivaci PBMC pacientů s CD s bakteriálními lysáty před a v průběhu anti-TNF- α terapie. IL-2 je produkován především CD4⁺ T-lymfocyty, na které působí jako autokrinní růstový faktor. Může podporovat rozvoj Th1 imunitní odpovědi, a naopak inhibovat Th17 odpověď (Amado *et al.*, 2013; Spolski *et al.*, 2018). U pacientů s CD byla detekována zvýšená produkce IL-2 CD4⁺ T-lymfocyty v krevní cirkulaci (Funderburg *et al.*, 2013; Katz *et al.*, 2014) i v lamina propria (Jaeger *et al.*, 2021) v porovnání se zdravými jedinci. Pozorování statisticky nevýznamného rozdílu mohlo být opět ovlivněno skutečností, že odpověď PBMC odráží spíše systémovou imunitní odpověď než tu střevní. Produkce IL-2 PBMC pacientů s IBD tedy může být, spíše než střevními mikroby, ovlivněna samotnou anti-TNF- α terapií. Bylo popsáno, že TNF- α může ovlivňovat produkci IL-2 přes receptor TNFR2 (E. Y. Kim & Teh, 2004) a že během anti-TNF- α dochází ke snížení produkce IL-2 PBMC pacienty s IBD (Katz *et al.*, 2014). Také u pacientů s CD bylo popsáno, že polymorfismus rs61839660 v CD25 podjednotce IL-2R způsobuje vyšší odpověď T-lymfocytů na stimulaci IL-2 a že u homozygotů mají T-lymfocyty zvýšenou expresi receptorů způsobujících homing do střevní sliznice, jako GPR15 a CCR6 (Goldberg *et al.*, 2021). V budoucnu by tedy bylo dobré kromě produkce cytokinu IL-2 v reakci na antigeny střevních mikrobů detekovat také homingové receptory do střevní sliznice.

Třetím detekovaným cytokinem v mé diplomové práci byl TNF- α , v jehož produkci CD4⁺ T-lymfocyty jsem pozoroval signifikantní pokles po kultivaci s bakterií *Lactobacillus plantarum* v průběhu anti-TNF- α terapie. Tento cytokin produkují především aktivované makrofágy a lymfocyty. Po vazbě na receptor cílové buňky indukuje buď aktivaci NF- κ B dráhy nebo apoptózu (Mitoma *et al.*, 2018) a u myši bylo popsáno, že se může podílet na tlumení reparace střevního epitelu (Ninnemann *et al.*, 2022). PBMC pacientů s IBD produkují TNF- α jako neadekvátní odpověď na mikroby či na jejich součásti (Calderón-Gómez *et al.*, 2016; Hegazy *et al.*, 2017). Coufal se svými kolegy pozoroval, že CD4⁺ T-lymfocyty pacientů s CD produkují po kultivaci s bakteriemi *Roseburia*, *Eubacterium* a *Faecalibacterium* více

TNF- α než buňky zdravých kontrol (Coufal *et al.*, 2019). Mé pozorování, že CD4⁺ T-lymfocyty produkují v průběhu anti-TNF- α terapie méně TNF- α v reakci na *L. plantarum*, bylo v souladu se studií, ve které byl popsán úbytek produkce tohoto cytokinu CD4⁺ buňkami u pacientů s CD podstupujících anti-TNF- α terapii (Katz *et al.*, 2014). *L. plantarum* je považována za prospěšnou bakterii tlumící produkci prozánětlivých cytokinů, včetně TNF- α (Zhang *et al.*, 2019). Snížením produkce TNF- α se podílí na znovunastolení funkční střevní bariéry zvýšením exprese proteinů těsných spojů mezi epitelovými buňkami střeva (Nam *et al.*, 2019) a zvýšením absorpce butyrátu buňkami epitelu (Borthakur *et al.*, 2010). Nižší odpověď CD4⁺ T-lymfocytů vůči této bakterii může mít tedy významný efekt v klinickém zlepšení pacientů s CD.

Ve své diplomové práci jsem pozoroval signifikantní úbytek produkce prozánětlivého cytokinu TNF- α CD4⁺ T-lymfocyty pacientů s CD po kultivaci s bakterií *Lactobacillus plantarum* během anti-TNF- α terapie. Stejně jako v předchozích částech této práce, toto pozorování by mělo být ověřené ve studii s větší skupinou pacientů. Také by měl být proveden výzkum, ve kterém by byla porovnána produkce více cytokinů (například IL-10, IL-22 a IL-23) po kultivaci s větším množstvím střevních komenzálních bakterií. Měly by být analyzovány další buněčné populace (například makrofágy či ILC3 izolované z lamina propria střeva). Analogicky by měla být provedena studie, která by zahrnovala také pacienty s UC.

Závěr

Patogeneze nespecifických střevních zánětů (IBD) je úzce spjata s imunitní odpovědí vůči střevní mikrobiotě jedince. V České republice je častou léčebnou metodou terapie monoklonálními protilátkami, které jsou specifické pro prozánětlivý cytokin TNF- α . Vysoké procento pacientů však na tuto terapii buď neodpovídá od začátku nebo na ni odpovídat přestane v jejím průběhu. Jakým způsobem tato terapie ovlivňuje složení střevní mikrobioty a imunitní odpověď hostitele vůči mikrobům není stále zcela objasněno, stejně jako zůstává nejasné, jakým způsobem lze predikovat odpověď pacienta na tuto terapii. Proto jsem se ve své diplomové práci zaměřil na hledání potenciálních biomarkerů, díky kterým by šlo odpověď pacientů s IBD na anti-TNF- α předpovídat.

Ve své práci jsem popsal, že pacienti s Crohnovou chorobou (CD) i s ulcerózní kolitidou (UC) mají signifikantně nižší α -diverzitu a rozdílné složení střevní mikrobioty v porovnání se zdravými jedinci. Během anti-TNF- α terapie se však, pravděpodobně v důsledku snížení střevního zánětu a hojení střevní sliznice, α -diverzita u pacientů s UC a mikrobiální složení pacientů s IBD začíná podobat zdravým jedincům. Po rozdělení pacientů podle jejich odpovědi na terapii v 38. týdnu jsem však nepozoroval žádné statisticky významné rozdíly. Stejně tak v mé práci nebyl nalezen žádný bakteriální taxon, který by byl jednoznačně spjat s odpovědí pacientů s IBD na anti-TNF- α terapii. Nedospěl jsem tedy k závěru, že by střevní mikrobiota mohla být biomarkerem predikujícím odpověď na tuto biologickou léčbu.

Dále jsem ve své diplomové práci pozoroval, že pacienti s CD i s UC mají před zahájením terapie signifikantně vyšší hladiny sérového kalprotektinu (sCP) a α -defensinu (DEFA)1 v krevním séru v porovnání se zdravými jedinci. V případě sCP jsem navíc detekoval téměř statisticky významný ($p = 0,07$) pokles sérových hladin v průběhu anti-TNF- α terapie u pacientů s IBD, kteří na terapii plně odpovídali. Signifikantní pokles u plně odpovídajících pacientů s IBD jsem také pozoroval u sérových hladin biomarkerů sCD14 a manan vázajícího lektinu (MBL).

Nakonec jsem pozoroval, že CD4+ T-lymfocyty z periferní krve pacientů s CD v průběhu anti-TNF- α terapie produkují signifikantně menší množství prozánětlivého cytokinu TNF- α v reakci na bakterii *Lactobacillus plantarum*. T-buněčná odpověď na tuto bakterii by se tedy mohla podílet na rozvoji a/nebo na udržování střevního chronického zánětu.

Přestože jsem ve své diplomové práci dospěl k některým zajímavým poznatkům, kvůli malému počtu pacientů zahrnutých do naší studie mohla spousta souvislostí vyjít falešně jako nesignifikantní. Proto by v budoucnu měla být provedena studie, do které by byla zahrnuta větší skupina pacientů a ve které by bylo detekováno více potenciálních biomarkerů, které by byly schopné predikovat odpověď pacientů s IBD na terapii protilátkami proti cytokinu TNF- α . Identifikace a zavedení takového biomarkeru do klinické praxe by mělo významný dopad nejen na zlepšení kvality života pacientů, ale také pozitivní dopad na ekonomiku zdravotnictví v České republice, jelikož biologická léčba je velmi nákladná.

Seznam použité literatury

- Aden, K., Rehman, A., Waschina, S., Pan, W.-H., Walker, A., Lucio, M., Nunez, A. M., Bharti, R., Zimmerman, J., Bethge, J., Schulte, B., Schulte, D., Franke, A., Nikolaus, S., Schroeder, J. O., Vandeputte, D., Raes, J., Szymczak, S., Waetzig, G. H., ... Rosenstiel, P. (2019). Metabolic Functions of Gut Microbes Associate With Efficacy of Tumor Necrosis Factor Antagonists in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, *157*(5), 1279-1292.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.025>
- Al-Saffar, A. K., Meijer, C. H., Gannavarapu, V. R., Hall, G., Li, Y., Diaz Tartera, H. O., Lördal, M., Ljung, T., Hellström, P. M., & Webb, D.-L. (2017). Parallel Changes in Harvey-Bradshaw Index, TNF α , and Intestinal Fatty Acid Binding Protein in Response to Infliximab in Crohn's Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, *2017*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/1745918>
- Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussaillant, M., Berrebi, D., Hugot, J., & Barreau, F. (2016). Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *Journal of Crohn's and Colitis*, *10*(12), 1428–1436. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw095>
- Alexander, K. L., Zhao, Q., Reif, M., Rosenberg, A. F., Mannon, P. J., Duck, L. W., & Elson, C. O. (2021). Human Microbiota Flagellins Drive Adaptive Immune Responses in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *161*(2), 522-535.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.03.064>
- Amado, I. F., Berges, J., Luther, R. J., Mailhé, M.-P., Garcia, S., Bandeira, A., Weaver, C., Liston, A., & Freitas, A. A. (2013). IL-2 coordinates IL-2–producing and regulatory T cell interplay. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(12), 2707–2720. <https://doi.org/10.1084/jem.20122759>
- Antonopoulos, D. A., Huse, S. M., Morrison, H. G., Schmidt, T. M., Sogin, M. L., & Young, V. B. (2009). Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infection and Immunity*, *77*(6), 2367–2375. <https://doi.org/10.1128/IAI.01520-08>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- * Atreya, R., Neurath, M. F., & Siegmund, B. (2020). Personalizing Treatment in IBD: Hype or Reality in 2020? Can We Predict Response to Anti-TNF? *Frontiers in Medicine*, *7*(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00517>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Baird, A. C., Mallon, D., Radford-Smith, G., Boyer, J., Piche, T., Prescott, S. L., Lawrance, I. C., & Tulic, M. K. (2016). Dysregulation of innate immunity in ulcerative colitis patients who fail anti-Tumor necrosis factor therapy Basic Study. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(41), 9104–9116. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i41.9104>
- Bąk-Romaniszyn, L., Świerzko, A. S., Sokołowska, A., Durko, Ł., Mierzwa, G., Szala-Poździej, A., Małecka-Panas, E., & Cedzyński, M. (2020). Mannose-binding lectin (MBL) in adult patients with inflammatory bowel disease. *Immunobiology*, *225*(1), 151859. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.10.008>
- Bank, S., Julsgaard, M., Abed, O. K., Burisch, J., Broder Brodersen, J., Pedersen, N. K., Gouliavov, A., Ajan, R., Nytoft Rasmussen, D., Honore Grauslund, C., Roug, S., Galsgaard, J., Sprogøe Høyer Finsen, D., Lindby, K., Sørensen, J., Larsen, L., Rohr Andersen, M., Brandslund, I., Thomassen, M., ... Andersen, V. (2019). Polymorphisms in the NFkB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *49*(7), 890–903. <https://doi.org/10.1111/apt.15187>
- Barber, G. E., Yajnik, V., Khalili, H., Giallourakis, C., Garber, J., Xavier, R., & Ananthakrishnan, A. N. (2016). Genetic Markers Predict Primary Non-Response and Durable Response to Anti-TNF Biologic Therapies in Crohn's Disease. *American Journal of Gastroenterology*, *111*(12), 1816–1822. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.408>
- Barr, J. J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K. L., Erb, M. L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A. S., Doran, K. S., Salamon, P., Youle, M., & Rohwer, F. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10771–10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>
- Barrett, J. C., Lee, J. C., Lees, C. W., Prescott, N. J., Anderson, C. A., Phillips, A., Wesley, E., Parnell, K., Zhang, H., Drummond, H., Nimmo, E. R., Massey, D., Blaszczyk, K., Elliott, T., Cotterill, L., Dallal, H., Lobo, A. J., Mowat, C., Sanderson, J. D., ... Strachan, D. P. (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nature Genetics*, *41*(12), 1330–1334. <https://doi.org/10.1038/ng.483>

- Bauché, D., Joyce-Shaikh, B., Fong, J., Villarino, A. V., Ku, K. S., Jain, R., Lee, Y., Annamalai, L., Yearley, J. H., & Cua, D. J. (2020). IL-23 and IL-2 activation of STAT5 is required for optimal IL-22 production in ILC3s during colitis. *Science Immunology*, 5(46). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav1080>
- Beltrán, C. J., Núñez, L. E., Díaz-Jiménez, D., Farfan, N., Candia, E., Heine, C., López, F., González, M. J., Quera, R., & Hermoso, M. A. (2010). Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(7), 1097–1107. <https://doi.org/10.1002/ibd.21175>
- Benchimol, E. I., Mack, D. R., Guttman, A., Nguyen, G. C., To, T., Mojaverian, N., Quach, P., & Manuel, D. F. (2015). Inflammatory Bowel Disease in Immigrants to Canada And Their Children : A Population-Based Cohort Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(4), 553–563. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.52>
- Bodelier, A. G. L., Pierik, M. J., Lenaerts, K., de Boer, E., Olde Damink, S. W., Hameeteman, W. M., Masclee, A. A. M., & Jonkers, D. M. (2016). Plasma intestinal fatty acid-binding protein fails to predict endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease patients. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 28(7), 807–813. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000616>
- Boland, B. S., He, Z., Tsai, M. S., Olvera, J. G., Omilusik, K. D., Duong, H. G., Kim, E. S., Limary, A. E., Jin, W., Milner, J. J., Yu, B., Patel, S. A., Louis, T. L., Tysl, T., Kurd, N. S., Bortnick, A., Quezada, L. K., Kanbar, J. N., Miralles, A., ... Chang, J. T. (2020). Heterogeneity and clonal relationships of adaptive immune cells in ulcerative colitis revealed by single-cell analyses. *Science Immunology*, 5(50). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb4432>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borthakur, A., Anbazhagan, A. N., Kumar, A., Raheja, G., Singh, V., Ramaswamy, K., & Dudeja, P. K. (2010). The probiotic *Lactobacillus plantarum* counteracts TNF- α -induced downregulation of SMCT1 expression and function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(4), G928–G934. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00279.2010>
- * Bortlík, M. (2018). Conventional and biological therapy for inflammatory bowel disease. *Vnitřní Lékařství*, 64(6), 642–653. <https://doi.org/10.36290/vnl.2018.088>
- * Bortlík, M., Ďuricová, D., Douda, T., Konečný, M., Koželuhová, J., Novotný, A., Zbořil, V., Prokopová, L., Kohout, P., Stehlík, J., Shonová, O., Mareš, K., Hrdlička, L., Matějková, P., Šerclová, Z., Nedbalová, L., Tomanová, M., Liberda, M., Hradský, O., ... Lukáš, M. (2019). Guidelines for the administration of biological therapy in patients with inflammatory bowel diseases: fourth, updated edition. *Gastroenterologie a Hepatologie*, 73(1), 11–24. <https://doi.org/10.14735/amgh201911>
- Britton, G. J., Contijoch, E. J., Mogno, I., Colombel, J., Dubinsky, M. C., Faith, J. J., Britton, G. J., Contijoch, E. J., Mogno, I., Vennaro, O. H., Llewellyn, S. R., & Ng, R. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t + Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice Healthy donors IBD donors Article Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balan. *Immunity*, 50(1), 212–224.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.015>
- Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Reris, R. A., Sheth, N. U., Huang, B., Girerd, P., Vaginal Microbiome Consortium, Strauss, J. F., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2015). The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiology*, 15(66). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0351-6>
- Buchheister, S., Buettner, M., Basic, M., Noack, A., Breves, G., Buchen, B., Keubler, L. M., Becker, C., & Bleich, A. (2017). CD14 Plays a Protective Role in Experimental Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Intestinal Barrier Function. *The American Journal of Pathology*, 187(5), 1106–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.012>
- Calderón-Gómez, E., Bassolas-Molina, H., Mora-Buch, R., Dotti, I., Planell, N., Esteller, M., Gallego, M., Martí, M., Garcia-Martín, C., Martínez-Torró, C., Ordás, I., Singh, S., Panés, J., Benítez-Ribas, D., & Salas, A. (2016). Commensal-Specific CD4+ Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology*, 151(3), 489–500.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.050>
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., & Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), 1091–1103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>
- Cantarel, B. L., Lombard, V., & Henrissat, B. (2012). Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLoS ONE*, 7(6), e28742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, 12(5).

<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>

- Catanzaro, J. R., Strauss, J. D., Bielecka, A., Porto, A. F., Lobo, F. M., Urban, A., Schofield, W. B., & Palm, N. W. (2019). IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Scientific Reports*, *9*(1), 13574. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49923-2>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *69*(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chan, B. C. L., Lam, C. W. K., Tam, L. S., & Wong, C. K. (2019). IL33: Roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. *Frontiers in Immunology*, *10*(364), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00364>
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brüning, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, *34*(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
- Choteau, L., Vasseur, F., Lepretre, F., Figeac, M., Gower-Rousseau, C., Dubuquoy, L., Poulain, D., Colombel, J.-F., Sendid, B., & Jawhara, S. (2016). Polymorphisms in the Mannose-Binding Lectin Gene are Associated with Defective Mannose-Binding Lectin Functional Activity in Crohn's Disease Patients. *Scientific Reports*, *6*(1), 29636. <https://doi.org/10.1038/srep29636>
- Christensen, H. R., Frøkiær, H., & Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *168*(1), 171–178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.171>
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., Reading, N. C., Villablanca, E. J., Wang, S., Mora, J. R., Umesaki, Y., Mathis, D., Benoist, C., Relman, D. A., & Kasper, D. L. (2012). Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell*, *149*(7), 1578–1593. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037>
- Cleynen, I., Boucher, G., Jostins, L., Schumm, L. P., Zeissig, S., Ahmad, T., Andersen, V., Andrews, J. M., Annesse, V., Brand, S., Brant, S. R., Cho, J. H., Daly, M. J., Dubinsky, M., Duerr, R. H., Ferguson, L. R., Franke, A., Kupcinskis, L., Lawrance, I. C., ... Lees, C. W. (2016). Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet*, *387*(10014), 156–167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00465-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00465-1)
- Colina, A. R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., & de Repentigny, L. (1996). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection and Immunity*, *64*(11), 4514–4519. <https://doi.org/10.1128/iai.64.11.4514-4519.1996>
- Colombel, J. F., Sandborn, W. J., Reinisch, W., Mantzaris, G. J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R. H., Broussard, D. L., Tang, K. L., van der Woude, C. J., & Rutgeerts, P. (2010). Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine*, *362*(15), 1383–1395. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904492>
- Coufal, S., Galanova, N., Bajer, L., Gajdarova, Z., Schierova, D., Jiraskova Zakostelska, Z., Kostovcikova, K., Jackova, Z., Stehlikova, Z., Drastich, P., Tlaskalova-Hogenova, H., & Kverka, M. (2019). Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response. *Cells*, *8*(7), 719. <https://doi.org/10.3390/cells8070719>
- Couturier-Maillard, A., Secher, T., Rehman, A., Normand, S., De Arcangelis, A., Haesler, R., Huot, L., Grandjean, T., Bressenot, A., Delanoye-Crespin, A., Gaillot, O., Schreiber, S., Lemoine, Y., Ryffel, B., Hot, D., Nùñez, G., Chen, G., Rosenstiel, P., & Chamaillard, M. (2013). NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *133*(4), 155–156. <https://doi.org/10.1172/JCI62236>
- Cox, M. A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Laverty, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Gustafson, E., Bayne, M., Chou, C.-C., Lundell, D., & Jenh, C.-H. (2009). Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(44), 5549. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5549>
- Cunliffe, R. N., Kamal, M., Rose, F. R. A. J., James, P. D., & Mahida, Y. R. (2002). Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Clinical Pathology*, *55*(4), 298–304. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.298>
- D'Amato, M., Pompili, M., Marra, G., Rapaccini, G. L., & Anti, M. (1986). Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel diseases. *Gut*, *27*(10), 1228–1228. <https://doi.org/10.1136/gut.27.10.1228>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>

- Deschasaux, M., Bouter, K. E., Prodan, A., Levin, E., Groen, A. K., Herrema, H., Tremaroli, V., Bakker, G. J., Attaye, I., Pinto-Sietsma, S.-J., van Raalte, D. H., Snijder, M. B., Nicolaou, M., Peters, R., Zwinderman, A. H., Bäckhed, F., & Nieuwdorp, M. (2018). Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nature Medicine*, *24*(10), 1526–1531. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0160-1>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(supplement_1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Ding, N. S., McDonald, J. A. K., Perdonés-Montero, A., Rees, D. N., Adegbola, S. O., Misra, R., Hendy, P., Penez, L., Marchesi, J. R., Holmes, E., Sarafian, M. H., & Hart, A. L. (2020). Metabonomics and the gut microbiome associated with primary response to anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *14*(8), 1090–1102. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa039>
- Duerkop, B. A., Clements, C. V., Rollins, D., Rodrigues, J. L. M., & Hooper, L. V. (2012). A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(43), 17621–17626. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206136109>
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., ... Cho, J. H. (2006). A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science*, *314*(5804), 1461–1463. <https://doi.org/10.1126/science.1135245>
- Duvallet, C., Gibbons, S. M., Gurry, T., Irizarry, R. A., & Alm, E. J. (2017). Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nature Communications*, *8*(1), 1784. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01973-8>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, *308*(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Even, G., Lokmer, A., Rodrigues, J., Audebert, C., Viscogliosi, E., Ségurel, L., & Chabé, M. (2021). Changes in the Human Gut Microbiota Associated With Colonization by Blastocystis sp. and Entamoeba spp. in Non-Industrialized Populations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.533528>
- Fieldhouse, K. A., Ukaibe, S., Crowley, E. L., Khanna, R., O'Toole, A., & Gooderham, M. J. (2020). Inflammatory bowel disease in patients with psoriasis treated with interleukin-17 inhibitors. *Drugs in Context*, *9*(Table 1), 1–9. <https://doi.org/10.7573/dic.2020-2-1>
- Foell, D., Wittkowski, H., Ren, Z., Turton, J., Pang, G., Daebritz, J., Ehrchen, J., Heidemann, J., Borody, T., Roth, J., & Clancy, R. (2008). Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *The Journal of Pathology*, *216*(2), 183–192. <https://doi.org/10.1002/path.2394>
- Fonseca, W., Malinczak, C.-A., Fujimura, K., Li, D., McCauley, K., Li, J., Best, S. K. K., Zhu, D., Rasky, A. J., Johnson, C. C., Bermick, J., Zoratti, E. M., Ownby, D., Lynch, S. V., Lukacs, N. W., & Ptaschinski, C. (2021). Maternal gut microbiome regulates immunity to RSV infection in offspring. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(11). <https://doi.org/10.1084/jem.20210235>
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *56*(3), 267–274. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7303.2007>
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., & Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, *52*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.65>
- Funda, D. P., Tučková, L., Farré, M. A., Iwase, T., Moro, I., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2001). CD14 Is Expressed and Released as Soluble CD14 by Human Intestinal Epithelial Cells In Vitro: Lipopolysaccharide Activation of Epithelial Cells Revisited. *Infection and Immunity*, *69*(6), 3772–3781. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3772-3781.2001>
- Funderburg, N. T., Stubblefield Park, S. R., Sung, H. C., Hardy, G., Clagett, B., Ignatz-Hoover, J., Harding, C. V., Fu, P., Katz, J. A., Lederman, M. M., & Levine, A. D. (2013). Circulating CD4 + and CD8 + T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*, *140*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1111/imm.12114>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyachi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>

- Geller, D. A., Kispert, P. H., Su, G. L., Wang, S. C., Di Silvio, M., Tweardy, D. J., Billiar, T. R., & Simmons, R. L. (1993). Induction of hepatocyte lipopolysaccharide binding protein in models of sepsis and the acute-phase response. *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, *128*(1), 22–27; discussion 27–8. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1993.01420130026005>
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C. V., Fleming, M. P. P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N. J., Travis, S. P. L., & Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(6), 1127–1133. <https://doi.org/10.1084/jem.20101712>
- * Glassner, K. L., Abraham, B. P., & Quigley, E. M. M. (2020). The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *145*(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.003>
- Glick, L. R., Sossenheimer, P. H., Ollech, J. E., Cohen, R. D., Hyman, N. H., Hurst, R. D., & Rubin, D. T. (2019). Low-Dose Metronidazole is Associated With a Decreased Rate of Endoscopic Recurrence of Crohn's Disease After Ileal Resection: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 1158–1162. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz047>
- Goldberg, R., Clough, J. N., Roberts, L. B., Sanchez, J., Kordasti, S., Petrov, N., Hertweck, A., Lorenc, A., Jackson, I., Tasker, S., Appios, A., Omer, O., Parkes, M., Prescott, N., Jenner, R. G., Irving, P. M., & Lord, G. M. (2021). A Crohn's Disease-associated IL2RA Enhancer Variant Determines the Balance of T Cell Immunity by Regulating Responsiveness to IL-2 Signalling. *Journal of Crohn's and Colitis*, *15*(12), 2054–2065. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab103>
- Gopalakrishnan, V., Spencer, C. N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M. C., Karpinets, T. V., Prieto, P. A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S. C., Cogdill, A. P., Zhao, L., Hudgens, C. W., Hutchinson, D. S., Manzo, T., Petaccia de Macedo, M., Cotechini, T., Kumar, T., Chen, W. S., ... Wargo, J. A. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, *359*(6371), 97–103. <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>
- Goyette, P., Boucher, G., Mallon, D., Ellinghaus, E., Jostins, L., Huang, H., Ripke, S., Gusareva, E. S., Annese, V., Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., Thomsen, I., Leslie, S., Daly, M. J., Van Steen, K., Duerr, R. H., Barrett, J. C., McGovern, D. P. B., Schumm, L. P., ... Rioux, J. D. (2015). High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nature Genetics*, *47*(2), 172–179. <https://doi.org/10.1038/ng.3176>
- * Guan, Q. (2019). A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>
- Guberna, L., Nyssen, O. P., Chaparro, M., & Gisbert, J. P. (2021). Frequency and Effectiveness of Empirical Anti-TNF Dose Intensification in Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review with Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(10), 2132. <https://doi.org/10.3390/jcm10102132>
- Guidi, L., Marzo, M., Andrisani, G., Felice, C., Pugliese, D., Mocci, G., Nardone, O., De Vitis, I., Papa, A., Rapaccini, G., Forni, F., & Armuzzi, A. (2014). Faecal calprotectin assay after induction with anti-Tumour Necrosis Factor α agents in inflammatory bowel disease: Prediction of clinical response and mucosal healing at one year. *Digestive and Liver Disease*, *46*(11), 974–979. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.07.013>
- Gutsmann, T., Müller, M., Carroll, S. F., MacKenzie, R. C., Wiese, A., & Seydel, U. (2001). Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infection and Immunity*, *69*(11), 6942–6950. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6942-6950.2001>
- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., & Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, *124*(7), 1767–1773. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00385-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00385-8)
- Halfvarson, J., Brislawn, C. J., Lamendella, R., Vázquez-Baeza, Y., Walters, W. A., Bramer, L. M., D'Amato, M., Bonfiglio, F., McDonald, D., Gonzalez, A., McClure, E. E., Dunklebarger, M. F., Knight, R., & Jansson, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*, *2*(February), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.4>
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., ... Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*, *39*(2), 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
- Harbour, S. N., Maynard, C. L., Zindl, C. L., Schoeb, T. R., & Weaver, C. T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(22), 7061–7066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415675112>
- Harvey, R. F., & Bradshaw, J. M. (1980). A simple index of Crohn's-disease. *The Lancet*, *315*(8167), 514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92767-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92767-1)
- Hegazy, A. N., West, N. R., Stubbington, M. J. T., Wendt, E., Suijker, K. I. M., Datsi, A., This, S., Danne, C., Campion, S., Duncan, S. H., Owens, B. M. J., Uhlig, H. H., McMichael, A., Bergthaler, A., Teichmann, S. A., Keshav, S., & Powrie, F. (2017). Circulating and Tissue-Resident CD4+ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy

- Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*, 153(5), 1320-1337.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.047>
- Heinken, A., Khan, M. T., Paglia, G., Rodionov, D. A., Harmsen, H. J. M., & Thiele, I. (2014). Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 3289–3302. <https://doi.org/10.1128/JB.01780-14>
- Henke, M. T., Kenny, D. J., Cassilly, C. D., Vlamakis, H., Xavier, R. J., & Clardy, J. (2019). *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(26), 12672–12677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904099116>
- Ho, S. S., Wall, C., Gearry, R. B., Keenan, J., & Day, A. S. (2020). A Pilot Study Evaluating Novel Urinary Biomarkers for Crohn's Disease. *Inflammatory Intestinal Diseases*, 5(4), 212–220. <https://doi.org/10.1159/000510682>
- Holm, T. L., Tornehave, D., Søndergaard, H., Kvist, P. H., Søndergaard, B.-C., Hansen, L., Hermit, M. B., Holgersen, K., Vergo, S., Frederiksen, K. S., Haase, C., & Lundsgaard, D. (2018). Evaluating IL-21 as a Potential Therapeutic Target in Crohn's Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2018/5962624>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*, 291(5505), 881–884. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Hosomi, S., Yamagami, H., Itani, S., Yukawa, T., Otani, K., Nagami, Y., Tanaka, F., Taira, K., Kamata, N., Tanigawa, T., Shiba, M., Watanabe, T., & Fujiwara, Y. (2018). Sepsis Markers Soluble IL-2 Receptor and Soluble CD14 Subtype as Potential Biomarkers for Complete Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 12(1), 87–95. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx124>
- Hou, Q., Zhao, F., Liu, W., Lv, R., Khine, W. W. T., Han, J., Sun, Z., Lee, Y.-K., & Zhang, H. (2020). Probiotic-directed modulation of gut microbiota is basal microbiome dependent. *Gut Microbes*, 12(1), 1736974. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1736974>
- Huang, H., Fang, M., Jostins, L., Umićević Mirkov, M., Boucher, G., Anderson, C. A., Andersen, V., Cleynen, I., Cortes, A., Crins, F., D'Amato, M., Deffontaine, V., Dmitrieva, J., Docampo, E., Elansary, M., Farh, K. K.-H., Franke, A., Gori, A.-S., Goyette, P., ... Barrett, J. C. (2017). Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature*, 547(7662), 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature22969>
- Huse, S. M., Ye, Y., Zhou, Y., & Fodor, A. A. (2012). A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters. *PLoS ONE*, 7(6), e34242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034242>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Ingrassia, I., Leplingard, A., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients To Adhere to and To Invade Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2880–2887. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2880-2887.2005>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, 139(3), 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Jabandziev, P., Pinkasova, T., Kunovsky, L., Papez, J., Jouza, M., Karlinova, B., Novackova, M., Urik, M., Aulicka, S., Slaby, O., Bohosova, J., Bajerova, K., Bajer, M., & Goel, A. (2020). Regional Incidence of Inflammatory Bowel Disease in a Czech Pediatric Population: 16 Years of Experience (2002-2017). *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(5), 586–592. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002660>
- Jaeger, N., Gamini, R., Cella, M., Schettini, J. L., Bugatti, M., Zhao, S., Rosadini, C. V., Esaulova, E., Di Luccia, B., Kinnett, B., Vermi, W., Artyomov, M. N., Wynn, T. A., Xavier, R. J., Jelinsky, S. A., & Colonna, M. (2021). Single-cell analyses of Crohn's disease tissues reveal intestinal intraepithelial T cells heterogeneity and altered subset distributions. *Nature Communications*, 12(1), 1921. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22164-6>
- Jarkovský, J., Benešová, K., Hejduk, K., Dušek, L., & Lukáš, M. (2017). Epidemiology, hospitalization and migration of patients with IBD under specialized care in the Czech Republic. *Gastroenterologie a Hepatologie*, 71(6), 501–509. <https://doi.org/10.14735/amgh2017501>
- Jespersgaard, C., Fode, P., Dybdahl, M., Vind, I., Nielsen, O. H., Csillag, C., Munkholm, P., Vainer, B., Riis, L., Elkjaer, M., Pedersen, N., Knudsen, E., & Andersen, P. S. (2011). Alpha-Defensin DEFA1A3 Gene Copy Number Elevation in Danish Crohn's Disease Patients. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(12), 3517–3524. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1794-8>

- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., & Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, *60*(5), 631–637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
- Ju, J., Dai, Y., Yang, J., Liu, C., Fan, L., Feng, L., Zhao, B., Zeng, M., Liu, Z., & Sun, X. (2020). Crohn's disease exacerbated by IL-17 inhibitors in patients with psoriasis: a case report. *BMC Gastroenterology*, *20*(1), 340. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01474-x>
- Jürgens, M., Mahachie John, J. M., Cleynen, I., Schnitzler, F., Fidder, H., van Moerkercke, W., Ballet, V., Noman, M., Hoffman, I., van Assche, G., Rutgeerts, P. J., van Steen, K., & Vermeire, S. (2011). Levels of C-reactive Protein Are Associated With Response to Infliximab Therapy in Patients With Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *9*(5), 421-427.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.02.008>
- Kabat, A. M., Harrison, O. J., Riffelmacher, T., Moghaddam, A. E., Pearson, C. F., Laing, A., Abeler-Dörner, L., Forman, S. P., Grecnis, R. K., Sattentau, Q., Simon, A. K., Pott, J., & Maloy, K. J. (2016). The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *ELife*, *5*(FEBRUARY2016), 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.12444>
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M. T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K. S., & Hibi, T. (2008). Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(6), 2269–2280. <https://doi.org/10.1172/JCI34610>
- Kanmura, S., Morinaga, Y., Tanaka, A., Komaki, Y., Iwaya, H., Kumagai, K., Mawatari, S., Sasaki, F., Tanoue, S., Hashimoto, S., Sameshima, Y., Ono, Y., Ohi, H., & Ido, A. (2021). Increased Gene Copy Number of DEFA1A3 Is Associated With the Severity of Ulcerative Colitis. *Clinical and Translational Gastroenterology*, *12*(4), e00331. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000331>
- Katz, L. H., Kopylov, U., Fudim, E., Yavzori, M., Picard, O., Ungar, B., Eliakim, R., Ben-Horin, S., & Chowers, Y. (2014). Expression of IL-2, IL-17 and TNF-alpha in patients with Crohn's disease treated with anti-TNF antibodies. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, *38*(4), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.01.010>
- * Kayama, H., & Takeda, K. (2012). Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International Immunology*, *24*(11), 673–680. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs094>
- Kim, E. Y., & Teh, H.-S. (2004). Critical Role of TNF Receptor Type-2 (p75) as a Costimulator for IL-2 Induction and T Cell Survival: A Functional Link to CD28. *The Journal of Immunology*, *173*(7), 4500–4509. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4500>
- Kim, J. Y., Whon, T. W., Lim, M. Y., Kim, Y. B., Kim, N., Kwon, M.-S., Kim, J., Lee, S. H., Choi, H.-J., Nam, I.-H., Chung, W.-H., Kim, J.-H., Bae, J.-W., Roh, S. W., & Nam, Y.-D. (2020). The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. *Microbiome*, *8*(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00894-x>
- Kinnebrew, M. A., Buffie, C. G., Diehl, G. E., Zenewicz, L. A., Leiner, I., Hohl, T. M., Flavell, R. A., Littman, D. R., & Pamer, E. G. (2012). Interleukin 23 Production by Intestinal CD103+CD11b+ Dendritic Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense. *Immunity*, *36*(2), 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.011>
- Kleinschek, M. A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E. E., Turner, S. P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W. A., de Waal Malefyt, R., Pierce, R. H., McClanahan, T., & Kastelein, R. A. (2009). Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(3), 525–534. <https://doi.org/10.1084/jem.20081712>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Kolho, K.-L., Korpela, K., Jaakkola, T., Pichai, M. V. A., Zoetendal, E. G., Salonen, A., & de Vos, W. M. (2015). Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. *American Journal of Gastroenterology*, *110*(6), 921–930. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.149>
- Kong, H. H., Andersson, B., Clavel, T., Common, J. E., Jackson, S. A., Olson, N. D., Segre, J. A., & Traidl-Hoffmann, C. (2017). Performing Skin Microbiome Research: A Method to the Madness. *Journal of Investigative Dermatology*, *137*(3), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.10.033>
- Kovacs, M., Papp, M., Lakatos, P. L., Jacobsen, S., Nemes, E., Polgar, M., Solyom, E., Bodi, P., Horvath, A., Molnar, K., Szabo, D., Cseh, A., Muller, K. E., Dezsofi, A., Arato, A., & Veres, G. (2013). Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *7*(2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.03.008>
- LaBouyer, M., Holtrop, G., Horgan, G., Gratz, S. W., Belenguer, A., Smith, N., Walker, A. W., Duncan, S. H., Johnstone, A. M., Louis, P., Flint, H. J., & Scott, K. P. (2022). Higher total faecal short-chain fatty acid concentrations correlate with increasing proportions of butyrate and decreasing proportions of branched-chain fatty acids across multiple

- human studies. *Gut Microbiome*, 3(e2), 1–14. <https://doi.org/10.1017/gmb.2022.1>
- Laffont, S., Siddiqui, K. R. R., & Powrie, F. (2010). Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1877–1883. <https://doi.org/10.1002/eji.200939957>
- Lakatos, P. L., Kiss, L. S., Palatka, K., Altorjay, I., Antal-Szalmas, P., Palyu, E., Udvardy, M., Molnar, T., Farkas, K., Veres, G., Harsfalvi, J., Papp, J., & Papp, M. (2011). Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(3), 767–777. <https://doi.org/10.1002/ibd.21402>
- Langley, B. O., Guedry, S. E., Goldenberg, J. Z., Hanes, D. A., Beardsley, J. A., & Ryan, J. J. (2021). Inflammatory Bowel Disease and Neutrophil–Lymphocyte Ratio: A Systematic Scoping Review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(18), 4219. <https://doi.org/10.3390/jcm10184219>
- Lawton, J., Achit, H., Pouillon, L., Boschetti, E., Demore, B., Matton, T., Tournier, C., Prodel, M., Peyrin-Biroulet, L., & Guillemin, F. (2019). Cost-of-illness of inflammatory bowel disease patients treated with anti-tumour necrosis factor: A French large single-centre experience. *United European Gastroenterology Journal*, 7(7), 908–913. <https://doi.org/10.1177/2050640619853448>
- Lee, H.-S., 2, S.-K. Y., Hong, M., Jung, S., Kim, B. M., Moon, J. W., Park, S. H., Ye, B. D., Oh, S. H., Kim, K. M., Yoon, Y. S., Yu, C. S., Baek, J., Lee, C. H., Han, B., Liu, J., Haritunians, T., McGovern, D. P. B., & Song, K. (2018). An intergenic variant rs9268877 between HLA-DRA and HLA-DRB contributes to the clinical course and long-term outcome of ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 12(9), 1113–1121. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy080>
- Lee, J. S., Tato, C. M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M. F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Judo, M., Ayanoglu, G., McClanahan, T. K., Li, X., & Cua, D. J. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity*, 43(4), 727–738. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.003>
- Lee, S. H., Kwon, J. eun, & Cho, M.-L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.1.26>
- Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M. E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S., Kupcinskis, L., Doré, J., Raedler, A., & Schreiber, S. (2011). Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 141(1), 227–236. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.011>
- Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–2279. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- * Lichtenstein, G. R. (2013). Comprehensive review: Antitumor necrosis factor agents in inflammatory bowel disease and factors implicated in treatment response. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 269–293. <https://doi.org/10.1177/1756283X13479826>
- Lin, Y. P., Thibodeaux, C. H., Peña, J. A., Ferry, G. D., & Versalovic, J. (2008). Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(8), 1068–1083. <https://doi.org/10.1002/ibd.20448>
- Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L. I., Kühl, A. A., Erben, U., May, C., Schulzke, J. D., & Siegmund, B. (2015). Monocyte and M1 macrophage-induced barrier defect contributes to chronic intestinal inflammation in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(6), 1297–1305. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000384>
- Lodes, M. J., Cong, Y., Elson, C. O., Mohamath, R., Landers, C. J., Targan, S. R., Fort, M., & Hershberg, R. M. (2004). Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113(9), 1296–1306. <https://doi.org/10.1172/JCI20295>
- Logan, M., MacKinder, M., Clark, C. M., Kountouri, A., Jere, M., Ijaz, U. Z., Hansen, R., McGrogan, P., Russell, R. K., & Gerasimidis, K. (2022). Intestinal fatty acid binding protein is a disease biomarker in paediatric coeliac disease and Crohn's disease. *BMC Gastroenterology*, 22(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02334-6>
- Lokmer, A., Cian, A., Froment, A., Gantois, N., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Ségurel, L. (2019). Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS One*, 14(2), e0211139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211139>
- Maerten, P., Shen, C., Colpaert, S., Liu, Z., Bullens, D. A. M., van Assche, G., Penninckx, F., Geboes, K., Vanham, G., Rutgeerts, P., & Ceuppens, J. L. (2004). Involvement of interleukin 18 in Crohn's disease: evidence from in vitro analysis of human gut inflammatory cells and from experimental colitis models. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(2), 310–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02362.x>
- Magnusson, M. K., Strid, H., Sapnara, M., Lasson, A., Bajor, A., Ung, K. A., & Öhman, L. (2016). Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota composition. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10(8), 943–952. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw051>
- Magwira, C. A., Kullin, B., Lewandowski, S., Rodgers, A., Reid, S. J., & Abratt, V. R. (2012). Diversity of faecal oxalate-

- degrading bacteria in black and white South African study groups: insights into understanding the rarity of urolithiasis in the black group. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 418–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05346.x>
- Manor, O., Dai, C. L., Kornilov, S. A., Smith, B., Price, N. D., Lovejoy, J. C., Gibbons, S. M., & Magis, A. T. (2020). Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nature Communications*, 11(1), 5206. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18871-1>
- Mascheretti, S., Hampe, J., Croucher, P. J. P., Nikolaus, S., Andus, T., Schubert, S., Olson, A., Bao, W., Fölsch, U. R., & Schreiber, S. (2002). Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: An analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics*, 12(7), 509–515. <https://doi.org/10.1097/00008571-200210000-00002>
- Maxwell, J. R., Zhang, Y., Brown, W. A., Smith, C. L., Byrne, F. R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J. A., Rottman, J. B., Budelsky, A. L., Symons, A., & Towne, J. E. (2015). Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity*, 43(4), 739–750. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.019>
- Mazzurana, L., Bonfiglio, F., Forkel, M., D'Amato, M., Halfvarson, J., & Mjösberg, J. (2021). Crohn's Disease Is Associated With Activation of Circulating Innate Lymphoid Cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, 27(7), 1128–1138. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa316>
- McAlindon, M. E., Hawkey, C. J., & Mahida, Y. R. (1998). Expression of interleukin 1 β and interleukin 1 β converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*, 42(2), 214–219. <https://doi.org/10.1136/gut.42.2.214>
- McDonnell, L., Gilkes, A., Ashworth, M., Rowland, V., Harries, T. H., Armstrong, D., & White, P. (2021). Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1870402>
- Meng, C., Feng, S., Hao, Z., Dong, C., & Liu, H. (2022). Changes in gut microbiota composition with age and correlations with gut inflammation in rats. *PLOS ONE*, 17(3), e0265430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265430>
- Michaud, E., Waeckel, L., Gayet, R., Goguyer-Deschaumes, R., Chanut, B., Jospin, F., Bathany, K., Monnoye, M., Genet, C., Prier, A., Tokarski, C., Gérard, P., Roblin, X., Rochereau, N., & Paul, S. (2022). Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *EMBO Molecular Medicine*, 33, 1–21. <https://doi.org/10.15252/emmm.202115386>
- Mims, T. S., Abdallah, Q. Al, Stewart, J. D., Watts, S. P., White, C. T., Rousselle, T. V., Gosain, A., Bajwa, A., Han, J. C., Willis, K. A., & Pierre, J. F. (2021). The gut mycobiome of healthy mice is shaped by the environment and correlates with metabolic outcomes in response to diet. *Communications Biology*, 4(1), 281. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01820-z>
- * Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., & Ueda, N. (2018). Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents – Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine*, 101, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.014>
- Mizuno, S., Mikami, Y., Kamada, N., Handa, T., Hayashi, A., Sato, T., Matsuo, K., Matano, M., Ohta, Y., Sugita, A., Koganei, K., Sahara, R., Takazoe, M., Hisamatsu, T., & Kanai, T. (2014). Cross-talk between ROR γ t⁺ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(8), 1426–1434. <https://doi.org/10.1097/MIB.000000000000105>
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y., & Merad, M. (2014). Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. *Science*, 343(6178). <https://doi.org/10.1126/science.1249288>
- * Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Mu, Q., Swartwout, B. K., Edwards, M., Zhu, J., Lee, G., Eden, K., Cabana-Puig, X., McDaniel, D. K., Mao, J., Abdelhamid, L., Brock, R. M., Allen, I. C., Reilly, C. M., & Luo, X. M. (2021). Regulation of neonatal IgA production by the maternal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(9), 1–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015691118>
- Murch, S. H., Braegger, C. P., Walker-Smith, J. A., & MacDonald, T. T. (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, 34(12), 1705–1709. <https://doi.org/10.1136/gut.34.12.1705>
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A. K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R. R., & van Lookeren Campagne, M. (2014). A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489), 456–462. <https://doi.org/10.1038/nature13044>
- Nakajima, A., Vogelzang, A., Maruya, M., Miyajima, M., Murata, M., Son, A., Kuwahara, T., Tsuruyama, T., Yamada, S., Matsuura, M., Nakase, H., Peterson, D. A., Fagarasan, S., & Suzuki, K. (2018). IgA regulates the composition and

- metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria. *Journal of Experimental Medicine*, 215(8), 2019–2034. <https://doi.org/10.1084/jem.20180427>
- Nam, B., Kim, S. A., Nam, W., Jeung, W. H., Park, S.-D., Lee, J.-L., Sim, J.-H., & Jang, S. S. (2019). Lactobacillus plantarum HY7714 Restores TNF- α Induced Defects on Tight Junctions. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(1), 64–69. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.1.64>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Nel Van Zyl, K., Whitelaw, A. C., Hesselning, A. C., Seddon, J. A., Demers, A.-M., & Newton-Foot, M. (2021). Association between clinical and environmental factors and the gut microbiota profiles in young South African children. *Scientific Reports*, 11(1), 15895. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95409-5>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Ninnemann, J., Winsauer, C., Bondareva, M., Kühn, A. A., Lozza, L., Durek, P., Lissner, D., Siegmund, B., Kaufmann, S. H. E., Mashreghi, M.-F., Nedospasov, S. A., & Kruglov, A. A. (2022). TNF hampers intestinal tissue repair in colitis by restricting IL-22 bioavailability. *Mucosal Immunology*, 15(4), 698–716. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00506-x>
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P. B., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., & Virgin, H. W. (2015). Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*, 160(3), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- O'Connor Jr, W., Kamanaka, M., Booth, C. J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J. K., & Flavell, R. A. (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 603–609. <https://doi.org/10.1038/ni.1736>
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J.-P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., & Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 603–606. [https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2009\)02-0418-05](https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0418-05)
- Okada, K., Okabe, M., Kimura, Y., Itoh, H., & Ikemoto, M. (2019). Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Laboratory Medicine*, 50(4), 370–380. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmz003>
- Okahara, S., Arimura, Y., Yabana, T., Kobayashi, K., Gotoh, A., Motoya, S., Imamura, A., Endo, T., & Imai, K. (2005). Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cDNA microarray analysis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21(9), 1091–1097. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02443.x>
- Okba, A. M., Amin, M. M., Abdelmoaty, A. S., Ebada, H. E., Kamel, A. H., Allam, A. S., & Sobhy, O. M. (2019). Neutrophil/lymphocyte ratio and lymphocyte/monocyte ratio in ulcerative colitis as non-invasive biomarkers of disease activity and severity. *Auto-Immunity Highlights*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0114-8>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Panaccione, R., Ghosh, S., Middleton, S., Márquez, J. R., Scott, B. B., Flint, L., Van Hoogstraten, H. J. F., Chen, A. C., Zheng, H., Danese, S., & Rutgeerts, P. (2014). Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 146(2), 392–400.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.052>
- Park, J., Kim, M., Kang, S. G., Jannasch, A. H., Cooper, B., Patterson, J., & Kim, C. H. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal Immunology*, 8(1), 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., & Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, 66(5), 813–822. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>
- Pasternak, B. A., D'Mello, S., Jurickova, I. I., Han, X., Willson, T., Flick, L., Petiniot, L., Uozumi, N., Divanovic, S., Traurnicht, A., Bonkowski, E., Kugathasan, S., Karp, C. L., & Denson, L. A. (2010). Lipopolysaccharide exposure is linked to activation of the acute phase response and growth failure in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(5), 856–869. <https://doi.org/10.1002/ibd.21132>
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., Van Den Brandt, P. A., & Stobberingh, E. E. (2006).

- Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511–521. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>
- Poholek, C. H., Dulson, S. J., Zajac, A. J., & Harrington, L. E. (2019). IL-21 Controls ILC3 Cytokine Production and Promotes a Protective Phenotype in a Mouse Model of Colitis. *ImmunoHorizons*, 3(6), 194–202. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1900005>
- Present, D. H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S. B., Mayer, L., van Hogezaand, R. A., Podolsky, D. K., Sands, B. E., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F., & van Deventer, S. J. H. (1999). Infliximab for the Treatment of Fistulas in Patients with Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine*, 340(18), 1398–1405. <https://doi.org/10.1056/NEJM199905063401804>
- Prochazkova, P., Roubalova, R., Dvorak, J., Kreisinger, J., Hill, M., Tlaskalova-Hogenova, H., Tomasova, P., Pelantova, H., Cermakova, M., Kuzma, M., Bulant, J., Bilej, M., Smitka, K., Lambertova, A., Holanova, P., & Papezova, H. (2021). The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*, 13(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902771>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Raimondi, S., Amaretti, A., Gozzoli, C., Simone, M., Righini, L., Candelieri, F., Brun, P., Ardizzoni, A., Colombari, B., Paulone, S., Castagliuolo, I., Cavalieri, D., Blasi, E., Rossi, M., & Peppoloni, S. (2019). Longitudinal Survey of Fungi in the Human Gut: ITS Profiling, Phenotyping, and Colonization. *Frontiers in Microbiology*, 10(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01575>
- Ramanan, D., Tang, M. S., Bowcutt, R., Loke, P., & Cadwell, K. (2014). Bacterial Sensor Nod2 Prevents Inflammation of the Small Intestine by Restricting the Expansion of the Commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity*, 41(2), 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.015>
- Rani, R., Smulian, A. G., Greaves, D. R., Hogan, S. P., & Herbert, D. R. (2011). TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *European Journal of Immunology*, 41(7), 2000–2009. <https://doi.org/10.1002/eji.201041135>
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022>
- Rector, A., Lemey, P., Laffut, W., Keyaerts, E., Struyf, F., Wollants, E., Vermeire, S., Rutgeerts, P., & Van Ranst, M. (2001). Mannan-binding lectin (MBL) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Genes & Immunity*, 2(6), 323–328. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363784>
- Rehman, A., Sina, C., Gavrilo, O., Hasler, R., Ott, S., Baines, J. F., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2011). Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*, 60(10), 1354–1362. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>
- Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., III, J. F. R., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, 29(4), 1395–1403. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259598>
- Reyman, M., van Houten, M. A., Watson, R. L., Chu, M. L. J. N., Arp, K., de Waal, W. J., Schiering, I., Plötz, F. B., Willems, R. J. L., van Schaik, W., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2022). Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nature Communications*, 13(1), 893. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28525-z>
- Ritterhouse, L. L., Crowe, S. R., Niewold, T. B., Kamen, D. L., Macwana, S. R., Roberts, V. C., Dedeker, A. B., Harley, J. B., Scofield, R. H., Guthridge, J. M., & James, J. A. (2011). Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(9), 1569–1574. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.148494>
- Royo, Ó. P., Román, A. L. S., Arbizu, E. A., de la Hera Martínez, A., Sevillano, E. R., & Martínez, A. A. (2007). Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(3), 269–277. <https://doi.org/10.1002/ibd.20019>
- Rosati, E., Rios Martini, G., Pogorelyy, M. V., Minervina, A. A., Degenhardt, F., Wendorff, M., Sari, S., Mayr, G., Fazio, A., Dowds, C. M., Hauser, C., Tran, F., von Schönfels, W., Pochhammer, J., Salnikova, M. A., Jaeckel, C., Gigla, J. B., Sabet, S. S., Hübenthal, M., ... Franke, A. (2022). A novel unconventional T cell population enriched in Crohn's disease. *Gut*, gutjnl-2021-325373. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325373>
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P. I., Godneva, A., Kalka, I. N., Bar, N., Shilo, S., Lador, D., Vila, A. V., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B. C., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695),

- 210–215. <https://doi.org/10.1038/nature25973>
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., & Tessier, P. A. (2003). Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *The Journal of Immunology*, *170*(6), 3233–3242. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3233>
- Sakuraba, A., Sato, T., Kamada, N., Kitazume, M., Sugita, A., & Hibi, T. (2009). Th1/Th17 Immune Response Is Induced by Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *137*(5), 1736–1745. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.049>
- Sam, Q. H., Ling, H., Yew, W. S., Tan, Z., Ravikumar, S., Chang, M. W., & Chai, L. Y. A. (2021). The Divergent Immunomodulatory Effects of Short Chain Fatty Acids and Medium Chain Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6453. <https://doi.org/10.3390/ijms22126453>
- Sanchis-Artero, L., Martínez-Blanch, J. F., Manresa-Vera, S., Cortés-Castell, E., Valls-Gandia, M., Iborra, M., Paredes-Arquiola, J. M., Boscá-Watts, M., Huguet, J. M., Gil-Borrás, R., Rodríguez-Morales, J., & Cortés-Rizo, X. (2021). Evaluation of changes in intestinal microbiota in Crohn's disease patients after anti-TNF alpha treatment. *Scientific Reports*, *11*(10016). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88823-2>
- Sankarasubramanian, J., Ahmad, R., Avuthu, N., Singh, A. B., & Guda, C. (2020). Gut Microbiota and Metabolic Specificity in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Frontiers in Medicine*, *7*(November). <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.606298>
- Sanos, S. L., Bui, V. L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., & Diefenbach, A. (2009). ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nature Immunology*, *10*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/ni.1684>
- Santos-Antunes, J., Nunes, A. C. R., Lopes, S., & Macedo, G. (2016). The relevance of Vitamin D and antinuclear antibodies in patients with inflammatory bowel disease under anti-TNF treatment: A prospective study. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(5), 1101–1106. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000697>
- Santos, F., Spinler, J. K., Saulnier, D. M. A., Molenaar, D., Teusink, B., de Vos, W. M., Versalovic, J., & Hugenholtz, J. (2011). Functional identification in *Lactobacillus reuteri* of a PoxR-like transcription factor regulating glycerol utilization and vitamin B12 synthesis. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-55>
- Sarikaya, M., Ergül, B., Doğan, Z., Filik, L., Can, M., & Arslan, L. (2015). Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) as a Promising Test for Crohn's Disease: A Preliminary Study. *Clinical Laboratory*, *61*(01+02/2015), 87–91. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2014.140518>
- Schierova, D., Roubalova, R., Kolar, M., Stehlikova, Z., Rob, F., Jackova, Z., Coufal, S., Thon, T., Mihula, M., Modrak, M., Kverka, M., Bajer, L., Kostovcikova, K., Drastich, P., Hercogova, J., Novakova, M., Vasatko, M., Lukas, M., Tlaskalova-Hogenova, H., & Zakostelska, Z. J. (2021). Fecal microbiome changes and specific anti-bacterial response in patients with ibd during anti-tnf therapy. *Cells*, *10*(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells10113188>
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F., & Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity*, *23*(5), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015>
- Schroeder, K. W., Tremaine, W. J., & Ilstrup, D. M. (1987). Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine*, *317*(26), 1625–1629. <https://doi.org/10.1056/NEJM198712243172603>
- Segain, J. P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H. M., & Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, *47*(3), 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>
- Seibold, F., Boldt, A. B. W., Seibold-Schmid, B., Schoepfer, A. M., Flogerzi, B., Muller, S., & Kun, J. F. J. (2007). Deficiency for mannan-binding lectin is associated with antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their relatives. *Gut*, *56*(1), 152–152. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.110007>
- Singh, U. P., Singh, N. P., Murphy, E. A., Price, R. L., Fayad, R., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2016). Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, *77*, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.008>
- Sivaram, G., Tiwari, S. K., Bardia, A., Manoj, G., Santhosh, B., Saikant, R., Aeja, H., Vishnupriya, S., Khan, A. A., & Habibullah, C. (2011). Association of genetic variants of mannan-binding (MBL) lectin-2 gene, MBL levels and function in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Innate Immunity*, *17*(6), 526–531. <https://doi.org/10.1177/1753425910384531>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T reg Cell Homeostasis. *Science*, *341*(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>

- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., & Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, *66*(6), 1039–1048. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(43), 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Soto-Martin, E. C., Warnke, I., Farquharson, F. M., Christodoulou, M., Horgan, G., Derrien, M., Faurie, J.-M., Flint, H. J., Duncan, S. H., & Louis, P. (2020). Vitamin Biosynthesis by Human Gut Butyrate-Producing Bacteria and Cross-Feeding in Synthetic Microbial Communities. *MBio*, *11*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00886-20>
- Spinler, J. K., Taweechoitapatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, *14*(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001>
- * Spolski, R., Li, P., & Leonard, W. J. (2018). Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*, *18*(10), 648–659. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>
- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(24), 15451–15455. <https://doi.org/10.1073/pnas.202604299>
- Stehle, J. R., Leng, X., Kitzman, D. W., Nicklas, B. J., Kritchevsky, S. B., & High, K. P. (2012). Lipopolysaccharide-Binding Protein, a Surrogate Marker of Microbial Translocation, Is Associated With Physical Function in Healthy Older Adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *67*(11), 1212–1218. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls178>
- Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., Muramatsu, M., Chiba, T., Honjo, T., & Fagarasan, S. (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(7), 1981–1986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307317101>
- Szymanska, E., Bierla, J., Dadalski, M., Wierzbicka, A., Konopka, E., Cukrowska, B., & Kierkus, J. (2022). New non-invasive biomarkers of intestinal inflammation and increased intestinal permeability in pediatric inflammatory bowel diseases and their correlation with fecal calprotectin: a pilot study. *Minerva Gastroenterology*. <https://doi.org/10.23736/S2724-5985.22.03156-4>
- Thangaraju, M., Cresci, G. A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J. P., Browning, D. D., Mellinger, J. D., Smith, S. B., Digby, G. J., Lambert, N. A., Prasad, P. D., & Ganapathy, V. (2009). GPR109A Is a G-protein-Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Research*, *69*(7), 2826–2832. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4466>
- Timmermans, W. M. C., van Laar, J. A. M., van der Houwen, T. B., Kamphuis, L. S. J., Bartol, S. J. W., Lam, K. H., Ouwendijk, R. J., Sparrow, M. P., Gibson, P. R., van Hagen, P. M., & van Zelm, M. C. (2016). B-Cell Dysregulation in Crohn's Disease Is Partially Restored with Infliximab Therapy. *PLOS ONE*, *11*(7), e0160103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160103>
- * Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Žádníková, R., Štěpánková, R., Cukrowska, B., Funda, D. P., Stříž, I., Kozáková, H., Trebichavský, I., Sokol, D., Řeháková, Z., Šinkora, J., Fundová, P., Horáková, D., Jelínková, L., & Sánchez, D. (2002). Mucosal Immunity: Its Role in Defense and Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, *128*(2), 77–89. <https://doi.org/10.1159/000059397>
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nuñez, G., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, *11*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1038/ni.1823>
- Truong, J. T., Fu, X., Saltzman, E., Al Rajabi, A., Dallal, G. E., Gundberg, C. M., & Booth, S. L. (2012). Age Group and Sex Do Not Influence Responses of Vitamin K Biomarkers to Changes in Dietary Vitamin K. *The Journal of Nutrition*, *142*(5), 936–941. <https://doi.org/10.3945/jn.111.154807>
- Tsai, C. H., Hill, M., Asa, S. L., Brubaker, P. L., & Drucker, D. J. (1997). Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *273*(1), E77–E84. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.1.E77>
- Tsukuda, N., Yahagi, K., Hara, T., Watanabe, Y., Matsumoto, H., Mori, H., Higashi, K., Tsuji, H., Matsumoto, S., Kurokawa, K., & Matsuki, T. (2021). Key bacterial taxa and metabolic pathways affecting gut short-chain fatty acid profiles in early life. *The ISME Journal*, *15*(9), 2574–2590. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00937-7>
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., & Akira, S. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by

- lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology*, 9(7), 769–776. <https://doi.org/10.1038/ni.1622>
- van de Pol, J. A. A., van Best, N., Mbakwa, C. A., Thijs, C., Savelkoul, P. H., Arts, I. C. W., Hornef, M. W., Mommers, M., & Penders, J. (2017). Gut Colonization by Methanogenic Archaea Is Associated with Organic Dairy Consumption in Children. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00355>
- Varela, E., Manichanh, C., Gallart, M., Torrejón, A., Borrueal, N., Casellas, F., Guarner, F., & Antolin, M. (2013). Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(2), 151–161. <https://doi.org/10.1111/apt.12365>
- Veyrard, P., Roblin, X., Pansart, C., Mao, R., Nancey, S., Killian, M., Waeckel, L., Berger, A.-E., Williet, N., Bastide, L., Barrau, M., Tournier, Q., & Paul, S. (2022). Serum calprotectin is useful to confirm inflammatory bowel disease activity but not to predict relapse. *Clinical Immunology Communications*, 2(February), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.clicom.2022.02.001>
- Walker, L. J., Aldhous, M. C., Drummond, H. E., Smith, B. R. K., Nimmo, E. R., Arnott, I. D. R., & Satsangi, J. (2004). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(3), 490–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02392.x>
- Wallace, B. D., Wang, H., Lane, K. T., Scott, J. E., Orans, J., Koo, J. S., Venkatesh, M., Jobin, C., Yeh, L.-A., Mani, S., & Redinbo, M. R. (2010). Alleviating Cancer Drug Toxicity by Inhibiting a Bacterial Enzyme. *Science*, 330(6005), 831–835. <https://doi.org/10.1126/science.1191175>
- Wang, R., Yang, X., Liu, J., Zhong, F., Zhang, C., Chen, Y., Sun, T., Ji, C., & Ma, D. (2022). Gut microbiota regulates acute myeloid leukaemia via alteration of intestinal barrier function mediated by butyrate. *Nature Communications*, 13(1), 2522. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30240-8>
- Wang, Y., Jiang, X., Zhu, J., Dan Yue, Zhang, X., Wang, X., You, Y., Wang, B., Xu, Y., Lu, C., Sun, X., & Yoshikai, Y. (2016). IL-21/IL-21R signaling suppresses intestinal inflammation induced by DSS through regulation of Th responses in lamina propria in mice. *Scientific Reports*, 6(1), 31881. <https://doi.org/10.1038/srep31881>
- Wedebye Schmidt, E. G., Larsen, H. L., Kristensen, N. N., Poulsen, S. S., Lynge Pedersen, A. M., Claesson, M. H., & Pedersen, A. E. (2013). TH17 Cell Induction and Effects of IL-17A and IL-17F Blockade in Experimental Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(8), 1567–1576. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318286fa1c>
- Weng, Y. J., Gan, H. Y., Li, X., Huang, Y., Li, Z. C., Deng, H. M., Chen, S. Z., Zhou, Y., Wang, L. S., Han, Y. P., Tan, Y. F., Song, Y. J., Du, Z. M., Liu, Y. Y., Wang, Y., Qin, N., Bai, Y., Yang, R. F., Bi, Y. J., & Zhi, F. C. (2019). Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 20(9), 447–459. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12795>
- Wiercinska-Drapalo, A., Jaroszewicz, J., Siwak, E., Pogorzelska, J., & Prokopowicz, D. (2008). Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regulatory Peptides*, 147(1–3), 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.12.002>
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., & Sabat, R. (2004). IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues. *Immunity*, 21(2), 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.007>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Yamaguchi, N., Isomoto, H., Mukae, H., Ishimoto, H., Ohnita, K., Shikuwa, S., Mizuta, Y., Nakazato, M., & Kohno, S. (2009). Concentrations of α - and β -defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation Research*, 58(4), 192–197. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8120-8>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Yilmaz, B., Juillerat, P., Øyås, O., Ramon, C., Bravo, F. D., Franc, Y., Fournier, N., Michetti, P., Mueller, C., Geuking, M., Pittet, V. E. H., Maillard, M. H., Rogler, G., Abdelrahman, K., Ademi, G., Aepli, P., Thomas, A., Anderegg, C., Antonino, A. T., ... Macpherson, A. J. (2019). Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nature Medicine*, 25(2), 323–336. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0308-z>
- Yuan, Y.-H., Hove, T. Ten, The, F. O., Slors, J. F. M., van Deventer, S. J. H., & te Velde, A. A. (2001). Chemokine Receptor CXCR3 Expression in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(4), 281–286. <https://doi.org/10.1097/00054725-200111000-00001>
- Zákostelská, Z., Kverka, M., Klimesova, K., Rossmann, P., Mrazek, J., Hornova, M., Srutkova, D., Hudcovic, T., Ridl, J., & Tlaskalova, H. (2011). Lysate of Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 Ameliorates Colitis by Strengthening

- the Gut Barrier Function and Changing the Gut Microenvironment. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027961>
- Zator, Z. A., Cantu, S. M., Konijeti, G. G., Nguyen, D. D., Sauk, J., Yajnik, V., & Ananthakrishnan, A. N. (2014). Pretreatment 25-hydroxyvitamin D levels and durability of anti-tumor necrosis factor- α therapy in inflammatory bowel diseases. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 38(3), 385–391. <https://doi.org/10.1177/0148607113504002>
- Zhang, F., Li, Y., Wang, X., Wang, S., & Bi, D. (2019). The Impact of *Lactobacillus plantarum* on the Gut Microbiota of Mice with DSS-Induced Colitis. *BioMed Research International*, 2019, 3921315. <https://doi.org/10.1155/2019/3921315>
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A. V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S. A., Joossens, M., Cenit, M. C., Deelen, P., Swertz, M. A., Weersma, R. K., ... Fu, J. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*, 352(6285), 565–569. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwartz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., & Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 53–60. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141>
- Zuo, T., Wong, S. H., Lam, K., Lui, R., Cheung, K., Tang, W., Ching, J. Y. L., Chan, P. K. S., Chan, M. C. W., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Yu, J., Sung, J. J. Y., & Ng, S. C. (2017). Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut*, 67(4), 1–10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313952>

* označuje sekundární citace