

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**Mechanismy patogeneze experimentální autoimunitní  
uveitidy a možnosti jejich ovlivnění**

MUDr. Aneta Klímová

Praha 2016



## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: 02 – Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Školící pracoviště: 1. lékařská fakulta

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

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

Autor: MUDr. Aneta Klímová

Adresa: Oční klinika VFN a 1. LF UK

U Nemocnice 2

Praha 2

Kontakt: [aneta.klimova@volny.cz](mailto:aneta.klimova@volny.cz)

737 800 058

## **Obsah**

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Kapitoly:	
1. Úvod.....	8
2. Hypotézy a cíle práce.....	9
3. Materiál a metody.....	10
4. Výsledky.....	12
5. Diskuse.....	14
6. Závěr.....	16
7. Vybraná literatura.....	18
Seznam vlastních publikací.....	19

Ráda bych poděkovala svým školitelkám Doc. MUDr. Jarmile Heissigerové, Ph.D., MBA a Doc. MUDr. Petře Svozílkové, Ph.D. za laskavé vedení během mého postgraduálního studia a za odborné rady během mé vědecké přípravy.

## **Abstrakt**

**Úvod:** Autoimunitní uveitida postihuje zejména střední věkovou kategorii a přes stále se rozvíjející terapeutické možnosti způsobuje těžké postižení zraku. Vzhledem k široké klinické variabilitě je studium autoimunitní uveitidy v humánní medicíně limitované, a proto byly vyvinuty experimentální modely. Cílem naší práce bylo zavést reprodukovatelný model experimentální autoimunitní uveitidy v České republice a dále na tomto modelu sledovat zastoupení CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici, zhodnotit vliv mikrobiálního prostředí na intenzitu nitroočního zánětu a testovat terapeutické možnosti.

**Materiál a metody:** Myším kmene C57BL/6J byl aplikován sítnicový antigen (IRBP 1-20, interphotoreceptor retinoid binding protein) potencionovaný kompletním Freundovým adjuvans a pertusovým toxinem, který vyvolá mírnou zadní autoimunitní uveitidu. Myši pocházely z konvenčního a gnotobiotického (bezmikrobiálního) chovu. Intenzita uveitidy byla hodnocena podle standardizovaných protokolů *in vivo* biomikroskopicky a *post mortem* histologicky na řezech barvených hematoxylin eozinem. Vzorky tkání byly analyzovány také imunohistochemicky a průtokovou cytometrií. Standardní sledovací doba experimentu byla 35 dnů. Myši s uveitidou z konvenčního chovu byly léčeny perorálními antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacin) podávanými profylakticky týden před indukci a ode dne indukce. Také byl testován účinek léčby uveitidy mykofenolát mofetilem, cyklofosfamidem a golimumabem.

**Výsledky:** V našich laboratorních podmínkách byl zaveden model experimentální autoimunitní uveitidy, byla ověřena jeho stabilita a reprodukovatelnost. Na histologických řezech sítnicí zpracovaných na imunohistochemii byla v čase zaznamenána stoupající koncentrace CD3+ a F4/80+ buněk a charakteristické uspořádání zánětlivých ložisek, CD3+ buňky v centru a F4/80+ buňky na jejich periferii. Byla prokázána nižší intenzita zánětu u myši v redukovaném mikrobiálním prostředí: u myši léčených profylakticky perorálními antibiotiky a u bezmikrobiálních myši. Byl potvrzen účinek mykofenolát mofetilu a cyklofosfamidu v léčbě experimentální autoimunitní uveitidy.

**Závěr:** Model experimentální autoimunitní uveitidy je vhodný pro studium imunopatogenetických mechanismů i terapeutických možností v základním výzkumu, což může přispět k efektivní léčbě nitroočních zánětů v humánní medicíně.

## The Mechanisms of Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveitis and Possibilities of Their Regulation

### Abstract

**Introduction:** Uveitis is an intraocular inflammation affecting mostly people of working age. Uveitis is responsible for severe visual impairment despite of expanding new therapeutics. Because of the clinical heterogeneity of uveitis, which limits studies in human medicine, the animal models of uveitis were established. The goal of our project was to set up a reproducible model of experimental autoimmune uveitis in Czech Republic, to observe the frequency of CD3+ and F4/80+ cells in retina on this model, to assess the influence of microbial environment on intensity of intraocular inflammation and to test the therapeutical possibilities.

**Material and methods:** The C57BL/6J mice were immunized by retinal antigen (IRBP 1-20, interphotoreceptor retinoid binding protein) enhanced by complete Freund's adjuvant and pertussis toxin, and mild posterior autoimmune uveitis was induced. The mice were bred in conventional and germ-free (gnotobiotic) conditions. Uveitis intensity was evaluated *in vivo* biomicroscopically and *post mortem* histologically on hematoxylin eosin stained sections according to the standard protocol. Mouse tissues were analyzed also by immunohistochemistry and by flow cytometry. Each experiment was performed for 35 days. The conventional mice with uveitis were treated with oral antibiotics (metronidazole and ciprofloxacin) starting a week before induction and at the day of induction. Furthermore, the effect of mycophenolate mofetil, cyclophosphamide and golimumab was tested on this model.

**Results:** The model of experimental autoimmune uveitis was established in our laboratory and its stability and the reproducibility was verified. On histological sections after immunohistochemical staining, the increasing concentration of CD3+ and F4/80+ cells in time was observed as well as the characteristic arrangement of retinal infiltrates with CD3+ cells in the center of the infiltrates and F4/80+ cells at its periphery. The lower inflammation intensity was proved in reduced microbial environment: in mice treated prophylactically by antibiotics and in germ-free mice. The effect of mycophenolate mofetil and cyclophosphamide was confirmed in treatment of experimental autoimmune uveitis.

**Conclusion:** The model of experimental autoimmune uveitis is an ideal tool to study the immunopathological mechanisms and therapeutical possibilities in basic research. This can contribute to effective treatment of intraocular inflammation in human medicine.



## Úvod

Uveitida je nespecifický název pro nitrooční zánět duhovky, řasnatého (ciliárního) tělíska a/nebo cévnatky.

Uveitida postihuje především střední věkovou kategorii, prevalence je 40 případů na 100 000 obyvatel a představuje desetiprocentní podíl na slepotě v rozvinutých zemích.

Existuje více možností klasifikace uveitid. Na základě klinického průběhu se dělí uveitidy na akutní a chronické. Anatomická klasifikace rozlišuje uveitidy přední, intermediální, zadní a panuveitidu. Podle příčiny se dělí na infekční, neinfekční, idiopatické a maskující syndrom. Až v 50 % případů zůstává příčina neznámá. Naše práce se věnuje problematice chronické zadní uveitidy autoimunitní etiologie na myším modelu experimentální autoimunitní uveitidy (EAU).

Vzhledem k tomu, že autoimunitní uveitida u lidí je relativně vzácné a heterogenní onemocnění, byly před 40 lety vyvinuty zvířecí modely ke studiu patogeneze uveitidy, jejich genetických souvislostí i terapeutických možností.

Modely EAU indukované antigeny využívají retinálních antigenů k imunizaci zvířat. Uveitida indukovaná IRBP antigenem u myši kmene C57BL/6 je mírná a chronická a blíže připomíná autoimunitní uveitidu u lidí s vitritidou, retinitidou, vaskulitidou a dalšími znaky. Výhodou u tohoto modelu je relativně dlouhá doba aktivity zánětu od 21. do 35. dne. Minimální či žádné postižení předního segmentu umožňuje při biomikroskopii dobrou vyšetřitelnost sítnice i při vysoké aktivitě zánětu.

Spouštěcí mechanismus autoimunitních onemocnění spojený se ztrátou autotolerance dosud nebyl plně objasněn. Některé hypotézy označují u geneticky predisponovaných jedinců za iniciátora onemocnění infekci. Za důležitý regulační prvek pro udržení imunologické homeostázy je považována střevní mikrobiota. Mikrobiota nahrazuje dřívější označení mikroflóra. V celé řadě experimentálních modelů autoimunitních onemocnění bylo prokázáno, že v bezmikrobních podmínkách nedochází k rozvoji onemocnění nebo je jeho průběh atenuován. Proto nás zajímalo, zda redukované mikrobiální prostředí u těchto myší mění aktivitu EAU.

Současná imunoterapie autoimunitní uveitidy používaná v klinické praxi je vzhledem k jejím nespecifickým účinkům často nedostatečně efektivní a bývá provázena závažnými nežádoucími účinky. Imunosupresivní a imunomodulační terapie se zaměřuje na ovlivnění T lymfocytů, zánětlivých cytokinů a obecně proliferujících buněk. Mnoho nových biologik zavedených v praxi bylo vyvinuto nebo ověřováno na zvířecích modelech autoimunitních nebo zánětlivých onemocnění, včetně EAU.

## Hypotézy a cíle práce

Cílem naší práce bylo zavedení reprodukovatelného modelu EAU u myši v České republice a studium autoimunitního zánětu v sítnici v průběhu zadní uveitidy včetně možností jeho ovlivnění. Intenzita zánětu byla posuzována na základě klinického a histologického hodnocení uveitidy. Byl prováděn imunohistochemický průkaz imunokompetentních buněk v místě zánětu a jejich kvantifikace v různých fázích uveitidy. Byla porovnána intenzita zánětu u bezmikrobních myši a u myši léčených perorálními antibiotiky. Dílčím cílem bylo farmakologické ovlivnění zánětu.

I. Za předpokladu, že v našich laboratorních podmínkách zavedeme stabilní a reprodukovatelný model EAU pomocí IRBP antigenu, budeme hodnotit,

- A. jaké faktory ovlivňují úspěšnou indukci uveitidy u myšího modelu EAU
- B. zda koreluje stupně klinického a histologického hodnocení intenzity zánětu

II. Je obecně známo, že T lymfocyty a makrofágy jsou nejpočetnějšími imunokompetentními buňkami v sítnici u myši s EAU. Naším cílem je kvantifikovat zastoupení T lymfocytů a makrofágů v sítnici v různých fázích uveitidy.

III. U některých autoimunitních onemocnění byl popsán vliv střevního mikrobiomu na intenzitu zánětu. Předpokládáme, že mikrobiom má význam také u EAU. Budeme posuzovat jeho vliv na intenzitu uveitidy včetně ovlivnění počtu imunokompetentních buněk.

IV. Účinek mykofenolát mofetilu není v léčbě autoimunitní uveitidy jednoznačný. Naším cílem je testovat účinnost mykofenolát mofetilu na modelu EAU, porovnat jeho účinek s cyklofosfamidem a objasnit, zda je mykofenolát mofetil indikován pro terapii uveitid.

## **Materiál a metody**

### *Experimentální zvířata*

Ve studii byly použity myši inbredního kmene C57BL/6J ve věku 6 až 8 týdnů, v konvenčním chovu pouze samice, v gnotobiotickém chovu u bezmikrobních myší samice i samci.

### *Indukce EAU*

Aplikace sítnicového peptidu IRBP, který působí jako autoantigen, byla prováděna podle standardního protokolu. Subkutánně bylo aplikováno 500 µg IRBP 1-20. Pro rozpuštění peptidu byl použit dimethylsulfoxid (DMSO). IRBP byl emulzifikován s kompletním Freundovým adjuvans (CFA) obsahujícím mykobakterie. Reaktivita imunitního systému byla podpořena intraperitoneální aplikací pertusového toxinu (PT), rozpuštěného v PBS (phosphate buffered saline).

### *Klinické vyšetření uveitidy*

Biomikroskopické vyšetření zvířat *in vivo* bylo prováděno pomocí otoskopu. Myši byly vyšetřovány v celkové intraperitoneální anestezii, pro rozšíření zornice byla aplikována mydriatika do spojivkového vaku. Na rohovku pokrytou vrstvou viskomateriálu byl přikládán otoskop připojený k zevnímu zdroji světla a k fotoaparátu s předsazenou čočkou +4,0 dioptrie.

### *Histologické zpracování materiálu*

Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací podle etických pravidel daných zákonem. Oči byly enukleovány bezprostředně *post mortem* 35. den po indukci EAU. Oči byly vloženy do gelového média a zamraženy ve 2-methylbutanu v atmosféře tekutého dusíku. Vzorky zmražené na -70°C byly krájeny na mikrotomu na 7 µm silné řezy. Řezy byly krájeny vždy z periferie a z oblasti optického nervu obou očí a barveny hematoxylin-eozinem podle standardního protokolu. Vzorky byly odebrány z obou očí, vzhledem k tomu, že zánět může být asymetrický.

Imunohistochemický průkaz T lymfocytů a makrofágů byl proveden na mražených řezech třístupňovou metodou s primární králičí protilátkou proti CD3 antigenu a krysí protilátkou proti F4/80 antigenu. Anti-CD3 polyklonální protilátka detekuje specificky T lymfocyty. Anti-F4/80 je monoklonální protilátka, která kromě makrofágů barví zkříženě mikroglie i malou fraksi dendritických buněk.

Průtoková cytometrie k detekci imunokompetentních buněk byla provedena z mezenteriálních a krčních uzlin.

### *Hodnocení intenzity uveitidy*

Posouzení stupně uveitidy je založeno na hodnocení biomikroskopickém *in vivo* nebo histologickém *post mortem* ve škále 0 (žádný zánět) až 4 (silný zánět) a po imunohistochemickém barvení byla provedena kvantitativní analýza CD3+ a F4/80+ buněk. Klinické známky zánětu na sítnici představuje vaskulitida, sítnicové infiltráty, edém optického nervu a v pokročilé fázi atrofie sítnice. Mezi histologické známky zadní uveitidy patří retinální záhyby, zánětlivá ložiska v sítnici, často lokalizovaná v blízkosti ciliárního tělíska, vaskulitida, vitritida, neovaskularizace sítnice, v pokročilé fázi ztráta fotoreceptorů.

### *Léčba antibiotiky*

Pro snížení mikrobiální nálože byly myši v konvenčním chovu léčeny širokospektrými antibiotiky (ATB) metronidazolem a ciprofloxacinem v pitné vodě podle zavedených postupů. Byly použity dva režimy léčby: zahájení týden před indukci uveitidy a zahájení v den indukce uveitidy. Léčba trvala po celou dobu experimentu.

### *Léčba EAU*

Byly srovnávány 4 skupiny léčených myší s kontrolami. Dvě skupiny léčené mykofenolát mofetilem (MMF) intraperitoneálně denně v dávce 30 mg/kg a 50 mg/kg. Další skupina myší byla léčena cyklofosfamidem (CF) intraperitoneálně v jediné dávce 100 mg/kg. Poslední skupina byla léčena golimumabem subkutánně 1x týdně v dávce 70 mg/kg. Kontrolní skupiny byly 2: skupina s EAU bez léčby a skupina s sham léčbou (aqua pro injectione aplikovaná intraperitoneálně).

### *Statistická analýza*

Data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism. K porovnání mezi skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitneyův test a Kruskalův-Walisův test. Hodnota  $p < 0,05$  byla hodnocena jako signifikantní.

## Výsledky

### *Zastoupení CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici během zánětu*

Počet T lymfocytů a makrofágů v sítnici v průběhu zánětu stoupá, výrazný nárůst je 25. den od indukce, kdy klinicky zaznamenáváme vrchol uveitidy. Postupně dochází ke kumulaci zánětlivých buněk a v pozdní fázi zánětu, v našem sledování 60. den, je jejich počet nejvyšší. Infiltrace sítnice T lymfocyty podle našich výsledků nastává od 10. dne po indukci, infiltrace makrofágy až od 20. dne po indukci. Celkový počet T lymfocytů proti makrofágům je v pozdní fázi více než dvojnásobný.

### *Vliv mikrobiální flóry na průběh zánětu*

Redukované mikrobiální prostředí u bezmikrobních myší a myší léčených profylakticky antibiotiky týden před indukci a po dobu experimentu snižuje intenzitu nitroočního zánětu.

Intenzita nitroočního zánětu byla sledována ve 3 skupinách: A) bezmikrobní myši, B) myši léčené perorálními antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacín) v pitné vodě podávanými profylakticky, tj. týden před indukci EAU a po dobu experimentu, C) myši léčené ATB od dne indukce EAU po dobu experimentu. Intenzita zánětu byla porovnána s kontrolní skupinou konvenčních myší s EAU.

U bezmikrobních myší byla v histologickém hodnocení intenzita zánětu ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší ( $p < 0,0001$ ). Kombinace širokospektrých antibiotik snižuje mikrobiální nálož ve střevě a významně změnilo složení mikrobioty. Léčba ATB týden před indukci vedla k signifikantnímu snížení zánětu při klinickém vyšetření oproti neléčeným kontrolám, s největším rozdílem pozorovaným 35. den ( $p = 0,011$ ). Toto bylo potvrzeno histologickým hodnocením 35. den, kdy intenzita zánětu byla významně snížena ( $p = 0,023$ ).

U myší léčených antibiotiky ode dne indukce uveitidy po celou dobu experimentu nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl v histologickém hodnocení intenzity zánětu oproti kontrolní skupině ( $p = 0,294$ ).

Kvantitativní analýza CD3+ a F4/80+ buněk v sítnici 35. den po indukci po imunohistochemickém barvení ukazuje u bezmikrobních myší oproti kontrolám signifikantně nižší počet T lymfocytů ( $p < 0,05$ ), i snížení počtu makrofágů ( $p = 0,093$ ).

Při průtokové cytometrii bylo zaznamenáno v drénující krční uzlině u bezmikrobních myší menší procento Th1 a Th17 lymfocytů a větší

akumulace Foxp3+Tregs oproti kontrolním myším. Větší počet Th1 a Th17 lymfocytů v krční uzlině u kontrolních myší je pravděpodobně výsledkem migrace buněk ze zánětlivé uveoretiny. Zastoupení CD4+TNF- $\alpha$ + T lymfocytů bylo podobné v obou skupinách. Vyšetření populace buněk v mezenterálních lymfatických uzlinách neukázalo rozdíly mezi bezmikrobní a kontrolní skupinou myší. Tyto výsledky naznačují, že zvýšení prozánětlivých T lymfocytů v drénující krční uzlině vzniká v důsledku orgánově specifického onemocnění oka.

#### *Účinek léků na intenzitu zánětu*

Cyklofosfamid prokázal 100% účinnost na snížení intenzity EAU ( $p < 0,0001$ ), také mykofenolát mofetil v dávce 30 mg/kg ukázal signifikantní snížení zánětu ( $p < 0,05$ ). Vyšší dávka mykofenolát mofetilu 50 mg/kg snížila intenzitu zánětu, ale výsledek nebyl statisticky signifikantní. Léčba golimumabem neprokázala účinek na snížení zánětu u myší. Z histologického hodnocení je zřejmé, že golimumab způsobil spíše vyšší intenzitu zánětu, což můžeme vysvětlit jeho humánním původem.

## Diskuze

Experimentální autoimunitní uveitida u myši představuje reprodukovatelný model, který otevírá další možnosti v oblasti výzkumu zadní uveitidy autoimunitní etiologie.

Výhodou modelu chronické EAU u myši C57BL/6 je relativně dlouhá doba aktivity zánětu trvající přibližně 3 až 4 týdny. Biomikroskopicky byla u našich myši nejvyšší intenzita zánětu kolem 25. dne po indukci. Histologicky byla největší kumulace zánětlivých změn 35. den po indukci. Naše pozorování korelují s výsledky jiných autorů, kteří zaznamenávají vrchol zánětu kolem 25. dne po indukci.

V průběhu zánětu dochází k infiltraci sítnice celou řadou imunokompetentních buněk: T a B lymfocyty, dendritické buňky, makrofágy, myeloidní supresorové buňky, neutrofilů. Nejpočetnějšími buňkami v sítnici a v choroidee jsou v průběhu celé doby zánětu T lymfocyty a makrofágy, což odpovídá našim výsledkům imunohistochemie. Místo vstupu zánětlivých buněk do sítnice je stále nejasné. Studie na potkanech ukázala, že aktivované makrofágy pocházející z krve jsou u EAU hlavními buňkami tkáňového poškození, které probíhá pod kontrolou antigenně specifických T lymfocytů a TNF- $\alpha$ . Forrester et al. pozoroval, že při uveoretinitidě makrofágy fagocytují zevní segmenty fotoreceptorů, což odpovídá atrofii fotoreceptorů u pokročilého stupně EAU na našich výsledcích histologie. Tkáňové poškození je také způsobeno z části volnými radikály, zejména oxidem dusnatým.

Podle současných literárních údajů mikrobiota významně ovlivňuje některá autoimunitní onemocnění. Přítomnost mikrobioty podmiňuje vznik kolitidy, roztroušené sklerózy, artritidy nebo ankylózní spondylitidy, naopak u modelu typu 1 diabetu intenzitu onemocnění snižuje. Na IRBP-indukovaném modelu EAU redukované mikrobiální prostředí podle našich výsledků snižuje intenzitu uveitidy, a to u myši chovaných v bezmikrobních podmínkách i u myši z konvenčního chovu, které byly profylakticky léčené širokospektrými antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacin) týden před indukcí EAU a po dobu experimentu. Pokud byla u konvenčních myši léčba antibiotiky zahájena v den aplikace antigenního peptidu a adjuvans, neměla léčba antibiotiky vliv na intenzitu EAU. Tyto výsledky mohou mít význam v humánní medicíně, kde vysvětlují nedostatečný terapeutický vliv podávaných systémových antibiotik v léčbě autoimunitní uveitidy.

Uveitida je zrak ohrožující onemocnění, které je terapeuticky náročné ovlivnit. Imunosupresiva ani biologická léčba nebývají vždy u pacientů s autoimunitní uveitidou účinné. V naší práci jsme prokázali signifikantní snížení očního zánětu léčbou mykofenolát mofetilem a cyklofosfamidem. Hlavní role mykofenolát mofetilu v léčbě autoimunitní uveitidy je spíše podpůrná a jeho účinek v monoterapii u zrak ohrožujících zánětů je sporný. Proto jsme testovali účinek mykofenolát mofetilu na modelu experimentální uveitidy u myší, kde dosud nebyl použit. Imunosupresivní účinek cyklofosfamidu je u lidí již dlouho znám. Pro závažné nežádoucí účinky je vyhrazen pro pacienty, u kterých selhal jiný imunomodulační režim, nebo jako léčba první volby u život ohrožujících onemocnění. Závěr naší práce podporuje indikaci léčby mykofenolát mofetilem u zadní uveitidy autoimunitní etiologie u lidí. Golimumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti TNF- $\alpha$ . Naše výsledky ukazují zhoršení uveitidy v léčené skupině. Zvýšení prozánětlivého účinku golimumabu může být vysvětleno aplikací plně humanizované protilátky myším, což vyvolá silnou imunitní reakci.



## Závěr

Tato práce se zabývala částí rozsáhlé problematiky IRBP-indukovaného nitroočního zánětu na myším modelu EAU a splnila cíle stanovené v úvodu této dizertační práce:

I. V naší laboratoři byl zaveden reprodukovatelný a stabilní myší model EAU indukovaný u myši kmene C57BL/6J sítnicovým antigenem IRBP 1-20. Klinicky byly myši vyšetřovány *in vivo* pomocí otoskopu, byly zdokumentovány klinické projevy uveitidy: sítnicové infiltráty, edém terče zřetivého nervu a opouzdření cév. Histologicky byly hodnoceny zánětlivé změny *post mortem* 35. den po indukci: retinální zánětlivá ložiska, retinální záhyby, neovaskularizace sítnice, serózní amoce, vaskulitida a vitritida. Intenzita zánětu byla posuzována pomocí zavedených hodnotících tabulek ve škále 0 (žádný zánět) až 4 (silný zánět).

A) Byla zjištěna kritická místa v protokolu indukce, zpřesněna příprava reagií a detailně popsána aplikace peptidu, což jsou zásadní předpoklady pro úspěšnou indukci uveitidy. Důležité faktory ovlivňující indukci jsou věk a pohlaví u myši, vhodné podmínky chovu a také mikrobiální prostředí.

B) Podle našich pozorování je při klinickém vyšetření vrchol zánětu 25. den po indukci, při histologickém vyšetření až 35. den. Pokud posuzujeme intenzitu zánětu 35. den po indukci, je při klinickém vyšetření vyšší (stupeň 3) než při hodnocení histologickém (stupeň 2). Tyto diskrepance mohou být vysvětleny rozdílným rozsahem hodnocené sítnice. Při klinickém vyšetření je přehlédnuta celá sítnice. Při histologickém hodnocení je posuzováno 8 až 10 řezů sítnice jednoho oka, nemusí být tedy zachyceny všechny léze. V dalším průběhu nastupují atrofické pozánětlivé změny, které zaznamenáme dříve při klinickém vyšetření.

II. Na IRBP-indukovaném modelu EAU u myši kmene C57BL/6J byly imunohistochemicky detekovány CD3+ T lymfocyty a F4/80+ makrofágy v sítnici. V průběhu zánětu se jejich počet prudce zvyšuje 25. den od indukce, v dalším průběhu do ukončení experimentu 60. den je vzestup pomalejší. Výrazné zvýšení počtu těchto zánětlivých buněk časově koreluje s vrcholem zánětu. T lymfocyty jsou zachyceny v sítnici od 10. dne po indukci, makrofágy se vyskytují v sítnici od 20. dne po indukci. Celkově je počet T lymfocytů 2x

vyšší než počet makrofágů. Charakteristické je uspořádání zánětlivých ložisek s T lymfocyty v centru a makrofágy na periferii ložiska.

III. V celé řadě experimentálních modelů autoimunitních onemocnění bylo prokázáno, že v bezmikrobních podmínkách nedochází k rozvoji onemocnění nebo je jeho průběh atenuován. V této práci bylo potvrzeno, že redukované mikrobiální prostředí před indukcí EAU (bezmikrobní myši a myši léčené profylakticky antibiotiky týden před indukcí) vede k nižší intenzitě EAU, zatímco antibiotika zahájena konkomitantně s indukcí neovlivňují intenzitu uveitidy. Kvantitativní analýza T lymfocytů a makrofágů v sítnici u bezmikrobních myši prokázala signifikantně nižší počet T lymfocytů, což potvrzuje, že čím je v sítnici nižší počet T lymfocytů, tím je intenzita uveitidy nižší.

Tato studie dokazuje blízký vztah mezi mikrobiomem a EAU a potvrzuje vliv nespecifické imunity na vznik EAU.

IV. CF v dávce 100 mg/kg a MMF v dávce 30 mg/kg signifikantně snižují intenzitu zánětu na IRBP-indukovaném modelu EAU. CF je zavedené imunosupresivum s prokázaným účinkem, užití MMF bylo dosud u autoimunitních uveitid rozporuplné. Signifikantní výsledek v našem pozorování podporuje použití MMF v léčbě zadní uveitidy autoimunitní etiologie v humánní medicíně.

Zavedení modelu EAU umožňuje podrobně studovat imunopatogenetické mechanismy zánětu a jejich cílenou regulaci, což může přispět k efektivní léčbě nitroočních zánětů autoimunitní etiologie v humánní medicíně. Nové terapeutické možnosti mohou vést ke snížení nákladů na léčbu uveitidy a jejich komplikací a ke snížení procenta slepoty u osob v produktivním věku.

## Vybraná literatura

1. Agarwal R.K., Silver P.B., Caspi R.R. (2012) Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis. *Autoimmunity: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 900, Springer Science+Business Media New York, Chapter 22: 443-469.
2. Caspi R. R., Silver P. B., Luger D., Tanq J., Cortes L.M., Pennesi G., Mattapallil M.J., Chan C.C. (2008) Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res.* 40: 169-174.
3. Caspi R.R. (2010) A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 120: 3073-3083.
4. Caspi R.R. (2013) Immunology of the eye-inside and out. *Int Rev Immunol.* 32: 1-3.
5. Caspi R.R. (2014) Understanding autoimmunity in the eye: from animal models to novel therapies. *Discov Med.* 17: 155-162.
6. Forrester J.V., Xu H. (2012) Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol.* 27: 338.
7. Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R. (2013) Základy imunologie, 5. vydání. Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-713-2.
8. Paques M., Guyomard J.L., Simonutti M., Roux J.M., Picaud S., Le-Gargasson J.F., Sahel J.A. (2007) Panretinal, High Resolution Color Photography of the Mouse Fundus, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2769-2774.
9. Řihová a kol. (2009) Uveitidy. Praha: Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-2897-1.
10. Tlaskalová-Hogenová H., Štěpánková R., Kozáková H., Hudcovic T., Vannucci L., Tučková L., Rossmann P., Hrnčír T., Kverka M., Zákostelská Z., Klimešová K., Příbylová J., Bártová J., Sanchez D., Fundová P., Borovská D., Srůtková D., Zídek Z., Schwarzer M., Drastich P., Funda D.P. (2011) The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 8: 110-120.
11. Xu H., Koch P., Chen M., Lau A., Reid D.M., Forrester J.V. (2008) A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res.* 87: 319-326.

## Seznam publikací

### Publikace, které jsou podkladem dizertace:

1. Klímová A., Seidler Štangová P., Heissigerová J., Svozílková P., Kučera T. (2014) Mycophenolate mofetil and cyclophosphamide treatments suppress inflammation intensity in an experimental model of autoimmune uveitis. *Folia Biol (Praha)*. 60: 228-234. **IF 1,0**
2. Klímova A., Seidler Stangova P., Svozilkova P., Forrester J.V., Klaska I., Heissigerova J. (2015) The critical points in induction of experimental autoimmune uveitis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 160: 140-142. **IF 1,2**
3. Klímová A., Seidler Štangová P., Svozílková P., Kučera T., Heissigerová J. (2016) Klinické projevy experimentální autoimunitní uveitidy. *Čes a slov Oftal.* 72: 276-282.
4. Heissigerova J., Seidler Stangova P., Klímova A., Svozilkova P., Hrcir T., Stepankova R., Kverka M., Tlaskalova-Hogenova H., Forrester J.V. (2016) The microbiota determines susceptibility to experimental autoimmune uveitis. *J Immunol Res*. **IF 2,9** (v tisku)

### Publikace bez vztahu k tématu dizertace:

1. Diblík P., Kalvodová B., Růžičková E. a kol. (2007) Oftalmologie v kazuistikách, Diabetická retinopatie - předčasná slepota a invalidizace, Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-025-6, 176-179.
2. Klímová A., Diblík P., Kuthan P., Sklenka P. (2011) Zánětlivý pseudotumor očnice. *Neurol. praxi.* 12: 164-166.
3. Kuthan P., Diblík P., Sklenka P., Klímová A. (2011) Temporální arteritida - akutní onemocnění vyžadující neodkladnou péči. *Neurol praxi.* 12: 160-163.
4. Svozílková P. a kol. (2014) Infekční konjunktivitidy, Diagnostika a léčba očních zánětů, Praha: Maxdorf Jessenius 2014, ISBN 978-80-7345-391-6, 32-59.
5. Klímová A., Svozílková P., Skalická P. (2015) Konjunktivitidy. *Remedia*, 25: 259-263.