

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Význam probiotik v prevenci a terapii ulcerózní kolitidy
v myším experimentálním modelu**

Bakalářská práce

Autor práce: Barbora Draboňová

Obor studia: Speciální chovy ABPSKS

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Tomáš Hudcovic, CSc

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Význam probiotik v prevenci a terapii ulcerózní kolitidy v myším experimentálním modelu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18.4.2019

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za pomoc, rady, výborné odborné vedení a čas, který mi při psaní práce věnovala.

Také bych chtěla poděkovat mému konzultantovi Ing. Tomášovi Hudcovicovi, CSc. za odbornou pomoc a rady v experimentální části této bakalářské práce.

V neposlední řadě bych chtěla velice poděkovat RNDr. Haně Kozákové, CSc. za cenné a pečlivé rady, odborné připomínky, čas a morální podporu.

Zvláště bych chtěla poděkovat svému manželovi a synovi za trpělivost.

Význam probiotik v prevenci a terapii ulcerózní kolitidy v myším experimentálním modelu

Souhrn

Ulcerózní kolitida (UC) je chronické, recidivující zánětlivé onemocnění střeva. Spolu s Crohnovou chorobou se řadí mezi idiopatické střevní záněty (Inflammatory Bowel Disease IBD). Jedná se o civilizační choroby vyskytující se často ve vyspělých zemích. Patogeneze tohoto onemocnění není ještě zcela objasněna. Je ale zřejmé, že u pacientů s UC dochází ke změnám ve střevní mikrobiotě, hlavně ke snížení bakteriální diverzity. V důsledku toho pak dochází k tzv. dysbióze, při které dochází k selhání funkce střevní bariéry a zvýšené stimulaci imunitních buněk lamina propria antigeny střevního obsahu, což vede k nepřiměřené imunitní odpovědi. Jednou z možných cest, jak tento zdravotní stav vylepšit, je užívání prebiotik a probiotik.

Cílem této práce bylo v literární části vytvořit přehled o vlivu probiotických bakterií na prevenci a léčbu UC a přehled experimentálních myších modelů, které se používají při studiu UC. Zajímala jsem se o funkci střevního epitelu se zaměřením na těsné spoje, jejichž funkce je spojena s propustností střeva, a které jsou narušeny při UC. V experimentální části byl sledován profylaktický účinek probiotické bakterie *E. coli* Nissle 1917 u monoasociovaných a reasociovaných myší kmene BALB/c. Cílem studie bylo zhodnotit vliv probiotické bakterie *E. coli* Nissle 1917 a uropatogenní bakterie *E. coli* O6K13 na vývoj střevního zánětu v experimentálním modelu akutní kolitidy vyvolaném podáním DSS. Myši byly neonatálně osazeny bakterií *E. coli* Nissle 1917 nebo bakterií *E. coli* O6K13 a poté reasociovány *E. coli* O6K13 nebo *E. coli* Nissle 1917. Akutní UC jsme u zvířat vyvolali podáváním 2,5 % dextranulfátu sodného (DSS) v pitné vodě po dobu 7 dnů. Výsledky jsme hodnotili pomocí histologické metody, kde jsme stupeň zánětu u jednotlivých skupin hodnotili podle Cooper et al. (1993). Zdravá kontrola byly myši neonatálně osazené *E. coli* Nissle 1917 a poté reasociovány *E. coli* O6K13 bez podávání DSS. Kontrolní skupina s indukovaným zánětem střeva byla konvenční zvířata, která po sedmidenním podávání DSS vykazovala příznaky těžkého zánětu hodnoceného stupněm 4. U bezmikrobních myší s DSS byl stupeň zánětu 1,6. Myši neonatálně osazené *E. coli* Nissle 1917 a poté reasociovány *E. coli* O6K13 zůstaly po dobu podávání DSS zdravé, bez příznaků těžkého střevního zánětu. Stupeň zánětu dle Cooper et al. (1993) jsme hodnotili 0,8. U skupiny myší neonatálně osazených *E. coli* O6K13 a reasociovaných *E. coli* Nissle 1917 byl DSS - indukovaný zánět hodnocen 2,3. Imunohistochemicky jsme hodnotili protein těsných spojů zonula occludens (ZO - 1). ZO - 1, který je znám jako fyziologický mediátor regulující střevní propustnost. U skupiny myší monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a poté reasociovaných *E. coli* O6K13 po sedmidenním podání DSS jsme detekovali zachovalou strukturu proteinu. U myší monoasociovaných *E. coli* O6K13 a poté reasociovaných *E. coli* Nissle 1917 po DSS vyvolaném zánětu, byl ZO - 1 snížen.

Dokázali jsme, že časná kolonizace myší bakterií *E. coli* Nissle 1917 ochránila myši před vznikem střevního zánětu v experimentálním modelu akutní kolitidy a že tato bakterie má probiotické účinky.

Klíčová slova: Probiotika, nespecifické střevní záněty, gnotobiotický myší modely, dextran-sulfátový model kolitidy, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Escherichia coli* O6K13

Probiotics in the prevention and therapy of ulcerative colitis in mouse experimental model

Summary

Ulcerative colitis (UC) is a chronic, recurrent, inflammatory disease of intestine. Together with Crohn's disease UC belongs to Inflammatory Bowel Diseases (IBD). These are lifestyle-related civilisation diseases that occur in highly developed countries. Pathogenesis of UC is still unknown. UC patients show changes in the intestinal microbiota and the bacterial diversity is reduced. As a result bacterial dysbiosis occurs in the intestinal tract. Disruptions in the microbiome composition and exposing lamina propria immune cells to intestinal content lead to inappropriate immune response. Probiotics and prebiotics are seen as one of the ways to prevent/improve this inflammatory condition.

In the literal part of the work the main aim was 1) creating an overview of published literature about the influence of probiotics bacteria on prevention and treatment UC and 2) summary of experimental mouse UC models. Specific emphasis was put on the function of the intestinal epithelium, especially on the tight junctions. Tight junctions regulate the paracellular permeability of intestinal epithelial cells and their function is disrupted in UC.

In the experimental part we tested the prophylactic effect of probiotic bacteria *E. coli* Nissle 1917 in mono-associated and reassociated BALB/c mice. We evaluated the influence of probiotic bacteria *E. coli* Nissle 1917 and uropathogenic bacteria *E. coli* O6K13 on development of intestinal inflammation in the experimental mouse model of acute colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS). Mice were neonatally colonized by bacteria *E. coli* Nissle 1917 or bacteria *E. coli* O6K13 and then they were reassociated by *E. coli* O6K13 or *E. coli* Nissle 1917. We induced the acute UC by administrating DSS in drinking water for 7 days. For scoring of the inflammatory changes, we used methodology developed by Cooper et al. (1993).

Mice neonatally colonized by *E. coli* Nissle 1917 and then reassociated by *E. coli* O6K13 were healthy controls. The CV-DSS mice were the positive control group. After the 7-day of DSS treatment the CV mice showed signs of heavy inflammation that we evaluated by the grade 4. The DSS-treated germ-free animals had the inflammation grade 1.6. The group of mice that were neonatally associated by bacteria *E. coli* Nissle 1917 and then reassociated by *E. coli* O6K13, stayed healthy during the experiment without the symptoms of severe intestinal inflammation – the grade of inflammation was 0.8. The group of mice that were neonatally associated by bacteria *E. coli* O6K13 and then reassociated by *E. coli* Nissle 1917 developed more severe inflammation with the score 2.3. We evaluated tight junction forming proteins zonula occludens (ZO – 1), known for controlling intestinal paracellular permeability, using immunohistochemistry. The structure of ZO-1 was preserved in the group of mono associated *E. coli* Nissle 1917 mice and then reassociated *E. coli* O6K13 mice. On the other hand, production of ZO – 1 was reduced in the group of mice mono associated with *E. coli* O6K13 and then reassociated *E. coli* Nissle 1917. We showed that bacteria *E. coli* Nissle 1917 protected

the mice against intestinal inflammation in the experimental mouse model of acute colitis and that the bacteria have probiotic effects.

Keywords: probiotics, non-specific inflammatory bowel disease, gnotobiotic mouse models, dextran sulphate model of colitis, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Escherichia coli* O6K13.

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíl práce.....	12
3	Literární rešerše	13
3.1	Vliv mikrobioty na eukaryotického hostitele	13
3.2	Mikrobiota a člověk	13
3.2.1	Fyziologická úloha střevní mikrobioty	14
3.3	Slizniční imunitní systém	14
3.3.1	Funkce slizničního imunitního systému	14
3.3.1.1	Bariérová funkce slizničního imunitního systému	15
3.3.1.1.1	Hlen	15
3.3.1.1.2	Těsné spoje	16
3.4	Zánětlivá onemocnění střeva.....	16
3.4.1	Patogeneze zánětlivých onemocnění střev	17
3.4.2	Dysbióza komenzální mikrobioty a imunitní systém	18
3.4.3	Crohnova choroba (CD).....	19
3.4.4	Ulcerózní kolitida	19
3.4.4.1	Léčba ulcerózní kolitidy	20
3.5	Probiotika	21
3.5.1	Historie užívání fermentovaných potravin	21
3.5.2	Novodobá historie - znovuobjevení zdraví prospěšných bakterií.....	21
3.5.3	Probiotika a jejich terapeutické působení	21
3.5.4	Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria, LAB)	23
3.5.5	Bifidobakterie	23
3.5.6	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	24
3.5.7	Prebiotika a synbiotika.....	24
3.6	Experimentální myší modely kolitidy	25
3.6.1	Chemicky indukovaná kolitida	26
3.6.1.1	Rektálně indukovaná kolitida	26
3.6.1.2	Perorálně indukovaná kolitida.....	26
3.6.2	Bakteriálně indukovaná kolitida	27

3.6.3	Spontánní kolitida	28
3.6.4	Adoptivní kolitida - přenosový model	28
4	Materiál a metody	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Roztoky	29
4.1.2	Experimentální zvířata	30
4.1.3	Bakterie	30
4.2	Pracovní postup	30
4.2.1	Příprava bakteriální suspenze pro sondování myší	30
4.2.2	Schéma experimentu	30
4.2.3	Ukončení experimentu	31
4.2.4	Histologie	32
4.2.4.1	Hodnocení stupně poškození tlustého střeva dle Cooperova testu	34
4.2.4.2	Hodnocení produkce mucinu v tlustém střevě	35
4.2.5	Imunohistochemie pro Zonula occludens – 1	35
5	Výsledky	37
5.1	Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva	37
5.2	Imunohistochemické hodnocení těsných spojů	41
6	Diskuze	42
7	Závěr	44
8	Seznam literatury	45

Seznam zkratk

CD	Crohn's Disease, Crohnova choroba
CFU	Colony Forming Unit, jednotka tvořící kolonii
CV	Conventional, konvenční
DSS	Dextransulfát sodný
FOS	Fruktooligosacharid
GF	Germ-Free, bezmikrobní
GIT	Gastrointestinální trakt
GOS	Galaktooligosacharid
H&E	Hematoxylin-eozin
IBD	Inflammatory Bowel Disease, zánětlivá onemocnění střeva
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LAB	Lactic Acid Bacteria, bakterie mléčného kvašení
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue, slizniční imunitní systém
OD	Optical Density, optická hustota
PBS	Phosphate-Buffered Saline, fosfátový pufr
SCFAs	Short Chain Fatty Acids, mastné kyseliny s krátkými řetězci
TNBS	2, 4, 6 – trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF	Tumour Necrosis Factor, tumor nekrotizující faktor
UC	Ulcerative Colitis, ulcerózní kolitida

1 Úvod

Zánětlivá onemocnění střev - Inflammatory Bowel disease (IBD), ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, patří mezi chronická střevní onemocnění neznámé etiologie. Genetické dispozice, životní prostředí, dietní návyky a stres jsou faktory, které ovlivňují nerovnovážné složení střevní mikrobioty. Tyto faktory způsobují dysregulaci slizniční imunitní odpovědi, která je za vznik IBD odpovědná. Zvířecí modely střevního zánětu jsou nezbytné pro pochopení patogeneze IBD. Tyto modely nepředstavují složitost lidských onemocnění a nemohou plně nahradit lidského pacienta. Jsou ale cenným nástrojem pro studium mnoha důležitých aspektů IBD, jako je patofyziologie mechanismů v časných fázích zánětu střev a účinky nových terapeutických strategií, které by se obtížně řešily u lidských pacientů.

V poslední době je kladen důraz na probiotickou a prebiotickou terapii, jejichž cílem je obnovit rovnováhu gastrointestinální mikrobioty a snížit zánět střev. Probiotika byla hodnocena v rozsáhlých studiích na zvířecích modelech, s řadou klinických studií, které prokazují potenciální terapeutické přínosy. Probiotika a prebiotika mohou nabídnout novou možnost pro léčbu IBD.

2 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je shrnout poznatky literárních pramenů, které jsou zaměřeny na slizniční imunitní systém a vzájemnou interakci eukaryotického hostitele s mikrobiotou. V teoretické části jsem charakterizovala UC, sledovala jsem vliv bakteriální kolonizace na vývoj imunity a vliv bakteriální nerovnováhy (dysbiózy) na rozvoj zánětlivých onemocnění střeva. Popsala jsem experimentální myší modely UC a charakterizovala probiotické bakterie využívané v prevenci a léčbě UC.

V naší laboratoři studujeme experimentálně vyvolaný akutní zánět střeva vyvolaný podáváním roztoku dextransulfátu sodného u myší. Tento typ zánětu se podobá zánětu objevujícímu se u lidských pacientů trpících ulcerózní kolitidou. V závěrečné části své bakalářské práce jsem se zaměřila na studie věnující se vlivu probiotické bakterie *E. coli* Nissle 1917 na experimentální zánět myší vyvolaný v kombinaci dextransulfátu sodného a uropatogenní bakterie *E. coli* O6K13.

3 Literární rešerše

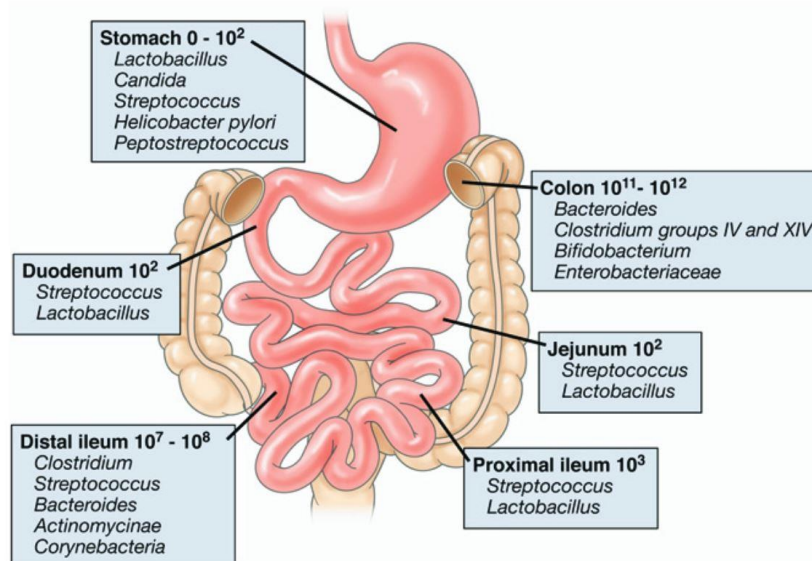
3.1 Vliv mikrobioty na eukaryotického hostitele

Savci jsou superorganismy, které jsou tvořené savčími a bakteriálními buňkami, se kterými žijí v symbióze. Počet buněk lidského těla je 10^{13} a stejně tak i počet bakterií kolonizujících gastrointestinální trakt, je uváděn 10^{13} (Sender et al. 2016). Střevní mikrobiota reprezentuje asi 2 000 bakteriálních druhů a z toho je více jak 80 % mikrobiálních populací nekultivovatelných. Současné poznatky zdůrazňují významnou roli mikrobioty pro správnou funkci imunitního systému a udržení homeostázy ovlivňuje zdraví hostitele. Bylo prokázáno, že interakce eukaryotického hostitele s komensální mikrobiotou je pro vyžívání jeho imunitního systému rozhodující. Kromě skupiny bakterií, o nichž víme, že určitá onemocnění způsobují (*Candida albicans*, salmonely) (Splichalova et al. 2018), kolonizuje gastrointestinální trakt ještě mnohem více mikroorganismů, o jejichž úloze v lidském zdraví dosud nic nevíme. Bylo prokázáno, že složení a diverzita významně ovlivňuje stav zdraví nebo nemoci hostitele (Tlaskalova-Hogenova et al. 2004; 2011; 2014).

3.2 Mikrobiota a člověk

Gastrointestinální trakt obývá 100 miliard různých mikroskopických organizmů - bakterie, viry, houby a prvoci. Tento ekosystém je označován jako mikrobiota (Honda & Littman 2012). Bakterie kolonizují všechny slizniční povrchy – dýchací trakt, ústní dutinu, kůži, urogenitální trakt. V gastrointestinálním traktu (GIT) koncentrace bakterií stoupá směrem od žaludku po tlusté střevo (obr. 1, Sartor 2008). Více jak 90 % celkového lidského střevního mikrobiomu představují kmeny Firmicutes, zejména Ruminococcus, Clostridium a Peptostreptococcus, Bacteroides (Martin et al. 2014). V menším zastoupení se vyskytují kmeny Actinobacteria, Verrumicrobia a další. Na odhalení lidského mikrobiomu jsou zaměřeny rozsáhlé výzkumné programy jako je evropský projekt MetaHIT a American Human Microbiome. Projekty přispěly k odhalení metagenomu lidského gastrointestinálního traktu (Human Microbiome Project 2012; Li et al. 2014).

Ke kolonizaci původně sterilního fetálního střeva dochází během porodu, kdy se novorozenec kolonizuje vaginální a fekální flórou matky při přirozeném porodu nebo bakteriemi prostředí, při porodu císařským řezem (Dominguez-Bello et al. 2010). Bylo prokázáno, že se mikroflóra stabilizuje ve věku 2 až 3 let a je relativně stabilní v dospělosti (Koenig et al. 2011; Yatsunenka et al. 2012). Komensální mikroflóra hraje důležitou roli při stimulaci a vývoji imunitního systému. Vhodná bakteriální kolonizace novorozenců je životně důležitá a má významný vliv na složení rezistentní mikrobioty u dospělých jedinců (Musilova et al. 2015).



Obr. 1 – Počty a nejčastější skupiny bakterií v jednotlivých částech trávicího traktu (Sartor 2008).

3.2.1 Fyziologická úloha střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota je velmi důležitá pro svého hostitele v mnohých směrech. Některé bakterie se podílí na tvorbě mastných kyselin s krátkým řetězcem (Short Chain Fatty Acids, SCFA), fermentaci škrobu a štěpení nestravitelných sacharidů (Marchesi et al. 2016). Bakteriální metabolity SCFA (zejména acetát, propionát a butyrát) hrají v tlustém střevě důležitou podpůrnou roli (Sun et al. 2017). Butyráty jsou primárními zdroji energie pro epitelální buňky tlustého střeva (kolonocyty). Bylo prokázáno, že kolonocyty pacientů s UC mají sníženou schopnost oxidace butyrátu (Thibault et al. 2010). Prokázali jsme, že butyráty produkované bakterií *Clostridium tyrobutyricum*, dokázaly zmírnit zánět střeva myši, u kterých byla kolitida navozená podáváním 2,5 % roztoku dextran sulfátu sodného (Hudcovic et al. 2012).

Na druhé straně bifidobakterie syntetizují vitaminy K a ve vodě rozpustné vitaminy skupiny B (LeBlanc et al. 2011). Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria, LAB) jsou významnými imunitními a metabolickými regulátory gastrointestinálního traktu (George et al. 2018).

3.3 Slizniční imunitní systém

Slizniční imunitní systém (MALT, SIS) je rozdělen na tři slizniční systémy, konkrétně NALT (Nose Associated Lymphoid Tissue), BALT (Bronchus Associated Lymphoid Tissue) a GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) (Krejsek et al. 2016).

3.3.1 Funkce slizničního imunitního systému

Imunitní odpovědi střeva se odehrávají v slizničním systému označovaném jako GALT a ve střevních regionálních uzlinách. Zatímco potrava a antigeny vzniklé stravením potravy jsou přítomné v tenkém střevě, mikrobiální antigeny vyvolávají hlavní imunitní akce v tlustém

střevě (Spencer & Sollid 2016). SIS je tvořen lymfoidní tkání a je důležitou součástí imunitního systému s velmi specializovanými mechanickými a chemickými vlastnostmi. Tyto bariéry brání vstupu patogenů a antigenů vnějšího prostředí a napomáhají jejich degradaci prostřednictvím celé řady chemických procesů. Sliznice se takto brání kolonizaci poškozujícími patogeny. Zároveň si však zachovává toleranci k potravním antigenům a komensální mikrobiotě. Zajišťuje rovnováhu na střevních sliznicích a chrání slizniční povrchy před nežádoucími imunitními reakcemi (Tlaskalová-Hogenová et al. 1995). Produkce střevního imunoglobulinu A (IgA) je výrazně regulována mikrobiotou. IgA hraje zásadní roli při nastolení homeostázy a v ochraně střeva před zánětem. Bylo prokázáno, že bakteriální metabolit acetát se váže na metabolicky citlivý G receptor GPR43 a dochází k produkci IgA (Wu et al. 2017).

3.3.1.1 Bariérová funkce slizničního imunitního systému

Slizniční vrstva je první bariérou střeva a chrání střevní epitel před mikrobiotou a potravními antigeny (McGuckin et al. 2011). Vnitřní vrstva je pevně přilnavá a bohatá na antimikrobiální látky a je sterilní. Zatímco vnější vrstva je volná a obsahuje hlen, zředěné antimikrobiální látky a komensální bakterie (Wallace et al. 2014). Intestinální epitel, který slouží jako epitelová bariéra, má mnoho funkcí jako je absorpce, sekrece a trávení. Epitel je tvořen enterocyty, pohárkovými buňkami, enteroendokrinními a Panethovými buňkami. Bariérová celistvost je udržována těsnými spoji, adherentními spoji a desmosomy. Defekty v epiteliální bariéře vedou k rozvoji UC. Zvýšená propustnost střev vede ke zvýšení antigenní expozice a k imunitní aktivaci (Salim & Soderholm 2011). Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou sekretovány epiteliálními buňkami pro ochranu a regulaci rovnováhy mezi komenzálními bakteriemi a hostitelskou sliznicí. Mezi AMP jsou řazeny např. α - a β -defenziny produkované Panethovými buňkami (Klag et al. 2013). AMP jsou nejvíce nahromaděné na vnitřní vrstvě sliznice, která udržuje sterilitu (Inohara et al. 2005). Dysregulace epitelové bariéry a změny v paracelulární propustnosti vlivem rozvolnění buněčných těsných spojů (Tight Junctions, TJ), může být rozhodujícím primárním faktorem v patogenezi IBD (Landy et al. 2016).

3.3.1.1.1 Hlen

Hlen, vrstva nad epitelem, je produkován pohárkovými buňkami, podporuje odizolování od střevního obsahu a poskytuje první linii obrany proti fyzickému a chemickému poškození způsobené požitým jídlem, nežádoucími mikroby a jejich produkty. Hlavní součástí hleny je sekretovaný mucin, glykoprotein s vysoce polymerní strukturou, s napojenými četnými hygrokopickými a hydrofilními oligosacharidovými postranními řetězci, které přispívají k formování jejich gelové struktury (Andrianifahanana et al. 2006). Muciny jsou rodinou glykoproteinů charakterizovanou O-glykany. Byly popsány dvě skupiny mucinů. Jsou to klasické polymerní muciny tvořící gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B a MUC6), a potom je to heterogenní skupina monomerních transmembránových mucinů (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 a MUC21). Převážná většina mucinů se nalézá na slizničních površích těla, kde vytváří ochrannou vrstvu mukusu, který chrání epiteliální buňka (glycocalyx). Ostatní muciny např. MUC1 je široce distribuován na mnohých

tělesných buňkách, včetně imunitních (Johansson et al. 2008). Vyvážená a dynamická interakce mezi hlenovou vrstvou, střevními epiteliálními buňkami, komensální mikroflórou a imunitou hostitele je nezbytná pro udržení střevní homeostázy. Porucha střevní homeostázy vede k poškození hlenové bariéry a zvýšené propustnosti, která vede k zánětu a poškození buněk střevní sliznice (McGuckin et al. 2009).

3.3.1.1.2 Těsné spoje

Těsné spoje jsou rozhodující pro udržení epiteliální bariéry a kontroly paracelulární permeability. Charakterizace změn v proteinech těsných spojů je důležité pro funkci epiteliální bariéry u zánětlivých onemocnění střeva. Těsné spoje, zejména klaudiny a zonuliny, jsou klíčovými hráči v epiteliální bariérové funkci (Landy et al. 2016). Existuje řada cest pro průchod epiteliální bariérou mezi vnitřním a vnějším prostředím. Intercelulární prostory mezi sousedními buňkami spojené dohromady integrálními proteinovými komplexy, jsou rozhodující pro regulaci slizniční bariéry. Ionty procházejí transcelulárními kanály. Paracelulární cesta také reguluje propustnost pro vodu, ionty a molekuly s nízkou molekulovou hmotností (< 600 kDa). Ve zdravém střevě těsné spoje vytvářejí dynamickou střevní bariéru, která reguluje paracelulární vstřebávání vody, živin a elektrolytů (Edelblum & Turner 2009; Shen et al. 2008). Rozdíly v paracelulární propustnosti mezi různými epitelami jsou těsné (tight) nebo netěsné (leaky). U chorobných stavů se můžou objevit epitelové spoje více těsné nebo více netěsné, což můžeme vidět v různých stádiích zánětlivých onemocnění střev (Krug et al. 2014). Těsné spoje jsou složeny ze zonulinu-1 (ZO-1), okludinů, tricelulinu, různých klaudinů a pojivových adhezních molekul. K cytoskeletu buňky jsou navázány F-aktinem a myosinem II (Edelblum & Turner 2009; Groschwitz & Hogan 2009). Dysfunkce těsných spojů pak vede k narušení integrity intestinální bariéry. Bariérovou funkci těsných spojů ovlivňuje změna pH, osmotického tlaku a poruchy funkce cytoskeletu (Schneeberger & Lynch 1992). Není úplně jasné, zda pozorované změny v těsných spojích jsou kauzální, což porušuje epiteliální bariérovou integritu, anebo zda samotný zánět způsobuje následné změny v těsných spojích (Landy et al. 2016).

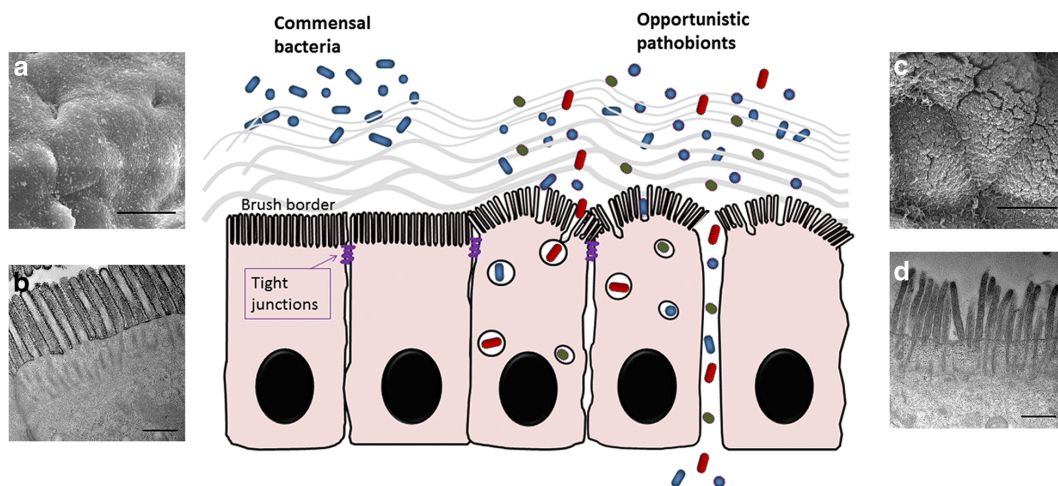
3.4 Zánětlivá onemocnění střeva

Zánětlivá onemocnění střeva kam patří Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, jsou chronická relapsující zánětlivá onemocnění střev. Ačkoli jejich incidence se celosvětově zvyšuje, přesná etiologie těchto onemocnění není známá (Nishida et al. 2018). IBD je rozšířena po celém světě. Nejvyšší prevalence IBD je v hospodářsky vyspělých západních zemích Evropy, v severní Americe a Austrálii (Molodecky et al. 2012). V USA žije s IBD více než 1,6 milionů osob, v Evropě se odhaduje že 2,5 - 3 milionů obyvatel je IBD postiženo. Náklady na zdravotní péči přesahují 4,5 miliardy EUR ročně. IBD se také objevila v nově industrializovaných zemích v Asii, Jižní Americe a na Středním východě a vyvinula se v globální onemocnění se stoupající prevalencí na všech kontinentech (Coward & Kaplan 2017). Vysoké náklady na léčbu onemocnění, dlouhá pracovní neschopnost pacientů a hlavně velký osobní diskomfort pacientů si zasluhuje věnovat těmto onemocněním zvýšenou

pozornost a věnovat se i zatím opomíjeným léčebným postupům a strategiím (probiotika, prebiotika, fekální transplantace).

3.4.1 Patogeneze zánětlivých onemocnění střev

Zánětlivá onemocnění střev (IBD) jsou multifaktoriální onemocnění, která vznikají v důsledku genetických, environmentálních, bariérových a mikrobiálních faktorů (Yu 2018). Střevní zánět ohrožuje integritu epiteliální bariéry, která vede ke zvýšené propustnosti a infiltraci patogenů (Teshima et al. 2012). Pokroky v genetických studiích IBD naznačily změny v genech, které regulují integritu a funkci bariéry sliznice, vrozenou imunitní odpověď a mikrobiální homeostázu. Dosud byly zjištěny čtyři geny se zvýšenou citlivostí u CD a jeden gen u UC (Sartor 2006). Gen PPAR γ , kde PPAR γ je nukleární receptor, který inhibuje aktivitu NF κ B a jeho exprese je snížena u pacientů s aktivní UC (Dubuqoy et al. 2003). Genetické faktory se projevují u CD ze 44 až 50%, zatímco u UC se zdá, že se genetická zátěž podílí mezi 6 – 14 % (Farell & Peppercorn 2002). Genetické faktory přispívají pouze částečně k rozvoji IBD, protože interakce mezi lidským genomem, imunitním systémem a střevní mikrobiotikou s vnějším prostředím musíme brát jako komplex hrající v patogenezi UC významnou roli (Loddo & Romano 2015). Zvýšená incidence a prevalence IBD v 21. století vedla ke značnému zájmu o faktory vnějšího prostředí. Mezi tyto faktory patří dieta, stres, kouření, léky (jako např. antibiotika). Kouření je jedním z nejméně studovaných faktorů. Způsobuje dvojnásobné zvýšení rizika vzniku CD. Ale naopak se zdá, že kouření má ochranný účinek proti UC. Avšak pokud vnímavý jedinec přestane kouřit, zvýší se riziko vzniku UC s účinkem trvajícím až deset let po úplném skončení kouření (Ananthakrishnan 2015). Jedním z nejnáročnějších úkolů předcházení vývoje IBD, je studium vhodných diet (Yadav et al. 2016). Tyto studie poskytují informace o účincích stravy na IBD u dospělých. Studie by se měly zaměřit na účinky stravy v raném věku (Coward & Kaplan 2017). Dalším faktorem je zvýšená hygiena. Hygienická hypotéza poukazuje na skutečnosti, že život na farmě spojený s kontaktem se zdravými zvířaty, s pitím nepasterizovaného mléka, s parazitární stimulací, početně větší rodiny, chránily před vývojem civilizačních onemocnění, mezi které patří i IBD. Imunitní systém lidí byl dříve vhodně stimulován k maturaci a navození slizniční tolerance (Lashner & Loftus Jr 2006). Čím více se země stává industrializovanou, tím vzrůstá příklon k západní stravě (fast food), potraviny jsou často nesmyslně sterilizovány. Navíc dochází k nadužívání léků, větší urbanizaci obyvatelstva a ke klimatickým změnám (Coward & Kaplan 2017). Tyto hlavní faktory jako jsou genetické predispozice a životního prostředí, nevhodná strava a stres, odrážejí nevyváženou imunitní odpověď spojenou se střevní dysbiózou (Tlaskalova-Hogenova et al. 2014)



Obr. 2 - Transcelulární a paracelulární cesty naznačují, jak epiteliální bariéra chrání vniknutí bakterií. Střevní bariéra je tvořena epiteliálními buňkami, na jejichž vrcholcích je lokalizován kartáčový lem (Brush border, BB). Těsné spoje (Tight Junctions, TJ) vážou vzájemně epiteliální buňky a upevňují paracelulární bariéru. Kartáčové lemy a těsné spoje tvoří fyzikální ultrastrukturní bariéru zabraňující za normálních podmínek, to je ve zdravém střevě, vniknutí komensálních bakterií. Pokud nastane poškození epiteliální bariéry, dochází k rozvíření a porušení uspořádanosti kartáčového lemu a otevírání těsných spojů, a potom komensální bakterie a patogeny mohou vstupovat do lamina propria.

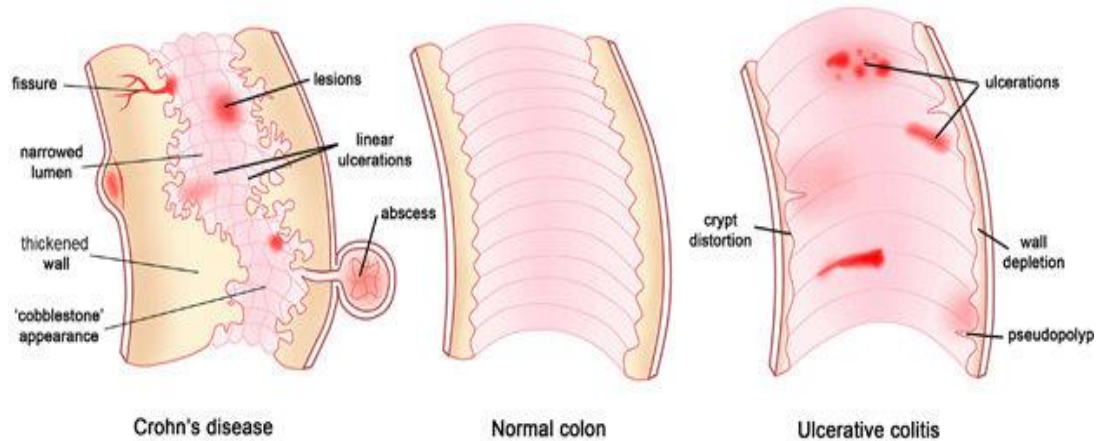
Snímek povrchu střeva neporušeného střeva za fyziologických podmínek (a) skenovacím mikroskopem a snímek (b) transmisním mikroskopem. Longitudinální pohled ukazuje vysoce organizovaný neporušený kartáčový lem. Na pravé straně obrázku je podobný pohled, avšak u patologicky poškozeného střeva (c) a (d) – poškozený povrch a neuspořádaný kartáčový lem. (a, c) Bar = 5 μm ; (b, d) Bar = 0.5 μm (Yu 2018).

3.4.2 Dysbióza komezální mikrobioty a imunitní systém

Patofyziologické defekty epiteliální bariéry a bakteriální invazivita způsobují mikrobiální dysbiózu a chronický zánět (obr. 2). Endogenní a exogenní faktory, které vyvolávají poškození střevní bariéry a imunitní aktivaci mohou vyvolat selektivní tlak na komensální mikrobiotu. Subklinické slizniční abnormality, které se vyvinou u jedinců s genetickou predispozicí, potom upřednostňují růst oportunních mikroorganismů, které se stávají patogenními. Tyto bakterie následně zhoršují morfologické a funkční změny ve střevní tkáni a vzdálených orgánech s patologickými následky a to vede k chronickému zánětu a klinickým příznakům (Yu 2018). Yu (2018) se domnívá, že počáteční dysfunkce epiteliální bariéry, která se projevuje transcelulární hyperpermeabilitou, může vyvolat selektivní tlak na mikrobiotu, což vede k nárůstu invazivních virulentních bakterií. Selektivní tlak a slizniční patogenní bakterie mohou způsobit posun ve fekální mikrobiální komunitě. Kombinace poškozené epiteliální bariéry a invazivních patogenů vede ke klinickým znakům morfologického poškození a chronickému zánětu. Chronický zánět střeva může mít vliv na mikrobiotu a způsobit poškození a úplnou ztrátu epiteliální bariéry (Yu 2018).

Pokroky v metagenomickém sekvenování mikrobiální RNA potvrdily snížení bakteriálního složení a rozmanitosti u pacientů s IBD v porovnání se zdravou populací. Dochází

k poškození epiteliální bariéry. Poškození pohárkových buněk vede ke snížené produkci hlenu. Dochází k poškození těsných spojů, které má za následek invazi luminálních antigenů na střevní sliznici. Jednovrstevný epitel představuje první a důležitou obranu hostitele před střevními bakteriemi. Poškození na úrovni epiteliální bariéry často vede k rozvoji UC (Wallace et al. 2014).



Obr. 3 - Obrázek střeva poškozeného při CD, zdravé střevo, střevo zachvácené UC (Wagnerova & Gardlik 2013).

3.4.3 Crohnova choroba (CD)

U CD může dojít k zánětu provázeného poškození sliznice v celém rozsahu - od úst až po konečník. Sliznice je poškozena transmurně, tedy v celé střevní stěně (obr. 3). Onemocnění je charakterizováno přítomností segmentů, kde se střídá zdravé střevo s postiženými oblastmi. Klinicky se projevuje průjmem, bolestmi břicha, tvorbě abscesů a fistul. Může dojít k zúžení lumen střeva, což může vést k jeho obstrukci. U CD je převážně Th1 řízená imunitní odpověď s počátečně zvýšenou expresí interleukinu 12 (IL-12), interferonem (IFN- γ) a tumor nekrotizujícím faktorem (TNF- α) (Papadakis & Targan 2000; Bouma & Strober 2003).

3.4.4 Ulcerózní kolitida

Podle Hippocrata (460 - 377 před n. l.) všechny choroby pochází ze střeva. Hippocrates popsal onemocnění s chronickým průjmem a spojené krvácení s výskytem ulcerací v tlustém střevě (obr. 3). V roce 1859 Dr. Samuel Wilks v Anglii zdokumentoval patrně první případ UC v novodobé medicíně. Samuel Wilks publikoval případ pitvy ženy, která zemřela údajně na úplavici, ale při pitvě zjistil zánětlivý proces, který zasahoval terminální ileum a celé tlusté střevo. O dvacet let později v roce 1875, představil diagnózu „ulcerózní kolitida“ lékařské komunitě (Wilks 1859; Wilks & Moxon 1875).

Ulcerózní kolitida patří mezi choroby neznámého původu a je charakterizována ulcerózně-hemorhagickým zánětem sliznice. Zánět je omezen na slizniční vrstvy, mukózu a submukózu. Zánětlivý proces se vztahuje na konečník a rozšiřuje se proximálně, ale zůstává omezen v tlustém střevě, které postihuje v celém svém rozsahu. Mezi klinické příznaky patří bolesti břicha, průjmy a hubnutí. Pacient je postižen velmi silným průjmem, který může být

hemorhagický a progresivní ztrátou peristaltické funkce střev. Zánět se může projevit v očích, ústech i na kůži. (Papadakis & Targan 2000; Bouma & Strober 2003). Při dlouhodobých potížích je zvýšené riziko kolorektálního karcinomu (Yu 2018).

Makroskopický nález je závislý na stadiu onemocnění. V počátcích onemocnění můžeme vidět překrvené a křehké sliznice. Postupně se objevují eroze, edém a ulcerace epitelu. V pozdějším stadiu se mohou vyskytnout i perforace střeva. V mikroskopickém nálezu je patrný zánět postihující povrchové (slizniční) vrstvy s infiltrací lymfocytů, granulocytů a ztrátou pohárkových buněk. Na sliznici vznikají eroze epitelu, který přechází v ulcerace. V pozdějších stadiích je patrná nekróza epitelu (Bouma & Strober 2003).

U ulcerózní kolitidy dochází k CD4 Th2 lymfocytární imunitní odpovědi, což vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů, například IL-6. (Papadakis & Targan 2000; Bouma & Strober 2003).

3.4.4.1 Léčba ulcerózní kolitidy

Současnou strategií léčby UC je odeznění příznaků a následné udržování remise. Pacienti jsou léčeni 5 - aminosalicylovou kyselinou (5-ASA) nebo kortikosteroidy mesalazinem. 5-ASA je první volbou udržovací terapie. V případě přetrvávajícího onemocnění anebo nežádoucích účinků bývají aplikovány imunomodulátory jako je azathiopurin a 6 - merkaptopurin. Ve vážných případech jsou žilně podávány kortikosteroidy, cyklosporiny, anti TNF- α činidla a později anti-integrin vedolizumab (Lauranne et al. 2016). Zonulin je klíčový regulátor střevní propustnosti prostřednictvím modulace epitelu těsných spojů (Fasano 2012). Syntetický peptidový inhibitor zonulin, známý jako AT 1001 nebo Larazotide, podstoupil klinické studie při léčbě střevních zánětů (Paterson et al. 2007). V knock-outové myši IL-10^{-/-}, AT 1001 snížila střevní propustnost a oslabila vývoj spontánní kolitidy (Arrieta et al. 2009). Toto je volba k potlačení příznaků než se musí přistoupit ke kolektomii, což je odstranění části nebo celého tlustého střeva (Lauranne et al. 2016). Tyto terapie mají značné nevýhody. Imunosupresivní terapie a anti TNF- α činidla jsou spojena s vyšším rizikem infekčních komplikací (Frei et al. 2013). Třetina pacientů nakonec musí podstoupit chirurgický zákrok, což naznačuje, že současné terapeutické možnosti jsou nedostatečné pro mnoho pacientů (Andersson & Soderholm 2009).

Antibiotika se běžně používají k léčbě komplikací souvisejících s UC. Jsou navrženy terapie k celkovému snížení bakterií, jako je např. Enterobacteriaceae. Je otázkou diskuze, zda užívání antibiotik je v této léčbě prospěšné (Scribano & Prantera 2013). Studie u zdravých lidí a zvířat odhalily, že antibiotická léčba vedla k výrazným změnám ve střevní mikrobiotě, které přetrvávaly delší dobu. Rozmanitost druhů se snížila a zvýšilo se riziko závažné infekce, což naznačuje, že léčba antibiotiky nemusí být optimální (Perez-Cobas et al. 2013). Tak dlouhodobé užívání antibiotik je omezeno vzhledem k časté antibiotické hypersenzitivitě (Hulten et al. 2000).

Dalším problémem jsou vysoké náklady na biologickou léčbu, čímž se zvyšuje finanční zatížení zdravotní péče. To zdůrazňuje potřebu dalších, ale nefarmakologických možností, které by mohly přispět k léčbě chronického střevního zánětu u UC. Vzhledem k důkazům o zapojení

střevní mikrobioty do patogeneze UC, je manipulace s mikrobiálním osídlením střeva tématem v posledním desetiletí. Skutečně byly u probiotik, která působí na mikrobiální složení, prokázány slibné výsledky v léčbě a zmírnění příznaků UC (Lauranne et al. 2016). Stejně tak je nadějná transplantace fekální mikrobioty (Moayyedi et al. 2015).

3.5 Probiotika

3.5.1 Historie užívání fermentovaných potravin

Historicky prokázané používání kysaných mléčných výrobků bylo poprvé zaznamenáno římským historikem Pliniem v roce 79 př. n. l., který popsal, že při střevních potížích je vhodné pít kyselé mléko. V antice bylo doporučováno, aby se děti a rekonvalescenti živili zkvašeným mlékem a sýry.

Nositel Nobelovy ceny, francouzský vědec ruského původu Ilja Iljič Mečnikov, studoval dlouhověkost 36 národů a zjistil, že nejvíce stoletých lidí žije v Bulharsku, kde obyvatelstvo žije velmi skromně a významnou součástí jejich stravy jsou jogurty získané z přirozeně kvašeného mléka. Mečnikov popsal, jak bakterie mléčného kvašení zabraňují hnilobným pochodům ve střevě a tím zlepšují trávení a prodlužují život. Popsal např. *Lactobacillus bulgaricus* (Metchnikoff 1907).

3.5.2 Novodobá historie - znovuobjevení zdraví prospěšných bakterií

Termín probiotikum byl poprvé použit v roce 1965 Lilly a Stillwellem (Lilly & Stillwell, 1965) k popisu „látky vylučované jedním mikroorganizmem, který stimuluje růst druhého organismu“. V roce 1974 Parker navrhl, že by probiotika měla být popsána jako mikroorganismy - látky, které přispívají ke střevní mikrobiální rovnováze (Parker 1974). Probiotika jsou definovány jako látky nebo produkty, které v dostatečném množství obsahují živé mikroorganismy, které po implantaci anebo kolonizaci změni mikroflóru v určitém anatomickém místě hostitele, což jim umožní projevit své zdraví prospěšné účinky. Je známa celá řada dalších definic probiotik, ale Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO 2001) a Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (Reid et al. 2003) stanovili jednotnou definici, která zní: „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přináší hostiteli zdravotní přínos“ (FAO/WHO 2001; Reid et al. 2003). V roce 1990 se webové aplikaci PubMed objevilo na heslo „probiotics“ 22 odkazů, v roce 2011 již 8 447 odkazů a k 1. 1. 2019 se již probiotika vyskytují ve 23 255 publikacích.

3.5.3 Probiotika a jejich terapeutické působení

Probiotika bývají aplikována při zdravotních situacích spojených se střevní dysbiózou. Mezi tato onemocnění patří IBD, u kterého byl popsán snížený výskyt bifidobakterií, laktobacilů, na druhé straně zvýšený výskyt proteobakterií – patogenních *E. coli* a salmonel (Derikx et al. 2016). Byla popsána celá řada dalších civilizačních onemocnění, u kterých je

snížena bakteriální diversita. Mezi takovátto onemocnění patří alergie, celiakie, urogenitální infekce, obezita (Tlaskalova-Hogenova et al. 2011; Hajavi et al. 2019). Aby probiotické bakterie mohly kolonizovat hostitele, musí odolávat kyselému prostředí žaludku a působení žlučových kyselin. Je proto důležité v *in vitro* studii prokázat, jak probiotikum potlačuje růst patogenních bakterií (Cukrowska et al. 2009). Např. Dieleman et al. (2003) inkuboval *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), aby zabránil adhezenci *Bacteroides vulgatus* na epiteliální myší buňky IEC-6 (Dieleman et al. 2003). Imunomodulační vlastnosti probiotik se testují na buňkách imunitních orgánů (např. slezinných buňkách nebo buňkách mezenterálních uzlin, nejčastěji myších), které ukážou změny v expresi cytokinů, které charakterizují efekt probiotik na složky přirozené imunitní odpovědi (Cukrowska et al. 2009; Srutkova et al. 2015). Buňky se stimulují inaktivovanými probiotickými bakteriemi a jsou stanoveny hladiny cytokinů produkovaných lymfocyty CD4⁺Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5), Th17 (IL-17), Th regulačních cytokinů (IL-10, TGF- β). Sleduje se vliv bakterií na vyžívání maturationálních znaků dendritických buněk CD40, CD80 nebo CD86. Z těchto výsledků můžeme odvodit, jak budou bakterie ovlivňovat imunitní systém hostitele. Mechanismy účinku jednotlivých probiotických kmenů mohou být odlišné, i když společný mechanismus je patrný u široké řady probiotických kmenů. Adherence na střevní slizniční stěnu zabraňuje kolonizaci patogenních bakterií (Guarner & Malagelada 2003). Probiotika tím mění střevní mikrobiální rovnováhu, blokují adhezni místa, konkurují patogenům v oblasti živin a mají antimikrobiální účinky (Jonkers et al. 2012; Orel & Trop 2014). Studie by se měly zaměřit na to, které probiotické kmeny mají skutečně největší účinnost v konkrétním prostředí a zda jsou účinnější samostatně anebo ve spojení s jinými kmeny. Tato znalost účinku probiotika na imunitní systém a propustnost střevní sliznice a v neposlední řadě na frekvenci a dávce probiotika je velice důležitá (Shanahan 2004). Musíme však vzít v úvahu, že nejen typ onemocnění, ale i vlastní imunologický stav hostitele by měl být určující při výběru probiotického kmene a způsobu aplikace. V experimentálním modelu kolitidy bylo prokázáno, že působení probiotických bakterií je přísně druhově specifické (Srutkova et al. 2015). Probiotika zvyšují proliferaci epiteliálních buněk v tenkém střevě, céku a distálním kolon (Ichikawa et al. 1999). Tato proliferace je způsobena schopností probiotických kmenů produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) fermentací polysacharidů. Snižují pH střevního obsahu a tím inhibují růst patogenních bakterií. Butyrát také poskytuje živiny kolonocytům a pozitivně ovlivňuje funkci střevní bariery zvýšením sekrece mucinu a tím posiluje těsné spoje (Jonkers et al. 2012, Hudcovic et al. 2012). Bezpečnost probiotických bakterií na hostitele se nejlépe ověří *in vivo* na citlivých bezmikrobních myších (Kozakova et al. 2016).

Tannock (2005) ve své studii publikoval, že je nepravděpodobné, aby probiotika mohla zásadně ovlivnit střevní mikrobiotu. I když jsou podávána ve velkém množství, probiotický kmen představuje přibližně 1 % ze všech bakterií ve střevě (Tannock 2005). Oproti tomu četné studie prokázaly, že probiotika mohou skutečně změnit složení střevní mikrobioty u zvířat (Vlkova et al. 2012) a též u lidí (Kuhbacher et al. 2006). I když v mnoha případech tato změna mikrobioty přetrvává jen krátkou dobu do skončení probiotické terapie (Tannock 2005). Když porovnáme výsledky na zvířecích modelech a v klinických studiích máme důkaz, že probiotické kmeny pomáhají snižovat zánět a poškození střev (Soccol et al. 2010).

3.5.4 Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Bakterie mléčného kvašení jsou mnohostranné mikroorganismy, které jsou významnými imunitními a metabolickými regulátory gastrointestinálního traktu. Vyskytují se v celém ekosystému a vytvářejí dynamické interakce zvířecích i rostlinných společenstev (George et al. 2018). Obecně LAB jsou grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé tyčinky nebo koky. Jsou mezo až termofilní, mikroaerofilní, aerotolerantní nebo fakultativně anaerobní, vždy s fermentativním metabolismem. Glukózu fermentují převážně na kyselinu mléčnou v homofermentativním případě, nebo heterofermentativním případě na kyselinu mléčnou, CO₂ a etanol (a/nebo kyselinu octovou). Bylo identifikováno asi 200 druhů laktobacilů (Afouda et al. 2017). Mají antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé a detoxifikační vlastnosti. Mnohé z nich mají vhodné probiotické vlastnosti a jsou součástí funkčních potravin. LAB přispívají k vyvážené Th1 a Th2 imunitní odpovědi. Stimulují Th regulační odpověď, protože stimulují produkci TGF- β (Kozakova et al. 2016). Bylo popsáno, že *L. plantarum* WJL stimuluje růst Drozofily a myši při nutričně chudé dietě (Schwarzer et al. 2016). Mezi nejznámější laktobacily s probiotickými účinky patří např. kmen *Lactobacillus (L.) rhamnosus*. Yan et al. (2007) detekoval dva proteiny - p75 (75kDa) a p40 (40 kDa) izolované z probiotické bakterie *L. rhamnosus* GG, které podporují buněčný růst a inhibují produkci TNF- α (Yan et al. 2007). Prokázali jsme probiotický ochranný efekt směsi laktobacilů. *L. casei* LOCK0919, *L. rhamnosus* LOCK0900 a *L. rhamnosus* LOCK0908 proti alergické senzibilizaci proteinem břízy Bet v 1 (Kozakova et al. 2016). Bylo prokázáno, že *L. rhamnosus* GG indukuje remisi u pacientů s IBD a zvířecích modelů (Yan et al. 2007). V humánní medicíně směs nazvaná VSL#3, která obsahuje 450 miliard lyofilizovaných bakterií, se skládá z osmi bakteriálních kmenů *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *S. thermophilus*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum*. Bylo prokázáno, že tato bakteriální směs stimuluje imunitní odpověď hostitele, zlepšuje funkci epitelálních bariér a zvyšuje tvorbu hlenu (Huynh et al. 2009). VSL#3 byl schopen indukovat významné klinické zlepšení relapsu mírně až středně závažných UC u pacientů, pomocí ochrany epitelální bariéry a snížením apoptózy (Tursi et al. 2010; Derikx et al. 2016).

3.5.5 Bifidobakterie

Bifidobakterie jsou obecně charakterizovány jako gram pozitivní, nepohyblivé a kataláza negativní anaeroby. Bifidobakterie jsou to jedna z hlavních skupin pozitivně působících bakterií v komplexním ekosystému lidí a teplokrevných zvířat a jejich počet určuje věk a dieta (Sgorbati et al. 1995). V mikroflóře kojenců bifidobakterie dominují a jsou detekovány krátce po narození. Počty bifidobakterií u vaginálně narozených novorozenců jsou významně vyšší než u dětí porozených císařským řezem. Ve vyšším kojeneckém věku záleží na tom, zda jsou děti krmeny mateřským mlékem. Plně kojené děti mívají vyšší počty bifidobakterií, protože oligosacharidy mateřského mléka podporují jejich rozvoj. Nárůst počtu bifidobakterií je stimulován glykoproteinovými složkami k-kaseinu v lidském mlezivu a přítomnosti oligosacharidů v mateřském mléce. Pokud mají děti porozené císařským řezem anebo i vaginálně snížený počet bifidobakterií, tak je často nahrazen zvýšenými počty klostridií a bakterií *E. coli*. (Musilova et al. 2015). Zvýšená kolonizace klostridiemi u jednoměsíčních dětí je spojena se svěděním a ekzémy (van Nimwegen et al. 2011). Výskyt bifidobakterií u telat je

významně závislý na složení stravy, protože telata krmená výhradně mlékem, mají fekální flóru bohatší na bifidobakterie (Vlkova et al. 2008).

Studie Srutkove et al. (2015), která porovnávala vlivy kmenů *Bifidobacterium* (*B.*) *longum* jako slibné kandidáty v prevenci a léčbě IBD, ukázala nové zajímavé skutečnosti. V této studii bylo testováno devět různých probiotických kmenů rodu *Bifidobacterium*, které byly testovány na základě jejich schopnosti indukovat produkci cytokinů v myších splenocytech. Na základě intenzity stimulace produkce cytokinů byly vybrány dva kandidáti jednoho poddruhu: *B. longum* ssp. *longum* CCDM 372 (vysoká produkce) a *B. longum* ssp. *longum* CCM 7952 (nízká produkce). V experimentálním modelu akutní UC vyvolané podáváním DSS byl prokázán profylaktický účinek probiotického kmene *B. longum* ssp. *longum* CCM 7952, jejíž účinek na produkci cytokinů byl mírný, zatímco druhá bakterie stejného druhu, zánět zhoršovala. Účinek jednotlivých bakterií při imunomodulaci je přísně kmenově specifický (Srutkova et al. 2015).

3.5.6 *Escherichia coli* Nissle 1917

Bylo prokázáno, že kromě bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, existují i jiné bakterie, které jsou schopné zabránit rozvinutí střevního zánětu. Mezi takovéto bakterie patří nepatogenní kmen *E. coli* Nissle 1917, který zabraňuje kolonizaci patogenních bakterií a je schopný pozitivně ovlivnit gastrointestinální homeostázu. *E. coli* jsou gramnegativní, pravidelné, pohyblivé, fakultativně anaerobní bakterie patřící do čeledi Enterobacteriaceae. Omezuje poškození střevní sliznice, snižuje epiteliální propustnost, což může zlepšit hojení tlustého střeva (Chibbar & Dieleman 2015). Pacienti trpící vředy UC byli léčeni *E. coli* Nissle 1917 a výsledky byly podobné jako léčba standartními léky jako je mesalazin (Kruis et al. 2004). Podobně byl zaznamenán jeho protizánětlivý účinek v experimentálním modelu kolitidy. Bezmikrobní myši kmen BALB/c byl osazen bakteriemi *E. coli* Nissle 1917 a poté uropatogenní *E. coli* O6K13. Střevní zánět byl vyvolán podáváním dextransu sulfátu sodného v pitné vodě. V akutním modelu zánětu nebyl u myši monokolonizovaných nepatogenní *E. coli* Nissle 1917 zánět zaznamenán. Na druhé straně myši monokolonizované *E. coli* O6K13 vykazovaly zánětlivé střevní nálezy. V chronickém modelu zánětu, myši monokolonizované *E. coli* Nissle 1917, neprokázaly žádné závažné zánětlivé změny sliznice tlustého střeva, zatímco u myši, které byly monokolonizovány *E. coli* O6K13, se vyvinul zánět tlustého střeva spojený s výraznou infiltrací zánětlivých buněk (Hudcovic et al. 2007). Nejnovější studie dokazuje, že za protizánětlivý účinek bakterie *E. coli* Nissle 1917 je odpovědná schopnost bakterie uvolňovat vnější membránové vezikuly (outer membrane vesicles), které v experimentálním modelu DSS kolitidy ochránily myši před poškozením střevní sliznice a následným zánětem (Fabrega et al. 2017).

3.5.7 Prebiotika a synbiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravin, které zlepšuje zdraví hostitele tím, že selektivně stimulují růst a aktivitu jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě. Mezi běžná prebiotika patří inulin, maltodextrin, oligosacharidy jako jsou

fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS) (Venema & Carmo 2015). Prebiotika mají za cíl podporovat endogenní luminální mikrobiotu selektivní stimulací růstu již přítomných bakterií (Bouhnik et al. 2004). Prebiotika ovlivňují slizniční imunitní systém, který stimuluje k produkci IgA a produkci protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β . V mnohých případech je účinek prebiotik popisován spolu s jejich působením v kombinaci s probiotiky. Tento společný efekt je označován jako synergický, kde prebiotika napomáhají selektivnímu růstu probiotik (MacFarlane et al. 2008; Derikx et al. 2016).

3.6 Experimentální myší modely kolitidy

Experimentální myší modely kolitidy jsou důležitým nástrojem pro pochopení patogeneze IBD a mohou pomoci vyřešit klíčové otázky a mechanismy. Díky těmto modelům je známo, že střevní zánět má mnoho spouštěčů, jak genetických, tak environmentálních. Poskytují základní informace o roli T buněk ve střevní homeostáze a naznačují, jak se tyto buňky na vzniku zánětu podílejí. Tím jsou tyto modely nepostradatelnými nástroji pro studium patogeneze IBD a jsou nezbytné pro hodnocení nových léčebných postupů. Nemohou však plně zastupovat lidský organizmus. Modely se používají se k získání poznatků o bakteriálních kmenech, které by se mohly použít jako probiotika (Martin et al. 2017), anebo zánět zhoršují (Srutkova et al. 2015). Myší experimentální modely jsou stále dostupnější a vědci mohou využít potenciál každého z nich jak z hlediska indukce zánětu, tak genetického pozadí. Žádný model sám o sobě nemůže reprezentovat složitost klinických a histopatologických vlastností lidské kolitidy. Pokud se však dají dohromady komplexní údaje získané z různých modelů, mohou poskytnout podrobnější informace k pochopení základních principů patogeneze lidské IBD. Modely se staly nepostradatelným nástrojem pro objasnění histopatologických, imunologických a morfologických změn ve střevním traktu. U některých modelů (např. KO myší IL-10^{-/-}) trvá několik měsíců, než se kolitida projeví, a proto nejsou vhodné pro rozsáhlé studie. Častěji se používají experimentální modely kolitidy indukované chemicky např. podáváním dextran sulfátu sodného (DSS), i když se její projevy se podobají lidské kolitidě pouze v určitých aspektech. Tyto modely nabízejí další výhody, jako jsou nízké náklady, vysoká reprodukovatelnost a mohou být využity pro charakterizaci nového myšího cíleného genu (Wirtz & Neurath 2007). Technologický pokrok ve výzkumu, zejména v oblasti sekvence DNA a velký počet zvířecích modelů, zvýšil znalosti o mikrobiálním složení střev a jejich interakci se střevním imunitním systémem v souvislosti s IBD (Kostic et al. 2014).

Martin et al. (2017) rozděluje na základě vyvolání onemocnění myší experimentální modely do čtyř hlavních skupin: 1) chemicky indukovaná kolitida

2) bakteriálně indukovaná kolitida

3) spontánní kolitida – geneticky upravené kmeny myší

4) adoptivní kolitida - přenosový model (Martin et al. 2017).

3.6.1 Chemicky indukovaná kolitida

Chemicky indukovaná kolitida se dělí podle způsobu podání na rektální a perorální.

3.6.1.1 Rektálně indukovaná kolitida

Wirtz et al. (2007) ve své práci popisují rektálně vyvolanou kolitidu. Kolitidu vyvoláme kyselinou trinitrobenzensulfonovou (TNBS) nebo kyselinou dinitrobenzensulfonovou (DNBS) nebo oxazolonom, rozpuštěným v etanolu, které se aplikují intrarektálně sondou (obr. 4). Etanol je nutný k porušení sliznice (Wirtz et al. 2007). I když jsou modely podobné, jsou zde rozdíly v imunitní odpovědi. TNBS a DNBS vyvolávají transmurální kolitidu, kde je sledována Th1 zprostředkovaná imunitní odpověď. Tato metoda byla poprvé popsána u kmene myši SJL/J, který je vysoce citlivý na chronickou kolitidu vyvolanou TNBS (Neurath et al. 1995). Oxazolonom indukovaná kolitida má podobné příznaky jako ulcerózní kolitida. Vyvolá zprostředkovanou Th2 odpověď (Randhawa et al. 2014). Závažnost kolitidy a terapeutickou účinnost probiotik stanovujeme pomocí změny tělesné hmotnosti, klinických příznaků (průjem, zácpa, krev ve stolici), histologických změn tlustého střeva, koncentrace cytokinů v buňkách (sleziny, mezenterální uzliny) a v neposlední řadě stanovením aktivity myeloperoxidázy v tlustém střevě, která vypovídá o závažnosti zánětu (Wirtz et al. 2007).



Obr. 4 – Intrarektální aplikace

3.6.1.2 Perorálně indukovaná kolitida

Perorálně indukovaná kolitida se vyvolá podáním různě koncentrovaného dextran-sulfátu sodného (DSS) rozpuštěného v pitné vodě (Wirtz et al. 2007). Myší kolitida se vyvolá při podávání 40 - 50 kDa DSS v pitné vodě. V modelu DSS kolitidy tento sulfátový polysacharid neindukuje střevní zánět přímo, ale působí jako chemický toxin s detergentními vlastnostmi v epitelu tlustého střeva, což vede k poškození epiteliálních buněk (Randhawa et al. 2014). Tento mechanismus vede k narušení epiteliální výstelky následované zánětem, což vede ke vstupu lumenálních bakterií a antigenů přímo do sliznice (Kiesler et al. 2015; Wirtz et al. 2007).

Závažnost kolitidy závisí na koncentraci DSS (obvykle 1 - 5%), době a frekvenci podávání (akutní nebo chronická forma, kdy jsou vloženy intervaly k regeneraci, kdy zvířata pijí vodu), molekulové hmotnosti DSS, kmeni zvířat (C3H/HeJ, C57BL/6 a BALB/C jsou náchylnější), mikrobiálním prostředí zvířat (Specific Pathogen Free, SPF, bezmikrobních, anebo cíleně kolonizovaných, tzv. gnotobiontů). Na základě těchto faktorů zvířata mohou vyvinout akutní kolitidu, chronickou kolitidu nebo dokonce kolitidu indukující střevní léze (Eichele & Kharbanda 2017). U dlouhodobého podávání DSS můžeme histologicky pozorovat adenokarcinom. Karcinogenní aktivita v tlustém střevě je dosažena pomocí DSS o molekulové hmotnosti 50 kDa, zatímco větší a menší molekulové hmotnosti (520 kDa a 10 kDa) nedokázaly vyvolat účinnou penetraci tkání (Perse & Cerar 2012). Akutní kolitida je vyvolána podáváním DSS vybranému kmeni myši, často C57BL/6 nebo BALB/c myším, po dobu 7 dní. Chronická kolitida je vyvolána podáváním DSS ve čtyřech až pěti cyklech. Každý cyklus zahrnuje podávání různých koncentrací DSS po dobu 1 týdne, po které následuje sterilní voda po dobu 7 - 14 dní. Závažnost kolitidy může být zvýšena na základě doby trvání podání DSS, stejně tak jako jeho koncentrace (Cooper et al. 1993; Randhawa et al. 2014). První příznaky se objevují už v prvních dnech podání, kdy můžeme vidět změny v těsných spojích. Tyto malé počáteční příznaky jsou následovány zhoršujícími se symptomy včetně zvýšené střevní propustnosti, průjmu, těžkého krvácení a uhynutí (Perse & Cerar 2012). Typické histologické změny u akutní kolitidy vyvolané podáváním DSS jsou vyčerpání pohárkových buněk, epiteliální rozrušení, ulcerace a infiltrace granulocytů do lamina propria a submukózy, což vede k prozánětlivé imunitní odpovědi (Kiesler et al. 2015). DSS kolitida je spojena se zvýšenou produkcí cytokinu a chemokinů. Bylo prokázáno, že cytokiny jsou produkovány již od prvního dne pití DSS. Rozdíl v zánětlivých profilech mezi akutní a chronickou fází kolitidy spočívají v tom, že při akutním DSS zánětu převládá zprostředkovaná Th-2 odpověď a v chronickém zánětu jsou zaznamenány snížené hladiny TNF- α , IL-17 a zvýšené hladiny IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ (Perse & Cerar 2012). Modely DSS jsou užitečné pro studium role vrozeného imunitního systému a střevní bariéry ve vývoje kolitidy a výzkumu probiotik. Hodnotí se vývoj nemoci a probiotická účinnost sledováním změn tělesné hmotnosti, vnějších symptomů onemocnění, morfologie tlustého střeva, histologický nález a imunologické a biochemické markery (Wirtz et al. 2007).

3.6.2 Bakteriálně indukovaná kolitida

Je kolitida způsobena patogenními mikroorganismy. Ačkoliv *E. coli* patří k normální mikrobiotě, některé její serotypy jsou patogenní nebo oportunisticky patogenní. Zvířecí modely byly kolonizovány *E. coli*, které bylo vyizolováno od pacientů, kteří trpí IBD. Bylo prokázáno, že Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) kmeny nalezené u pacientů s Crohnovou chorobou, způsobují u myši poškození střevní epiteliální bariéry, zvyšují hladiny zánětlivých markerů, zejména když jsou použity současně v DSS modelu (Martin et al. 2017). Jiným příkladem může být kolonizace původně bezmikrobních myši uropatogenní bakterií *E. coli* O6K13 a v kombinaci DSS vyvolanou kolitidou (Hudcovic et al. 2007). V některých studiích byl používán přirozený myši bakteriální patogen *Citrobacter rodentium* (Borenshtein et al. 2008).

3.6.3 Spontánní kolitida

Pro studium IBD bylo popsáno více než 70 myších modelů připravených genovým inženýrstvím, které spontánně vyvíjejí kolitidu (Mizoguchi et al. 2016). Příkladem jsou selektivně vyšlechtěné C3H/HeJBir myši. Tento kmen myši je citlivější na produkované antigeny komensální mikrobioty a tím reaguje nadměrnou produkcí B a T buněk, což vede k rozvoji kolitidy (Sundberg et al. 1994). Nicméně projev spontánní kolitidy je závislý na podmínkách chovu (Martin et al. 2017). U myši s deficitem Muc 2 je charakterizována ztráta hlenové vrstvy, kde bakterie jsou v přímém kontaktu s epiteliálními buňkami a také hlouběji v kryptách. Tyto myši jsou náchylnější ke spontánní kolitidě a mají zvýšené riziko rakoviny tlustého střeva (Johansson et al. 2008). Kuhn et al. v roce 1993 vyvinul IL-10^{-/-} deficitní myši a zjistil, že mají podobné fyziologické i morfologické příznaky jako pacienti s IBD. Zánětlivé léze, infiltrace buněk do lamina propria a submukózy, vyčerpání mucinu, vředy a epiteliální hyperplazie (Kuhn et al. 1993). V současné době jsou IL-10^{-/-} myši nejběžnějším modelem pro studium hostitelských probiotických interakcí. Poskytují informace o různých mechanismech používaných probiotických kmenů. Hrají klíčovou roli ve střevní homeostáze a je známo, že mnoho pacientů s IBD má defektní alely tohoto genu (Martin et al. 2017). Velkou roli hraje věk a místní mikrobiálnímu osazení zvířat. Pokud se IL-10^{-/-} myši chovají v bezmikrobních podmínkách, střevní zánět se u nich nevyvine. Ale když se tento kmen myši dostane do konvenčních podmínek, onemocnění se rozvine (Strober et al. 2007).

3.6.4 Adoptivní kolitida - přenosový model

Model přenosu T buněk chronické kolitidy napomáhá rozpoznat imunologické mechanismy zodpovědné na indukci a regulaci střevního zánětu. Příkladem je studie Stepankove et al. (2007), která analyzovala vliv střevní mikrobioty na vývoj střevního zánětu v přenosovém modelu. Z imunokompetentních myši byla ze slezin vyizolována subpopulace T lymfocytů CD4⁺CD45RB^{high}, která byla přenesena do imunodeficitních bezmikrobních a cíleně bakteriálně kolonizovaných SCID myši. Po 12 týdnech došlo u myši, jejichž mikrobiota obsahovala bakterie *Segmented Filamentous Bacteria* (SFB), k rozvoji kolitidy (Stepankova et al. 2007).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Roztoky

- *Dextransulfát sodný (DSS), 2,5%*
 - DSS, m. w. 36 - 50 kDa (MP Biomedicals, LLC, Illkirch, Francie)
 - 10 g doplnit do 400 ml vody

- *Aerrane (Baxter, S.A., Lessines, Belgie)*
 - inhalace parou, tekutina

- *Roztoky pro histologii*
 - Carnoy: etanol (VWR, Leuven, Belgie) 60 ml
chloroform (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)..... 30 ml
kyselina octová (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA) 10 ml
 - Etanol (VWR, Leuven, Belgie)
 - Metylsalicylát (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)
 - Benzen (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)
 - Benzenparafín:
 - Nasycený roztok parafinu a benzenu.
 - Histowax (Bamed, Litvínovice, ČR)
 - Voskové pelety byly rozpuštěny při 56°C.
 - Xylen (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)
 - Uhličitan vápenatý (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
 - Butanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)
 - Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
 - Hematoxylin Mayerův (Bamed, Litvínovice, ČR)
 - Eosin (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
 - Alciánová modř (Bamed, Litvínovice, ČR)
 - Jádrová červeň (DIAPATH, S.p.A., Martinengo, Itálie)
 - roztok byl před použitím přefiltrován
 - Poly-Mount (Polyscience, Warrington, USA)

- *Roztoky pro imunohistochemii*
 - Tissue-Tek (Sakura Finetek Japan, Co., Tokyo, Japonsko)
 - Aceton (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
 - Promývací pufr - (0,5% Tween v PBS)
 - PBS 500 ml
 - Tween 20 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA).... 1 ml
 - Králičí sérum
 - Protilátka Rabbit Anti ZO – 1, ředění 1:50 (Zymed, Vídeň, Rakousko)

- Protilátka Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), ředění 1:150 (Zymed, Vídeň, Rakousko)
- SlowFade (Lifetechnologies, Eugene, USA)
- Bloxall, Blocking solution (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

4.1.2 Experimentální zvířata

V pokusech jsme využili samice inbredního myšího kmene BALB/c. Myši pocházely z chovu Laboratoře gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku v Orlických horách. Myši byly chovány v plastových izolátorech typu Trexler v bezmikrobních nebo gnotobiologických podmínkách a byly krmeny sterilními peletami a auklávovanou vodou *ad libitum* (Hudcovic et al. 2007).

Konvenční myši pocházely z chovu Laboratoře gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku.

4.1.3 Bakterie

- *E. coli* Nissle 1917 (MUTAFLO, Ardeypharm, Německo)
- *E. coli* O6K13 (Univerzita; Göteborg, Švédsko)

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava bakteriální suspenze pro sondování myší

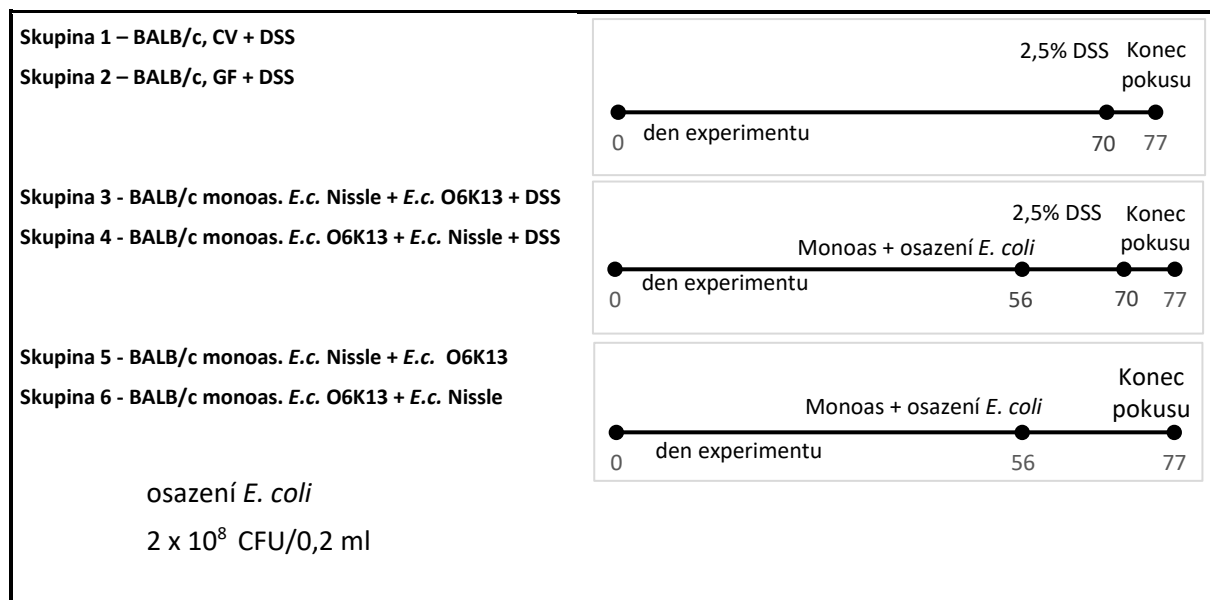
Do zkumavky s 10 ml kultivačního média (LB bujon) jsme zaočkovali 0,1 ml narostlé bakteriální kultury, kterou jsme kultivovali přes noc. Druhý den jsme změřili optickou denzitu (OD) narostlé bakteriální kultury tak, že jsme ke 200 μ l bakteriální kultury přidali 800 μ l PBS a změřili absorbanci při vlnové délce 650 nm proti 5x naředěnému kultivačnímu médiu (200 μ l média + 800 μ l PBS). Z naměřeného OD jsme stanovili počet CFU pomocí křivky závislosti OD na koncentraci bakterií daného bakteriálního kmene. Kulturu jsme centrifugovali při 4500 x g, 10 min, při pokojové teplotě a supernatant jsme slili. Kulturu jsme nakonec naředili v PBS na koncentraci 2×10^8 na dávku 200 μ l.

4.2.2 Schéma experimentu

V experimentu bylo 6 skupin myší po pěti samicích (tabulka 1). První skupina byly konvenční myši (CV). Druhou skupinu tvořily bezmikrobní myši (GF). Třetí skupinou byly myši monoasociované bakterií *E. coli* Nissle 1917 a 56. den experimentu jim byla pomocí intragastrické sondy podána bakterie *E. coli* O6K13 (obr. 5). Čtvrtou skupinou byly myši monoasociované bakterií *E. coli* O6K13 a 56. den experimentu jim byla pomocí intragastrické sondy podána bakterie *E. coli* Nissle 1917. Všechny čtyři skupiny dostaly v 70. dnech stáří 2,5% DSS v pitné vodě *ad libitum* po dobu 7 dní. Pátou skupinou byly monoasociované myši *E. coli* Nissle a 56. den experimentu jim byla pomocí intragastrické sondy podána bakterie *E. coli* O6K13. Šestou skupinou byly monoasociované myši *E. coli* O6K13 a 56. den experimentu

jim byla pomocí intragastrické sondy podána bakterie bakterie *E. coli* Nissle 1917. Experiment byl ukončen v 77. dni stáří myši.

Tabulka 1 - Schéma experimentu



Obr. 5 Intragastrické sondování myši

4.2.3 Ukončení experimentu

Myši jsme usmrtili vykrvácením ze srdce v anestezii Aerrane podle pravidel etické komise MBÚ AV ČR. Pro histologické hodnocení zánětlivých změn jsme odebrali 1 cm kousky colon descendens do fixačního roztoku Carnoy. Po 30 minutách jsme tkáň vložili do 96 % etanolu. Pro imunohistochemické stanovení Zonula occludens jsme odebrali 1 cm kousky colon

descendens do Tissue-Tek a zamrazili v tekutém dusíku. Poté jsme vzorky uložili do hlubokomrazného boxu (- 70°C).

4.2.4 Histologie

Principem zalévání tkáně do parafinu je prosycení odvodněné tkáně rozehrátým parafinem při teplotě 57°C. Parafin vyplní všechny mikroskopické štěrbinke ve tkáni, takže se pak tkáň dá krájet v tenkých řezech, silných 5 µm.

Zalítí vzorku do parafinu

- *Odvodnění tkáně*
 - 100% etanol I. 1 hod,..... 22°C
 - 100% etanol II. 1 hod,..... 22°C
 - 100% etanol III. 1 hod,..... 22°C
- *Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafin*
 - metylsalicylát I. 4 hod,..... 22°C
 - metylsalicylát II. 4 hod,..... 22°C
 - metylsalicylát III. 8 hod,..... 22°C
 - benzen I. 10 min,..... 22°C
 - benzen II. 10 min,..... 22°C
 - benzen III. 10 min,..... 22°C
- *Prosycení tkáně parafinem*
 - benzenparafin 30 min,..... 57°C
 - parafin I. 2 hod,..... 57°C
 - parafin II. 4 hod,..... 57°C
 - parafin III. 8 hod,..... 57°C
- *Vlastní zalítí do parafinu*

K vlastnímu zalítí jsme použili papírové zalévací komůrky, do kterých jsme nalili parafin zahřátý na 57°C. Do komůrky jsme pinzetou přenesli tkáň. Tkáň jsme si podle potřeby orientovali nahřátou pinzetou. Komůrku jsme vložili do studené vody, aby parafin se vzorkem tkáně ztvrdnul.

Krájení tkáňových bloků

Když byl parafin dostatečně ztuhlý, zalévací komůrka se odstranila (papírová krabička se snadno sloupá). Parafinový bloček jsme si přiřízli do obdélníku okolo tkáně. Takto připravenou tkáň jsme připevnili roztaveným parafinem k dřevěnému špalíčku. Poté jsme na mikrotomu řezali příčné řezy o tloušťce 5 µm. Řezy jsme pokládali na hladinu destilované vody, která byla prohřátá na 45°C. Nakonec jsme si je štětcem usazovali na podložní sklíčka. Preparáty jsme nechali dva dny při pokojové teplotě zaschnout a poté jsme je použili na dvě metody barvení: hematoxilin-eosin a barvení alciánovou modří.

Barvení preparátů hematoxilin-eosinem

K barvení používáme vodných roztoků barviv, a proto musíme řezy nejprve zbavit parafinu. K odparafinování používáme dvě lázně xylenu a dále sestupnou řadu etanolů, která slouží k převedení řezů do vody. Po vyprání řezů ve vodě přistupujeme k vlastnímu barvení. Obarvené řezy dále odvodníme vzestupnou řadou vhodně koncentrovaného etanolu a následně butanolem. Pokračujeme projasněním ve dvou lázních xylenu a nakonec řezy uzavřeme (montujeme) do uzavírajícího média.

- *Odparafinování*
 - xylen I.....5 min
 - xylen II5 min
 - etanol 100%5 min
 - etanol 96%5 min
 - voda5 min
- *Vlastní barvení*
 - hematoxylin Mayerův 10 min
 - vodaopláchnutí
 - diferenciacie v kyselém etanolu (3 - 5 kapek HCl do 100 ml 96% etanolu).....
.....opláchnutí
 - praní v tekoucí vodě s 1g uhličitanu vápenatého v kyvetě
 - kontrola pod mikroskopem
 - eosin 3-5 min
 - destilovaná voda.....opláchnutí
 - diferenciacie v 80 % etanolu
 - kontrola pod mikroskopem
- *Odvodnění*
 - etanol 96% opláchnutí
 - etanol 100% opláchnutí
 - butanol..... 5 min
- *Projasnění*
 - xylen I..... 5 min
 - xylen II 5 min
- *Uzavírání obarvených řezů*

Obarvené řezy jsme uzavřeli mezi podložní a krycí sklíčko do uzavírajícího média Poly- Mount.

- *Výsledek barvení hematoxylin- eosinem*

Jádra buněk se barví modře, kolagenní vazivo růžově a svalstvo červeně.

Barvení preparátů alciánovou modří s dobarvením jádrovou červení

Tato metoda se používá k průkazu kyselých mukopolysacharidů. Princip barvení je stejný jako u barvení hematoxylinem- eosinem.

- *Odparafinování* (viz. hematoxilin- eosin)
- *Vlastní barvení*
 - destilovaná vodaopláchnutí
 - alciánová modř 2 hod
 - destilovaná vodaopláchnutí
 - jádrová červeně..... 10 min
 - destilovaná vodaopláchnutí
- *Odvodnění* (viz. hematoxilin- eosin)
- *Projasnění* (viz. hematoxilin- eosin)
- *Uzavírání obarvených řezů* (viz. hematoxilin- eosin)
- *Výsledek barvení alciánovou modří*

Kyselý mukopolysacharidy se barví modrozeleně a jádra buněk červeně.

Obarvené preparáty jsme hodnotili mikroskopem Olympus BX 40 s kamerou. Fotky jsme snímali kamerou Olympus Camedia DP 70 a následně je zpracovali v programech Olympus Quick Photo Micro 2,3.

4.2.4.1 Hodnocení stupně poškození tlustého střeva dle Cooperova testu

Hodnocení stupně poškození povrchového epitelu a distorze krypt jednotlivých úseků tlustého střeva bylo provedeno dle Cooperova testu (Cooper et al. 1993), kdy jsou stanoveny 4 stupně poškození.

- 0.stupeň - beze změn
- 1.stupeň
 - dilatace a zkrácení krypt o 1/3
 - poškození 1 - 25% sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - mezi bází krypt a muscularis mucosa se objevuje hyalinová vrstva znázorňující časné poškození střeva
 - je zeslabeno perikryptové kolagenové pouzdro
 - mírné zvýšené kolagenu mezi kryptami
 - bez zánětlivých změn
- 2.stupeň
 - poškozeno 26 - 50% sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - zkrácení krypt o 2/3
 - bez zánětlivých změn
- 3.stupeň
 - poškozeno 51 - 75% sliznice tlustého střeva na jeho průřezu
 - vymizení krypt
 - povrchový epitel je zachován
 - lamina propria a submukóza obsahují mírný zánětlivý infiltrát

- 4.stupeň
 - hyperplazie epitelu – u méně než 2/3 krypt
 - ztráta mucinu
 - zánětlivé změny v mukóze i submukóze

4.2.4.2 Hodnocení produkce mucinu v tlustém střevě

Sekreci mucinu jsme hodnotili podle následujících čtyř kategorií:

- M1 hlenotvorba v epitelích zachována v rozsahu 25 %
- M2 hlenotvorba v epitelích zachována v rozsahu 50 %
- M3 hlenotvorba v epitelích zachována v rozsahu 75 %
- M4 hlenotvorba v epitelích zachována v rozsahu 100 %

4.2.5 Imunohistochemie pro Zonula occludens – 1

Základním cílem imunohistochemických metod je detekce specifických antigenních determinant s využitím imunologické vazby, na principu vazby antigenu a protilátky. Použili jsme nepřímou dvoustupňovou metodu. Na tkáňové řezy jsme nejprve aplikovali primární protilátku, specifickou proti prokazovanému antigenu. Ve druhé vrstvě nanášíme sekundární protilátku, která je značená enzymem (fluorochrom CY3) a imunologickou vazbou se váže na protilátku primární. Nakonec se na preparát nanese medium Sow fade a s DAPI a překryje se krycím sklíčkem.

- Zamraženou tkáň jsme si přenesli do kryostatu. Nakrájeli jsme si příčné řezy o tloušťce 5µm.
 - Aceton 10 min
 - Obkroužení řezů pomocí PAP- pen
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Blokování králičím sérem 20 min
 - Bloxall- blocking solution 10 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Monoklonální protilátka Rabbit Anti ZO – 1 (Zymed).....24 hod
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Promývací pufr 5 min
 - Sekundární protilátka Goat Anti- Rabbit IgG – fluorochrom CY-3 (Zymed)1 hod
 - Promývací pufr 5 min

- Promývací pufr..... 5 min
- Promývací pufr..... 5 min
- Slow fade s DAPI a zakrýt krycím sklíčkem

Preparáty jsme hodnotili mikroskopem Olympus BX 40 s kamerou. Fotky jsme snímali kamerou Olympus Camedia DP 70 a následně je zpracovali v programech Olympus Quick Photo Micro 2,3.

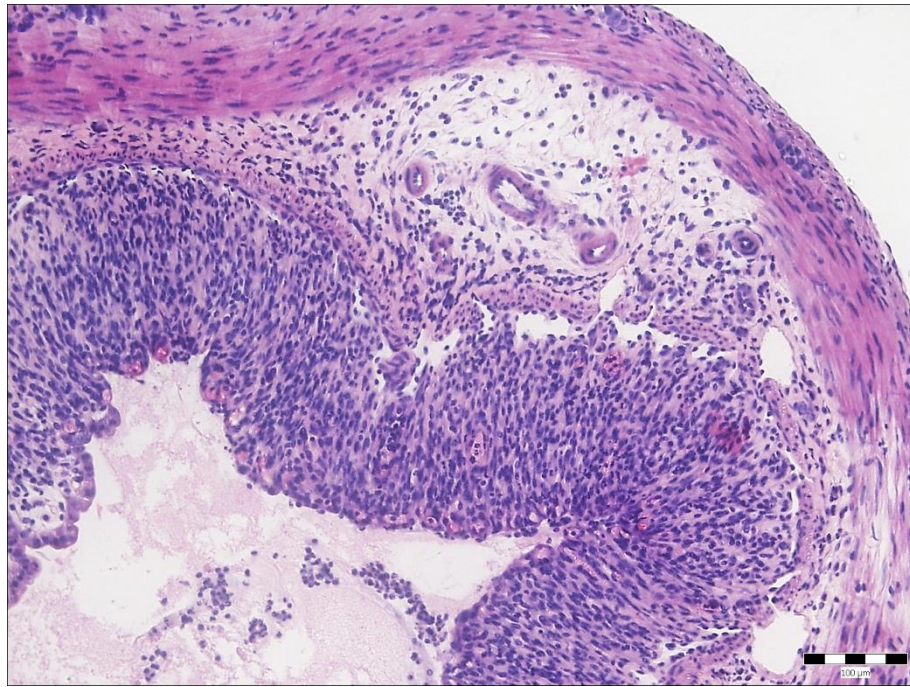
5 Výsledky

Experiment byl ukončen v 77. dni stáří myši. Podle pravidel etické komise MBÚ AV ČR byly myši po anestézii (Aerane) vykrváčeny ze srdce. Pro histologické a imunohistochemické metody jsme odebrali 1 centimetrové kousky colon descendens. Po zpracování vzorků jsme preparáty hodnotili mikroskopem Olympus BX 40 s kamerou Olympus Camedia DP 70 (tabulka 2).

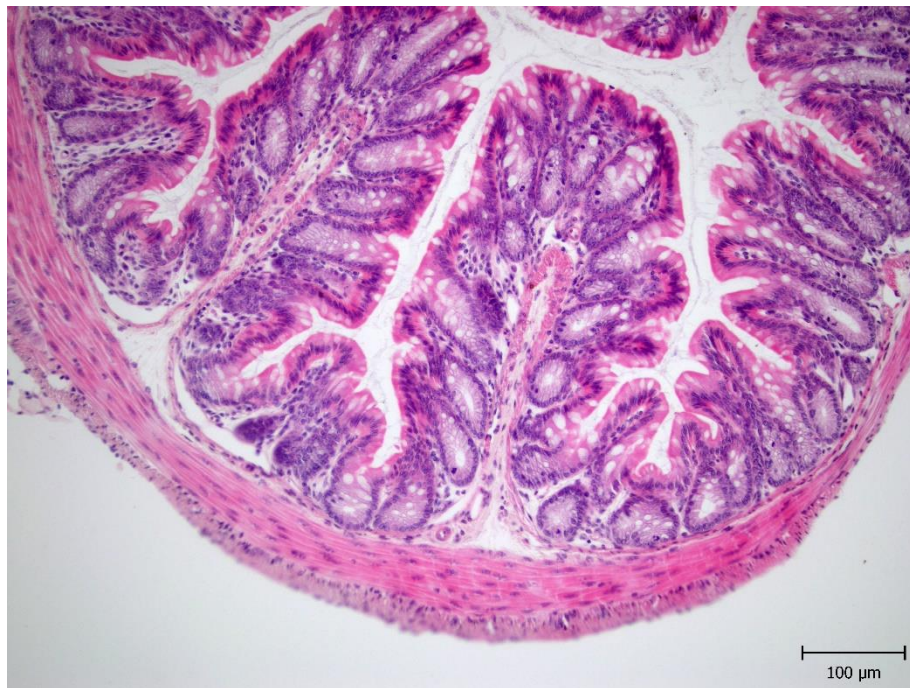
5.1 Histologické hodnocení zánětlivých změn tlustého střeva

Tabulka 2 – Histologické hodnocení dle Coopera (Cooper et al. 1993).

skupina	stupeň poškození	zkrácení krypt	poškození sliznice v %
1 - BALB/c, CV + DSS	4,0	povrchový epitel i krypty chybí, výrazný zánět v mukóze i submukóze	
2 - BALB/c, GF + DSS	1,6	o 1/3	25
3 - BALB/c, monoas. <i>E. coli</i> Nissle 1917 + <i>E. coli</i> O6K13 + DSS	0,8	beze změn	0
4 - BALB/c, monoas. <i>E. coli</i> O6K13 + <i>E. coli</i> Nissle 1917 + DSS	2,3	o 2/3	50
5 - BALB/c, monoas. <i>E. coli</i> Nissle 1917 + <i>E. coli</i> O6K13	0	beze změn	0
6 - BALB/c, monoas. <i>E. coli</i> O6K13 + <i>E. coli</i> Nissle 1917	0,6	beze změn	0



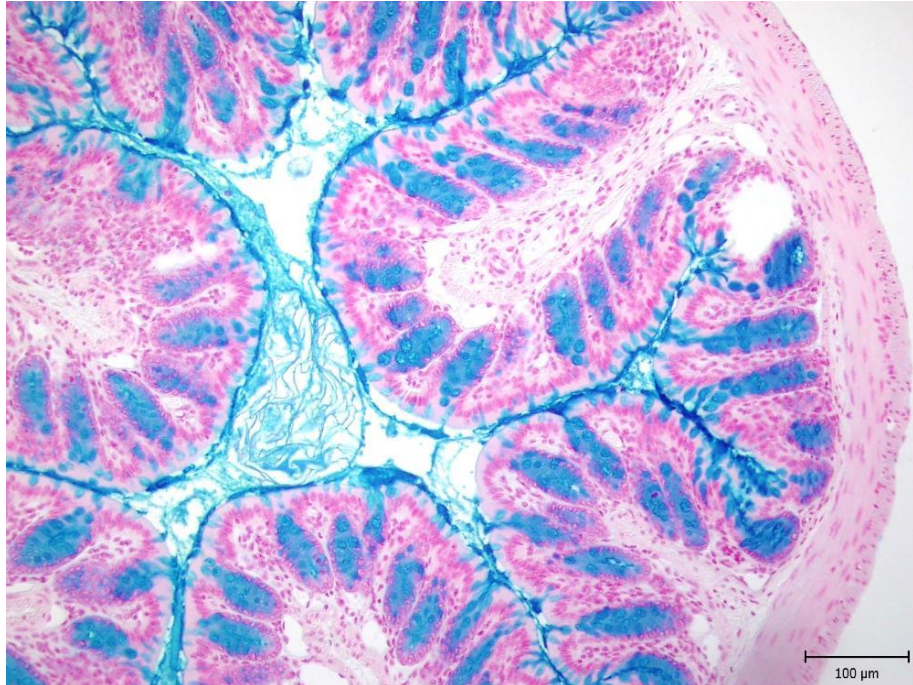
Obr. 6 - Skupina 1 - Sliznice colon-descendens v konvenčních myších BALB/c po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS. Histologické změny jsou v oblasti descendens, kde je úplný defekt krypt a povrchového epitelu. Zánětlivá infiltrace je patrná v lamina propria a zřetelný edém je v submukóze. Výrazné zesílení svalové vrstvy je patrné. Stupeň poškození 4 (H&E).



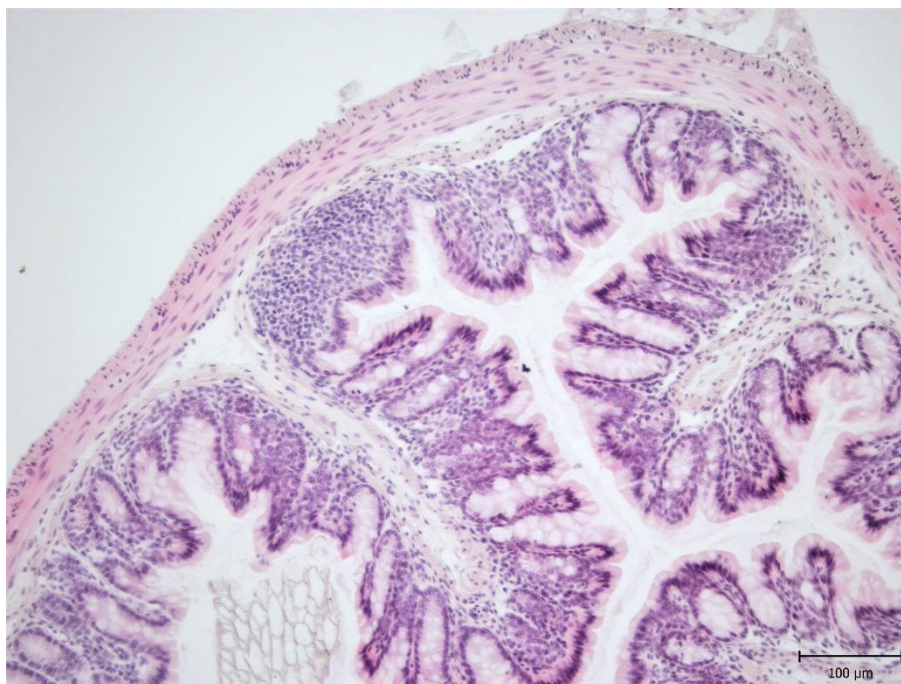
Obr. 7 – Skupina 5 - Sliznice colon-descendens v myších BALB/c monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a následně rekolonizovanými *E. coli* O6K13, bez DSS. Krypty, povrchový epitel a pohárkové buňky jsou nezměněny. Stupeň poškození 0 (H&E).



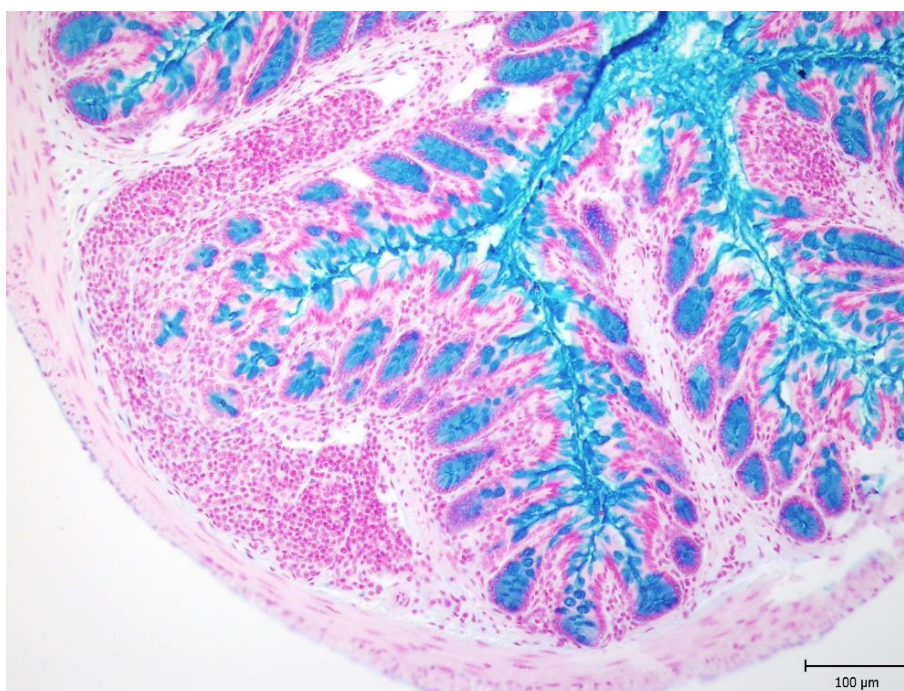
Obr. 8 – Skupina 3 - Sliznice colon-descendens v myších BALB/c monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a následně rekolonizovanými *E. coli* O6K13, po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS. Krypty, povrchový epitel a pohárkové buňky jsou nezměněny. Mírná zánětlivá infiltrace v lamina propria. Stupeň poškození 0 – 1 (H&E).



Obr.9 – Skupina 3 - Sliznice colon-descendens v myších BALB/c monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a následně rekolonizovanými *E. coli* O6K13, po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS. Je zachován normální obraz pohárkových buněk. Stupeň produkce mucinu 4 (AM).



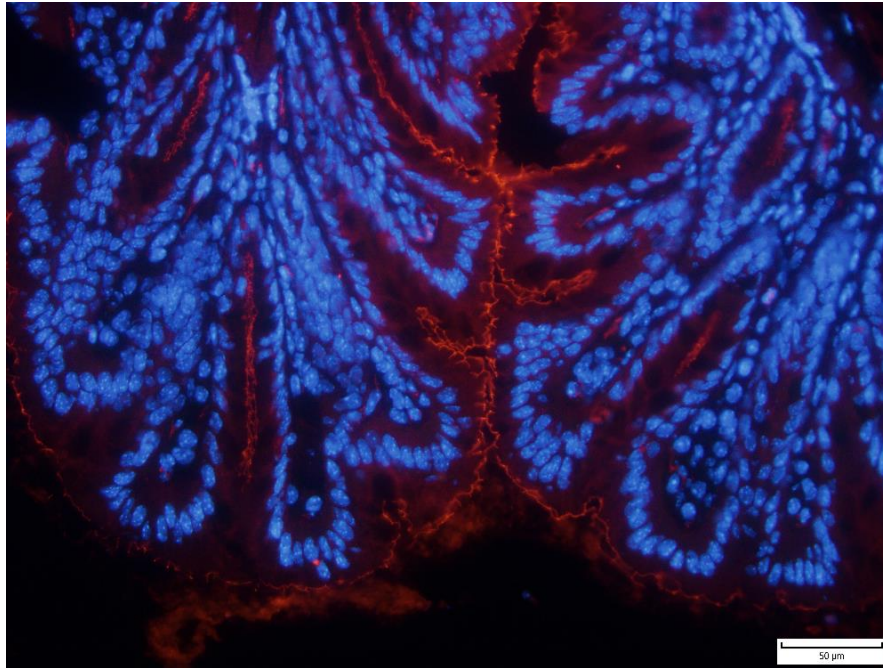
Obr. 10 – Skupina 4 - Sliznice colon-descendens v myších BALB/c monoasociovaných *E. coli* O6K13 a následně rekolonizovanými *E. coli* Nissle 1917, po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS. Krypty jsou zkráceny, povrchový epitel je zachován. V lamina propria je kolísavá, ale značná infiltrace a ložiskový edém je vidět i v submukóze. Stupeň poškození je 2 – 3 (H&E).



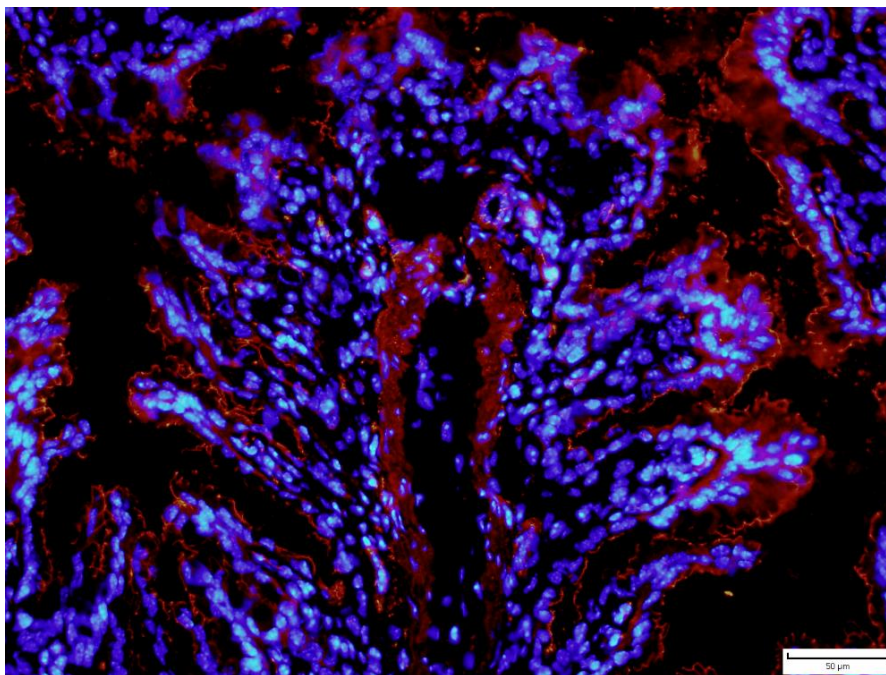
Obr. 11 – Skupina 4 - Sliznice colon-descendens v myších BALB/c monoasociovaných *E. coli* O6K13 a následně rekolonizovanými *E. coli* Nissle 1917, po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS. Počet pohárkových buněk je snížen. Stupeň produkce mucinu 3 (AM).

5.2 Imunohistochemické hodnocení těsných spojů

Imunohistochemická analýza produkce proteinu těsných spojů: Zonula occludens (ZO-1) sliznice colon-descendens u 2 měsíčních BALB/c myši po 1 týdenním podávání 2,5 % DSS.



Obr. 12



Obr. 13

Monoklonální protilátkou anti-ZO-1 a sekundární protilátky konjugované s Cy-3 (červeně) jsme detekovali zachovalou strukturu proteinu ZO-1 u skupiny myši monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a následně rekolonizovaných *E. coli* O6K13 (obr. 12) ve srovnání se skupinou myši monoasociovaných *E. coli* O6K13 a následně rekolonizovaných *E. coli* Nissle 1917, kde je povrchová struktura poškozena a produkce proteinu ZO-1 je snížena (obr. 13). Značení buněčných jader bylo provedeno DAPI (modře).

6 Diskuze

Bakterie osidlující GIT představují komplexní ekosystém. Změny ve složení střevní mikrobioty mohou onemocnění způsobit, ale také mohou zabránit jeho vzniku. U lidí s nespecifickými střevními záněty jsou tyto změny předmětem výzkumu. Manipulace se střevní mikrobiotou pomocí probiotických bakterií se ukazuje jako bezpečná a efektivní léčba IBD.

Zvířecí modely střevního zánětu jsou nezbytné pro pochopení patogeneze Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy, idiopatické formy zánětlivého onemocnění střev u lidí. Klinický vzhled lidské IBD je heterogenní, což je skutečnost, která se odráží ve stále rostoucím počtu myších kmenů, které se používají v modelech IBD (Wirtz & Neurath 2007).

V naší studii bylo cílem zjistit, zda probiotická bakterie *E. coli* Nissle 1917 bude mít ochranný účinek na akutní střevní zánět vyvolaný u BALB/c myši podáváním dextransulfátu sodného v modelu lidské ulcerózní kolitidy podpořeném podáním uropatogenní bakterie *E. coli* O6K13. Jako kontrola byly použity myši monokolonizované od narození *E. coli* Nissle 1917 a 56. den rekolonizované bakterií *E. coli* O6K13 bez indukce zánětu pomocí DSS. Stupeň zánětu byl 0. U konvenčních myši, u kterých je akutní kolitida sliznice tlustého střeva vyvolána DSS podobná lidské UC, byl zánět hodnocen stupněm 4. Pokud byla zvířata monokolonizována od narození *E. coli* Nissle 1917 a poté ještě 56. den rekolonizována bakterií *E. coli* O6K13 vykazovala v tlustém střevě po 1 týdenním podání 2,5% DSS v pitné vodě jen velmi mírnou zánětlivou infiltraci se zachováním povrchového epitelu, pohárkových buněk i Lieberkūnových krypt (stupeň poškození 0 - 1). Pokud však byla zvířata nejprve monoasociována bakterií *E. coli* O6K13 a 56. den rekolonizována *E. coli* Nissle 1917, tak jsme po 1 týdenním podání 2,5% DSS pozorovali zkrácení krypt, infiltraci leukocytů a ložiskový edém v submukóze hodnocené stupněm poškození 2 - 3. Touto částí experimentu jsme navázali na výsledky práce, které již byly v naší laboratoři provedeny (Hudcovic et al. 2007). V tomto experimentu myši monokolonizované s *E. coli* Nissle 1917 zánětlivé změny po podání 2,5% DSS nevyvinuly (stupeň poškození 0), zatímco zvířata monokolonizovaná s *E. coli* O6K13 vykazovala zánětlivé změny podobné těm, které byly vyvolány u konvenčních myši (stupeň poškození 4) (Hudcovic et al. 2007). Podobné výsledky potvrzuje studie Rodriguez-Nogales et al. (2018), kde použili kmen myši C57BL/6J. Zvířata byla chována v konvenčních podmínkách a kolitida byla vyvolána podáním 3% DSS. Myši ošetřené probiotickým kmenem *E. coli* Nissle 1917 nevykazovaly makroskopicky a ani histologicky známky kolitidy, zatímco neošetřená zvířata prokazovala makroskopické změny - průjem a ztrátu tělesné hmotnosti. Mikroskopické hodnocení prokázalo intenzivní ulcerace postihující více než 75% povrchu sliznice střeva a kompletní depleci mucinu z pohárkových buněk (Rodriguez-Nogales et al. 2018).

Zásadní úlohu mají těsná spojení mezi buňkami epitelu, které mají určující roli pro charakter bariéry. Těsná spojení musí selektivně umožnit paracelulární absorpci skrze proteiny těsných spojů a na druhé straně zabránit průchodu bakterií a toxinů těmito spoji. V naší studii jsme se zaměřili na intracelulární protein zonula occludens (ZO - 1), který patří mezi fosfolipidy a interaguje s kladiny. Tyto adaptorové proteiny těsných spojů jsou velmi důležité pro zachování střevní integrity. U skupiny myši monoasociovaných *E. coli* Nissle 1917 a poté reasociovaných *E. coli* O6K13 jsme detekovali zachovalou strukturu proteinu. U myši monoasociovaných *E. coli* O6K13 a poté reasociovaných *E. coli* Nissle 1917 byla produkce ZO - 1 snížena. Naše výsledky korelují s prací Ukena et al. (2007), kde prokázali zvýšenou

produkci ZO – 1 a sníženou propustnost střevní bariéry u kmene myši BALB/c ošetřených *E. coli* Nissle 1917 v DSS modelu kolitidy (Ukena et al. 2007).

Naše studie ukazuje profylaktický účinek probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 v myším experimentálním modelu DSS kolitidy v souladu s předchozími studiemi (Schultz et al. 2004; Garrido-Mesa et al. 2011). Vykazuje pozitivní vliv *E. coli* Nissle 1917 na zachování integrity střevní bariéry (Rodriguez-Nogales et al. 2018). Kruis et al. 2004 dokázali, že účinek *E. coli* Nissle 1917 je ekvivalentní k léčivu mesalazin pro udržení remise v UC (Kruis et al. 2004).

Prokázali jsme, že vhodné probiotické vlastnosti a dobré kolonizační schopnosti *E. coli* Nissle 1917 chrání myši před střevním zánětem indukovaným kmenem *E. coli* O6K13 v DSS modelu ulcerózní kolitidy.

7 Závěr

V DSS modelu ulcerózní kolitidy myši monoasociované kmenem *E. coli* Nissle 1917 a poté reasociované kmenem *E. coli* O6K13 vyvinuly nižší stupeň střevního zánětu ve srovnání se skupinou myši monoasociovaných kmene *E. coli* O6K13 a poté reasociovaných kmen *E. coli* Nissle 1917. Došli jsme k závěru, že bakterie *E. coli* Nissle 1917 chrání myši před střevním zánětem indukovaným kmenem *E. coli* O6K13 a rovněž chrání myši před střevním zánětem vyvolaným podáním DSS. Z tohoto důvodu se domníváme, že *E. coli* Nissle 1917 je, vzhledem ke svým kolonizačním a protektivním schopnostem, vhodnou probiotickou bakterií, která se bude dále testovat v jiných gnotobiologických modelech.

8 Seznam literatury

- Afouda P, Fournier PE, Raoult D, Merhei V. 2017. '*Lactobacillus timonensis*' sp. nov., a new bacterial species isolated from the human gut. *New microbes and new infections* **19**: 121-122.
- Ananthakrishnan AN. 2015. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review. *Dig Dis Sci* **60**:290-298.
- Andersson P, Soderholm JD. 2009. Surgery in Ulcerative Colitis: Indication and Timing. *Digestive Diseases* **27**:335-340.
- Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. 2006. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1765**:189-222.
- Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. 2009. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* **58**:41-48.
- Borenshtein D, McBee ME, Schauer DB. 2008. Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Current Opinion in Gastroenterology* **24**:32-37.
- Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourie B, Brouns F, Bornet FR. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr* **80**:1658-1664.
- Bouma G, Strober W. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**:521-533.
- Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ. 1993. Clinicopathological Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. *Laboratory Investigation* **69**:238-249.
- Coward S, Kaplan GG. 2017. IBD in the New World, Old World, and Your World. *Inflammatory Bowel disease*. Humana Press, New York, USA.
- Cukrowska B, Motyl I, Kozakova H, Schwarzer M, Gorecki RK, Klewicka E, Slizewska K, Libudzisz Z. 2009. Probiotic *Lactobacillus* Strains: in vitro and in vivo Studies. *Folia Microbiologica* **54**:533-537.
- Derikx LA, Dieleman LA, Hoentjen F. 2016. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **30**:55-71.
- Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. 2003. *Lactobacillus* GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* **52**:370-376.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11971-11975.

- Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in Ulcerative colitis. *Gastroenterology* **124**: 1265-1276.
- Edelblum KL, Turner JR. 2009. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Current Opinion in Pharmacology* **9**:715-720.
- Eichele DD, Kharbanda KK. 2017. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology* **23**:6016-6029.
- Fabrega MJ, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badia J, Gimenez R, Galvez J, Baldoma L. 2017. Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Frontiers in Microbiology* **8** (1274)DOI: 10.3389/fmicb.2017.01274.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario. Available from www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (accessed april 30 and May 1 2002)
- Farell RJ, Peppercorn MA. 2002. Ulcerative colitis. *Lancet* **359**: 331-340
- Fasano A. 2012. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Barriers and Channels Formed by Tight Junction Proteins Ii* **1258**:25-33.
- Frei P, Biedermann L, Nielsen OH, Rogler G. 2013. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **19**:1040-1048.
- Garrido-Mesa N, Utrilla P, Comalada M, Zorrilla P, Garrido-Mesa J, Zarzuelo A, Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J. 2011. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochemical pharmacology* **82**: 1891-1900.
- George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, Revol-Junelles AM, Borges F, Foligne B. 2018. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology* **9** (2899) DOI: 10.3389/fmicb.2018.02899.
- Groschwitz KR, Hogan SP. 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**:3-20.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Role of bacteria in experimental colitis. *Best practice and research clinical gastroenterology* **17**: 793-804.
- Hajavi J, Esmaeili SA, Varasteh AR, Vazini H, Atabati H, Mardani F, Momtazi-Borojeni AA, Hashemi M, Sankian M, Sahebkar A. 2019. The immunomodulatory role of probiotics in allergy therapy. *Journal of Cellular Physiology* **234**:2386-2398.
- Honda K, Littman DR. 2012. The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annual Review of Immunology* **30**:759-795.

- Hudcovic T, Kolinska J, Klepetar J, Stepankova R, Rezanka T, Srutkova D, Schwarzer M, Erban V, Du Z, Wells JM, Hrcir T, Tlaskalova-Hogenova H, Kozakova H. 2012. Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clinical and Experimental Immunology* **167**:356-365.
- Hudcovic T, Stepankova R, Kozakova H, Hrcir T, Tlaskalova-Hogenova H. 2007. Effects of monocolonization with *Escherichia coli* strains O6K13 and Nissle 1917 on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiologica* **52**:618-626.
- Hulten K, Almashhrawi A, El-Zaatari FA, Graham DY. 2000. Antibacterial therapy for Crohn's disease: a review emphasizing therapy directed against mycobacteria. *Dig Dis Sci* **45**:445-456.
- Human Microbiome Project C. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**:207-214.
- Huynh HQ, deBruyn J, Guan LL, Diaz H, Li MJ, Girgis S, Turner J, Fedorak R, Madsen K. 2009. Probiotic Preparation VSL#3 Induces Remission in Children with Mild to Moderate Acute Ulcerative Colitis: A Pilot Study. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**:760-768.
- Chibbar R, Dieleman LA. 2015. Probiotics in the Management of Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* **49**:S50-S55.
- Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S, Sakata T. 1999. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Digestive Diseases and Sciences* **44**:2119-2123.
- Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nunez G. 2005. NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual Review of Biochemistry* **74**:355-383.
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:15064-15069.
- Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. 2012. Probiotics in the Management of Inflammatory Bowel Disease A Systematic Review of Intervention Studies in Adult Patients. *Drugs* **72**:803-823.
- Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. 2015. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **1**:154-170.
- Klag T, Stange EF, Wehkamp J. 2013. Defective Antibacterial Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases* **31**:310-316.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 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**:4578-4585.
- Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. 2014. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* **146**:1489-1499.
- Kozakova H, Schwarzer M, Tuckova L, Srutkova D, Czarnowska E, Rosiak I, Hudcovic T, Schabussova I, Hermanova P, Zakostelska Z, Aleksandrak-Piekarczyk T, Koryszewska-Baginska A, Tlaskalova-Hogenova H, Cukrowska B. 2016. Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cell Mol Immunol* **13**: 251-262.
- Krejsek J, Andrys C, Krčmová I. 2016. *Imunologie člověka*. Garamon s.r.o., Hradec Králové.
- Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. 2014. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **36**:166-176.
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**:1617-1623.
- Kuhbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleesen B, Gionchetti P, Blaut M, Campieri M, Fölsch UR, Kamm MA, Schreiber S. 2006. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* **55**:833-841.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* **75**:263-274.
- Landy J, Ronde E, English N, Clark SK, Hart AL, Knight SC, Ciclitira PJ, Al-Hassi HO. 2016. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **22**:3117-3126.
- Lashner BA, Loftus EV, Jr. 2006. True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **101**:1003-1004.
- Lauranne AAP, Derikx MD, Levinus A, Dieleman, Frank Hoentjen. 2016. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. *Best Practice and Research Clinical gastroenterology*. Elsevier Ltd, Amsterdam.
- LeBlanc JG, Laino JE, del Valle MJ, Vannini V, van Sinderen D, Taranto MP, de Valdez GF, de Giori GS, Sesma F. 2011. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology* **111**:1297-1309.
- Li JH, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, Juncker AS, Manichanh C, Chen B, Zhang W, Levenez F, Wang J, Xu X, Xiao L, Liang S, Zhang D, Zhang Z, Chen W, Zhao H, Al-Aama JY, Edris S, Yang H, Wang J, Hansen T, Nielsen HB, Brunak S, Kristiansen K, Guarner F, Pedersen O, Doré J, Ehrlich SD; MetaHIT Consortium, Bork P, Wang J; MetaHIT Consortium. 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology* **32**:834-841.

- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* **147**:747-748.
- Loddo I, Romano C. 2015. Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Frontiers in Immunology* **6** (551) doi: 10.3389/fimmu.2015.00551.
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* **104**:305-344.
- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* **65**:330-339.
- Martin R, Chain F, Miquel S, Motta JP, Vergnolle N, Sokol H, Langella P. 2017. Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol Rev* **41**:S49-S70.
- Martin R, Miquel S, Langella P, Bermudez-Humaran LG. 2014. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence* **5**:413-423.
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G. 2009. Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**:100-113.
- McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology* **9**:265-278.
- Metchnikoff E. 1907. *The prolongation of life: optimistic studies, the potential life-lengthening properties of lactic acid bacteria.* Heinemann, London.
- Mizoguchi A, Takeuchi T, Himuro H, Okada T, Mizoguchi E. 2016. Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease. *Journal of Pathology* **238**:205-219.
- Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. 2015. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **149**:102-109.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* **142**:46-54.
- Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V, Nevoral J. 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica* **104**:E184-E186.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. 1995. Antibodies to Interleukin-12 Abrogate Established Experimental Colitis in Mice. *Journal of Experimental Medicine* **182**:1281-1290.

- Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. 2018. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* **11**:1-10.
- Orel R, Trop TK. 2014. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **20**:11505-11524.
- Papadakis KA, Targan SR. 2000. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* **51**:289-298.
- Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* **29**: 4–8.
- Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. 2007. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* **26**:757-766.
- Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D, Bargiela R, von Bergen M, Neulinger SC, Däumer C, Heinsen FA, Latorre A, Barbas C, Seifert J, dos Santos VM, Ott SJ, Ferrer M, Moya A. 2013. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* **62**:1591-1601.
- Perse M, Cerar A. 2012. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (718617) doi: 10.1155/2012/718617.
- Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. 2014. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **18**:279-288.
- Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* **37**:105-118.
- Rodriguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Utrilla MP, Chueca N, Fernández-Caballero JA, García F, Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J. 2018. The Administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 Ameliorates Development of DSS-Induced Colitis in Mice. *Frontiers in Pharmacology* 9 (468) DOI: 10.3389/fphar.2018.00468.
- Salim SY, Soderholm JD. 2011. Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**:362-381.
- Sartor RB. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* **3**:390-407.
- Sartor RB. 2008. Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:16413-16414.
- Scribano ML, Prantera C. 2013. Antibiotics and Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases* **31**:379-384.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14 (e1002533) DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.

- Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D. 1995. The Genus Bifidobacterium. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, London.
- Shanahan F. 2004. Probiotics in inflammatory bowel disease - therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**:809-818.
- Shen L, Weber CR, Turner JR. 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *Journal of Cell Biology* **181**:683-695.
- Schneeberger EE, Lynch RD. 1992. Structure, Function, and Regulation of Cellular Tight Junctions. *American Journal of Physiology* **262**:L647-L661.
- Schultz M, Strauch UG, Linde HJ, Watzl S, Obermeier F, Göttl C, Dunger N, Grunwald N, Schölmerich J, Rath HC. 2004. Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**: 372-378.
- Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-Gayet I, Srutkova D, Hermanova P, Martino ME, Balmand S, Hudcovic T, Heddi A, Rieusset J, Kozakova H, Vidal H, Leulier F. 2016. Lactobacillus plantarum strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* **351**:854-857.
- Soccol CR, de Souza Vandenberghe LP, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, De Dea Lindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V. 2010. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology* **48**: 413-434
- Spencer J, Sollid LM. 2016. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol* **9**:1113-1124.
- Splichalova A, Slavikova V, Splichalova Z, Splichal I. 2018. Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets. *Front Immunol* 9 (220) DOI: 10.3389/fimmu.2018.00220.
- Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, Rittich B, Kozakova H, Schabussova I. 2015. Bifidobacterium longum CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *Plos One* 10 (e0134050) DOI: 10.1371/journal.pone.0134050.
- Stepankova R, Powrie F, Kofronova O, Kozakova H, Hudcovic T, Hrcir T, Uhlig H, Read S, Rehakova Z, Benada O, Heczko P, Strus M, Bland P, Tlaskalova-Hogenova H. 2007. Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *Inflammatory Bowel Disease* **13**: 1202-1211
- Strober W, Fuss I, Mannon P. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* **117**:514-521.
- Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. 2017. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **52**:1-8.
- Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. 1994. Spontaneous, Heritable Colitis in a New Substrain of C3h/Hej Mice. *Gastroenterology* **107**:1726-1735.

- Tannock GW. 2005. New Perceptions of the Gut Microbiota: Implications for Future Research. *Gastroenterology clinics of North America* **34**: 361-382
- Teshima CW, Dieleman LA, Meddings JB. 2012. Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease pathogenesis. *Barriers and Channels Formed by Tight Junction Proteins II* **1258**:159-165.
- Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain JP. 2010. Butyrate Utilization by the Colonic Mucosa in Inflammatory Bowel Diseases: A Transport Deficiency. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**:684-695.
- Traskalova-Hogenova H, , Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* **93**:97-108.
- Traskalova-Hogenova H, ,Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčíř 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 DP. 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. *Cellular & Molecular Immunology* **8**:110-120.
- Traskalová-Hogenová H, Farré-Castany MA, Štěpánková R, Kozáková H, Tučková L, Funda DP, Barot R, Cukrowska B, Šinkora J, Mandel L, Karská K, Kolínská J. 1995. The gut as a lymphoepithelial organ: the role of intestinal epithelial cells in mucosal immunity. *Folia Microbiol (Praha)* **40**:385-391.
- Traskalova-Hogenova H, Vannucci L, Klimesova K, Stepankova R, Krizan J, Kverka M. 2014. Microbiome and colorectal carcinoma: insights from germ-free and conventional animal models. *Cancer J* **20**:217-224.
- Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, Forti G, Morini S, Hassan C, Pistoia MA, Modeo ME, Rodino' S, D'Amico T, Sebkova L, Sacca' N, Di Giulio E, Lizza F, Imeneo M, Larussa T, Di Rosa S, Annese V, Danese S, Gasbarrini A. 2010. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* **105**:2218-2227.
- Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhard R, Seidler U, Hansen W, Bleich A, Bruder D, Franzke A, Rogler G, Suerbaum S, Buer J, Gunzer F, Westendorf AM. 2007. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS ONE* **2** (e1308) doi:10.1371/journal.pone.0001308.
- van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, Postma DS, Koppelman GH, Kerkhof M, Reijmerink NE, Dompeling E, van den Brandt PA, Ferreira I, Mommers M, Thijs C. 2011.

- Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* **128**:948-955 e941-943.
- Venema K, Carmo AP. 2015. Probiotics and prebiotics. Castier Academic Press, United Kingdom.
- Vlkova E, Rada V, Bunesova V, Rockova S. 2012. Growth and survival of lactic acid bacteria in lucerne silage. *Folia Microbiologica* **57**:359-362.
- Vlkova E, Rada V, Trojanova I, Killer J, Smehilova M, Molatova Z. 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch Anim Nutr* **62**:359-365.
- Wagnerova A, Gardlik R. 2013. In vivo reprogramming in inflammatory bowel disease. *Gene Therapy* **20**: 1111-1118
- Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. 2014. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **20**:6-21.
- Wilks S, Moxon W. Lectures on pathological anatomy. 1875. Lindsay and Blakiston, Philadelphia.
- Wilks S. 1859. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Medical Times & Gazette* **2**:264.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols* **2**:541-546.
- Wirtz S, Neurath MF. 2007. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:1073-1083.
- Wu W, Wu W, Sun M, Chen F, Cao AT, Liu H, Zhao Y, Huang X, Xiao Y, Yao S, Zhao Q, Liu Z, Cong Y. 2017. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunology* **10**:946-956.
- Yadav V, Varum F, Bravo R, Furrer E, Bojic D, Basit AW. 2016. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. *Transl Res* **176**:38-68.
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* **132**:562-575.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**:222-227.
- Yu LCH. 2018. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *Journal of Biomedical Science* **25** (79) doi: 10.1186/s2929-018-0483-8.