

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# VLIV VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ NA RŮST HOSTITELE V GNOTOBIOTICKÉM MYŠÍM MODELU

VERONIKA DRGOŇOVÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Schwarzer, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

## **Poděkování**

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování vedoucímu diplomové práce, panu PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D., a konzultantovi, Mgr. Martinu Schwarzerovi, Ph.D., za jejich vynikající odborné vedení, cenné rady, trpělivost a obětavou pomoc během celého zpracování práce. Velké díky patří také celému vědeckému týmu pana doktora Schwarzera, bez jehož pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěla vyjádřit vděk Mikrobiologickému ústavu AV ČR za umožnění tvorby práce a poskytnutí profesionálního prostředí pro můj experiment. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem mým nejbližším, kteří mě při studiu podporovali a také myším, které se účastnily experimentů.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2024

## Obsah

1.	ABSTRAKT .....	6
2.	ABSTRACT .....	7
3.	ÚVOD .....	8
4.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	10
5.	TEORETICKÁ ČÁST .....	11
5.1	Malnutrice – špatný stav výživy .....	11
5.1.1	Definice .....	11
5.1.2	Dělení podvýživy .....	12
5.1.3	Nová cesta v boji s podvýživou.....	13
5.2	Bakterie mléčného kvašení .....	13
5.2.1	Probiotikum .....	14
5.3	Bifidobakterie .....	15
5.3.1	Taxonomie .....	15
5.3.2	Morfologie .....	16
5.3.3	Vlastnosti .....	17
5.3.4	<i>Bifidobacterium longum</i> .....	17
5.3.5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....	18
5.4	Gnotobiologie .....	18
5.4.1	Experimentální zvířata .....	19
5.5	Somatotropní osa.....	20
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
6.1	Materiál .....	21
6.1.1	Bakterie .....	21
6.1.2	Experimentální zvířata .....	21
6.1.3	Dieta.....	23
6.1.4	Média, roztoky a činidla .....	24
	Pomůcky.....	25
6.1.5	Přístroje.....	26
6.2	Pracovní postup .....	28

6.3	Statistická analýza.....	37
7.	VÝSLEDKY.....	38
8.	DISKUSE.....	57
9.	ZÁVĚR.....	61
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	62
11.	SEZNAM TABULEK.....	63
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	64
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	66
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	68

# 1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Farmacie

Autor: Veronika Drgoňová

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Schwarzer, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv vybraných probiotických bakterií na růst hostitele v gnotobiotickém myším modelu

Tato diplomová práce rozšiřuje znalosti o schopnosti bakterie *Lactiplantibacillus plantarum* WJL podporovat růst gnotobiotického hostitele v modelu chronické podvýživy. Bylo zkoumáno, zda i další bakterie mají podobné schopnosti a zda jsou tyto vlastnosti druhově a kmenově specifické. Testovány byly kmeny *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* a *Bifidobacterium adolescentis* v gnotobiotickém juvenilním myším modelu chronické podvýživy a byl sledován jejich vliv na somatotropní osu hostitele. Současně bylo analyzováno, jak podvýživa ovlivňuje bakterie ve střevě hostitele a úroveň kolonizace střeva.

Bezmikrobní myši C57BL/6J byly monokolonizovány intragastrickou sondou testovanými bakteriálními kmeny. Po ověření stabilní kolonizace byly myši připuštěny a samčí potomci F1 byli převedeni 21. den po narození na experimentální dietu s nízkým obsahem bílkovin a tuků. Každý týden byl sledován jejich růst měřením délky těla a hmotnosti. Myši byly utraceny po 5 týdnech a byly odebrány vzorky pro další analýzu. Jako kontrola byly použity bezmikrobní myši.

Výsledky naznačují, že i jiné bakteriální kmeny než *Lactiplantibacillus plantarum* WJL, vykazují účinky na podporu růstu u chronicky podvyživených myší, přičemž tyto účinky jsou druhově i kmenově specifické.

Úroveň kolonizace všemi testovanými kmeny bakterií se u myší na experimentální dietě snížila. Byla prokázána druhová i kmenová specifita a to tak, že oba testované kmeny *Bifidobacterium longum* (Bl) vykazují u hostitele zlepšený systémový růst ve srovnání s oběma kmeny *Bifidobacterium adolescentis* (Bad) i kontrolní bezmikrobní skupinou (GF) a zároveň kmen Bl 372 vykazoval signifikantně větší podporu růstu myší než Bl 367. To bylo doprovázeno zvýšenými hodnotami hladin IGF-1 v séru v Bl 372 ve srovnání s myšmi kolonizovanými Bl 367, Bad 368 a Bad 373. Histologická analýza architektury tenkého střeva ukázala nejdelší klky u myší kolonizovaných kmenem Bl 372.

**Klíčová slova:** bifidobakterie, gnotobiologie, růst, somatotropní osa

## 2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Pharmacy

Author: Veronika Drgoňová

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martin Schwarzer, Ph.D.

Title of diploma: Impact of selected probiotic bacteria on juvenile host growth in gnotobiotic mouse model

This thesis expands understanding of the ability of *Lactiplantibacillus plantarum* WJL bacteria to support the growth of gnotobiotic hosts in models of chronic malnutrition. It was investigated whether other bacteria also have similar capabilities and whether these traits are species- and strain-specific. Strains of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium adolescentis* were tested in a gnotobiotic juvenile mouse model of chronic malnutrition and their impact on the host's somatotrophic axis was monitored. Concurrently, it was analysed how malnutrition affects the bacteria in the host's gut and the level of its colonization.

Germ-free C57BL/6J mice were mono-colonized *via* intragastric gavage with the aforementioned bacterial strains. The mice were mated after confirming stable colonization and F1 male offspring were weaned on the 21st day after birth onto an experimental diet with low protein and fat content. Their growth was monitored weekly by measuring body length and weight. The mice were euthanized 5 weeks later and samples were collected for further analysis. Germ-free mice were used as a control.

Results suggest that other bacterial strains besides *Lactiplantibacillus plantarum* WJL exhibit growth-promoting effects in chronically malnourished mice, with these effects being species- and strain-specific.

The colonization level of all tested bacterial strains decreased in mice on the experimental diet. Species and strain specificity were demonstrated by both tested *Bifidobacterium longum* (BI) strains showing improved systemic growth compared to both *Bifidobacterium adolescentis* (Bad) strains and the control germ-free (GF) group, with BI 372 strain exhibiting significantly enhanced growth compared to BI 367. This was accompanied by elevated levels of IGF-1 in the serum of mice colonized with BI 372 compared to those colonized with BI 367, Bad 368, and Bad 373. Histological analysis of the architecture of the small intestine revealed the longest villi in mice colonized with BI 372.

**Keywords:** bifidobacteria, gnotobiology, growth, somatotrophic axis

### 3. ÚVOD

Podvýživa je globálním zdravotním problémem, který má vážné důsledky pro miliony lidí po celém světě. Průzkumy ukazují, že přibližně 2,4 miliardy jedinců, převážně žen a obyvatel venkovských oblastí, nemělo v roce 2022 konzistentní přístup k výživné, bezpečné a dostatečné potravě a jsou přímo ohroženi tímto stavem. Dětská podvýživa je celosvětově stále znepokojivě vysoká. V roce 2021 bylo 22,3 % (148,1 milionů) dětí zakrnělých a 6,8 % (45 milionů) na podvýživu zemřelo (1). Důsledky podvýživy jsou rozmanité a zahrnují oslabení imunitního systému, narušení růstu a vývoje, a zvýšení rizika úmrtnosti (2). Tento závažný problém je dlouhodobý a vyžaduje intenzivní výzkum a inovativní léčebné strategie. Studie provedené v oblasti podvýživy ukazují, že její dlouhodobý dopad může ovlivnit celé generace a ohrozit globální zdravotní situaci. Také se prokázalo, že podvýživa u dětí může mít dlouhodobé důsledky na jejich růst a vývoj, což může vést k chronickým zdravotním problémům v dospělosti (3).

V souvislosti s podvýživou zaujímá střevní mikrobiom stále více pozornosti jako potenciální terapeutický cíl. Mikrobiom, který představuje dynamický a interaktivní mikroekosystém podléhající změnám v čase, je propojen s makroekosystémy, včetně eukaryotických hostitelů, pro jejichž zdraví je klíčový. Zásadní roli hraje v trávení potravy, syntéze vitaminů a ve vývoji a celkovém nastavení imunitního systému. Podvýživa může způsobit nerovnováhu v složení mikrobiomu, což může dále zhoršit stav jedince. Proto je důležité zkoumat, jak mikrobiom reaguje na podvýživu a jakým způsobem lze mikrobiom ovlivnit za účelem zlepšení zdravotního stavu jedince.

V tomto kontextu se ukazuje, že gnotobiotický model je ideálním nástrojem pro studium interakcí mezi mikrobiomem a hostitelským organismem a celkově pro zkoumání vlivu mikrobiomu na zdraví a výživový stav jedince. Jedná se o precizně kontrolovaný a technologicky náročný model, ve kterém jsou zvířata chována v prostředí bez detekovatelných živých mikroorganismů a následně je možné je kolonizovat vybranými mikroorganismy za účelem studia například specifických interakcí konkrétních bakteriálních kmenů.

V předchozím výzkumu se postupovalo od bezobratlého modelu, konkrétně gnotobiotických larev mouchy octomilky (*Drosophila melanogaster*), který umožnil screening a výběr vhodných bakteriálních kmenů, až po myší model, který poskytuje podrobnější a přesnější simulaci mikrobiomu lidského gastrointestinálního traktu. Myší model, použitý v této práci, umožňuje zkoumání i anaerobních bakterií, které nelze testovat v modelu octomilky, jejíž střevní prostředí je aerobní, což rozšířilo možnosti výzkumu a zlepšilo jeho relevanci ve vztahu k lidskému mikrobiomu (4).

V práci Martina Schwarzera bylo prokázáno, že specifické kmeny bakterie *Lactiplantibacillus plantarum* mohou podporovat růst mladých podvyživených myší (5). Bylo vypořádáno, že zvířata kolonizovaná dvěma různými kmeny, *Lactiplantibacillus plantarum* WJL a *Lactiplantibacillus plantarum* NIZO2877, se lišila kinetikou růstu a v míře aktivity somatotropní osy. U myší kolonizovaných kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* WJL byly prokázány příznivé účinky mikrobioty na somatotropní osu a na myší juvenilní růst.



*Lactiplantibacillus plantarum* NIZO2877 kolonizovaná zvířata měla podobnou odpověď organismu na růst v modelu chronické podvýživy jako bezmikrobní myši (GF).

Bifidobakterie jsou považovány za klíčového člena lidského střevního mikrobiomu a jejich počet může být ovlivněn stavem výživy jedince. Studie naznačují, že pokles počtu bifidobakterií je spojen s podvýživou u dětí, a dokonce i se stářím populace (6,7). Na rozdíl od laktobacilů jsou bifidobakterie mnohem hojnější ve střevním mikrobiomu dospělých a jejich přítomnost ve střevě bývá spojována s mnoha zdravotními přínosy (8). To vede k zájmu o testování a porovnávání různých kmenů *Bifidobacterium* na myším modelu podvýživy.

Pro účely této práce byly vybrány specifické kmeny druhů *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium adolescentis*, jejichž prorůstové vlastnosti na hostitele budou podrobně zkoumány a porovnány. Vybrány byly z důvodu prokázaných kmenově specifických vlastností v myším modelu zánětlivých onemocnění střev (9). Stejně jako ve výše zmíněné práci je předmětem zájmu potvrzení schopnosti rodu *Bifidobacterium* stimulovat růst podvyživeného juvenilního myšího modelu a potvrzení druhové a kmenové specifity těchto bakterií.

Základním předpokladem je, že spolu s nutriční terapií mohou mikrobiální intervence s použitím preklinicky testovaných a vybraných bakteriálních kmenů představovat novou a doplňkovou strategii k potlačení nepříznivých účinků chronické podvýživy na člověka. Takový přístup může přinést nové poznatky a přispět k léčbě podvýživy a zlepšení stavu trávicího systému u postižených jedinců.

## 4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je provést rešerši aktuálních poznatků o podvýživě a jejím významu v kontextu současného dění. Dále se práce zabývá detailním studiem rodu *Bifidobacterium* a jeho relevancí pro lidské využití, jakož i na seznámení s oborem gnotobiologie a zdůraznění důležitosti gnotobiotického modelu v rámci této problematiky.

V experimentální části se práce zaměřuje na *in vivo* testování čtyř různých kmenů rodu *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* české sbírky mikroorganismů (CCM) 7952 (Bl 367), *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* sbírky mlékárenských mikroorganismů (CCDM) 372 (Bl 372), *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373), v gnotobiotickém juvenilním myším modelu chronické podvýživy. Hlavním cílem bude zhodnotit vliv testovaných vybraných bakterií na somatotropní osu experimentálních myší a posoudit, zda je tento vliv odlišný mezi jednotlivými druhy a kmeny bakterií. Současně bude hodnoceno, jak chronická podvýživa ovlivňuje samotné bakterie, včetně jejich úrovně kolonizace a morfologických vlastností. V závěru práce budou získané výsledky experimentální části detailně vyhodnoceny a jejich vztah k původním cílům práce bude podrobně diskutován.

## 5. TEORETICKÁ ČÁST

### 5.1 Malnutrice – špatný stav výživy

#### 5.1.1 Definice

Malnutricí, podle definice Světové zdravotnické organizace (WHO), rozumíme nedostatek, nadbytek nebo nerovnováhu v příjmu živin, či zhoršené využívání živin. Hlavní pilíře malnutrice zahrnují nejen podvýživu, ale také nadváhu, obezitu a nepřenositelné nemoci spojené se stravou. Podvýživa, jako jedna z forem malnutrice, může mít tři hlavní projevy: chřadnutí, zakrnění a podváha (viz Obrázek 1) (10).

##### ❖ Chřadnutí

Chřadnutí se definuje jako nízká hmotnost v poměru k výšce, často indikující nedávnou a velkou ztrátu hmotnosti. Může být spojeno s vyšším rizikem úmrtí u dětí, pokud není adekvátně léčeno.

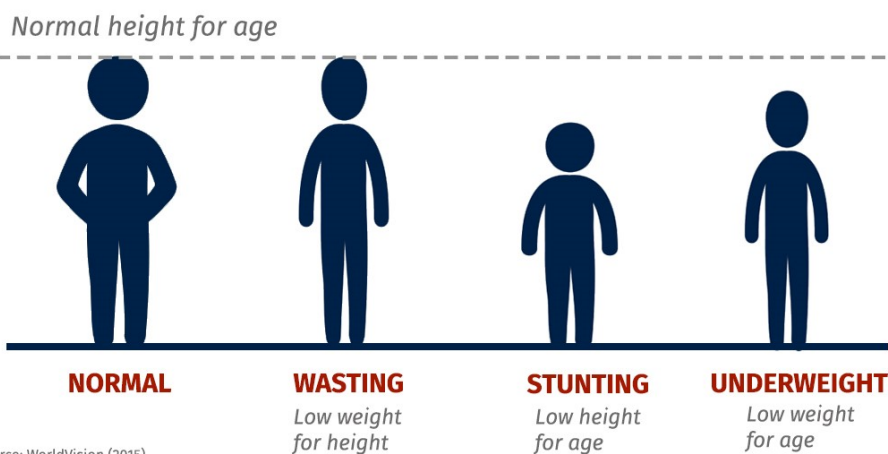
##### ❖ Zakrnění

Zakrnění pak značí nízkou výšku vzhledem k věku, ovlivňující fyziologický a kognitivní vývoj dětí.

##### ❖ Podváha

Podváha, definovaná jako nízká hmotnost vzhledem k věku, může způsobit zakrnění, ochablost nebo obojí.

#### Different types of undernutrition



**Obrázek 1** - Názorná ukázka jednotlivých typů podvýživy uvedených výše v textu. Zleva můžeme pozorovat zobrazení běžně živeného člověka, dále chřadnutí, zakrnění a nakonec podvýživu (11).

## 5.1.2 Dělení podvýživy

### 5.1.2.1 Akutní podvýživa

Když se rozvíjející mladý organismus setká s určitými nutričními výzvami, jako je podvýživa, může dojít k úbytku na váze, úbytku síly a energie vedoucí k neschopnosti vykonávat rutinní činnosti, zakrnění mikrobiomu až k samotným projevům chronické podvýživy. Tento stav ohrožuje nejen fyzický, ale i kognitivní vývoj jedince. Největším problémem tohoto typu podvýživy je neúplné obnovení zdravého růstu (12).

Podle aktuálního protokolu WHO bylo prokázáno, že poskytování terapeutické stravy připravené k použití (RUTF) a profylaktické podávání antibiotik dětem zlepšilo krátkodobě zdravotní stav a snížilo riziko jeho krátkodobého zhoršení. Nicméně, míra zotavení byla stále suboptimální a pozorované rozdíly nebyly udrženy ani do 6 měsíců po zahájení léčby (13,14).

Při akutní podvýživě může pomoci aplikace specifických bakteriálních kmenů, čímž se dosáhne záměrné úpravy mikrobiomu. Podobně může fungovat i poskytnutí vhodných substrátů, které podporují růst konkrétních bakteriálních skupin.

Gehrig a spol. demonstrovali, že vylepšení terapeutické diety o přídatné látky, jež podporují růst bakteriálních kmenů spojených se zdravým růstem v mikrobiomu podvyživených dárců, vedlo k podpoře zdravého růstu jak v preklinických modelech podvýživy u myší a selat, tak i v následném výzkumu na lidech (15). Tyto výsledky nejen že potvrdily přenositelnost poznatků z preklinických modelů, ale také ukázaly na potenciálně nový přístup k léčbě malnutrice u dětí.

### 5.1.2.2 Chronická podvýživa

Na rozdíl od akutní podvýživy, chronická podvýživa je výsledkem dlouhodobé nedostatečné výživy, což vede k poruchám lineárního růstu a ústí v malé a hubené jedince. Příčiny této formy podvýživy jsou stále špatně pochopeny (16) a až do nedávna nebyla u savců známa žádná role mikrobioty v jejím rozvoji (5).

V bezobratlém modelu chronické proteinové podvýživy u gnotobiotických larev mouchy octomilky bylo prokázáno, že mikrobiota obecně, a konkrétně určité specifické symbiotické kmeny bakterií, jako jsou *Acetobacter* a *Lactobacillus*, podporují systémový růst hostitele během juvenilní fáze (17,18).

Stejný závěr byl potvrzen i v modelu chronicky podvyživených juvenilních myší, kde došlo ke zjištění, že *Lactiplantibacillus plantarum* ve střevní mikrobiotě udržuje aktivitu růstového hormonu prostřednictvím signálních drah v játrech, čímž překonává rezistenci na růstový hormon (5). Tento mechanismus podporuje postnatální růst juvenilních myší trpících chronickou podvýživou tím, že řídí metabolické a hormonální změny, které se projevují zvýšenou hladinou inzulínu podobnému růstovému faktoru 1 (IGF-1) a inzulínu v krvi (19).

Společně tyto studie ukazují, že specifické probiotické kmeny bakterií, jako například *Lactiplantibacillus plantarum* WJL a jiní agonisté intracelulárního senzoru pro malé peptidy,

konkrétně oligomerizační domény 2 vázající nukleotid (NOD2), či od nich odvozená postbiotika, by mohly být potenciálně využity k řešení syndromů podvýživy (19).

### 5.1.3 Nová cesta v boji s podvýživou

Stále více studií naznačuje, že kromě samotné stravy hraje střevní mikrobiom také zásadní roli při vzniku nemocí spojených s podvýživou (5,19,20).

S rozvojem sekvenování, využitím tradičních bakteriálních kultivačních metod a využíváním gnotobiotických modelů bylo dosaženo velkého pokroku v porozumění úlohy mikrobiomu a konkrétních bakteriálních kmenů v etiologii a prevenci podvýživy, včetně chřadnutí, zakrnění a podváhy.

## 5.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou skupinou mikroorganismů s mnoha příznivými vlastnostmi pro trávení a zdraví gastrointestinálního traktu. Tyto bakterie mají schopnost bránit přilnutí, množení a šíření různých škodlivých patogenů ve střevech díky svým antimikrobiálním mechanismům. Kromě toho produkují enzymy, které podporují trávení a snižují příznaky střevní malabsorpce. Konzumace potravin obsahujících BMK může mít protinádorové účinky, které spočívají v potlačení různých karcinogenních procesů a inhibici růstu nádorů. Specifické složky BMK navíc aktivují imunitní systém a mohou modulovat imunitní odpovědi. Celkově lze říct, že bakterie mléčného kvašení mají pozitivní vliv na trávicí systém a mohou být využity jako probiotika k podpoře lidského zdraví (21).

BMK představují heterogenní skupinu mikroorganismů, které mají schopnost fermentovat různé živiny s následnou produkcí kyseliny mléčné a dalších organických kyselin a jiných metabolitů (22). Přestože tyto bakterie mají různorodé vlastnosti, společně sdílejí schopnost fermentace a jsou proto souhrnně označovány jako bakterie mléčného kvašení. Jsou širokou skupinou grampozitivních, nesporulujících, kataláza negativních a aerotolerantních bakterií, která zahrnuje velké množství rodů (23). Jsou klasifikovány na základě jejich morfologie, způsobu fermentace glukózy, růstu při různých teplotách a tolerance vůči soli (24).

Jako důležité předpoklady pro to, aby kmeny byly účinnými probiotickými mikroorganismy, jsou uváděny například odolnost vůči žaludeční kyselině a fyziologickým koncentracím žluči, stejně jako aktivita hydrolázy žlučových solí a adherence k buňkám střevního epitelu. Tyto vlastnosti lze určit pomocí *in vitro* testů, které se obecně používají pro selekci potenciálních probiotických bakterií (25).

Už v roce 1908 Ilja Mečnikov, držitel Nobelovy ceny v oblasti fyziologie a medicíny, předpokládal, že BMK obsažené ve fermentovaném mléku mohou přispívat k rozvoji zdravé střevní mikrobioty. Na základě této hypotézy navrhl teorii, že bakterie mléčného kvašení v zažívacím traktu mohou prostřednictvím svého preventivního působení prodloužit život jedince. Mečnikovova práce později ukázala, že některé druhy BMK a grampozitivní bifidobakterie (dále označované jako BMKB) se přirozeně vyskytují v lidských nebo živočišných tělních dutinách, včetně gastrointestinálního traktu (např. *Lactobacillus acidophilus*,

*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*), ústní dutiny (např. *Streptococcus mutans*, *Bifidobacterium longum*) a vaginální dutiny (např. *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus agalactiae*, *Lactobacillus crispatus*).

V gastrointestinálním traktu novorozenců tvoří BMK méně než 1 % z celkové střevní mikrobioty, zatímco bifidobakterie představují 60–90 % střevního mikrobiomu kojených dětí. Bifidobakterie typicky osidlují střevní trakt kojenců těsně po narození a během prvního týdne se stávají dominující bakteriální skupinou. Množství a druhové složení BMKB, které osidlují gastrointestinální trakt novorozence, jsou ovlivněny tím, zda je kojen, nebo zda dostává sušené mléko (26).

V současné době jsou do skupiny bakterií mléčného kvašení řazeny rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Rod *Bifidobacterium* patřící do vývojové větve aktinomycet je řazen mezi BMK díky fenotypické podobnosti (27).

### 5.2.1 Probiotikum

Vývoj pojmu probiotikum začíná v roce 1989, kdy Robert Fuller poprvé definoval pojem živý mikrobiální doplněk stravy, který příznivě ovlivňuje hostitelské zvíře zlepšením jeho střevní mikrobiální rovnováhy. Tato definice byla později v roce 1992 rozšířena Havenaarem a Huis in't Veldem na mono – nebo smíšenou kulturu živých mikroorganismů, která prospívá člověku nebo zvířatům zlepšením vlastností původní mikroflóry. V té době, konkrétně v roce 1995, byl gastrointestinální trakt považován za nejhustěji osídlenou oblast lidského těla, což zdůrazňuje význam střevního mikrobiomu. Následné výzkumy, zejména v 90. letech 20. století, dále rozšířily povědomí o výhodách probiotik, včetně schopnosti ovlivňovat imunitní systém, snižovat hladinu cholesterolu, krevní tlak a poskytovat ochranu proti různým střevním onemocněním. V současnosti je konzumace probiotických kultur široce uznávána pro své zdravotní přínosy, ačkoli některé konkrétní účinky stále zůstávají předmětem výzkumu a diskuzí (28).

V oblasti probiotik dochází v posledních letech k výraznému pokroku, který je dán celosvětovým nárůstem poznatků o roli lidského mikrobiomu ve vztahu ke zdraví a nemoci. Vzhledem k této skutečnosti je stále naléhavější potřeba definovat účinné strategie pro formování zdravějšího mikrobiomu. Dobře kontrolované intervenční studie, systematické přehledy a metaanalýzy nabízejí přesvědčivé důkazy o výhodách probiotik, které mají zásadní vliv na veřejné zdraví.

Definice konzilia Food and Agriculture Organization a World Health Organization (FAO, WHO) uvádí, že probiotika jsou živé mikroorganismy, které když jsou podávány v adekvátním množství, prospívají hostiteli.

Z dokumentu vydaného Mezinárodní vědeckou asociací pro probiotika a prebiotika z roku 2014 vyplývá, že pro probiotika je nezbytný důkaz o jejich zdravotních přínosech, a to buď na úrovni jednotlivého kmene nebo skupiny, v závislosti na charakteru těchto přínosů. Existuje rozmanitost způsobů podávání probiotik, cílových druhů hostitelů (člověk a zvířata), cílových populací, cílových míst (střevo i mimo ně) a konečných bodů účinnosti, a to v různých

regulačních kategoriích. Všechna probiotika musí být pro zamýšlené použití bezpečná. Mrtvé mikroorganismy, mikrobiální produkty a mikrobiální složky nespádají do kategorie probiotik (29).

## 5.3 Bifidobakterie

Některé druhy rodu *Bifidobacterium* se stávají stále častěji používanými probiotiky v potravinářství a doplňcích stravy. Tyto bakterie jsou přirozenou součástí lidského mikrobiomu, kolonizují gastrointestinální trakt již od počátku života a zůstávají klíčovými aktéry střevního zdraví po celý lidský život. Složení a množství bifidobakterií se však v průběhu lidského vývoje podstatně liší a je ovlivněno faktory jako je strava (kojení versus umělá výživa), užívání léků (např. antibiotika) a věk (30).

### 5.3.1 Taxonomie

Doména:	<i>Bacteria</i>
Oddělení:	<i>Firmicutes</i>
Kmen:	<i>Actinobacteria</i>
Třída:	<i>Actinobacteria</i>
Podtřída:	<i>Actinobacteridae</i>
Řád:	<i>Bifidobacteriales</i>
Čeleď:	<i>Bifidobacteriaceae</i>

Taxonomické zařazení bifidobakterií prošlo komplexním vývojem a několika reklasifikacemi. První izolace bifidobakterií se datuje přibližně k roku 1900, kdy Tissier poprvé izoloval tyto mikroorganismy ze stolice plně kojených dětí a označil je jako "*Bacillus bifidus*" (31). Tato objevná práce vzbudila značný zájem, zejména mezi odbornou veřejností. O 24 let později uznal Orla-Jensen existenci samostatného rodu *Bifidobacterium* (32), přičemž zjistil, že bifidní bakterie jsou heterofermentativní a hlavním metabolitem je kyselina octová, s relativně vysokým podílem L(+)-mléčné kyseliny bez produkce oxidu uhličitého.

Přesto byly ještě před rokem 1960 označovány jako bakterie *Lactobacillus bifidus*, a to z důvodu rozhodnutí Weisse a Rettgera, kdy roku 1938 zaznamenali příbuznost s rodem *Lactobacillus*. Proto po dlouhá léta byly bifidobakterie součástí tohoto rodu. Až v roce 1963 je Reuter vyčlenil, a z původně jediného představitele *Bifidobacterium bifidum* se rod rozrostl o dalších pět rozdílných druhů.

Od roku 1974 se začalo rozlišovat jedenáct různých druhů a v publikaci z roku 1986 se autoři zmiňují dokonce o 24 druzích bifidobakterií (33). V roce 2004 rod *Bifidobacterium* zahrnoval 28 druhů a 5 poddruhů (34).

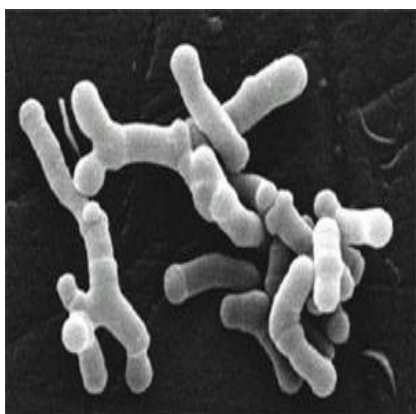
V současnosti se mikrobiologické druhy identifikují na základě sekvenace DNA, metabolických charakteristik a enzymatických vlastností. Díky novým technologiím a detekčním metodám došlo k identifikaci mnoha dalších druhů. Mezi druhy tohoto rodu náleží: *Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* (2 poddruhy: *B. animalis* ssp. *animalis*, *B. animalis* ssp. *lactis*), *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. bohemicum*,

*B. bombi*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. globosum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. longum* (*B. longum* ssp. *infantis*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. longum* ssp. *suus*), *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. mongoliense*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* (*B. pseudolongum* ssp. *pseudolongum*, *B. pseudolongum* ssp. *globosum*), *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminale*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovi*, *B. stercoris*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum* (*B. thermacidophilum* ssp. *thermacidophilum*, *B. thermacidophilum* ssp. *porcinum*) *B. thermophilum* a *B. tsurumiense* (22).

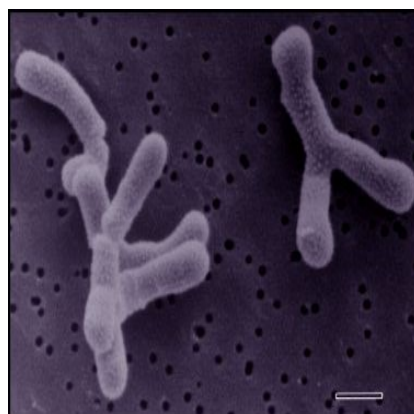
### 5.3.2 Morfologie

Všechny druhy rodu *Bifidobacterium* se vyskytují ve formě tyčinek, avšak jejich tvar je velmi nepravidelný a může se lišit v závislosti na konkrétním druhu bakterie a na podmínkách prostředí, ve kterém jsou kultivovány. Tyto tyčinky mají velikost v řádu  $10^{-6}$  metru a mohou být kokovitěho, krátkého nebo středního tvaru se špičatým zakončením. Některé tyčinky mohou být velmi dlouhé s drobnými ohyby a různými výrůstky či hrboly (32).

Tyto bakterie se mohou vyskytovat jednotlivě, ve formě řetězců nebo shluků. Některé z nich mohou mít větvenou strukturu ve tvaru Y nebo V. Mohou mít také rozšířený konec, což označujeme jako kyjovitý tvar. Některé z těchto typických znaků lze vidět na následujících obrázcích, kde jsou oba druhy zachyceny pomocí elektronové mikroskopie (**Obrázek 2**, **Obrázek 3**). Bifidobakterie nevytvářejí spory a nepohybují se, a proto jsou klasifikovány jako nesporující a nepohyblivé (35). Při barvení s methylenovou modří mohou být tyto bakterie nepravidelně zbarveny. Jejich morfologie je silně ovlivněna živinami (33).



**Obrázek 2** - *Bifidobacterium longum* zobrazené pomocí elektronové mikroskopie (36)



**Obrázek 3** - *Bifidobacterium adolescentis* zobrazené pomocí elektronové mikroskopie (37)

Kolonie bifidobakterií jsou hladké, rovné nebo mírně vypouklé, s ohraničenými okraji a smetanově bílou barvou, která se leskne na povrchu a má měkkou konzistenci.

Morfologické charakteristiky bifidobakterií jsou důležité pro jejich diagnostiku a identifikaci jednotlivých druhů. Tyto základní tvary jsou obvykle zaznamenány v Bergeyově



systematickém přehledu. Pro srovnání musí být bakterie kultivovány za stejných podmínek jako v původním vzorku (32).

Pevná buněčná stěna s vysokým obsahem peptidoglykanu, absencí vnější membrány a lipopolysacharidové vrstvy indikuje, že se jedná o grampozitivní bakterie. Po dokončení diagnostického barvení podle Grama jsou bakterie modrofialově zbarvené (38).

### 5.3.3 Vlastnosti

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou obecně nepatogenní, s výjimkou těch, které byly izolovány ze zubního kazu, kde se podílejí na jeho vzniku (39). Tyto bakterie jsou schopny rozkládat cukry bez produkce plynu. Jsou heterofermentativní, což znamená, že produkují více než jednu hlavní látku. V případě bifidobakterií to konkrétně znamená, že glukózu primárně zkvašují na kyselinu octovou a L(+)-mléčnou, obvykle v poměru 3:2. Navíc vytvářejí malé množství kyseliny mravenčí a jantarové, zatímco oxid uhličitý a kyselinu máselnou ani propionovou nevytvářejí (33).

Bifidobakterie jsou schopny syntetizovat vitamíny – zejména thiamin a laktoflavin a další vitamíny skupiny B a K. Pro svůj růst potřebují neutrální nebo kyselé uhličitany a oxid uhličitý. Mastné kyseliny a aminokyseliny pro ně nejsou vhodné. Pouze cystein a cystin jsou pro ně důležité jako zdroje dusíku. Zvláště významnou a zajímavou vlastností je schopnost bifidobakterií a laktobacilů adhezivně působit na epitel střevní stěny, což podporuje její obnovu (32).

I když jsou bifidobakterie často spojovány se skupinou bakterií mléčného kvašení, toto označení není zcela přesné kvůli vysoké produkci kyseliny octové (40).

Podle japonských vědců jsou bifidobakterie dokonce důležitější než laktobacily díky své relativní odolnosti v kyselém prostředí žaludku, alkalickém prostředí tenkého střeva a celkovým specifickým fyziologickým účinkům (32). Jejich reakce na kvalitativní změny v dostupnosti substrátu a schopnost regulace metabolických drah, které šetří buněčnou energii, přispívají k vysvětlení ekologické vhodnosti těchto bakterií pro život ve střevech během trávicího procesu. Člověk, jako hostitel, každodenně ovlivňuje substráty, které střevním bakteriím dodává, a schopnost trávení odolných sacharidů se mění v závislosti na přijaté potravě (40).

### 5.3.4 *Bifidobacterium longum*

*Bifidobacterium longum* je grampozitivní anaerobní bakterie (41), patřící do rodu *Bifidobacterium* (8), která kolonizuje střevní trakt lidí a zvířat. Tento mikroorganismus je jedním z prvních, který kolonizuje střevo hostitele.

*Bifidobacterium longum*, jako jeden z nejhojnějších mikroorganismů ve střevech kojenců a dospělých (42,43), hraje klíčovou roli v lidském střevním mikrobiomu a prokázalo se, že má řadu příznivých účinků na imunitní systém (44–46).

Studie na zvířatech a klinické výzkumy potvrdily schopnost *Bifidobacterium longum* snižovat příznaky střevního zánětu (47). Tento mikroorganismus chrání střevní epiteliální bariéru, udržuje tkáňovou strukturu a vyrovnává střevní mikrobiom, což vede ke zmírnění příznaků kolitidy (48). *Bifidobacterium longum* také produkuje aktivní metabolity (42), které přispívají k celkovému zdraví hostitele.

Regulací rovnováhy imunitního systému, zlepšováním funkce střevní bariéry a zvyšováním produkce acetátu inhibuje *Bifidobacterium longum* zánětlivé procesy (50).

Tento druh bakterií je široce využíván jako probiotikum díky svým příznivým účinkům na zdraví hostitele a získal schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (51).

### **5.3.5 *Bifidobacterium adolescentis***

*Bifidobacterium adolescentis* je grampozitivní anaerobní bakterie nacházející se hojně v gastrointestinálním traktu lidí a dalších primátů (52). Je to jeden z nejhodnějších druhů rodu *Bifidobacterium* detekovaný v lidské populaci, zejména pak u dospělých (53).

Studie prokázaly jeho zdravotní přínosy, včetně ochrany a zlepšení stavu při různých onemocněních, jako jsou jaterní (54) a metabolické (55) choroby, alergie (56), kolitida (57), artritida (58) a bakteriální infekce. *Bifidobacterium adolescentis* vykazuje protizánětlivé (59), anxiolytické, antidepresivní (60), antioxidační (61) a/nebo antivirové účinky (62).

Tato bakterie produkuje kyselinu octovou, kyselinu mléčnou a mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Dále přispívá k produkci kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (63), neurotransmiteru snižujícího stres a úzkost, a některé kmeny mohou syntetizovat vitaminy skupiny B, jako je kyselina listová (64,65).

U některých kmenů byla prokázána schopnost zvyšovat růst všech bifidobakterií v gastrointestinálním traktu, což zvyšuje pozitivní zdravotní přínosy (43), důležité pro zdravé stárnutí (66). Existuje několik komerčně dostupných kmenů, u kterých vědecké studie potvrzují jejich zdravotní přínosy.

Stejně jako *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium adolescentis* získalo schválení Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (67).

## **5.4 Gnotobiologie**

Gnotobiologie je obor biologie, který se zabývá studiem živých organismů, které jsou od počátku svého života udržovány v prostředí, ve kterém je přesně známo složení jejich mikrobiomu. Termín „gnotobiotický“ pochází z řeckého „gnótos“, což znamená známý, a „bios“, což znamená život. Hlavním cílem gnotobiologie je zkoumání vztahů mezi živými organismy a jejich mikrobiomem, tj. souborem mikroorganismů (bakterií, archeí, hub, virů, a dalších mikroorganismů), kteří žijí v nebo na těle hostitele.

Gnotobiologie umožňuje kontrolu mikrobiálního prostředí živých organismů a zkoumání vlivu těchto mikroorganismů na různé aspekty hostitelské biologie, včetně imunitních reakcí, vývoje, metabolismu a střevního mikrobiomu. Tímto způsobem může gnotobiologie poskytnout hlubší pochopení interakcí mezi hostitelem a jeho mikrobiomem a přispět k poznání významu mikroorganismů pro zdraví a choroby. Metody gnotobiologie zahrnují sterilní chov živočichů, selektivní kolonizaci specifickými mikroorganismy a manipulaci s mikrobiomem hostitele za účelem studia jeho vlivu na různé biologické procesy.

## 5.4.1 Experimentální zvířata

### 5.4.1.1 Historie experimentálních zvířat v gnotobiologii

V roce 1885 přišel Louis Pasteur s myšlenkou chovat zvířata bez mikrobů na čisté sterilní stravě od narození. Podle jeho názoru byl vzájemný vztah a závislost hostitele na bakteriích tak hluboký, že život bez mikrobů by se stal nemožným (68). Trvalo 10 let, než G. Nuttal a H. Thierfelder odchovali první bezmikrobní zvíře (morče) (69). Přestože bylo sterilní udržováno pouze po krátkou dobu (8 dní), dokázali, že život bez mikrobů je skutečně možný. Tento průkopnický experiment připravil cestu k bezmikrobnímu chovu jiných živočišných druhů, jako jsou mouchy, kuřata nebo hlodavci (70,71).

S technologickým pokrokem se izolátory pro chov bezmikrobních zvířat stále vylepšovaly, a po druhé světové válce byly založeny první dlouhodobé chovy myší, které byly kontinuálně chovány v bezmikrobních podmínkách (22–25).

Hlavní výhodou bezmikrobních systémů je možnost opětovné kolonizace střeva jednotlivými druhy mikroorganismů nebo definovanými směsnými populacemi, čímž vznikají takzvaná gnotobiotická zvířata: monoasociovaná, oligoasociovaná nebo konvenčně asociovaná, podle složitosti použitých mikrobiálních konsorcií (72–75). Tímto způsobem je možné zkoumat vliv mikroflóry na různé fenotypické znaky u hostitele a testovat, zda jsou fenotypové vlastnosti přenosné transferem mikrobiomu (např. obezita). Důležité je, že gnotobiotický systém umožňuje nahlížet na mikrobiotu jako na celou komunitu nebo na její různé složky jednotlivě.

### 5.4.1.2 Od bezobratlých modelů k obratlovcům

Bezobratlý model má sice mnoho nesporných výhod pro výzkum, ale pro studie hypotéz relevantní k člověku nejsou dostatečné. Člověk má ve srovnání s bezobratlými modely mimo jiné mnohem složitější mikrobiom zahrnující jak aerobní, tak anaerobní mikroorganismy, rozdílné fyziologické procesy a adaptivní imunitní systém.

V tomto ohledu jsou relevantnější modely obratlovců, jako je *Danio rerio*, *Mus musculus* nebo *Sus scrofa*. Díky nedávným pokrokům v gnotobiologii je lze zbavit mikroorganismů, přičemž každý modelový organismus má své specifické výhody. Rozdíly jsou v generační době chovu, možnostech osazení mikrobiálním společenstvem a také v nákladech na chov (76).

Myš je v současné době nepoužívanější model nejen v klasickém biomedicínském výzkumu, ale také v gnotobiologii. Současně je nejrozšířenějším savčím modelovým organismem, který byl chován v izolátorech po řadu generací ve velkém měřítku (77). Navíc existence myších izogenních linií a výkonné genetické nástroje umožňují generování transgenních a knockout myší (78). To v kombinaci s dlouhodobým gnotobiotickým chovem umožňuje studovat široké aspekty vývoje a fyziologie savců v kontextu interakce hostitel–mikrobiom.

## 5.5 Somatotropní osa

U savců je růst mláďat regulován jak příjmem živin, tak aktivitou somatotropní osy (79).

Růstový hormon (GH) je uvolňován z předního laloku hypofýzy v pulzech a působí vazbou na svůj receptor v membráně cílových buněk v játrech nebo periferních orgánech (80). Tato vazba spouští signální kaskádu vedoucí k fosforylaci proteinů rodiny Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) a indukci transkripce genů regulovaných GH, jako je IGF-1 (81).

IGF-1 je hlavním mediátorem účinků GH. Současně inhibuje uvolňování GH negativní zpětnovazební smyčkou. V oběhu je IGF-1 spojen s proteiny vázajícími růstový faktor podobný insulinu (IGFBP) a podjednotkou labilní v kyselém (ALS) prostředí, které prodlužují jeho poločas odbourávání v cirkulaci a také regulují jeho signální aktivitu (82).

Inzulín je vedle IGF-1 považován za hlavní anabolický hormon těla (83), regulující metabolismus sacharidů, tuků a bílkovin a v důsledku toho i řadu dalších procesů, včetně metabolismu, vývoje a růstu (84). Inzulínová signalizační dráha je evolučně spojená s insulinu podobnými peptidy, které regulují metabolismus a růst a které se vyskytují už u nižších mnohobuněčných eukaryotních organismů jako jsou mouchy a červi (85).

Inzulin je uvolňován z pankreatických beta buněk v reakci na postprandiální zvýšení hladin cirkulující glukózy (83) a inhibuje jaterní uvolňování glukózy z glykogenu. Umožňuje tak periferní vychytávání glukózy do svalových a tukových buněk.

Zatímco somatotropní osa má klíčový význam během růstu, je také nutná přesná regulace hlavních metabolických drah, aby se všem rostoucím tkáním poskytly substráty a energie koordinovaným způsobem.

Při proteinové podvýživě nebo hladovění je buněčná signalizační dráha GH inhibována, hladiny IGF-1 klesají a negativní zpětná vazba na produkci GH je narušena. To vede ke zvýšení hladin GH v oběhu a jedinci vstupují do udržovacího režimu v rámci boje o přežití. Současně se také snižují cirkulující hladiny inzulinu, aby se udržely hladiny cirkulující glukózy u podvyživených jedinců (86).

Zdá se, že stav odolnosti vůči GH je adaptivní reakcí na podvýživu za účelem udržení euglykémie a zachování energie. Mechanismy těchto účinků jsou však stále nejasné (87).

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Materiál

#### 6.1.1 Bakterie

Dva druhy rodu *Bifidobacterium*, konkrétně kmeny *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* z české sbírky mikroorganismů (CCM) 7952 (BI 367), *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* sbírky mlékárenských mikroorganismů (CCDM) 372 (BI 372), *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). Kmeny byly izolovány ze stolic zdravých dospělých a kojených dětí a poskytnuty díky spolupráci s profesorem Vojtěchem Radou z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze a s profesorem Jiřím Nevoralem, dříve působícím na Interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Tyto kmeny byly archivovány ve Sběrce kultur mléčných mikroorganismů v Praze a České sbírce mikroorganismů v Brně. Pro experimenty byly izoláty kultivovány v De Man–Rogosa–Sharpe (MRS) bujonu doplněném o 0,05 % L-cystein-hydrochloridu (MRSC) při teplotě 37 °C v anaerobních podmínkách po dobu 48 až 72 hodin.

#### 6.1.2 Experimentální zvířata

Pro tento experiment byl využit myší model C57BL/6J, což je inbrední kmen, široce využívaný pro obecné experimenty, generování spontánních či indukovaných mutací, a je vhodný i pro transgenní a knockout genetické úpravy (Obrázek 4).

Myši C57BL/6J se vyznačují dobrou reprodukční schopností, dlouhou životností a nízkou náchylností k nádorovým onemocněním. Hematopoetické kmenové buňky z myši C57BL/6J prokazují výrazně zpomalené stárnutí ve srovnání s kmeny BALB/C a DBA/2J.

Tento inbrední kmen C57BL/6J byl vytvořen Dr. CC Little z páření samice 57 se samcem 52 z chovu slečny Abbie Lathrop. Stejně křížení vedlo k vzniku kmenů C57L a C57BR (88).



**Obrázek 4** - Myší model inbredního kmene C57BL/6J použitý v experimentu (88).

Všechny myši použité v experimentu byly samci C57BL/6J ve věku od 21. do 56. dne věku. Byly drženy v oddělených klecích v izolátoru a byly vystaveny cyklům 12:12 hodin světlo:tma. Jejich strava se skládala z experimentální diety ve formě pelet a měly k dispozici sterilní vodu *ad libitum*.

Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí pro pokusy na zvířatech Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky a byly provedeny v souladu s „Evropskou úmluvou o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely (CETS No. 123)“.

Pro tento experiment bylo použito následující počty myší na skupinu (**Tabulka 1**).

**Tabulka 1** - Počet použitých myší v tomto experimentu v dané skupině.

skupina	počet myší v experimentu
GF	7
Bl 367	9
Bl 372	11
Bad 368	14
Bad 373	13

### 6.1.3 Dieta

Pro pokus byla použita experimentální dieta s nízkým obsahem bílkovin a tuků ve formě pelet. Dieta byla získána upravením diety AIN93G (89), ve které bylo sníženo množství kaseinu (protein) z 17,7 % na 4,1 % celkové hmotnosti a sójového oleje (tuk) ze 7,2 % na 2 %. Současně došlo k navýšení množství škrobu tak, aby dieta byla izokalorická, tj. aby měla na 1 g stejné množství metabolizovatelné energie jako klasická dieta AIN93G.

Přesné zastoupení nutrientů a ingrediencí je uvedeno níže v tabulkách (**Tabulka 2**, **Tabulka 3**). Ve spolupráci s firmou Bioster, a.s. byla dodávána dieta sterilizovaná gama zářením (45 kGy).

**Tabulka 2** - Porovnání a informace o procentuálním zastoupení hlavních nutrientů v použité experimentální dietě ve srovnání s AIN93G dietou.

	Dieta AIN93G (% celkové hmotnosti)	Experimentální dieta (% celkové hmotnosti)	Dieta AIN93G (% kcal v dietě)	Experimentální dieta (% kcal v dietě)
Proteiny	17.7	4.1	20.3	4.7
Sacharidy	53.2	78.8	61.1	90.1
Tuky	7.2	2.0	18.6	5.3

**Tabulka 3** - Informace o jednotlivém zastoupení hlavních ingrediencí obsažených v AIN93G dietě a použité experimentální dietě.

Ingredience	AIN93G dieta [g/kg]	Experimentální dieta [g/kg]
kasein	200.0	46.0
L-cystein	3.0	0.7
kukuřičný škrob	249.486	533.94
maltodextrin	200.0	200.0
sacharóza	100.0	107.7
sójový olej	70.0	20.0
celulóza	130.0	50.0
minerální mix (AIN-93G-MX)	35.0	
minerální mix (AIN-93G-VX)	10.0	10.0
cholin bitartát	2.5	2.5
antioxidant (terciální butylhydrochinon)	0.014	0.01

## 6.1.4 Média, roztoky a činidla

### ❖ MRS agar

MRS agar, nebo také celým názvem De Man-Rogosa-Sharpe agar, je selektivní kultivační médium určené pro bakterie mléčného kvašení, tedy především pro rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Do 1000 ml destilované vody bylo přidáno 62 g MRS agaru (Oxoid, Hampshire, Velká Británie), pH odpovídá hodnotě  $6,2 \pm 0,2$  při 25 °C. Agar byl vysterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min.

### ❖ MRS bujón

MRS bujón je tekuté médium a je stejně jako výše uvedený MRS agar selektivní, tekutou, živnou půdou pro bakterie mléčného kvašení.

Do 1000 ml destilované vody bylo přidáno 52 g MRS bujónu (Oxoid, Hampshire, Velká Británie), pH odpovídá hodnotě  $6,2 \pm 0,2$  při 25 °C. Bujón byl vysterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 15 min.

### ❖ L-cystein

L-cystein je neesenciální aminokyselina charakteristická svou thiolovou skupinou – SH, která nejen, že se významně podílí na tvorbě bílkovin, ale pro naše účely je zásadní pro stabilizaci přiměřeného oxidačně-redukčního potenciálu.

Do vlažného MRS agaru i MRS bujónu bylo před kultivací asepticky přidáno 0,05 % L-cysteinu (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA).

### ❖ AERRANE 100 %

V experimentu byl využit AERRANE (Baxter BioScience s.r.o., Jevany, ČR), tekutina k inhalaci obsahující isofluran, což je celkové anestetikum spadající do kategorie halogenovaných etherů. Toto anestetikum je běžně používáno pro celkovou inhalační anestezii či analgezii. AERRANE byl v této práci využit k uspání myši před měřením a vážením v izolátoru, stejně jako k uspání před vykrvením a následnou cervikální dislokací.

### ❖ Roztoky pro Gramovo barvení:

- Krystalová violeť (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
- Lugolův roztok (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
- Odbarvující roztok (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
- Safranin (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)



❖ **komponenty pro histologii:**

- 4 % roztok paraformaldehydu ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (4 % PFA/PBS)
- Histoalkohol 99,99 % (Bamed, Litvínovice, ČR)
- Neoclear-histovax, 50:50
- Histowax (Bamed, Litvínovice, ČR)
- Neoclear (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Uhličitan vápenatý (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
- Butanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Destilovaná voda
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Hematoxylin Gill (Bamed, Litvínovice, ČR)
- Eosin (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
- Jádrová červeň (DIAPATH, S.p.A., Martinengo, Itálie)
- Neomount-Mount (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)

❖ **Tissue-Tec O.C.T Compound (Sakura, Finetek, USA)**

❖ **Imerzní olej pro mikroskopii typ-F OLYMPUS (Edmund Optics, York, Velká Británie)**

❖ **PBS („phosphate buffered saline“, fosfátem pufovaný fyziologický roztok, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)**

❖ **PERSTERIL (OQEMA, Šenov, ČR)**

## **Pomůcky**

- ❖ Špičky na poloautomatické pipety Diamond for PIPETMAN (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- ❖ Diagnostické proužky do glukometru FreeStyle Lite (Abbott, Maidenhead, Velká Británie)
- ❖ Polypropylenové zkumavky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- ❖ Eppendorfy (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- ❖ Cryo vialky CryoKING (Biotech a.s., Praha, ČR)

- ❖ Mikrotitrační destičky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ Folie na překrytí ELISA destičky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ Nitrilové rukavice TITAN, X-GEN PLUS (Schoeller Pharma Praha, Praha, ČR)
- ❖ Anaerostat (Oxoid, Hampshire, Velká Británie)
- ❖ Skleněné ampule (P-LAB, Praha, ČR)
- ❖ Podložní sklíčka (P-LAB, Praha, ČR)
- ❖ AnaeroGen 2,5L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ Skleněné kuličky (P-LAB, Praha, ČR)
- ❖ Bakteriologická klička (P-LAB, Praha, ČR)
- ❖ Petriho misky 90 mm (GAMA GROUP a.s., České Budějovice, ČR)
- ❖ Stojánky (P-LAB, Praha, ČR)

### 6.1.5 Přístroje

- ❖ Váhy KERN EW2200-2NM (Kern&Sohn, Balingen, Německo)
- ❖ Váhy Precisa 40SM-200A (LABO - MS, spol. s r.o., Praha, ČR)
- ❖ Váhy BBI\_32 (BOECO, Hamburk, Německo)
- ❖ Váhy CB 501 (ADAM EQUIPMENT, Oxford, Velká Británie)
- ❖ Poloautomatické pipety FINNPIPETTE F1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ Časovač DUAL-TIMER C5080 (TFA Dostmann, Wertheim, Německo)
- ❖ Glukometr FreeStyle Lite (Abott, Maidenhead, Velká Británie)
- ❖ Digitálního posuvné měřítko FESTA 150/0,01 mm (Levior s.r.o., Přerov, ČR)
- ❖ Pipetus (HIRSCHMANN LABORGERATE, Eberstadt, Německo)
- ❖ Chlazená centrifuga Biofuge stratos, Heraeus instruments (Galileo, Nalón, Španělsko)
- ❖ Mrazící zařízení -21 °C (LIEBHERR, Bulle, Švýcarsko)
- ❖ Mrazící zařízení -23 °C (LIEBHERR, Bulle, Švýcarsko)
- ❖ Mrazící zařízení -80 °C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ❖ Mrazící zařízení -80 °C MDF-U73V (SANYO, Osaka, Japonsko)
- ❖ Chladící zařízení +8 °C (CALEX, Zlaté Moravce, Slovensko)

- ❖ Zařízení pro mikrovlnný ohřev (DAEWOO, Bupyeong, Jižní Korea)
- ❖ Termostat 37 °C (MEMMERT GmbH, Schwabach, Německo)
- ❖ Vortex (VELP SCIENTIFICA, Usmate Velate, Itálie)
- ❖ Mikroskop Leica DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo)
- ❖ Mikroskop OLYMPUS BX40 (Microscope central, Bustleton Pike, USA)
- ❖ Kamera OLYMPUS Camedia DP 70 (Microscope central, Bustleton Pike, USA)
- ❖ Mikrotom RM2245 (BARIA, Praha, ČR)
- ❖ Vodní lázeň W20 (VWR International, Radnor, USA)
- ❖ Mikroskop OLYMPUS CX21 (Microscope central, Bustleton Pike, USA)
- ❖ Kahan (P-LAB, Praha, ČR)
- ❖ ELISA reader Labsystems Multiskan RC 351 (Labsystems Diagnostics Oy, Vantaa, Finsko)
- ❖ Laminární box AURA 2000 (BIOAIR, Siziano, Itálie)
- ❖ Autokláv 3850ELCPV-D (TUTTNAUER, New York, USA)
- ❖ Výrobník ledové tříště (BREMA Group SpA, Milán, Itálie)
- ❖ Počítačka kolonií (ČSAV MÚ)
- ❖ Izolátor
- ❖ Software Olympus Quick Photo Micro 2,3
- ❖ Software GraphPad Prism 10.2.2
- ❖ Software Genesis 3.04
- ❖ Software LAS X
- ❖ Software Fiji 2.0.0

## 6.2 Pracovní postup

### ❖ Oživení bakterií a jejich kultivace

Nepatogenní kmeny bakterií *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367), *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372), *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373) byly zamraženy v kryozkumavkách a uchovávány při teplotě -80 °C.

Před samotnou prací byl laminární box sterilizován UV zářením a řádně vydezinfikován. Z kryovialky s konkrétním kmenem bakterie byl sterilní kličkou v blízkosti plamene přenesen její obsah do sterilního MRSC bujónu tak, aby nedošlo ke kontaminaci. Zkumavka s daným kmenem, řádně popsaná, byla uzavřena sterilní buničinou a ve stojánku předána do sterilního anaerostatu s AnaeroGene 2,5L sáčkem, čímž byly zajištěny anaerobní podmínky pro růst. Bakterie byla kultivována při teplotě 37 °C v termostatu po dobu 48 hodin do zakalení média. Takto oživená kultura byla ještě dvakrát přeočkována do sterilního MRSC bujónu a za výše zmíněných podmínek kultivována.

Narostlá kultura každého bakteriálního kmene byla v laminárním boxu sterilně přenesena do předem vyžíhané, již vychladlé, skleněné ampule. Natavením a vytažením hrdla ampule byla kultura sterilně zatavena. Ze zbytku narostlé kultury, naředěné pomocí desítkové ředící řady, byl ze zkumavek s ředěním  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  odebrán dvakrát 1 ml do dvou označených Petriho misek, jenž byl přelit teplým (ne horkým) MRSC agarem. Po zatuhnutí agarů byly plotny kultivovány za anaerobních podmínek v termostatu po dobu 48 až 72 hodin.

Po 48 až 72 hodinách byly plotny vyjmuty z anaerostatu z termostatu a byly spočítány narostlé kolonie, čímž bylo zjištěno i množství bakterií, jímž byly pokusné myši v izolátorech intragastrickou gaváží kolonizovány.

Takto bylo nakládáno s každým kmenem bakterie zvlášť. Mezi prací s různými kmeny byl vždy laminární box řádně vydezinfikován stejně jako vše, co by mohlo zapříčinit kontaminaci vzorků. Ve fázi získání finální podoby bakteriální suspenze pro osazení myši byl připraven preparát kultury pro vizualizaci, jak konkrétní kultura při osazování vypadá.

### ❖ Osazení myši v izolátoru

Okamžitě po vytvoření zatavené ampule s vykultivovaným bakteriálním kmenem byla ampule spolu se sterilní gavážovací sadou proložena do bubnu izolátoru, tento prostor byl postřikem vydezinfikován PERSTERILEM (=vyvážený roztok kyseliny peroxyoctové, peroxidu vodíku, kyseliny octové, stabilizátoru a vody), který se nechal 2 hodiny působit. Po uplynulých 2 hodinách bylo možné bezpečně a sterilně přenést ampuli s bakteriálním kmenem a gavážovací sadu do čistého prostoru izolátoru k myším.

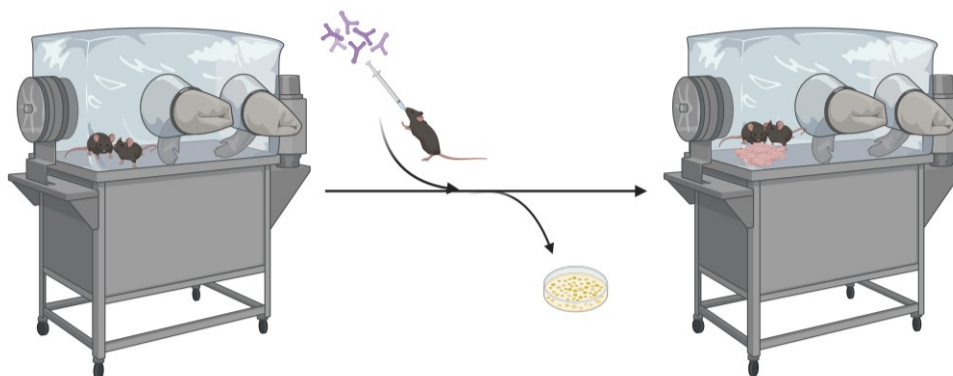
Každá myš v izolátoru (konkrétně dva dospělí samci a čtyři dospělé samice) byla uspána krátkou inhalací isofluranu. V době působení isofluranu byla myším zavedena intragastrická sonda, pomocí níž bylo každé myši aplikováno 0,2 mililitru (BI 367, BI 372) nebo 0,1 mililitru (Bad 368 a Bad 373) bakteriální suspenze. Výpočtem byla zpětně zjištěna koncentrace jednotek

tvořící kolonie z anglického „Colony Forming Units“ (CFU), kterou byly jednotlivé skupiny myši osazeny. Konkrétně skupina BI 367 byla osazena koncentrací  $5,8 \times 10^7$  CFU/dávku, BI 372  $1,32 \times 10^7$  CFU/dávku, Bad 368  $8,50 \times 10^6$  CFU/dávku a Bad 373  $8,50 \times 10^6$  CFU/dávku.

Po třech, sedmi a deseti dnech byly odebrány gnotobiotické myši výkaly pro kontrolu, zda jsou dané bakteriální kmeny schopné myši kolonizovat a v jakém množství. Jakmile bylo patrné, že je velikost osazení stabilní, tedy nijak významně nekolísá, bylo možné začít s připouštěním myši.

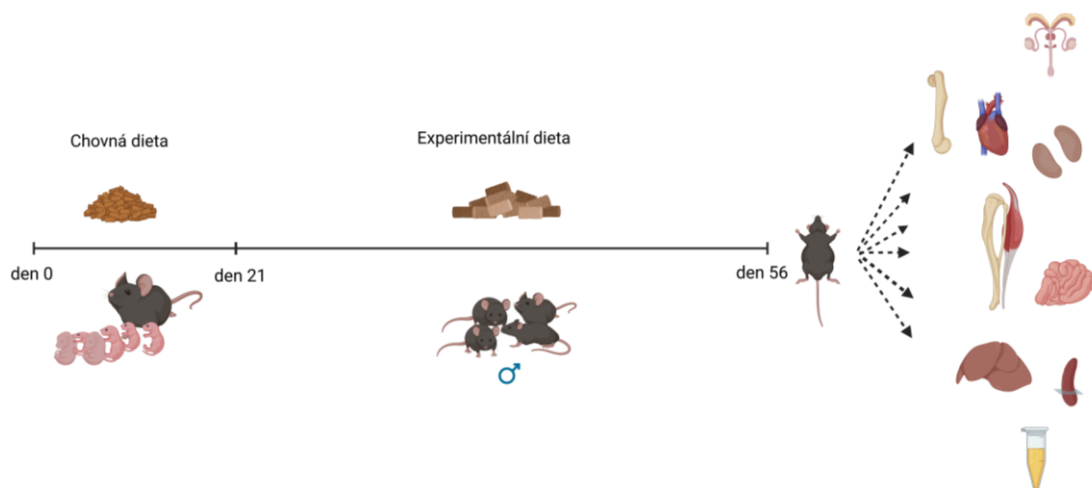
#### ❖ Návrh a schéma experimentu

Schéma experimentu je následující. Nejprve se zavedou sterilní izolátory s bezmikrobními myšmi, které se později osadí konkrétním kmenem bakterie. Během celého experimentu probíhá pravidelná kontrola kolonizace. Jakmile je potvrzeno dlouhodobé osídlení myši, samice jsou připouštěny (**Obrázek 5**).



**Obrázek 5** - Schéma osazení bezmikrobního chovu myši v izolátoru intragastrickou sondou daným kmenem bakterií. Při stabilní kolonizaci se začíná s připouštěním samic. Kontrolní skupina myši GF nebyla kolonizována žádným kmenem. Obrázek byl vytvořen programem BioRender.

Narozená mláďata zůstávají s matkou na chovné dietě až do 21. dne věku, kdy jsou samci odstaveni na experimentální dietu. Od 21. dne jsou myši pravidelně měřeny a váženy v týdenních intervalech. V 56. dni stáří experimentálních myši probíhá poslední měření a vážení myši, následuje jejich usmrcení a získávání vzorků pro další experimenty. Pro snazší orientaci je schéma experimentu názorně zobrazeno na následujícím obrázku (**Obrázek 6**).



**Obrázek 6** - Experimentální design práce. Ode dne narození myších mláďat jsou s matkou do 21. dne na chovné dietě. Od 21. dne věku jsou mladí samci odstaveni na experimentální dietu, kdy začíná samotný experiment s pravidelným týdenním měřením a vážením. Poslední měření a vážení probíhá v 56. dni., po němž jsou myši usmrceny a z myší jsou získávány vzorky pro další laboratorní stanovení. Obrázek byl vytvořen pomocí programu BioRender.

#### ❖ Měření, vážení

Průběh měření a vážení experimentálních myší byl systematický a standardizovaný. Měření a vážení probíhalo v týdenních intervalech od 21. do 56. dne věku myší. Všechny procedury byly prováděny za pečlivě stanovených podmínek a postupů. Před vstupem do izolátoru byly rukavice řádně dezinfikovány, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Postup měření a vážení zahrnoval následující kroky:

- Identifikace konkrétní myši podle značek na ocasu.
- Mírné uspání myši inhalací par isofluranu pro dosažení úplného uvolnění těla.
- Změření délky těla myši (od kořene ocasu po čenich).
- Změření délky ocasu (od špičky po kořen ocasu).
- Zvážení myši na vytárovaných vahách v kádince (tři opakování).
- Vrácení myši zpět do boxu společně s ostatními pokusnými myšmi stejného data narození.

Tímto postupem bylo zajištěno konzistentní a spolehlivé sběrové měření pro všechny zkoumané myši. Data z měření a vážení byla okamžitě a pečlivě zaznamenána a zaevidována v souladu s přesnými postupy a standardy.

#### ❖ Ukončení experimentu

Pelety a podestýlka byly odstraněny v 8 hodin ráno. Myši byly zváženy a byla jim změřena glykémie na lačno pomocí glukometru FreeStyle Lite (Abbott, Maidenhead) z kapky krve získané nástřihem ocasu. Po 5 hodinách hladovění byly myši uspány inhalací isofluranu, vykrvены nástřihem krční tepny a usmrceny cervikální dislokací. Všechna zvířata byla utracena během jedné hodiny mezi 13. a 14. hodinou. Srdce, slezina, játra, ledviny, slepé střevo, epididymální tuk a *musculus gastrocnemius* byly zváženy. Z toho epididymální tuk, *musculus gastrocnemius* a séra myší byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -80 °C pro případné další experimenty. Vzorky tenkého střeva byly zafixovány pryskyřicí a po zatuhnutí působením par tekutého dusíku byly zmrazeny a skladovány stejným způsobem jako předchozí vzorky při teplotě -80 °C. Část odebraných vzorků tenkého střeva byla fixována 10% roztokem pufovaného formalinu po dobu 24 hodin a následně uskladněny v 80% EtOH při 4 °C. Na konci experimentu byla provedena také měření délky holenní a stehenní kosti posuvným digitálním měřítkem.

#### ❖ Měření délky kostí

Po ukončení experimentu, v den 56, po odběru a zvážení všech vzorků určených k dalšímu zkoumání, byly myším odebrány holenní a stehenní kosti. Ty byly zbaveny svalů, úponů a kolenního kloubu, a následně byly změřeny pomocí digitálního posuvného měřítka FESTA 150/0,01 mm. Kostí byly uchovávány v chladu v 80% ethanolu.

#### ❖ Měření sérových faktorů

Krev odebraná na konci experimentu byla ponechána po dobu dvou hodin při pokojové teplotě, aby došlo k jejímu vysrážení. Poté byla séra oddělena centrifugací při 2 000 g po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Oddělené sérum bylo následně zmrazeno a skladováno při teplotě -80 °C až do použití pro analýzu hladiny IGF-1 a IGFBP3. Koncentrace IGF-1 byla stanovena pomocí myšího/kryšního kitu IGF-1 Quantikine ELISA od společnosti (Bio-Techne R&D Systems s.r.o, Praha, ČR), IGFBP3 byla měřena pomocí kitu Mouse IGFBP-3 ELISA (Bio-Techne R&D Systems s.r.o, Praha, ČR). Všechna stanovení byla provedena podle pokynů výrobce kitů.

#### ❖ Kontrola osazení z gnotobiotického myšího výkalu

Myším byly odebrány výkaly do zkumavek (sterilních, předem připravených v izolátoru), které byly co nejšetrnějším způsobem přeneseny přes buben tak, aby za žádnou cenu nedošlo ke kontaminaci izolátoru a vzorků.

Takto získané vzorky byly zváženy a dle výpočtu k nim bylo napipetováno úměrné množství PBS + 0,05 % L-cysteinu, v němž se pomocí sterilních skleněných kuliček a vortexu myší výkaly rozsuspendovaly.

Po získání suspenze byla za pečlivého měnění špiček vytvořena desítková ředící řada, přičemž původní suspenze je považována za ředění 10<sup>1</sup>. Ředícím roztokem řady je opět PBS + 0,05 % L-cystein.

Ze zkumavek, ve kterých byl očekáván počitatelný výsledek CFU/g výkalu, byl napipetován do označené Petriho misky jeden mililitr bakteriální suspenze a přelit teplým (ne horkým) MRSC agarem. Práce od zvážení myších výkalů po zalití agarem probíhá v předem vysvíceném a vydezinfikovaném laminárním boxu za dodržování zásad aseptické práce.

Po zatuhnutí agaru byly plotny kultivovány za anaerobních podmínek v termostatu po dobu 48 až 72 hodin. Všechna předpokládaná ředění byla vysévána v duplikátu.

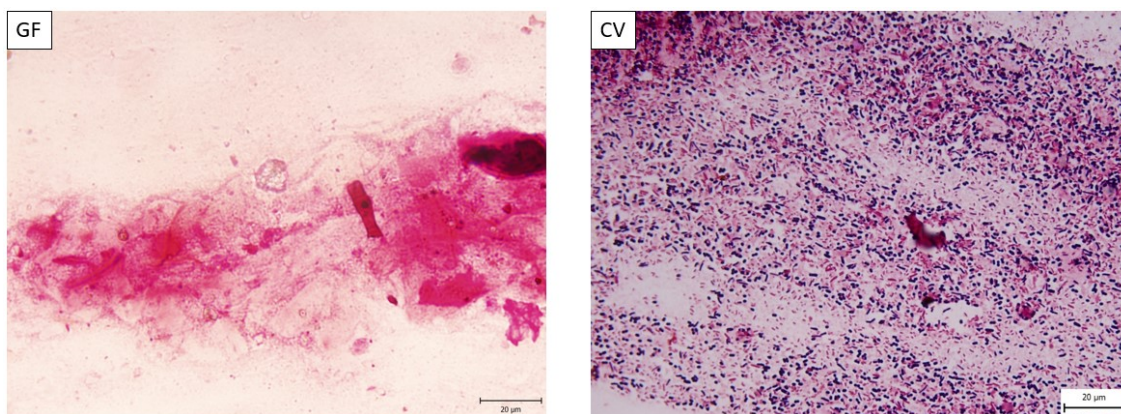
Po 48 až 72 hodinách byly plotny z anaerostatu vyjmuty a pomocí počítačky kolonií spočítány CFU na gram výkalu. Získaná data se zanesla do evidence kontrol osazení.

Kontrola osazení byla prováděna pravidelně ve dvou až třítýdenních intervalech, aby byl přehled o dlouhodobém stavu osazení myší v izolátoru. Stejně tak probíhala kontrola osazení pokusných myší v den 21 a 56. K těmto kontrolám se dělal i kontrolní preparát nátěrem výkalu.

#### ❖ Tvorba preparátu z myšího gnotobiotického výkalu

Stejně jako v předchozím bodu byl odebrán výkal do sterilní zkumavky a v ní bezpečně vyjmut z izolátoru. Zkumavka s naším vzorkem byla přenesena do sterilního laminárního boxu s připraveným náčiním. Myší výkal byl vyndán ze zkumavky a pomocí sterilní špičky rozetřen v tenké a pokud možno rovnoměrné vrstvě na sterilní popsané podložní sklíčko. Po zaschnutí nátěru byl preparát zafixován ožehnutím nad kahanem a následně obarven dle Grama pro následnou světelnou mikroskopii.

Fotografie preparátů v experimentální části této práce se mohou porovnat s následujícím obrázkem (**Obrázek 7**), kdy je nalevo zobrazeno, jak vypadá nátěr z výkalu bezmikrobní myši (GF) a napravo, jak vypadá preparát z výkalu konvenční myši (CV), tedy běžně osazené.



**Obrázek 7** - Fotografie preparátů nátěru gnotobiotických myších výkalů pro porovnání s nátěry výkalů monokolonizovaných myší ve výsledkové části (Obrázek 11-14). Vlevo vidíme preparát bezmikrobní myši (GF) a vpravo konvenční, tedy běžně kolonizované myši (CV), kde je patrné osazení směsí různých bakterií různých rodů, různého množství.



### ❖ Gramovo barvení

Barvení dle Grama je jedno ze základních diagnostických barvení v mikrobiologii, díky němuž se dá určit, zda se jedná o G+ či G- bakterii. Proces barvení je takový, že se na zafixované podložní sklíčko postupně nanáší barvicí/odbarvovací roztoky v následovném pořadí:

- krystalová violeť (30 s)
- Lugolův roztok (30 s)
- alkohol (tím opatrně smýváme, dokud odchází barva)
- opatrně opláchneme vodou
- safraninový roztok (1 minuta)

Po zaschnutí jsou preparáty s kapkou imerzního oleje pozorovány při 1000x zvětšení světelnou mikroskopií. Preparáty byly připravovány nahodile v průběhu chovu osazených myší a v den 21 a 56 stáří myší v experimentu.

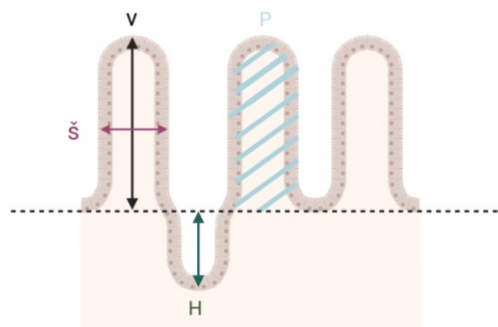
### ❖ Hodnocení preparátů

Obarvené preparáty byly hodnoceny mikroskopem Olympus BX 40 s kamerou Olympus Camedia DP 70 a následně byly zpracovány v programech Olympus Quick Photo Micro 2.3.

### ❖ Histologie a morfometrická analýza

Byly odebrány 1 cm dlouhé řezy jejuna experimentálních myší, fixovány ve 4% PFA/PBS při 4 °C. Následně byly zality do parafínu. Tkáně zalité v parafínu byly nařezány na 5 µm řezy, zbaveny vosku v xylenevé lázni a před barvením rehydratovány v roztocích se snižujícím se obsahem alkoholu. Dále byly obarveny kombinací barev hematoxylin a eosin za použití standardních technik.

Tkáně barvené hematoxylin-eosinem byly vizualizovány pod světelným mikroskopem Leica DM6000 (Leica) a snímky byly pořízeny pomocí software LAS X (Leica). Plocha klků (P), výška klků (V), šířka klků (Š) a hloubky krypt (H) byly měřeny pomocí Fiji 2.0.0 softwaru. Obarvené preparáty byly pozorovány mikroskopem Olympus BX 40. Fotky se snímaly kamerou Olympus Camedia DP 70 a následně byly zpracovány v programech Olympus Quick Photo Micro 2.3. Metodika měření je znázorněna následujícím obrázkem (**Obrázek 8**).



**Obrázek 8** - Způsob měření parametrů uvedených v grafech ve výsledkové části znázorňující rozmezí, v jakém byly parametry plocha klků (P), výška klků (V), šířka klků (Š) a hloubky krypt (H) byly měřeny softwarem Fiji 2.0.0 (Graf 19-22).

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

○ Zalítí vzorku do parafinu

● **Odvodnění tkáně**

100% ethanol I.	30 min	22 °C
100% ethanol II.	30 min	22 °C
100% ethanol III.	30 min	22 °C

● **Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín**

Histoalkohol-Neoclear (50:50)	30 min	22 °C
Neoclear I.	30 min	22 °C
Neoclear II.	30 min	22 °C
Neoclear III.	30 min	22 °C

● **Prosycení tkáně parafínem**

Histowax-Neoclear (50:50)	45 min	57 °C
Histovax I.	2 hod	57 °C
Histowax II.	4 hod	57 °C
Histowax III.	8 hod	57 °C

● **Vlastní zalítí do parafínu**

K vlastnímu zalítí byly použity papírové zalévací komůrky, do kterých se nalil parafín zahřátý na 57 °C. Do komůrky byla pinzetou přenesena tkáň. Tkáň byla podle potřeby orientována nahřátou pinzetou. Komůrka byla vložena do studené vody, aby parafín se vzorkem tkáně ztvdnul.

● **Krájení tkáňových bloků**

Když byl parafín dostatečně ztuhlý, zalévací komůrka se odstranila (papírová krabička se snadno sloupala). Parafínový bloček se přiřízl do tvaru obdélníku okolo tkáně. Takto připravená tkáň byla připevněna roztaveným parafínem k dřevěnému špalíčku. Poté byly na mikrotomu řezány příčné řezy o tloušťce 5 µm. Řezy se pokládaly na hladinu destilované vody, která byla prohřátá na 45 °C. Nakonec se štětce umísťovaly na podložní sklíčka. Preparáty se nechaly dva dny při pokojové teplotě zaschnout a poté se barvily hematoxylinem-eosinem.

○ Barvení preparátů hematoxilin-eosinem

K barvení se používají vodné roztoky barviv, a proto se musí řezy nejprve zbavit lipofilního parafinu. K odparafinování se používají dvě lázně Neoclearu (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) a dále sestupná koncentrační řada ethanolu, která slouží k převedení řezů do vody. Po vyprání řezů ve vodě se přistupuje k vlastnímu barvení. Obarvené řezy se dále odvodňují vzestupnou řadou vhodně koncentrovaného ethanolu a následně butanolem. Pokračuje se projasněním ve dvou lázních Neoclearu, a nakonec se řezy uzavřou (montují) do uzavíracího média.

• **Odparafinování**

Neoclear I.	5 min
Neoclear II.	5 min
ethanol 100%	5 min
ethanol 96%	5 min
voda	5 min

• **Vlastní barvení**

hematoxylin Gill	10 min
diferenciace v 80% ethanolu	opláchnutí
voda	opláchnutí
diferenciace v kyselém ethanolu (3–5 kapek HCl do 100 ml 96% ethanolu)	opláchnutí
praní v tekoucí vodě s 1 g uhličitanu vápenatého v květeř	
kontrola pod mikroskopem	
eosin	3-5 min
destilovaná voda	opláchnutí
kontrola pod mikroskopem	

• **Odvodnění**

ethanol 96%	opláchnutí
ethanol 100%	opláchnutí
butanol	5 min

• **Projasnění**

Neoclear I.	5 min
Neoclear II.	5 min

• **Uzavírání obarvených řezů**

Obarvené řezy se uzavřely mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média Neomount-Mount.

• **Výsledek barvení hematoxylin – eosinem**

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

## ❖ ELISA

ELISA z anglického enzyme-linked immunosorbent assay je imunoanalytická metoda používaná k měření koncentrace různých analytů (antigenů, hormonů, cytokinů apod.). Existuje několik variant této metody, včetně sendvičové ELISA, která byla použita v experimentu k určení hladiny IGF-1, IGFBP3 a inzulínu v séru myši. Princip této metody spočívá v následujících krocích:

- Navázání protilátky na dno mikrotitrační destičky
  - navázání protilátky probíhá pasivní adsorpcí na základě hydrofobních interakcí mezi nepolárními strukturami proteinů a povrchem destičky.
  - tento krok někdy bývá již připraven výrobcem
- Blokování volných vazebných míst roztokem PBS-Tween80-BSA
- Přidání vzorku a inkubace, během které vzniká vazba mezi antigenem a protilátkou
- Promývání
  - odstranění nenavázaného antigenu
- Přidání druhé protilátky, která váže stejný antigen, a zároveň je na ní kovalentně vázaný enzym
- Inkubace, promytí a tím odstranění nadbytečné protilátky s enzymem
- Přidání substrátu a sledování enzymatické reakce
  - nejčastěji užívaným enzymem je křenová peroxidáza, jejíž substrátem bývá peroxid vodíku
    - při jejich reakci se peroxid vodíku rozkládá na kyslík, který následně oxiduje bezbarvý chromogen, čímž vzniká barevný produkt
- Zastavení reakce a spektrofotometrické měření při vlnových délkách určených protokolem
  - zastavovacím roztokem bývá zpravidla silná kyselina
    - způsobí rychlou denaturaci enzymů
    - mění absorpční spektrum produktu
    - intenzita zbarvení produktu je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku

Sandwichový/Sendvičový komplex tedy vzniká tak, že se antigen naváže na specifickou protilátku zakotvenou na stěnách jamek mikrodestičky. Na antigen se v dalším kroku naváže konjugát, což je sekundární specifická protilátka značená enzymem. Konjugát pak v dalším

kroku reaguje s příslušným substrátem za vzniku barevného produktu. Míra zabarvení byla při vlnových délkách dle výrobce kitu spektrofotometricky změřena pomocí ELISA Readeru Labsystems Multiskan RC 351 (Labsystems Diagnostics Oy, Vantaa, Finsko).

Výsledky byly vyhodnoceny počítačovým programem Genesis. Pro každé měření bylo nutné ověřit kalibrační křivku vytvořenou programem a její linearitu v rozmezí koncentrací, ve kterém byly testovány neznámé vzorky.

### 6.3 Statistická analýza

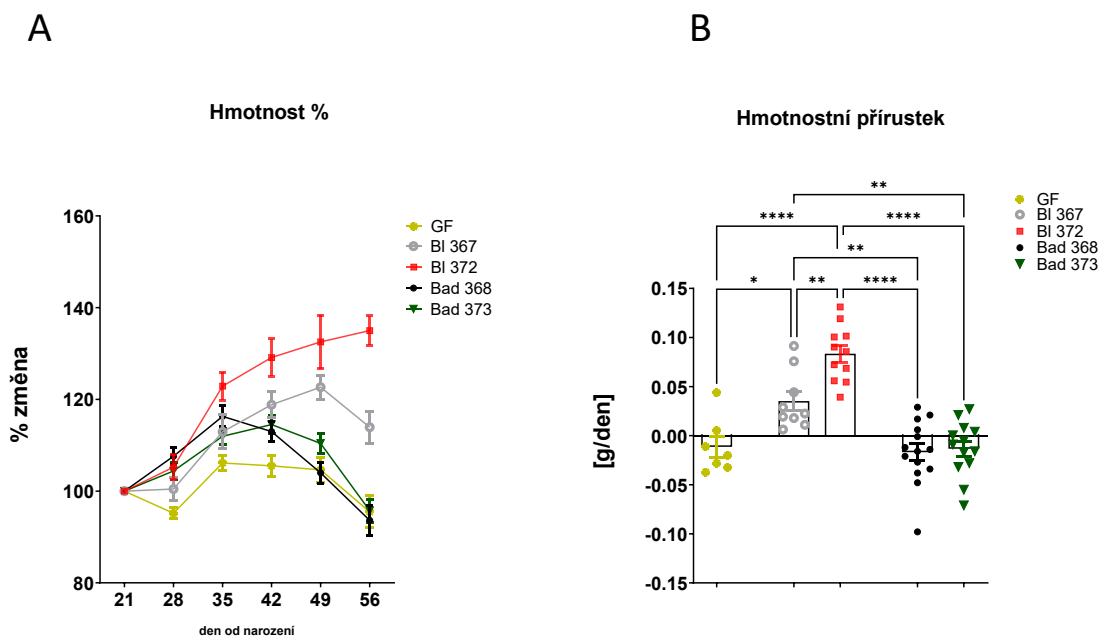
Pro srovnání mezi skupinami byla použita metoda Analýza rozptylu jednoduchého třídění (one way analysis of variance – ANOVA) společně s Tukey srovnávacím post-hoc testem. Analýza byla provedena pomocí softwarového programu GraphPad Prism 10.2.2. Všechna data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  standardní chyba průměru (SEM). Hodnota  $p < 0,05$  byla přijata jako statisticky významná a její přibližná hodnota byla v grafech znázorněna pomocí počtu hvězdiček \*.

*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$ .
****	$p < 0,0001$ .

## 7. VÝSLEDKY

Procentuální nárůst hmotnosti v průběhu experimentu v týdenních intervalech měření je zaznamenán v Grafu 1A. Ve srovnání s kontrolní skupinou vykazovaly myši monokolonizované bakterií BI 372 signifikantní zvýšení hmotnosti od 35. dne věku do dne ukončení experimentu. Ve 28. dni prokázala skupina Bad 368 signifikantní hmotnostní spurt ve srovnání s GF ( $p=0,0065$ ), od té doby již dále neprospívala a držela se nízkých hodnot kontrolní skupiny. V 35. dni je patrný signifikantní nárůst hmotnosti BI 372 oproti kontrolní skupině GF a Bad 373 ( $p=0,0022$ ;  $p=0,0297$ ), zatímco v dalších týdnech je vždy signifikantně těžší než kontrolní skupina GF a obě skupiny osazené druhem *Bifidobacterium adolescentis*. Konkrétně 42. den věku u GF, Bad 368 a Bad 373 ( $p < 0,0001$ ;  $p=0,0008$ ;  $p=0,0040$ ) a 49. den ve stejném pořadí ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p=0,0003$ ). V posledním dni experimentu nejen že kmen BI 372 prokázal zvýšení hmotnosti oproti kontrolní skupině ( $p < 0,0001$ ), oproti oběma kmenům druhu *Bifidobacterium adolescentis* 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ), ale také oproti skupině stejného druhu, ale rozdílného kmene, a to skupinou BI 367 ( $p=0,0007$ ). Při měření v 49. dni věku kromě výše uvedených rozdílů je patrný i signifikantní nárůst hmotnosti u kmene BI 367 ve srovnání s GF a Bad 368 ( $p=0,0282$ ;  $p=0,0034$ ) a v posledním dni experimentu stojí za zmínku vyjma výše zmíněného i významný rozdíl zvýšení hmotnosti kmene BI 367 oproti kontrolní skupině ( $p=0,0125$ ), a Bad 368 a 373 ( $p=0,0006$ ;  $p=0,0030$ ).

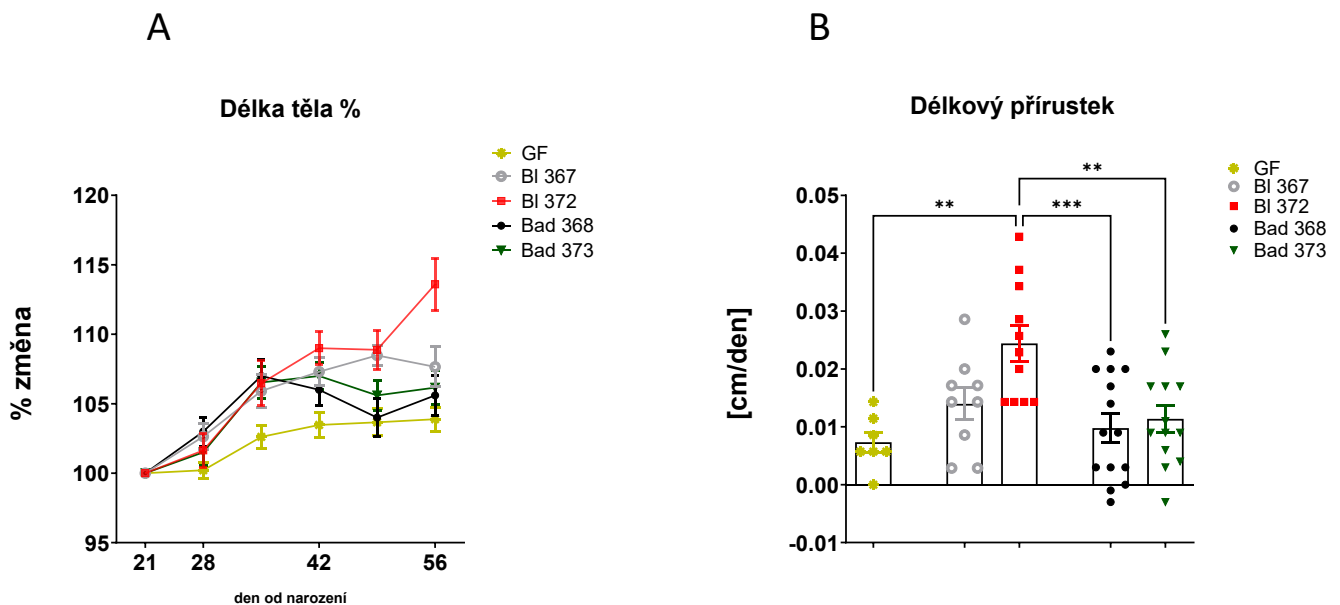
Pokud bychom hodnotili průměrné denní hmotnostní přírůstky v průběhu celého experimentu (Graf 1B), odpovídá stejnému trendu jako graf nalevo a můžeme pozorovat významný statistický nárůst hmotnosti kmene BI 372 vůči všem ostatním skupinám včetně kontrolní skupiny GF ( $p < 0,0001$ ). Stejně tak vidíme, že skupina BI 367 opět vykazuje vyšší hodnoty než GF ( $p=0,0243$ ), Bad 368 a 373 ( $p=0,0014$ ;  $p=0,0039$ ) a opět vidíme kmenovou specifitu v rámci druhu *Bifidobacterium longum*, která je statisticky významná ( $p=0,0062$ ).



**Graf 1** - Relativní změna váhy (A) a průměrný denní hmotnostní přírůstek (B) u experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Procentuální nárůst délky těla v průběhu experimentu v týdenních intervalech měření je znázorněn v Grafu 2A. Na rozdíl od procentuálního přírůstku na váze znázorněného v Grafu 1A se zde projevil významný rozdíl až v 42. den věku pokusných myší, a to konkrétně růst BI 372 ve srovnání s GF ( $p=0,0278$ ). O týden později byl signifikantní rozdíl mezi BI 372 a Bad 368 ( $p=0,0192$ ) a na konci experimentu, v den 56, mají myši skupiny BI 372 signifikantně vzrostlejší tělo jak ve srovnání s bezmikrobní skupinou GF ( $p=0,0021$ ), tak ve srovnání s oběma kmeny druhu *Bifidobacterium adolescentis* Bad 368 a 373 ( $p=0,0025$ ;  $p=0,0067$ ).

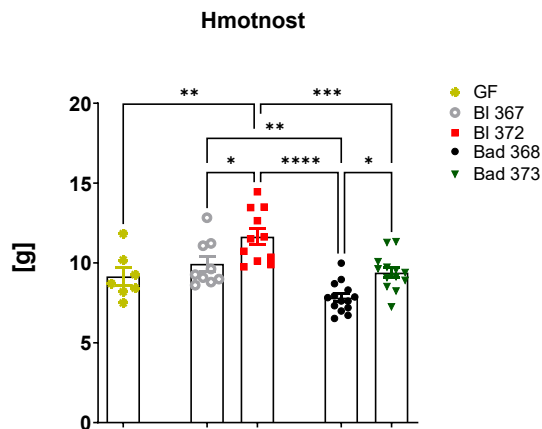
Při hodnocení průměrného denního přírůstku délky těla (viz Graf 2B) dospějeme k stejnému výsledku jako v den 56 předchozího grafu a to, že jak skupina BI 372 prokazuje signifikantně vyšší růst těla jak ve srovnání s bezmikrobní skupinou GF ( $p=0,0016$ ), tak ve srovnání s oběma kmeny druhu *Bifidobacterium adolescentis* Bad 368 a 373 ( $p=0,0011$ ;  $p=0,0056$ ). Statisticky významný rozdíl v rámci jednoho druhu tentokrát nebyl pozorován.



**Graf 2** - Relativní změna délky těla a průměrný denní délkový přírůstek u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

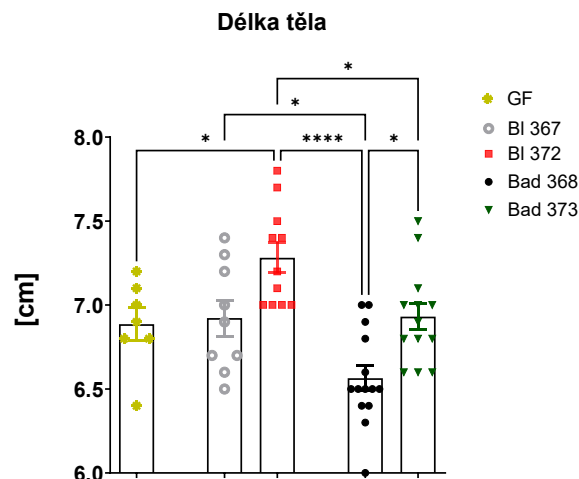
Z vážení myší v den 56 (viz Graf 3) vyplývá, že vyšší tělesnou hmotnost má ve srovnání s kontrolní skupinou GF pouze skupina myší BI 372 ( $p=0,0022$ ), týž efekt je pozorovatelný i ve srovnání s Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ;  $p=0,0010$ ). Rozdíl je i mezi skupinami myší BI 367 a Bad 368 ( $p=0,0034$ ). Zároveň můžeme pozorovat statisticky významnou diverzitu na úrovni kmenové specifiky u obou druhů, konkrétně mezi BI 367 a 372 ( $p=0,0414$ ) a také mezi Bad 368 a 373 ( $p=0,0232$ ).

Z výsledků zobrazených v Grafu 3 lze vyvodit, že docházíme k velmi podobným závěrům, jako nám ukazují předchozí grafy věnující se nárůstu délky těla experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.



**Graf 3** - Hmotnost experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.

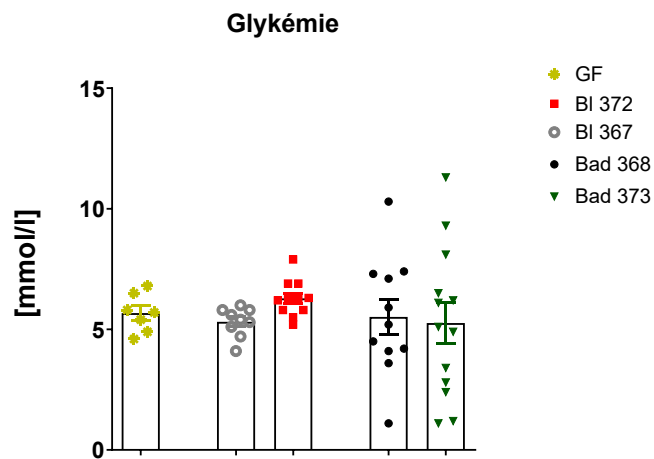
Z měření délky těla myší v den 56 vyplývá, že delší tělo ve srovnání s kontrolní skupinou GF vykazuje pouze skupina myší BI 372 ( $p=0,0500$ ). Skupina BI 372 jeví týž efekt i ve srovnání s Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ;  $p=0,0362$ ) (viz Graf 4). Patrný rozdíl je i mezi skupinami myší BI 367 a Bad 368 ( $p=0,0427$ ). Zároveň můžeme opět pozorovat statisticky významnou diverzitu na úrovni kmenové specifiky mezi skupinami Bad 368 a 373 ( $p=0,0153$ ).



**Graf 4** - Délka těla experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.

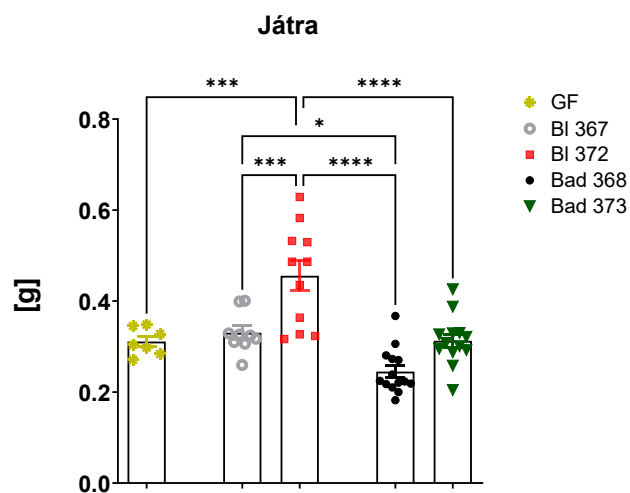


Hladiny glykémie nejeví jakékoliv významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami experimentálních gnotobiotických myší, jak je patrné z Grafu 5.



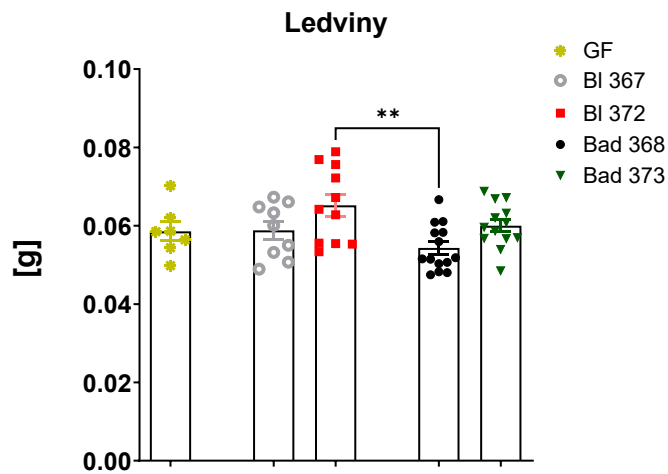
**Graf 5** - Hladina glykémie u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.

V Grafu 6 je možno pozorovat druhově i kmenově specifický vliv na hmotnost jater experimentálních myší v den 56. Nejen, že pozorujeme druhovou specifitu mezi nejvyšší hmotností jater BI 372 s oběma kmeny *B. adolescentis* ( $p < 0,0001$ ), ale opět můžeme pozorovat signifikantní kmenovou specifitu mezi jednotlivými kmeny *Bifidobacterium longum* 367 a 372 ( $p=0,0008$ ). Tentokrát pozorujeme vyšší hodnoty u BI 367 ve srovnání s Bad 368 ( $p=0,0333$ ). Ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF vykazují signifikantně vyšší hmotnost pouze játra experimentální skupiny osazené BI 372 ( $p=0,0003$ ).



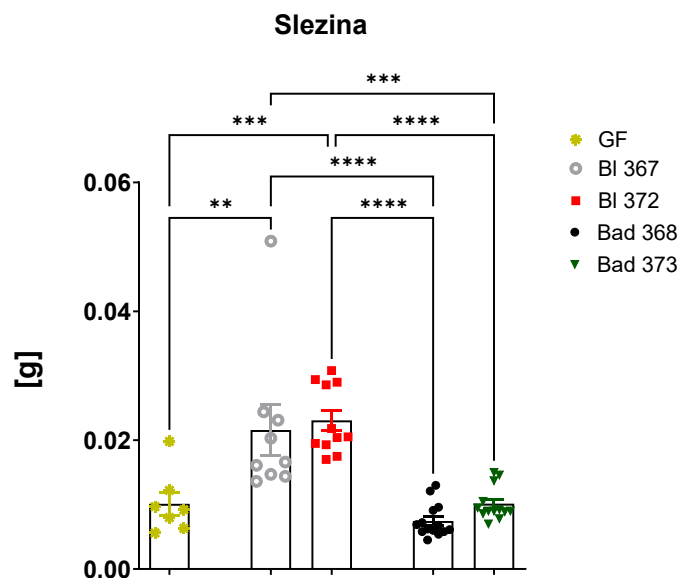
**Graf 6** - Hmotnost odebraných jater v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Na tomto grafu (Graf 7) je možné vidět významně vyšší hmotnost ledvin skupiny BI 372 ve srovnání s Bad 368 ( $p=0,0027$ ).



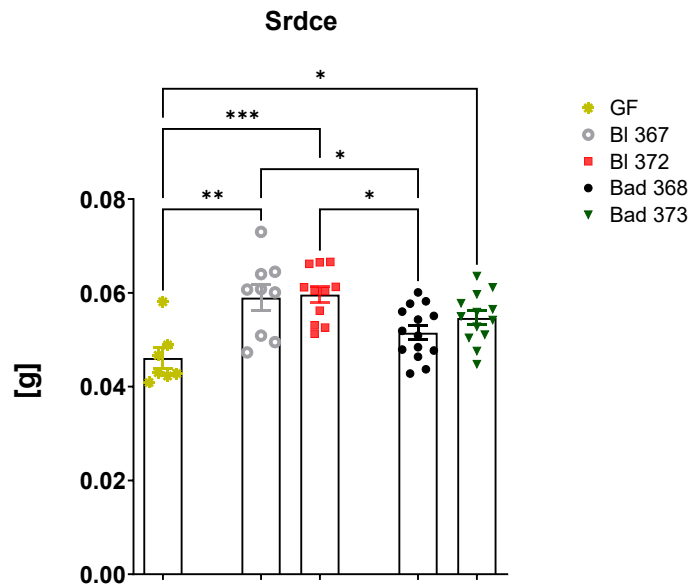
**Graf 7** - Hmotnost odebraných ledvin v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Jak je patrné v Grafu 8, ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF můžeme pozorovat vyšší hmotnost slezin u BI 367 i 372 ( $p=0,0026$ ;  $p=0,0003$ ). Dále pozorujeme významně vyšší hodnoty u BI 367 v porovnání s Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ;  $p=0,0004$ ), stejně tak jako BI 372 ( $p < 0,0001$ ).



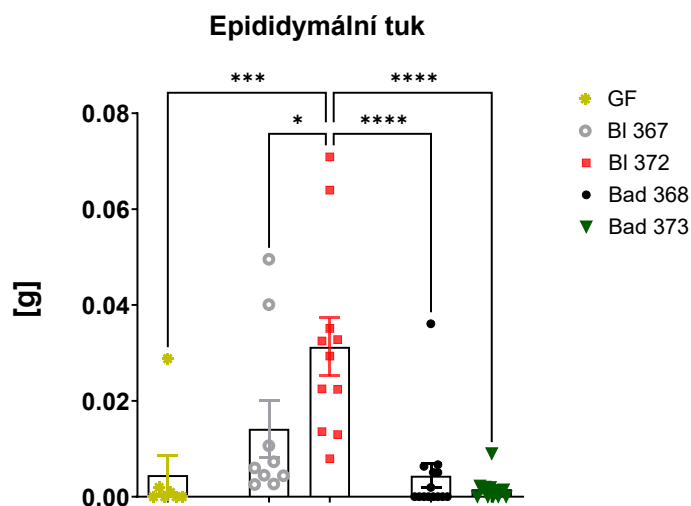
**Graf 8** - Hmotnost odebraných slezin v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

V případě měřených hmotností odebraných srdcí (viz Graf 9) pozorujeme v porovnání s kontrolní bezmikrobní skupinou GF experimentálních myší signifikantně vyšší hodnoty u skupin BI 367, 372 a Bad 373 ( $p=0,0011$ ;  $p=0,0003$ ;  $p=0,0337$ ). Dále můžeme tvrdit, že oba kmeny osazené *Bifidobacterium longum*, tedy BI 367 a 372, mají těžší srdce než Bad 368 ( $p=0,0463$ ;  $p=0,0148$ ).



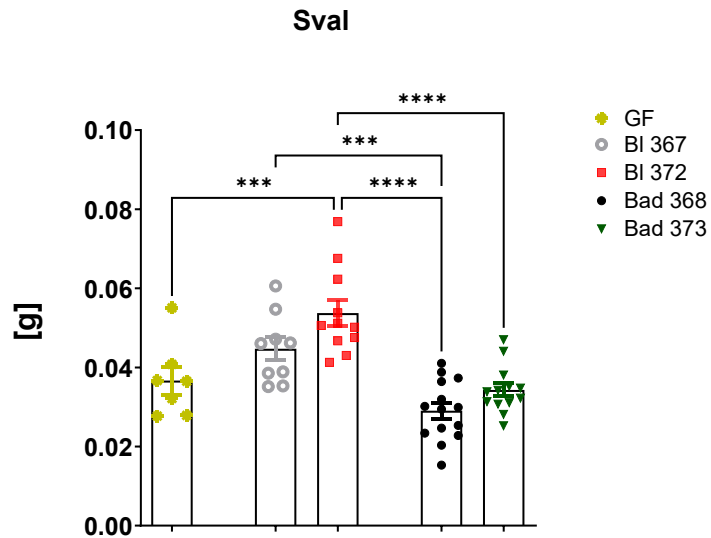
**Graf 9** - Hmotnost odebraných srdcí v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Hmotnosti odebraného epididymálního tuku byly všeobecně velmi nízké a je tak velmi těžké objektivně posoudit statistickou významnost, nicméně i přesto ji pozorujeme u BI 372 v porovnání s bezmikrobní skupinou GF ( $p=0,0010$ ), oběma kmeny Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ) a dokonce s BI 367 ( $p=0,0428$ ), kde můžeme odkazovat na kmenovou specifitu (viz Graf 10).



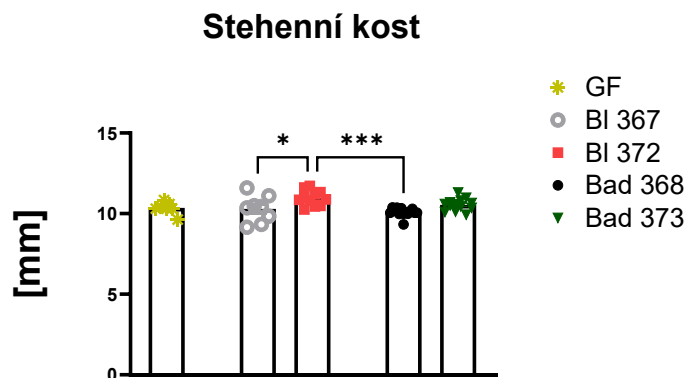
**Graf 10** - Hmotnost odebraného epididymálního tuku v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Hmotnost měřeného svalu skupiny BI 372 je signifikantně vyšší v porovnání s bezmikrobní skupinou GF ( $p=0,0010$ ) i s oběma skupinami osazenými kmeny *Bifidobacterium adolescentis*, tedy skupiny Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ). Významný rozdíl mezi hmotnostmi váženého svalu spatřujeme i mezi skupinou BI 367 a Bad 368 ( $p=0,0006$ ) (viz Graf 11).



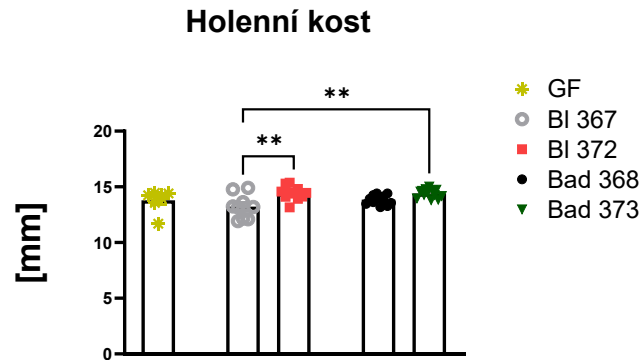
**Graf 11** - Hmotnost odebraného svalu, konkrétně svalu *musculus gastrocnemicus*, v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Nejvyšší hodnoty délky stehenní kosti, jak je patrné z Grafu 12, opět prokázala skupina gnotobiotických myši monokolonizovaných kmenem *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372). Signifikantní rozdíl byl pozorován ve srovnání se skupinou BI 367 ( $p=0,0278$ ) a Bad 368 ( $p=0,0003$ ).



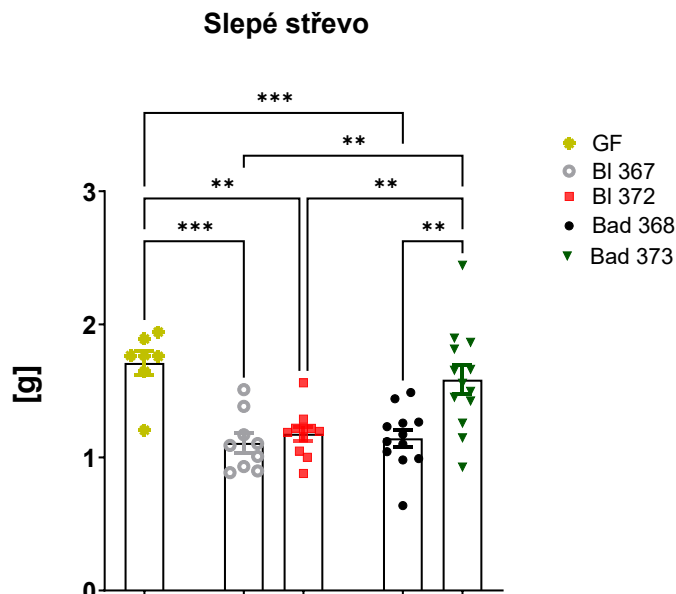
**Graf 12** - Délka stehenní kosti v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Stejně jako u délek stehenních kostí, i u holenních kostí dosáhla největších hodnot gnotobiotická skupina myší BI 372 (viz Graf 13), konkrétně ve srovnání se skupinou BI 367 se statistickou významností ( $p=0,0026$ ). Významný rozdíl byl pozorován i mezi skupinami BI 367 a Bad 373 ( $p=0,0019$ ).



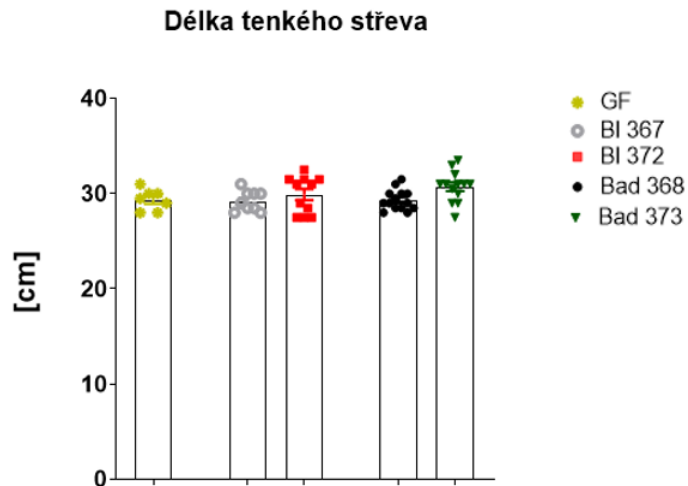
**Graf 13** - Délka holenní kosti v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

V Grafu 14 můžeme pozorovat signifikantně vyšší hmotnost slepého střeva kontrolní bezmikrobní skupiny GF ve srovnání s oběma skupinami monokolonizovanými *Bifidobacterium longum*, tedy BI 367 a 372 ( $p=0,0005$ ;  $p=0,0014$ ), a také ve srovnání s Bad 368 ( $p=0,0005$ ). Zároveň skupina Bad 373 prokázala zvětšené slepé střevo oproti skupině kolonizované kmenem Bad 368 ( $p=0,0014$ ), ale také oproti BI 367 a 372 ( $p=0,0014$ ;  $p=0,0047$ ).



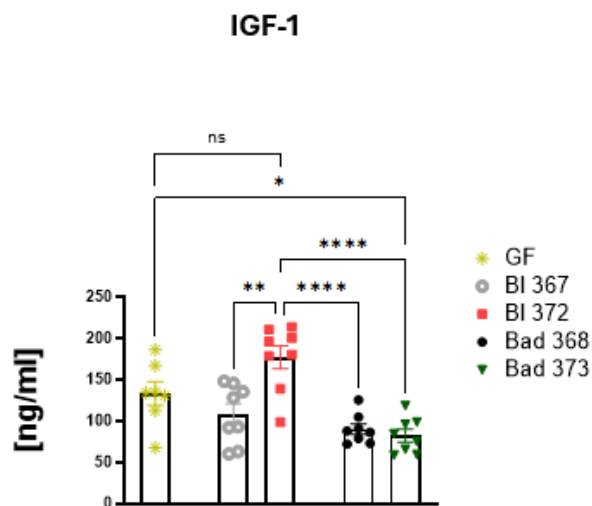
**Graf 14** - Hmotnost odebraného slepého střeva v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Měření délky tenkého střeva nevykázalo žádnou zásadní odlišnost mezi jednotlivými skupinami gnotobiotických skupin myší, jak je také patrné z Grafu 15.



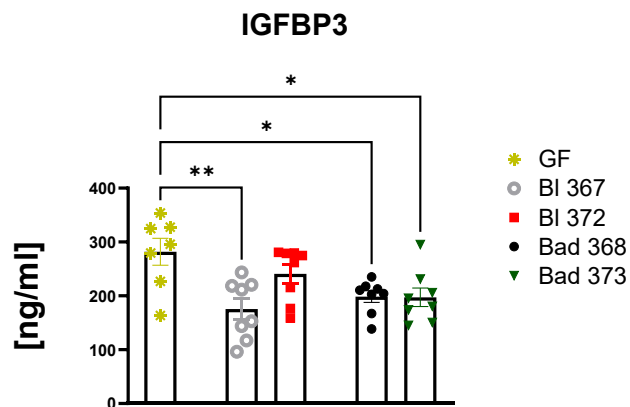
**Graf 15** - Délka tenkého střeva v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Cirkulující hladiny hormonu IGF-1, který je hlavním markerem aktivity somatotropní osy, nám ukazují, že skupina gnotobiotických myší BI 372 dosáhla nejlepších výsledků, a to jak v porovnání se skupinou myší BI 367 ( $p=0,0010$ ), tak s oběma skupinami monokolonizovanými *Bifidobacterium adolescentis*, skupinami Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ) (viz Graf 16). Při sledování odlišností mezi kontrolní skupinou GF a skupinou BI 372 sice signifikantní rozdíl nevidíme, ale velmi se mu přibližuje ( $p=0,0784$ ) – na grafu je toto porovnání vyobrazeno úsečkou označenou ns (not significant). Dalším významným prvkem jsou i vyšší hladiny IGF-1 u kontrolní skupiny GF v porovnání se skupinou Bad 373 ( $p=0,0280$ ). Stanovení bylo provedeno u 8 myší/skupinu, GF u 7 myší.



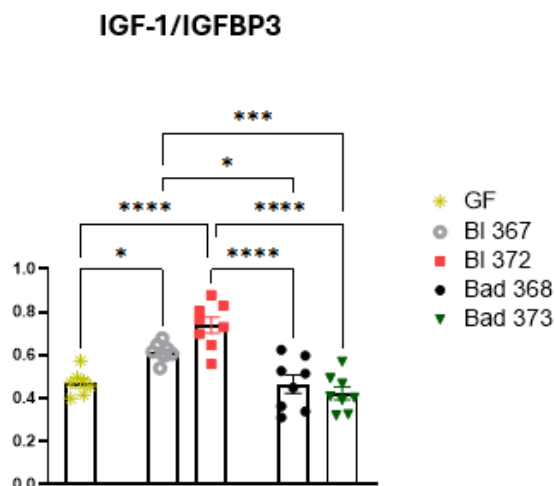
**Graf 16** - Hladina IGF-1 v séru gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Při srovnávání hladin IGFBP3 pozorujeme významně vyšší hladiny u bezmikrobní skupiny GF než u BI 367 ( $p=0,0026$ ) a Bad 368, Bad 373 ( $p=0,0261$ ;  $p=0,0229$ ) (Graf 17).



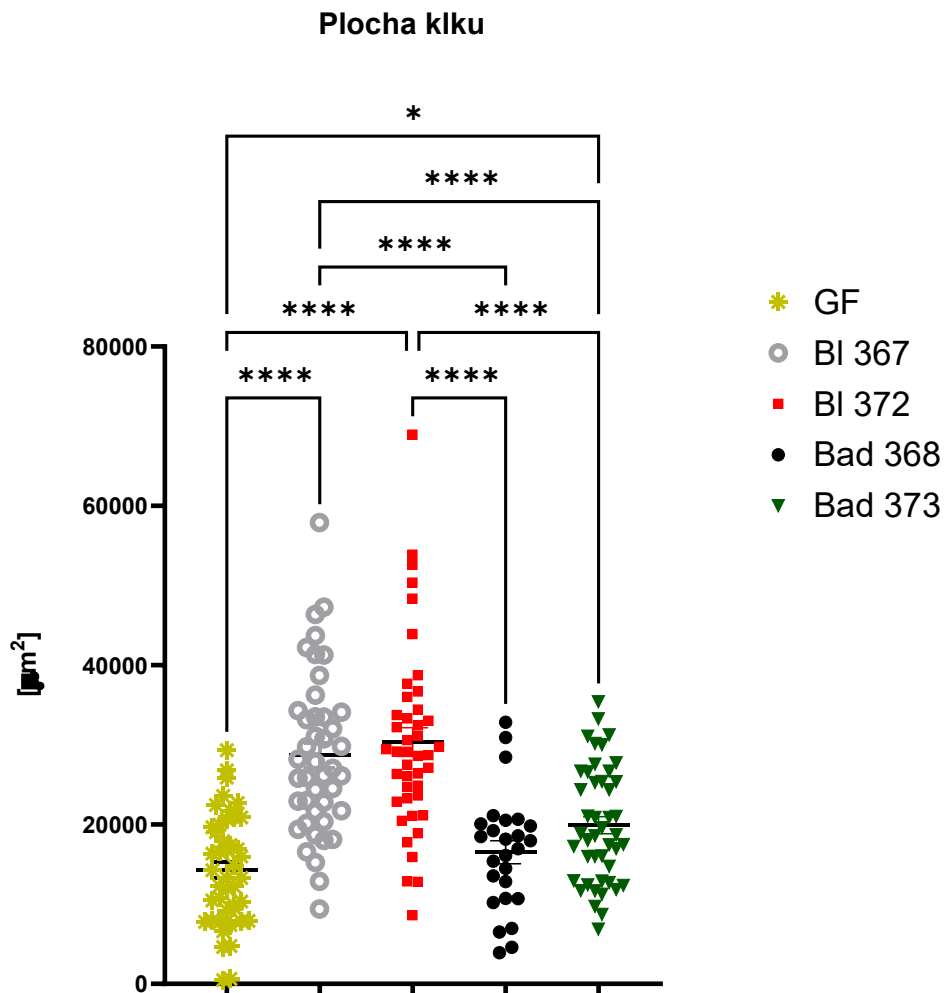
**Graf 17** - Hladina IGFBP3 v séru gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

Jak je patrné z Grafu 18, poměr IGF-1/IGFBP3 získaný výpočtem z hodnot IGF-1 a IGFBP3 jednoznačně ukazuje, že skupina myší BI 372 prokázala největší pozitivní vliv na růst podvyživeného jedince i na úrovni somatotropní osy, kdy má signifikantně vyšší hodnoty než kontrolní skupina GF a skupiny Bad 368, Bad 373 ( $p < 0,0001$ ). Dokonce i při srovnávání se skupinou BI 367 se velmi přibližuje statisticky významnému rozdílu ( $p=0,0515$ ). Kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367) také projevuje svůj příznivý vliv na růst i v tomto parametru. Nedosahuje sice tak vysokých hodnot jako BI 372, ale vykazuje významně vyšší hodnoty než kontrolní skupina GF ( $p=0,0224$ ) a skupiny Bad 368 a 373 ( $p=0,0126$ ;  $p=0,0008$ ). V porovnání s bezmikrobní skupinou myší GF tedy dosahují významně vyšších hodnot oba kmeny druhu BI, konkrétně BI 367 a BI 372 ( $p=0,0224$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Graf 18** - Poměr hladin IGF-1 a IGFBP3 ze séra gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

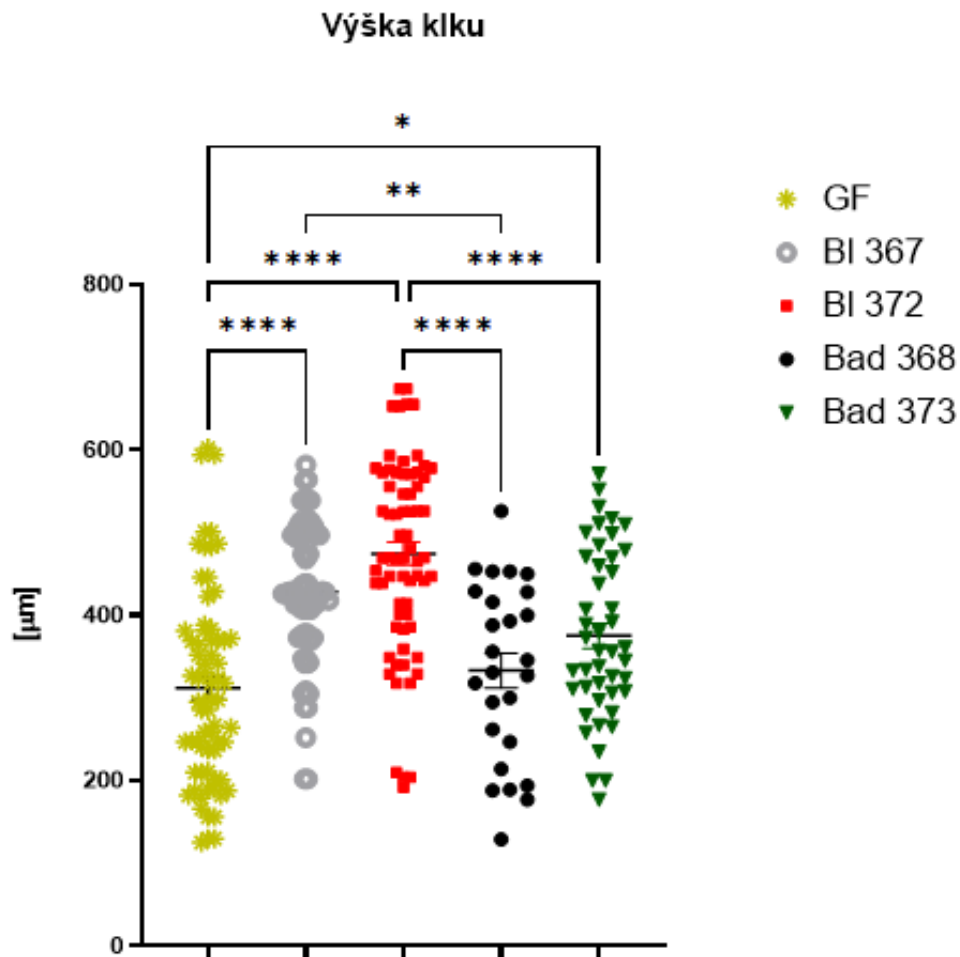
Při měření histologických preparátů byla získána data zobrazená v Grafu 19, z nichž vyplývá, že ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF jsou signifikantně větší plochy klků u BI 367, BI 372 ( $p < 0,0001$ ) a Bad 373 ( $p = 0,0285$ ). Největší plochu klků najdeme u skupiny BI 372, u níž můžeme tvrdit, že má významně větší plochu klků než GF i Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ). Stejný jev vykazuje i skupina BI 367 v porovnání s Bad 368 a 373 i GF ( $p < 0,0001$ ). Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými kmeny v rámci jednoho druhu nepozorujeme.



**Graf 19** - Histologicko-morfometrická analýza plochy klků tenkého střeva v oblasti jejunu gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.

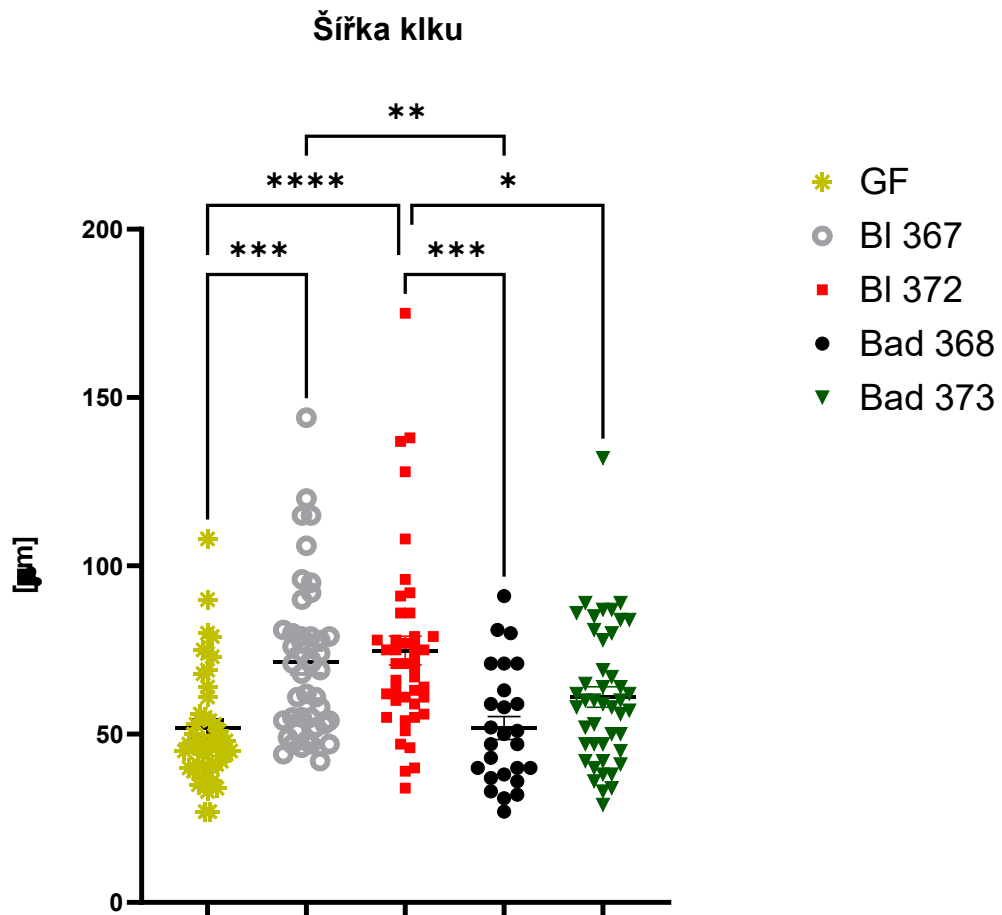


Graf 20 určující výšku klků experimentálních gnotobiotických skupin myši ukazuje, že ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF pozorujeme vyšší klky u BI 367, 372 ( $p < 0,0001$ ) a Bad 373 ( $p = 0,0174$ ). Patrné jsou vyšší klky skupiny BI 372 v porovnání nejen s GF, ale i s Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ). Skupina Bad 373 má tentokrát vyšší hodnoty pouze oproti GF. Skupina myši kolonizovaná BI 367 tentokrát vykazuje signifikantně vyšší hodnoty pouze ve srovnání s Bad 368 ( $p = 0,0013$ ). Odlišnost na úrovni kmenové specifiky opět nepozorujeme.



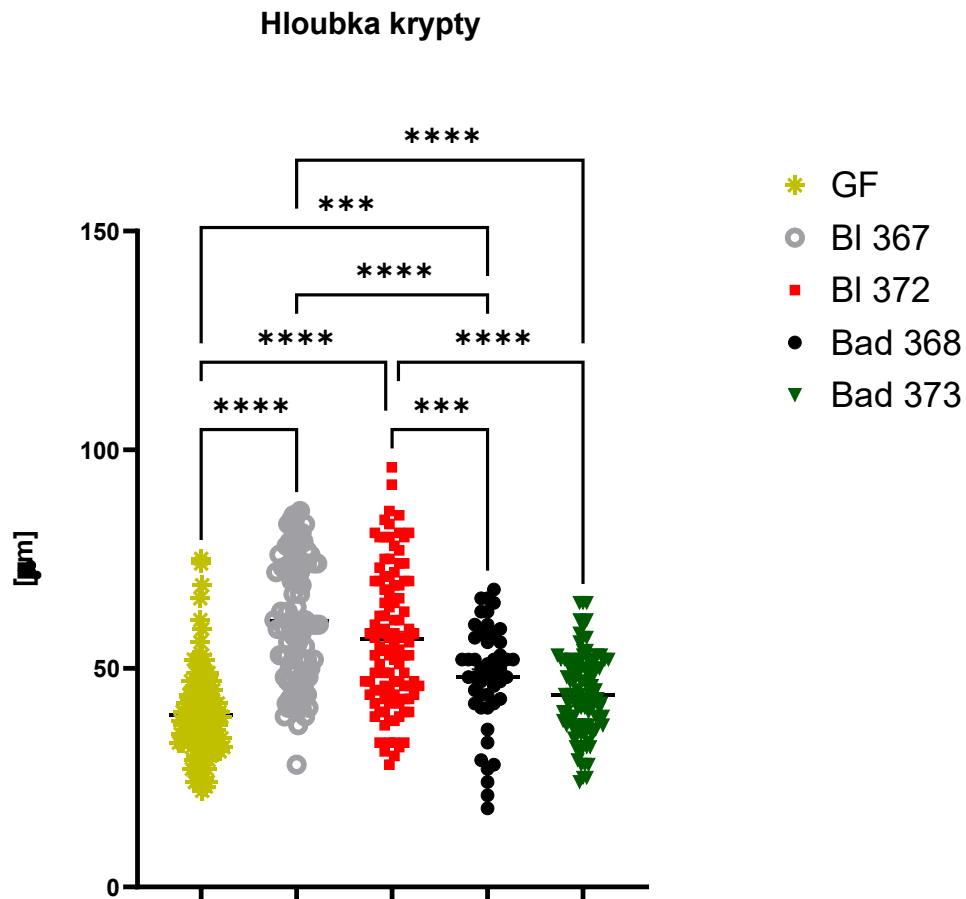
**Graf 20** - Histologicko-morfometrická analýza výšky klků tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Z Grafu 21 je patrné, že ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF vykazují širší klky střeva pouze skupiny BI 367 a 372 ( $p=0,0005$ ;  $p < 0,0001$ ). Patrný rozdíl pozorujeme i ve srovnání BI 372 oproti Bad 368 a 373 ( $p=0,0004$ ;  $p=0,0296$ ). Významně širší klky můžeme spatřit i u BI 367 v porovnání s Bad 368 ( $p=0,0039$ ).



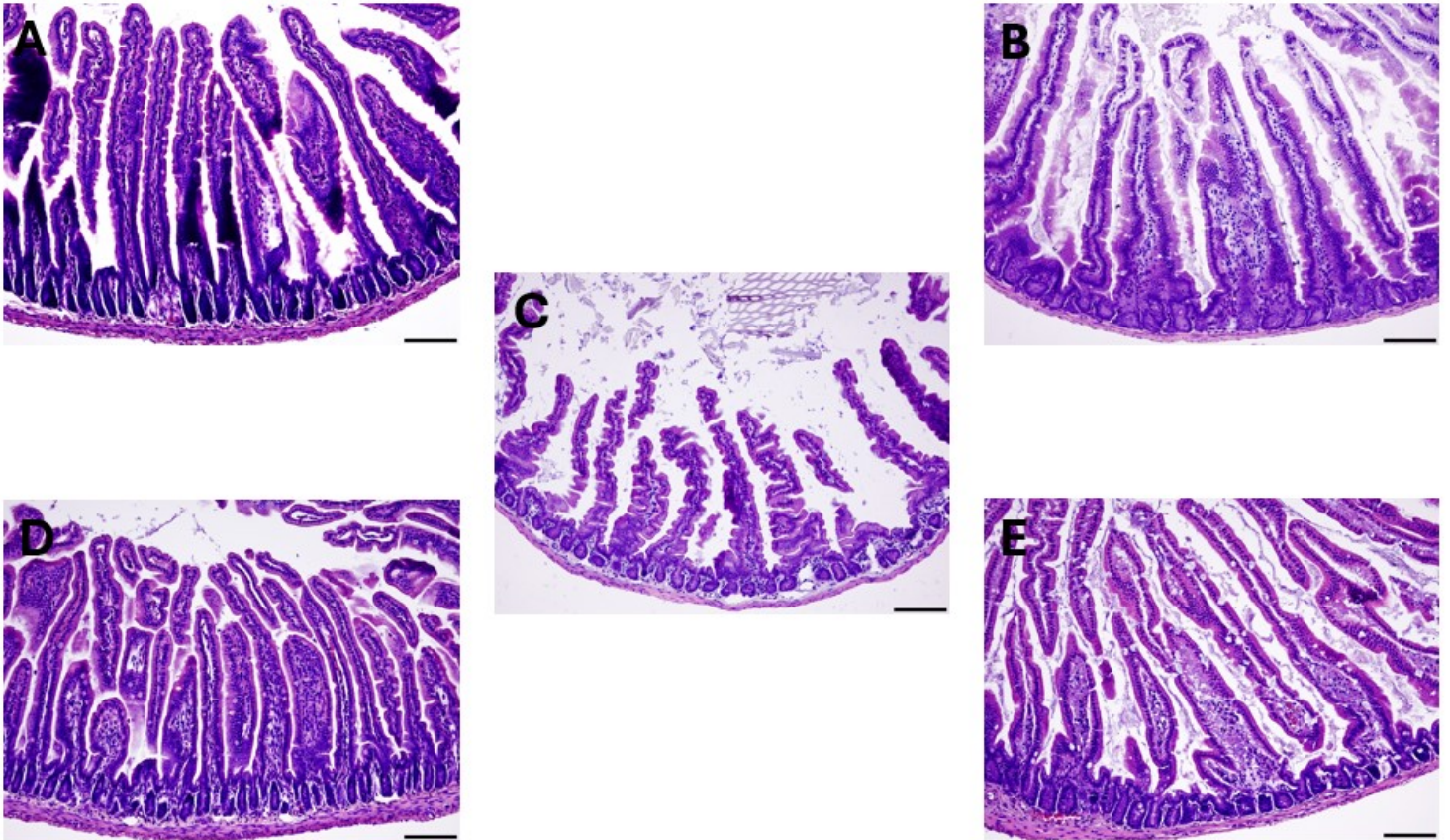
**Graf 21** - Histologicko-morfometrická analýza šířky klků tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Při měření histologických preparátů byla získána data zobrazená v Grafu 22, z nichž vyplývá, že ve srovnání s bezmikrobní kontrolní skupinou GF jsou významně hlubší krypty u skupin BI 367, BI 372 ( $p < 0,0001$ ) a Bad 368 ( $p = 0,0005$ ). Nejhlubší krypty nalezneme u skupiny BI 372, u níž kromě rozdílu s GF nalezneme odlišnou hloubku krypt i obou skupin osazených *Bifidobacterium adolescentis*, Bad 368 a 373 ( $p < 0,0001$ ). Stejný efekt vykazuje i skupina BI 367, pouze s jinou mírou signifikance ( $p = 0,0007$ ,  $p < 0,0001$ ). Kmenovou specifikitu ani zde nepozorujeme.



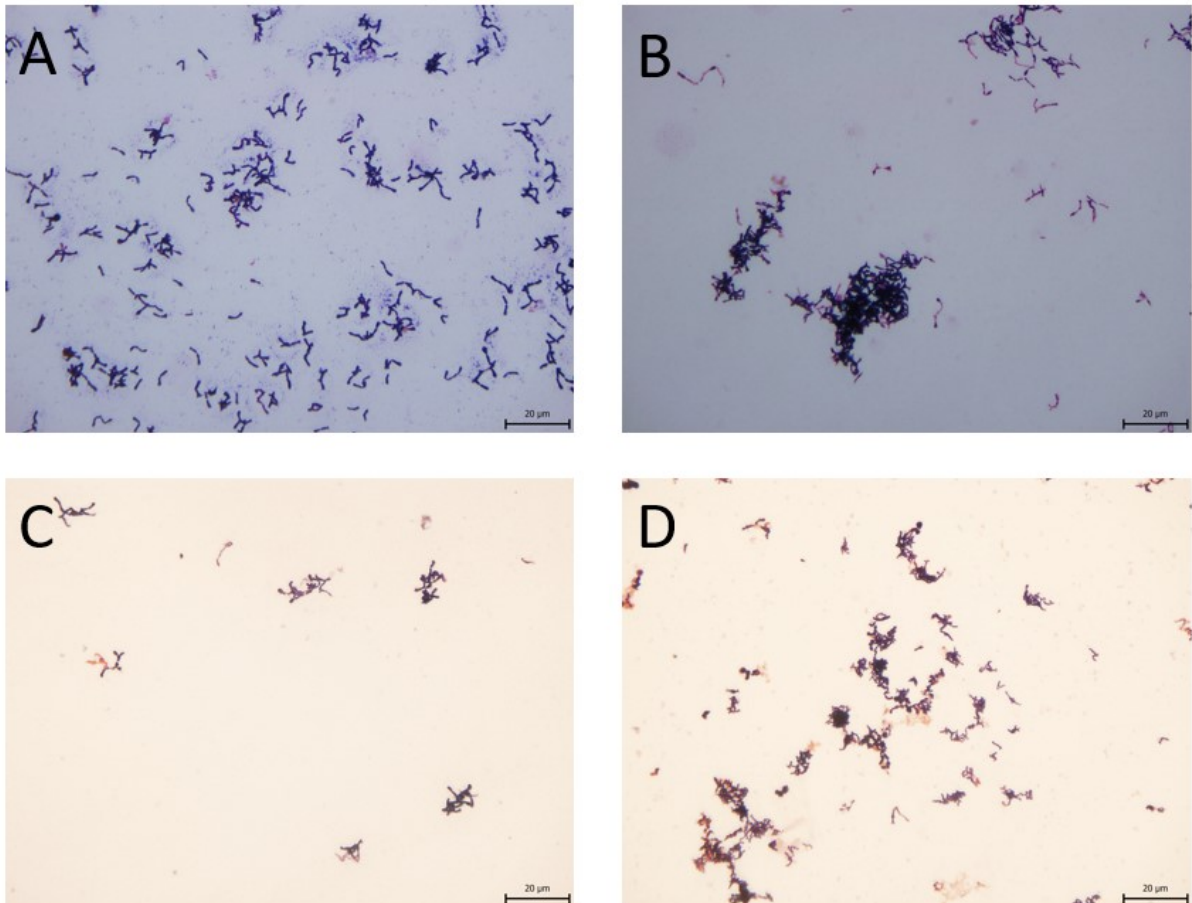
**Graf 22** - Histologicko-morfometrická analýza hloubky krypty tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myši na experimentální dietě.

Na následujících fotografiích histologických preparátů tenkého střeva, oblasti jejunum, můžeme pozorovat rozdíly (viz Obrázek 9) mezi jednotlivými skupinami experimentálních myší. Vzhledem k tomu, že byly myši vystaveny chronické podvýživě, nejsou klky tak ukázkové jako by byly u konvenčních myší na chovné dietě, ale i přesto můžeme pozorovat výše porovnávané parametry jako jsou plocha klku, výška klku, šířka klku a hloubka krypt (uvedené v Grafech 19-22).



**Obrázek 9-** Reprezentativní obrázky histologických preparátů příčného řezu tenkého střeva v oblasti jejunum gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě. Uprostřed, tedy preparát C, označuje bezmikrobní skupinu GF, se kterou je možné porovnávat preparáty A, B, D a E. Preparát vlevo nahoře (A) je ukázkou skupiny myší osazených BI 367, vpravo nahoře (B) skupiny kolonizované kmenem BI 372, vlevo dole (D) skupiny osazené Bad 368 a vpravo dole (E) myší osazených kmenem Bad 373. Preparáty jsou barvené hematoxylin-eosinem a černá úsečka na obrázcích značí měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

Na následujících obrázcích (viz Obrázky 10–14) je možné porovnat, jak jednotlivé kmeny bifidobakterií vypadaly při odebrání z kultury, následně jak vypadaly bakterie ve výkalu dospělého myšního hostitele na chovné dietě ve srovnání s tím, jak vypadaly po vystavení chronické podvýživě ve výkalech myši na experimentální dietě v den 56 věku.



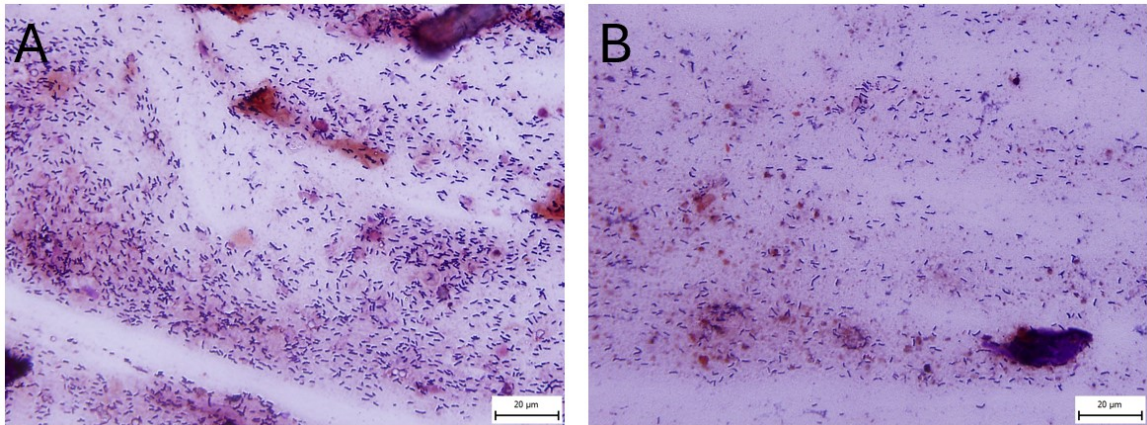
**Obrázek 10** - Kultury jednotlivých kmenů bakterií, jimiž byly původně bezmikrobní myši v izolátorech osazeny. Preparáty byly pro lepší viditelnost obarveny pomocí barvení dle Grama. Pozorovány byly pomocí imerze při 1000x zvětšení objektivu.

(A) Kultura bakterie *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367)

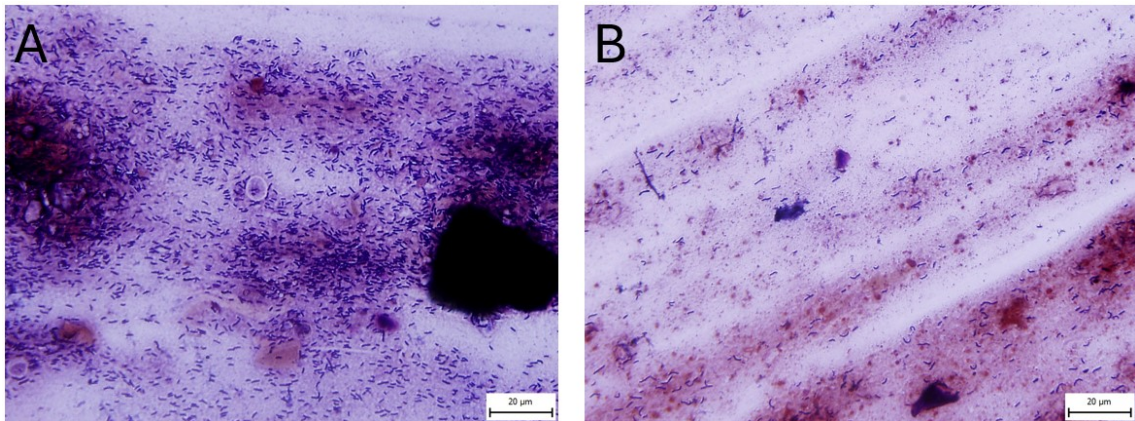
(B) Kultura bakterie *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372)

(C) Kultura bakterie *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368)

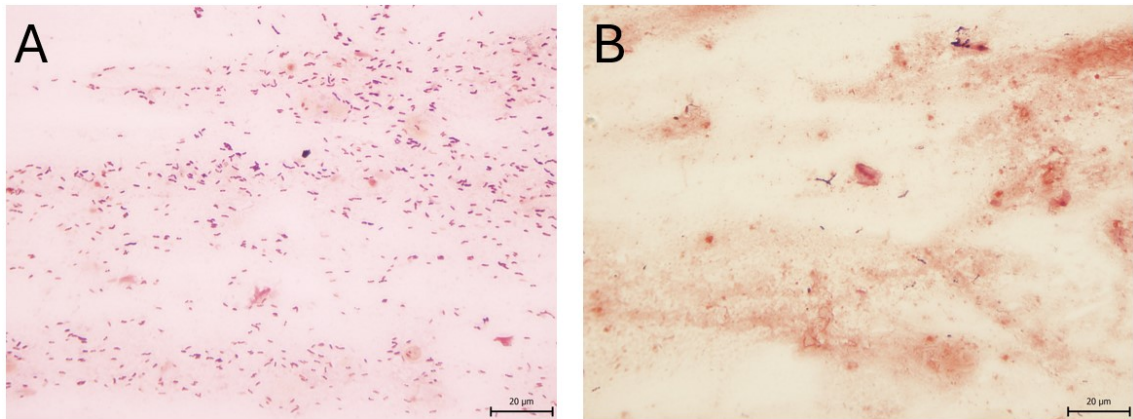
(D) Kultura bakterie *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373)



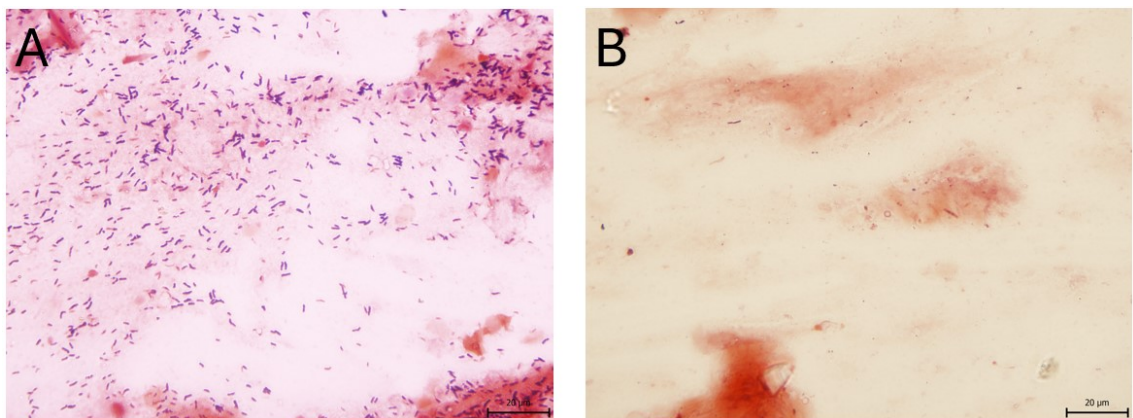
**Obrázek 11** - Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny BI 367, osazené *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367), obarvené dle Grama zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích můžeme pozorovat patrný rozdíl ve změně tvaru i množství bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B).



**Obrázek 12** - Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny osazené *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích je viditelný rozdíl ve změně tvaru i množství bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B).



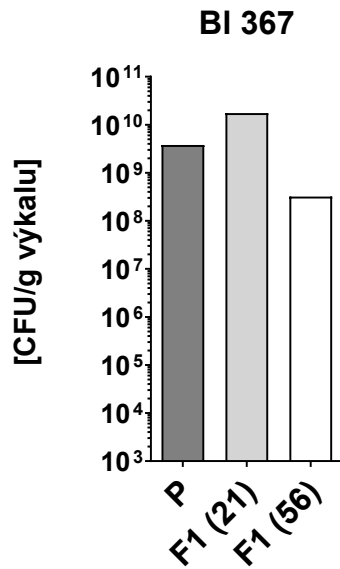
**Obrázek 13** - Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny Bad 368, osazené bakterií *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích je zřejmý rozdíl v deformaci tvaru i úbytku bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B).



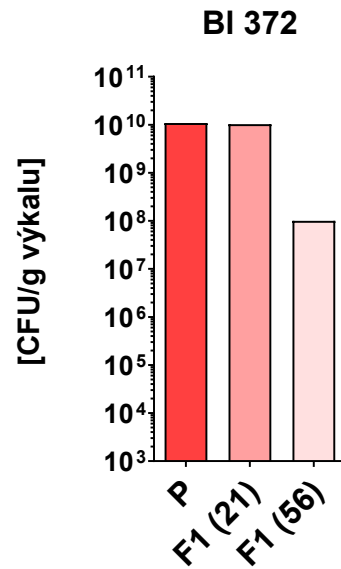
**Obrázek 14** - Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny Bad 373, osazené bakterií *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích můžeme i tentokrát pozorovat zřetelný rozdíl v deformaci tvaru i úbytku bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B).

Při pozorování následujících grafů A, B, C, D (Graf 23) můžeme sledovat úbytek CFU na gram výkalu u myši vystavených chronické podvýživě, tedy F1 generaci v den 56 věku, v porovnání s množstvím CFU na gram výkalu u rodičovské generace P na chovné dietě i F1 generaci v den odstavu, tedy F1 (21).

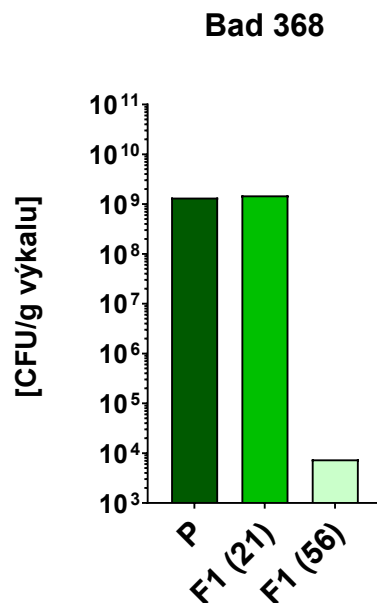
A



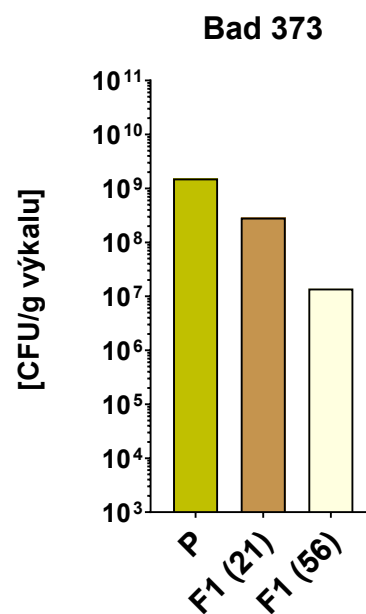
B



C



D



**Graf 23** - Počet CFU na gram gnotobiotického myšního výkalu. Zde je možné pozorovat zřetelné snížení koncentrace bakterií ve výkalu experimentálních myši v den 56 po chronické podvýživě (F1 (56)) ve srovnání s koncentrací osazení experimentálních myši v den odstavu (F1 (21)) a rodičovskou generací na chovné dietě (P).



## 8. DISKUSE

Globální zátěž dětskou podvýživou je alarmující. Souvisí s téměř polovinu všech úmrtí u dětí do 5 let (90). Podvýživa nejen, že vystavuje děti většímu riziku úmrtí na běžné infekce, ale zvyšuje také jejich četnost a závažnost a oddaluje jejich zotavení. Více než 18 milionů dětí ve výše uvedeném věkovém rozmezí je postiženo těžkou akutní podvýživou, nejextrémnější formou podvýživy. Předpokládá se, že je způsobena řadou faktorů, včetně velmi nízkého příjmu energie ve stravě či ztráty živin v důsledku infekce (91). Podvýživa je kromě akutního ohrožení života spojená také s dlouhodobým narušením růstu a kognitivního vývoje (92).

Současné přístupy k léčbě zahrnují léčbu širokospektrými antibiotiky a nutriční suplementací energeticky bohatými terapeutickými potravinami (14,93). Zatímco tyto přístupy snižují úmrtnost (94), mnoho dětí se potýká s přetrvávající středně těžkou akutní podvýživou a zůstávají tak v riziku relapsu těžké akutní podvýživy.

Současné studie zkoumají roli bifidobakterií, zejména pak *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, v patogenezi těžké akutní podvýživy jako možné formy probiotické léčby. Studie došly k závěru, že akutní podvýživa u kojenců a dětí je spojena s narušeným vývojem střevního mikrobiomu (12,95) a preklinické a klinické studie naznačují, že tento narušený společný vývoj střevního mikrobiomu a hostitele je jednou z příčin, nikoli pouze důsledkem akutní podvýživy (15,96).

V předchozích studiích na zvířecích modelech byl popsán podpůrný vliv laktobacilů na růst gnotobiotické mouchy octomilky (*Drosophila melanogaster*) (97) a dále vliv specifických kmenů bakterie mléčného kvašení *Lactiplantibacillus plantarum* WJL a NIZO2877, a na somatotropní osu v gnotobiotickém myším modelu chronické podvýživy (5). U myší, stejně jako u larev octomilky, byla popsána kmenová specifita *Lactiplantibacillus plantarum*.

Primárním cílem této práce bylo zjistit, zda mají i jiné bakterie mléčného kvašení, než je *Lactiplantibacillus plantarum* WJL, podpůrný vliv na somatotropní osu při chronické podvýživě. Dalším hlediskem, které bylo v rámci práce zkoumáno bylo, zda je možné pozorovat i kmenově či druhově specifické vlastnosti jednotlivých bifidobakterií. Vzhledem k tomu, že bifidobakterie jsou anaerobním mikroorganismem a nelze je tedy testovat v aerobním modelu mouchy octomilky, byli zvoleni gnotobiotičtí juvenilní samci myší v modelu experimentálně navozené chronické podvýživy. Kromě vlivu bakterií na růst podvyživených myší v průběhu experimentu bylo zkoumáno i další hledisko a to, jaký vliv má podvýživa na bakterie samotné.

V experimentální části diplomové práce byly testovány prorůstové vlastnosti čtyř kmenů rodu *Bifidobacterium* v gnotobiotickém myším modelu za podmínek experimentálně navozené chronické podvýživy. Kontrolou byla bezmikrobní skupina myší chovaná za stejných podmínek.

Konkrétně byly testovány tyto čtyři kmeny: *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367), *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372), *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). Tyto

kmeny byly izolovány ze stolic zdravých dospělých jedinců a kojených dětí a byly poskytnuty na základě spolupráce s profesorem Vojtěchem Radou z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky na České zemědělské univerzitě v Praze, a s profesorem Jiřím Nevoralem dříve působícím na Interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Ve všech zásadních zkoumaných aspektech prokázal druh *Bifidobacterium longum* příznivý vliv na růst podvyživených myší. Tento efekt byl často pozorován nejen v porovnání s kontrolní bezmikrobní skupinou GF, ale také v porovnání s oběma testovanými skupinami kolonizovanými kmeny druhu *Bifidobacterium adolescentis*. Dále bylo potvrzeno, že v podpoře nárůstu hmotnosti podvyživených myší pozorujeme kmenovou specifitu, kdy kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372) byl signifikantně prospěšnější než *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (BI 367). V dalších sledovaných parametrech jsme pozorovali stejný trend. Kmeny *Bifidobacterium longum* byly v předchozí práci Šrůtková a kol. (9) testovány na schopnost zmírnit zánět v myším modelu kolitidy. Potvrzena byla specifita mezi těmito kmeny, avšak jejich účinek v tomto modelu byl odlišný. Podávání kmene BI 367 bránilo rozvoji experimentální kolitidy, naopak kmen BI 372 neprokázal žádný efekt ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky podtrhují nezbytnost testovat probiotika na kmenové úrovni a pečlivě zvažovat jejich použití pro dané účely. Každý kmen probiotika je specifický a vhodnost jeho použití záleží na konkrétní aplikaci (98).

Aby bylo možné ověřit, že zlepšený růst není podmíněn jen větším množstvím bakterií ve střevech, byly porovnány grafy získané z kontrol osazení a byl formulován závěr, že míra kolonizace bakterií nesouvisí s jejím vlivem na podporu růstu hostitele.

Jak už bylo zmíněno výše, v hlavních sledovaných parametrech, tedy v podpoře hmotnosti a délky těla, prokázal kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372) největší efekt nejen ve srovnání s kontrolní bezmikrobní skupinou GF, ale i oběma skupinami osazenými kmeny *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). Dokonce ve směru schopnosti zvýšení hmotnosti potvrdil i kmenovou specifitu.

Dalšími pozorovanými parametry byly hmotnosti jednotlivých orgánů odebraných v den 56 věku myší. Sledovány byly hmotnosti jater, obou ledvin, slezin a srdce. Při sledování hmotnosti jater a slezin byl pozorován opět významný efekt kmene BI 372, a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou GF, tak i s oběma kmeny druhu *Bifidobacterium adolescentis*. U jater i slezin tedy pozorujeme signifikantní druhovou specifitu, u jater dokonce i kmenovou. Při srovnávání hmotností ledvin prokázal kmen BI 372 vyšší hmotnost pouze při srovnání s myšmi kolonizovanými Bad 368 a ve srovnávání hmotností srdce s bezmikrobní kontrolní skupinou GF i monokolonizovanou skupinou myší Bad 368.

Sledovaným faktorem byla i hmotnost epididymálního tuku myší. V tomto parametru je opět možné tvrdit, že myši osazené kmenem BI 372 mají signifikantně větší zásobu epididymálního tuku než bezmikrobní skupina GF i všechny ostatní monokolonizované skupiny myší. I pro tento parametr je tedy možné deklarovat, že je pozorována druhová i kmenová specifita, ač jsou hmotnosti epididymálních tuků u všech skupin velmi nízké.

Při vážení svalu *musculus gastrocnemius* byla prokázána pouze druhová specifita, kdy byla pozorována vyšší hmotnost svalů u skupiny BI 372 než u bezmikrobní kontrolní skupiny GF a skupin Bad 368 a Bad 373.

Délka stehenních a holenních kostí vykazovala pouze stejný trend, nicméně i zde je naprosto zřejmé, že bakterie BI 372 pomáhá svému hostiteli v růstu nejvíce ze všech testovaných kmenů bifidobakterií. Výsledky měření stehenních i holenních kostí naznačují kmenovou specifitu mezi skupinami BI 367 a BI 372.

Dalším zásadním sledovaným aspektem této práce je vliv probiotických kmenů bifidobakterií na somatotropní osu chronicky podvyživeného hostitele. Na základě hodnot získaných ze sér experimentálních myší je možno tvrdit, že *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372) jednoznačně podporuje růst ve srovnání s ostatními kmeny bifidobakterií i na úrovni somatotropní osy. Skupina gnotobiotických myší BI 372 měla nejvyšší hodnoty IGF-1 v séru, což je hlavní ukazatel růstu, na již výše zmíněné úrovni somatotropní osy. Tento kmen nejen že prokázal druhovou specifitu, ale právě i tu kmenovou. To, že *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 podporuje růst je z grafů ve výsledkové části naprosto zřejmé, nicméně v sledovaném parametru IGF-1 nebyl po srovnání statistickou analýzou s bezmikrobní skupinou GF označen za významný, ale signifikantním hodnotám se velmi přibližuje.

Sledovanou hodnotou v myším séru byla i hladina proteinu IGFBP3, který váže IGF-1 a zabraňuje vazbě IGF-1 na jeho receptor a snižuje tak jeho biologickou dostupnost (99). Na základě toho bylo rozhodnuto, že bude výpočtem získán poměr hodnot IGF-1 a IGFBP3 a získá se tak nejrelevantnější výsledek podpory růstu myší v přítomnosti jednotlivých kmenů bifidobakterií na úrovni somatotropní osy. Bylo dosaženo zajímavého výsledku, že oba testované kmeny *Bifidobacterium longum* (BI 367 a BI 372) vykazují vyšší poměr IGF1/IGFBP3 jak v porovnání s bezmikrobní skupinou GF, tak s oběma kmeny *Bifidobacterium adolescentis* (Bad 368 a Bad 373). Rozhodně tak může být na základě výsledků této práce tvrzeno, že na úrovni somatotropní osy kmen BI 372 vykazuje pozitivní vliv na růst a tento efekt je druhově specifický. Kmenová specifita opět nebyla po srovnání statistickou analýzou označena za signifikantní, nicméně velmi těsně se jí přibližovala.

Tenké střevo je místem, kde dochází ke vstřebávání živin z potravy. Dalším bodem zájmu tedy logicky bylo, zda bakterie mohou ovlivnit morfologii střeva a tím i proces vstřebávání, což by mohl být jeden z možných mechanismů, jak podporují růst. Pomocí histologicko-morfometrické analýzy tenkého střeva, konkrétně oblasti jejunu, bylo zjištěno, že nejvyšší hodnoty ve všech měřených parametrech prokazuje bakteriální druh *Bifidobacterium longum*. Tento jev je vysvětlován tak, že *Bifidobacterium longum* pomáhá svému hostiteli i přes vystavení chronické podvýživě udržet dostatečnou velikost klků pro zajištění co největší absorpční plochy pro vstřebávání živin. Jestli je tato domněnka pravdivá, to zatím zůstává pouze dohadem. Co tvrdit lze je, že podvýživa má souvislost s poškozením střevní sliznice (100). V této práci byly ukázány výsledky, že obě skupiny osazené testovanými kmeny druhu *Bifidobacterium longum* prokázaly ve srovnání s kontrolní skupinou GF lepší schopnost zachovat si lepší parametry střevní sliznice při vystavení chronické podvýživě. Myši skupiny BI 372 prokázaly významně lepší hodnoty ve velikosti plochy, výšce i šířce klků a hloubce krypt

než skupiny GF, Bad 368 a Bad 373. Skupina BI 367 dosáhla taktéž velmi dobrých výsledků – má větší plochu klků a hloubku krypt než GF, Bad 368 i 373 a výšku i šířku krypt větší než GF a Bad 368.

Sledované parametry jako délka tenkého střeva a glykémie na lačno nedosáhly žádných rozdílů v závislosti na osazení.

Další otázkou je, zda má podvýživa vliv i na bakterie jako takové. Při pozorování preparátů, získaných roztěrem výkalů experimentálních skupin myší, byl pozorován úbytek množství bakterií u chronicky podvyživených myší. Z těchto preparátů je také patrné, že dochází k deformaci tvaru bakterií. Předchozí práce ukázala, že změna tvaru u gram pozitivní bakterie *Lactobacillus plantarum* v protáhlé vláknité buňky je odpovědí bakterie na stresové podmínky (101). Vypadá to tedy, že experimentální dieta s nízkým obsahem bílkovin a tuku kromě zakrslosti u hostitele vyvolává také stres u střevních bakterií. Jako důkaz o úbytku počtu bakterií samozřejmě nelze považovat pouhý preparát, proto byl sledován úbytek bakterií u myší na chovné dietě versus experimentální myši v den odstavu (den 21) a po vystavení chronické podvýživě (v den 56) pomocí výsevu na plotny z gnotobiotického myšního výkalu. Výsledky jednoznačně ukazují, že v den 56 došlo k úbytku CFU na gram myšního výkalu. Domněnkou tedy je, že jako je dokázáno, že dochází k úbytku bifidobakterií při různých onemocněních jako například atopická dermatitida a astma (102) nebo i zánětlivých onemocněních střev (103), mohla by i podvýživa jako taková mít přímý vliv na úbytek bifidobakterií ve střevě.

V této práci bylo prokázáno, že i jiné bakterie mléčného kvašení, než *Lactiplantibacillus plantarum* WJL (5), má příznivý vliv na vývoj hostitele v podmínkách chronické podvýživy. Bylo zjištěno, že z vybraných kmenů má v tomto ohledu nejlepší vlastnosti kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (BI 372) a také je možné tvrdit, že kromě toho, že je jeho vliv druhově specifický, je v některých sledovaných parametrech i kmenově specifický. Dalším významným zjištěním je i to, že v průběhu podvýživy došlo k deformaci bakterií a k jejich úbytku ve střevě. Pro upřesnění, jak bifidobakterie zlepšují růst podvyživených myší, by bylo zajímavé věnovat se mechanismu, jakým tento stav zprostředkovávají a samozřejmě je třeba mít na paměti, že kmeny testované v této práci nejsou jediné a bylo by třeba otestovat v souvislosti se schopností podporovat růst podvyživených gnotobiotických myší mnohem širší spektrum kmenů bifidobakterií.

## 9. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly v rámci teoretické části přehledně shrnuty informace o podvýživě jakožto globálním zdravotním problému, probiotických bakteriích a jejich významu v souvislosti se zdravím, významnosti gnotobiologického modelu pro vědu i tuto práci a fungování somatotropní osy.

V práci byly otestovány čtyři kmeny bifidobakterií v gnotobiotickém myším modelu s cílem objasnit, zda mají vliv na růst hostitele v modelu chronické podvýživy. Tyto bakteriální kmeny byly izolovány ze stolic zdravých dospělých jedinců a kojených dětí a poskytnuty díky spolupráci s profesorem Vojtěchem Radou a profesorem Jiřím Nevoralem.

Jako testované kmeny byly použity *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCM 7952 (Bl 367), *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (Bl 372) a *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368), *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). U obou testovaných kmenů druhu *Bifidobacterium longum* byl patrný příznivý vliv na růst hostitele, nejlepších výsledků však dosahoval kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 372 (Bl 372).

Výsledky této diplomové práce prokázaly schopnost některých kmenů bifidobakterií podporovat růst mladých jedinců v gnotobiotickém myším modelu chronické podvýživy. Zdá se, že je tento účinek druhově specifický a v některých parametrech i kmenově specifický, avšak je nutné jejich další testování a detailní popsání mechanismu tohoto účinku.

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY

ssp.	<i>subspecies</i>
BI	<i>Bifidobacterium longum</i>
Bad	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
BI 367	kmen <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> CCM 7952
BI 372	kmen <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> CCDM 372
Bad 368	kmen <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCDM 368
Bad 373	kmen <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCDM 373
GF	skupina bezmikrobních myší
CV	konvenční myš (tedy myš s běžným osazením)
BMK	bakterie mléčného kvašení
BMKB	bakterie mléčného kvašení a grampozitivní bifidobakterie
CCM	označení české sbírky mikroorganismů
CCDM	označení sbírky mlékárenských mikroorganismů
C57BL/6J	označení kmene myšího modelu použitého v experimentu
WHO	World Health Organization
FAO	Food and Agriculture Organization
RUTF	terapeutická strava připravená k použití
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor-1
IGFBP	proteiny vázající růstový faktor podobný insulinu IGF-1
NOD2	oligomerizační doména 2 vázající nukleotid; intracelulární senzor pro malé peptidy
AIN93G	označení diety z níž úpravou vznikla naše experimentální dieta
AIN-93G-MX	označení minerálního mixu v dietě AIN93G
AIN-93G-VX	označení minerálního mixu v dietě AIN93G
GH	růstový hormon
STAT	proteiny rodiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)
ALS	acidolabilní podjednotka ternárního komplexu IGF-1/IGFBP-3/ALS
MRS	selektivní kultivační médium (Man Rogosa Sharpe)
MRSC	MRS médium doplněné o 0,05 % L-cystein-hydrochloridu
PFA	paraformaldehyd
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
ELISA	imunoanalytická metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)
ANOVA	statistická metoda (one way anylysis of variance)
SEM	standartní chyba průměru (standard error of the mean)
GAČR	Grantová agentura České republiky
UV	ultrafialové záření (ultraviolet light)
p	statistický ukazatel

V grafech a obrázcích ve výsledkové části práce jsou pro jednoduchost monokolonizované skupiny myší označené v legendě stejnou zkratkou jako bakterie, jimiž jsou osazené, a to:

GF	skupina bezmikrobních myší skupina gnotobiotických myší kolonizovaná kmenem <i>Bifidobacterium longum</i>
BI 367	ssp. <i>longum</i> CCM 7952

Bl 372	skupina gnotobiotických myší kolonizovaná kmenem <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> CCDM 372
Bad 368	skupina gnotobiotických myší kolonizovaná kmenem <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCDM 368
Bad 373	skupina gnotobiotických myší kolonizovaná kmenem <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCDM 373

## 11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Počet použitých myší v tomto experimentu v dané skupině. Porovnání a informace o procentuálním zastoupení hlavních nutrientů	22
Tabulka 2	v námi použité experimentální dietě ve srovnání s AIN93G dietou. Informace o jednotlivém zastoupení hlavních ingrediencí obsažených v	23
Tabulka 3	AIN93G dietě a námi použité experimentální dietě.	23

## 12. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b>	Názorná ukázka jednotlivých typů podvýživy uvedených výše v textu. Zleva můžeme pozorovat zobrazení běžně živeného člověka, dále chřadnutí, zakrnění a nakonec podvýživy (11).	11
<b>Obrázek 2</b>	<i>Bifidobacterium longum</i> v elektronové mikroskopii (36).	16
<b>Obrázek 3</b>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> v elektronové mikroskopii (37).	16
<b>Obrázek 4</b>	Myší model inbredního kmene C57BL/6J použitý v experimentu (88).	21
<b>Obrázek 5</b>	Schéma osazení bezmikrobního chovu myší v izolátoru intragastrickou sondou daným kmenem bakterií. Při stabilní kolonizaci se začíná s připouštěním samic. Kontrolní skupina myší GF nebyla kolonizována žádným kmenem. Obrázek byl vytvořen programem BioRender.	29
<b>Obrázek 6</b>	Experimentální design práce. Ode dne narození myších mláďat jsou s matkou do 21. dne na chovné dietě. Od 21. dne věku jsou mladí samci odstaveni na experimentální dietu, kdy začíná samotný experiment s pravidelným týdenním měřením a vážením. Poslední měření a vážení probíhá v 56. dni., po němž jsou myši usmrceny a z myší jsou získávány vzorky pro další laboratorní stanovení. Obrázek byl vytvořen pomocí programu BioRender.	30
<b>Obrázek 7</b>	Fotografie preparátů nátěru gnotobiotických myších výkalů pro porovnání s nátěry výkalů monokolonizovaných myší ve výsledkové části (Obrázek 11-14). Vlevo vidíme preparát bezmikrobní myši (GF) a vpravo konvenční, tedy běžně kolonizované myši (CV), kde je patrné osazení směsí různých bakterií různých rodů, různého množství.	32
<b>Obrázek 8</b>	Způsob měření parametrů uvedených v grafech ve výsledkové části znázorňující rozmezí, v jakém byly parametry plocha klků (P), výška klků (V), šířka klků (Š) a hloubky krypt (H) byly měřeny softwarem Fiji 2.0.0 (Graf 19-22).	33
<b>Obrázek 9</b>	Reprezentativní obrázky histologických preparátů příčného řezu tenkého střeva v oblasti jejunu gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě. Uprostřed, tedy preparát C, označuje bezmikrobní skupinu GF, se kterou je možné porovnávat preparáty A, B, D a E. Preparát vlevo nahoře (A) je ukázkou skupiny myší osazených BI 367, vpravo nahoře (B) skupiny kolonizované kmenem BI 372, vlevo dole (D) skupiny osazené BI 368 a vpravo dole (E) myší osazených kmenem BI 373. Preparáty jsou barvené hematoxilin-eosinem a černá úsečka na obrázcích značí měřítko 100 μm.	52
<b>Obrázek 10</b>	Kultury jednotlivých kmenů bakterií, jimiž byly původně bezmikrobní myši v izolátorech osazený. Preparáty byly pro lepší viditelnost obarveny pomocí barvení dle Grama. Pozorovány byly pomocí imerze při 1000x zvětšení objektivu.	53
<b>Obrázek 11</b>	Preparáty nátěru z gnotobiotického myšího výkalu skupiny BI 367, osazené <i>Bifidobacterium longum ssp. longum</i> CCM 7952 (BI 367), obarvené dle Grama zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích můžeme pozorovat patrný rozdíl ve změně tvaru i množství bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B).	54



- Obrázek 12** Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny osazené *Bifidobacterium longum ssp. longum* CCDM 372 (BI 372). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích je viditelný rozdíl ve změně tvaru i množství bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B). 56
- Obrázek 13** Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny Bad 368, osazené bakterií *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 368 (Bad 368). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích je zřejmý rozdíl v deformaci tvaru i úbytku bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B). 56
- Obrázek 14** Preparáty nátěru z gnotobiotického myšního výkalu skupiny Bad 373, osazené bakterií *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 373 (Bad 373). Jsou obarvené gramovým barvením zobrazené při 1000x zvětšení pomocí imerze. Na obrázcích můžeme i tentokrát pozorovat zřetelný rozdíl v deformaci tvaru i úbytku bakterií mezi nátěry z výkalu dospělé myši na chovné dietě (A) a myši na experimentální dietě v 56. den věku (B). 56

## 13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1	Relativní změna váhy a průměrný denní hmotnostní přírůstek u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	38
Graf 2	Relativní změna délky těla a průměrný denní délkový přírůstek u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	39
Graf 3	Hmotnost experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.	40
Graf 4	Délka těla experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.	40
Graf 5	Hladina glykémie u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě v den 56.	41
Graf 6	Hmotnost odebraných jater v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	41
Graf 7	Hmotnost odebraných ledvin v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	42
Graf 8	Hmotnost odebraných slezin v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	42
Graf 9	Hmotnost odebraných srdcí v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	43
Graf 10	Hmotnost odebraného epididymálního tuku v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	43
Graf 11	Hmotnost odebraného svalu, konkrétně svalu <i>musculus gastrocnemicus</i> , v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	44
Graf 12	Délka stehenní kosti v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	44
Graf 13	Délka holenní kosti v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	45
Graf 14	Hmotnost odebraného slepého střeva v den 56 z experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	45
Graf 15	Délka tenkého střeva v den 56 u experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	46
Graf 16	Hladina IGF-1 v séru gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	46
Graf 17	Hladina IGFBP3 v séru gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	47
Graf 18	Poměr hladin IGF-1 a IGFBP3 ze séra gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	47
Graf 19	Histologicko-morfometrická analýza plochy klků tenkého střeva v oblasti jejunu gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	48
Graf 20	Histologicko-morfometrická analýza výšky klků tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	49
Graf 21	Histologicko-morfometrická analýza šířky klků tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	50

Graf 22	Histologicko-morfometrická analýza hloubky krypty tenkého střeva v oblasti jejunu experimentálních gnotobiotických skupin myší na experimentální dietě.	51
Graf 23	Počet CFU na gram gnotobiotického myšího výkalu. Zde je možné pozorovat zřetelné snížení koncentrace bakterií ve výkalu experimentálních myší v den 56 po chronické podvýživě (F1 (56)) ve srovnání s koncentrací osazení experimentálních myší v den odstavu (F1 (21)) a rodičovskou generací na chovné dietě (P).	56

## 14. POUŽITÁ LITERATURA

1. Moumen H. UNICEF DATA. 2023 [citován 21. březem 2024]. State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI) 2023. Dostupné z: <https://data.unicef.org/resources/sofi-2023/>
2. Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor | Science [Internet]. [citován 21. březem 2024]. Dostupné z: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1229000>
3. Milman A, Frongillo EA, de Onis M, Hwang JY. Differential improvement among countries in child stunting is associated with long-term development and specific interventions 1. *J Nutr.* 1. červen 2005;135(6):1415–22.
4. Schwarzer M, Strigini M, Leulier F. Gut Microbiota and Host Juvenile Growth. *Calcif Tissue Int.* 1. duben 2018;102(4):387–405.
5. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-Gayet I, Srutkova D, Hermanova P, et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science.* 19. únor 2016;351(6275):854–7.
6. Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol.* 2016;7:1204.
7. Dinh DM, Ramadass B, Kattula D, Sarkar R, Braunstein P, Tai A, et al. Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Persistently Stunted Young Children in South India. *PLOS ONE.* 5 2016;11(5):e0155405.
8. O’Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 15. červen 2016;7:925.
9. Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, et al. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PLoS ONE.* 28. červenec 2015;10(7):e0134050.
10. Malnutrition [Internet]. [citován 13. březem 2024]. Dostupné z: <https://www.who.int/health-topics/malnutrition>
11. Lett A. Imperial Medicine Blog. 2019 [citován 16. květen 2024]. Why legumes may be the key in the fight against undernutrition. Dostupné z: <https://blogs.imperial.ac.uk/imperial-medicine/2019/03/13/why-legumes-may-be-the-key-in-the-fight-against-undernutrition/>
12. Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent Gut Microbiota Immaturity in Malnourished Bangladeshi Children. *Nature.* 19. červen 2014;510(7505):417–21.
13. Lelijveld N, Godbout C, Krietemeyer D, Los A, Wegner D, Hendrixson DT, et al. Treating high-risk moderate acute malnutrition using therapeutic food compared with nutrition counseling (Hi-MAM Study): a cluster-randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 8. květen 2021;114(3):955–64.

14. Das JK, Salam RA, Saeed M, Kazmi FA, Bhutta ZA. Effectiveness of Interventions for Managing Acute Malnutrition in Children under Five Years of Age in Low-Income and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 1. leden 2020;12(1):116.
15. Gehrig JL, Venkatesh S, Chang HW, Hibberd MC, Kung VL, Cheng J, et al. Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children. *Science*. 2019;365(6449):eaau4732.
16. Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The Human Gut Microbiota and Undernutrition. *Sci Transl Med*. 6. červen 2012;4(137):137ps12-137ps12.
17. Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, et al. *Drosophila* Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science*. 4. listopad 2011;334(6056):670–4.
18. Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*. 7. září 2011;14(3):403–14.
19. Schwarzer M, Gautam UK, Makki K, Lambert A, Brabec T, Joly A, et al. Microbe-mediated intestinal NOD2 stimulation improves linear growth of undernourished infant mice. *Science*. 24. únor 2023;379(6634):826–33.
20. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog*. srpen 2012;53(2):100–8.
21. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1. leden 1999;39(1):13–126.
22. Holzapfel WH, Wood BJB. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons; 2014. 648 s.
23. Mulaw G, Sisay Tessema T, Muleta D, Tesfaye A. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. *Int J Microbiol*. 25. srpen 2019;2019:7179514.
24. Desai AR. Strain identification, viability and probiotics properties of *Lactobacillus Casei* [Internet] [phd]. Victoria University; 2008 [citován 5. duben 2024]. Dostupné z: <http://vuir.vu.edu.au/>
25. Schillinger U, Guigas C, Heinrich Holzapfel W. In vitro adherence and other properties of *Lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J*. 1. prosinec 2005;15(12):1289–97.
26. Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E. Probiotics, that modify disease risk 1. *J Nutr*. 1. květen 2005;135(5):1294–8.
27. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*. 29. duben 1997;36(1):1–29.

28. Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol.* 15. září 1999;50(1):45–57.
29. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* srpen 2014;11(8):506–14.
30. Ghoddsi HB, Tamime AY. MICROFLORA OF THE INTESTINE | Biology of Bifidobacteria. In: Batt CA, Tortorello ML, editoři. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [citován 18. březen 2024]. s. 639–45. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002081>
31. Křupalová Alena. Význam a využití rodu *Bifidobacterium* [Internet] [bakalářská práce]. [Brno]: Mendelova univerzita v Brně; 2016. Dostupné z: [https://theses.cz/id/zlhhie/zaverecna\\_prace.pdf](https://theses.cz/id/zlhhie/zaverecna_prace.pdf)
32. Maxa V., Rada V. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. 2. vydání. 2nd ed. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací;
33. Voříšek K. Probiotika a gastrointestinální mikroflóra. Praha: Vysoká škola zemědělská Praha, 111 s.; 1989.
34. Rosberg-Cody E, Ross RP, Hussey S, Ryan CA, Murphy BP, Fitzgerald GF, et al. Mining the Microbiota of the Neonatal Gastrointestinal Tract for Conjugated Linoleic Acid-Producing Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* srpen 2004;70(8):4635–41.
35. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil; 1996. 558 s.
36. *Bifidobacterium longum* - microbewiki [Internet]. [citován 24. duben 2024]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium\\_longum](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_longum)
37. *Bifidobacterium adolescentis* [Internet]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium\\_adolescentis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_adolescentis)
38. Schindler J. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2. vydání. Roč. 2014. Praha: Grada Publishing;
39. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.* Springer Science & Business Media; 2006. 1208 s.
40. Mayo B., Sinderen D. *Bifidobacteria: Genomics and molecular aspects.* Norfolk: Caister Academic Press; 2010.
41. Bottacini, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *The Biochemical journal.* 2017;474(24):4137–52.
42. Wang Y, Parker CE, Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 9. květen 2016;2016(5):CD000544.

43. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *J Exp Med*. 18. duben 2005;201(8):1205–15.
44. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, et al. Exploring the Diversity of the Bifidobacterial Population in the Human Intestinal Tract. *Appl Environ Microbiol*. březen 2009;75(6):1534.
45. Turrone F, Marchesi JR, Foroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, et al. Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *ISME J*. červen 2009;3(6):745–51.
46. Ventura M, Turrone F, Lugli GA, van Sinderen D. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J Sci Food Agric*. 30. leden 2014;94(2):163–8.
47. Zhang M, Zhou L, Zhang S, Yang Y, Xu L, Hua Z, et al. Bifidobacterium longum ovlivňuje hladinu methylace promotoru forkhead box P3 u kolitidy vyvolané kyselinou 2, 4, 6-trinitrobenzensulfonovou u potkanů. *Microb Pathog*. 1. září 2017;110:426–30.
48. Kim WG, In Kim H, Kyung Kwon E, Joo Han M, Kim DH. Lactobacillus plantarum LC27 and Bifidobacterium longum LC67 mitigate alcoholic steatosis in mice by inhibiting LPS-mediated NF- $\kappa$ B activation through restoration of the disturbed gut microbiota. *Food Funct*. 2018;9(8):4255–65.
49. Chugh B, Kamal-Eldin A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Curr Opin Food Sci*. 1. duben 2020;32:76–82.
50. Chichlowski M, Shah N, Wampler JL, Wu SS, Vanderhoof JA. Bifidobacterium longum Subspecies infantis (*B. infantis*) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients*. červen 2020;12(6):1581.
51. Zhang C, Yu Z, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Kolonizace a probiotická funkce Bifidobacterium longum. *J Funct Foods*. 1. únor 2019;53:157–65.
52. Evolutionary development and co-phylogeny of primate-associated bifidobacteria - Lugli - 2020 - Environmentální mikrobiologie - Wiley Online Library [Internet]. [citován 18. březen 2024]. Dostupné z: <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.15108>
53. Derrien M, Turrone F, Ventura M, van Sinderen D. Insights into endogenous Bifidobacterium species in the human gut microbiota during adulthood. *Trends Microbiol*. 1. říjen 2022;30(10):940–7.
54. Long X, Liu D, Gao Q, Ni J, Qian L, Ni Y, et al. Bifidobacterium adolescentis Alleviates Liver Steatosis and Steatohepatitis by Increasing Fibroblast Growth Factor 21 Sensitivity. *Front Endocrinol*. 30. prosinec 2021;12:773340.
55. Chen J, Wang R, Li XF, Wang RL. Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. květen 2012;107(10):1429–34.

56. Casaro MC, Crisma AR, Vieira AT, Silva GHM, Mendes E, Ribeiro WR, et al. Prophylactic *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 supplementation reduces partially allergic airway disease in Balb/c but not in C57BL/6 mice. *Benef Microbes*. 25. duben 2018;9(3):465–76.
57. Wu W, Wang Y, Zou J, Long F, Yan H, Zeng L, et al. *Bifidobacterium adolescentis* protects against necrotizing enterocolitis and upregulates TOLLIP and SIGIRR in premature neonatal rats. *BMC Pediatr*. 5. leden 2017;17:1.
58. Fan Z, Yang B, Ross RP, Stanton C, Shi G, Zhao J, et al. Protective effects of *Bifidobacterium adolescentis* on collagen-induced arthritis in rats depend on timing of administration. *Food Funct*. 26. květen 2020;11(5):4499–511.
59. Kawabata K, Baba N, Sakano T, Hamano Y, Taira S, Tamura A, et al. Functional properties of anti-inflammatory substances from quercetin-treated *Bifidobacterium adolescentis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 3. duben 2018;82(4):689–97.
60. Jang HM, Lee KE, Kim DH. The Preventive and Curative Effects of *Lactobacillus reuteri* NK33 and *Bifidobacterium adolescentis* NK98 on Immobilization Stress-Induced Anxiety/Depression and Colitis in Mice. *Nutrients*. 11. duben 2019;11(4):819.
61. Huang HC, Chang TM. Antioxidative properties and inhibitory effect of *Bifidobacterium adolescentis* on melanogenesis. *World J Microbiol Biotechnol*. 1. září 2012;28(9):2903–12.
62. Lee DK, Kang JY, Shin HS, Park IH, Ha NJ. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 against Hepatitis B virus. *Arch Pharm Res*. 1. prosinec 2013;36(12):1525–32.
63. Duranti S, Ruiz L, Lugli GA, Tames H, Milani C, Mancabelli L, et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Sci Rep*. 24. srpen 2020;10:14112.
64. Arunachalam KD. Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology. *Nutr Res*. 1. říjen 1999;19(10):1559–97.
65. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients*. leden 2011;3(1):118–34.
66. Kumar M, Babaei P, Ji B, Nielsen J. Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. *Nutr Healthy Aging*. 4(1):3–16.
67. Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. *Bifidobacteria* and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol Spectr*. 23. červen 2017;5(3):10.1128/microbiolspec.bad-0010–2016.
68. Pasteur L. Observations liées aux remarques précédentes de M. Duclaux. *ČR Acad Sci*. 1885;100(68).
69. Nuttall GHF, Thierfelder H. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. 1. leden 1896;21(2–3):109–21.
70. Gordon HA. The germ-free animal. *Am J Dig Dis*. 1. říjen 1960;5(10):841–67.



71. Steven B, Hyde J, LaReau JC, Brackney DE. The Axenic and Gnotobiotic Mosquito: Emerging Models for Microbiome Host Interactions. *Front Microbiol.* 12. červenec 2021;12:714222.
72. Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science.* 1. červenec 2011;333(6038):101–4.
73. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* prosinec 1998;62(4):1157–70.
74. Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* březen 2011;8(2):110–20.
75. Ma D, Storelli G, Mitchell M, Leulier F. Studying host-microbiota mutualism in *Drosophila*: Harnessing the power of gnotobiotic flies. *Biomed J.* 2015;38(4):285–93.
76. Leulier F, MacNeil LT, Lee W jae, Rawls JF, Cani PD, Schwarzer M, et al. Integrative physiology: at the crossroads of nutrition, microbiota, animal physiology and human health. *Cell Metab.* 7. březen 2017;25(3):522–34.
77. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol.* 1. duben 2007;19(2):59–69.
78. Brown SDM, Moore MW. The International Mouse Phenotyping Consortium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mamm Genome.* 1. říjen 2012;23(9):632–40.
79. Breier BH. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest Anim Endocrinol.* 1. říjen 1999;17(2):209–18.
80. Brinkman JE, Tariq MA, Leavitt L, Sharma S. Physiology, Growth Hormone. In: *StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [citován 17. březen 2024]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482141/>*
81. Bartke A, Sun LY, Longo V. Somatotrophic Signaling: Trade-Offs Between Growth, Reproductive Development, and Longevity. *Physiol Rev.* duben 2013;93(2):571–98.
82. Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol.* 9. duben 2018;9:117.
83. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2. červenec 2018;217(7):2273–89.
84. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature.* březen 2010;464(7288):504–12.
85. Schlegel A, Stainier DYR. Lessons from “Lower” Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism. *PLOS Genet.* 11 2007;3(11):e199.

86. Martins PA, Sawaya AL. Evidence for impaired insulin production and higher sensitivity in stunted children living in slums. *Br J Nutr.* květen 2006;95(5):996–1001.
87. Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of Growth Hormone Resistance in Malnutrition. *J Endocrinol.* 27. leden 2014;220(3):R57–65.
88. 000664 - Details about the strain B6 [Internet]. [citován 17. březem 2024]. Dostupné z: <https://www.jax.org/strain/000664>
89. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet 1 2. *J Nutr.* 1. květen 1997;127(5):838S-841S.
90. Malnutrition in Children - UNICEF DATA [Internet]. [citován 13. dubem 2024]. Dostupné z: <https://data.unicef.org/topic/nutrition/malnutrition/#>
91. Uauy R, Desjeux JF, Ahmed T, Hossain M, Brewster D, Forbes D, et al. Global Efforts to Address Severe Acute Malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* listopad 2012;55(5):476.
92. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *The Lancet.* 13. leden 2007;369(9556):145–57.
93. Ashworth A, Organization WH. Guidelines for the Inpatient Treatment of Severely Malnourished Children. World Health Organization; 2003. 50 s.
94. Hossain M, Chisti MJ, Hossain MI, Mahfuz M, Islam MM, Ahmed T. Efficacy of World Health Organization guideline in facility-based reduction of mortality in severely malnourished children from low and middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *J Paediatr Child Health.* květen 2017;53(5):474–9.
95. Raman AS, Gehrig JL, Venkatesh S, Chang HW, Hibberd MC, Subramanian S, et al. A sparse covarying unit that describes healthy and impaired human gut microbiota development. *Science.* 2019;365(6449):eaau4735.
96. Chen RY, Mostafa I, Hibberd MC, Das S, Mahfuz M, Naila NN, et al. A Microbiota-Directed Food Intervention for Undernourished Children. *N Engl J Med.* 22. duben 2021;384(16):1517–28.
97. Matos RC, Schwarzer M, Gervais H, Courtin P, Joncour P, Gillet B, et al. D-Alanylation of teichoic acids contributes to *Lactobacillus plantarum*-mediated *Drosophila* growth during chronic undernutrition. *Nat Microbiol.* prosinec 2017;2(12):1635–47.
98. Strain-Specific Benefits of Bacillus Probiotics in Hybrid Grouper: Growth Enhancement, Metabolic Health, Immune Modulation, and *Vibrio harveyi* Resistance - PMC [Internet]. [citován 16. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11011011/>
99. Martín AI, Priego T, Moreno-Ruperez Á, González-Hedström D, Granado M, López-Calderón A. IGF-1 and IGFBP-3 in Inflammatory Cachexia. *Int J Mol Sci.* 31. srpen 2021;22(17):9469.

100. Boza JJ, Moënnoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, et al. Food Deprivation and Refeeding Influence Growth, Nutrient Retention and Functional Recovery of Rats. *J Nutr.* 1. červenec 1999;129(7):1340–6.
101. Ingham CJ, Beerthuyzen M, van Hylckama Vlieg J. Population Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Microcolonies in Response to and Recovery from Acid Stress. *Appl Environ Microbiol.* 15. prosinec 2008;74(24):7750–8.
102. Akay HK, Bahar Tokman H, Hatipoglu N, Hatipoglu H, Siraneci R, Demirci M, et al. The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0–3 years-old children in Turkey. *Anaerobe.* 1. srpen 2014;28:98–103.
103. Yao S, Zhao Z, Wang W, Liu X. *Bifidobacterium Longum*: Protection against Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res* [Internet]. 2021 [citován 15. duben 2024];2021. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8324359/>