

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Jan Kubovčíak**

Studium interakcí mezi mikrobiotou a obratlovci za použití germ-free organismů

Research of vertebrate-microbiota relationship using germ-free organisms

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

Praha, 2014

### *Poděkování*

Práce vznikla jako součást projektu GA ČR 14-16596P: „Interakce mezi ekologickými znaky ptáků jejich gastrointestinální mikrobiotou: Metagenomický přístup“. Rád bych poděkoval svému školiteli, Jakubu Kreisingerovi a konzultantce Lucii Kropáčkové za cenné rady při psaní této práce. Dále děkuji Heleně Svobodové za korekturu.

### **Prohlášení:**

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

V Praze, 15. 5. 2014

Podpis

1. Abstrakt .....	4
2. Úvod .....	5
2.1 Interakce mikrobioty a obratlovců .....	5
2.2 Definice pojmů, metodologie .....	7
3. Vliv mikrobioty na fenotyp hostitele .....	8
3.1 Úloha mikrobioty při trávení .....	8
3.2 Efekt na metabolismus a metabolický profil hostitele .....	11
3.2.1 Metabolický profil hostitele .....	11
3.2.2 Trávicí enzymy hostitele .....	12
3.2.3 Metabolismus tuků .....	13
3.2.4 Metabolismus minerálů .....	14
3.2.5 Metabolismus močoviny .....	15
3.2.6 Metabolismus xenobiotik .....	15
3.3 Regulace motility dolního trávicího traktu .....	16
3.4 Vliv na morfologii a cytologii dolního trávicího traktu .....	17
3.5 Interakce mikrobioty s imunitním systémem .....	20
3.5.1 Genová exprese epiteliálních buněk .....	20
3.5.2 Lymfatické orgány zažívacího traktu .....	21
3.5.3 Lymfocyty a protilátky .....	22
3.5.4 Makrofágy .....	24
3.6 Vliv germ-free stavu na interakci hostitele s patogenními organismy .....	25
3.7 Efekt na chování hostitele .....	27
3.8 Vliv mikrobioty na oběhový systém hostitele .....	27
4. Využití gnotobiologie v lidské medicíně .....	28
5. Závěr .....	28
6. Seznam použitých zkratek .....	30
7. Seznam literatury .....	30

## 1. Abstrakt

Germ-free (axenická) zvířata jsou individua chovaná ve speciálních podmínkách neumožňujících kontakt s okolními mikroorganismy. V některých vlastnostech se tyto jedinci liší od přirozeně osídlených protějšků. Tyto rozdíly pravděpodobně odrážejí vliv přítomnosti komplexního střevního mikrobiálního společenství, které různými mechanismy ovlivňuje zásadní fyziologické funkce hostitele. Charakter těchto rozdílů tedy umožňuje studium vztahu hostitele, v tomto případě obratlovců a jejich intestinální mikrobioty, který se vyvinul ve složitý systém interakcí zajišťující relativně stabilní soužití. Pozornost je v germ-free výzkumu tohoto vztahu soustředěna zejména na interakce mikrobioty s imunitním systémem, metabolismem, morfologií orgánů a chováním hostitele. Práce předkládá shrnutí výsledků studií výše uvedené problematiky.

**Klíčová slova:** germ-free, axenický, mikrobiota, hostitel, obratlovci, zažívací trakt, střeva, imunita, metabolismus

## Abstract

Germ-free (axenic) animals are individuals reared under specific conditions preventing their contact with surrounding microorganisms. Some of the features observed in these individuals vary from those observed in naturally colonized counterparts. These differences probably reflect the influence of presence of a complex intestinal microbial population in the intestine, which influences important physiological functions of the host body by various mechanisms. Thus, nature of these differences allows to study relationship of the host, vertebrate in this case and its microbiota, which evolved into a complicated system of interactions providing relatively stable coexistence. Germ-free research of this relationship is focused on interactions between microbiota and host's immune system, metabolism, morphology of digestive tract and behavior. This thesis provides summary of research outcomes on previously mentioned topics.

**Key words:** germ-free, axenic, microbiota, host, vertebrate, digestive tract, gut, immunity, metabolism

## 2. Úvod

Cílem této literární rešerše je zhodnotit dosavadní znalosti o vlivu střevní mikrobioty na fenotyp jejího hostitele, v tomto případě obratlovců, získané na základě experimentů s germ-free zvířaty, tj. jedinci, kteří byli po celý svůj dosavadní život chováni ve sterilních podmínkách bez přítomnosti mikroorganismů. Práce má dále přinést čtenáři představu o tom, do jaké míry a jakými mechanismy může mikrobiota fenotyp hostitele ovlivnit.

### 2.1 Interakce mikrobioty a obratlovců

Těla obratlovců jsou v průběhu ontogeneze přirozeně v kontaktu s jinými organismy z okolního prostředí. Kromě makroskopických druhů mají stejně tak nezanedbatelný význam určité části těla osidlující mikroorganismy, jimž těla obratlovců poskytují atraktivní podmínky pro růst. K infekci mikroorganismy dochází v raném stadiu postnatálního vývoje, např. po porodu nebo vylihnutí z vejce, a to zejména prokaryotickými organismy, které v hojné míře kolonizují tělní povrchy a některé dutiny. Druhé složení tohoto mikrobiálního společenství v raném stadiu postnatálního vývoje velmi kolísá a s prodlužujícím se stářím hostitele se do jisté míry stabilizuje (Mackie, Sghir & Gaskins 1999).

Nejvyšší koncentrace mikroorganismů žijících v symbióze s obratlovcem byla zaznamenána v dolní části trávicího traktu (Hooper 2004). Tato oblast je charakteristická anaerobním prostředím a zvýšenou teplotou, což limituje druhové složení společenství. Dalšími limitujícími faktory je působení HCl v žaludku a žlučových kyselin v proximálním tenkém střevě, kterým musí nově přichozí bakterie odolat, a interakce s imunitním systémem hostitele. Počet bakterií obývajících střeva člověka může nabývat až  $10^{14}$  buněk (Suau *et al.* 1999). Druhá skladba tohoto společenství je velmi rozmanitá, dle odhadů se pohybuje mezi 500 až 1000 druhy (Xu & Gordon 2003). Populace střevních bakterií tvoří komplexní ekosystém s nepřehledným množstvím interakcí uvnitř bakteriálního společenství a mezi hostitelem a střevní mikrobiotou (Faust *et al.* 2012). Poměr druhů střevních bakterií se v průběhu ontogeneze mění, například u člověka je druhové složení mikrobioty v prvním roce života charakterizováno převažujícími oportunními mikrobiálními kolonizátory a poměry druhů se významně liší mezi jedinci, u všech starších jedinců se ustanovuje převaha bakterií kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Eckburg *et al.* 2005; Palmer *et al.* 2007). Dále je druhové složení do jisté míry závislé na způsobu porodu. Jedinci narození pomocí císařského řezu mají nižší zastoupení vaginálních bakterií, například bifidobakterií, a naopak vyšší zastoupení druhů *E. coli*. Vliv na druhové složení střevní mikrobioty mají samozřejmě také genetické predispozice hostitele (Penders *et al.* 2006), způsob a složení výživy a přítomnost mikrobů v prostředí (Heavey & Rowland 1999).

Většina těchto střevních bakterií nezpůsobuje hostiteli žádnou újmu, jistá část naopak poskytuje osídlenému jedinci výhodu, kterou si hostitel mohl v evoluci zajistit vytvořením vhodných podmínek

pro růst těchto určitých skupin bakterií v lumen<sup>1</sup> střev. Jedná se například o degradaci hostitelem nestravitelných složek potravy (Evrard *et al.* 1964) nebo produkci vitamínů (Sumi *et al.* 1977).

Dále mají střevní bakterie mimo jiné vliv na vývoj morfologie dolního trávicího traktu (Meslin & Sacquet 1984; Stappenbeck, Hooper & Gordon 2002), vývoj imunitního systému (Bauer & Horowitz 1963; Macpherson *et al.* 2001), genovou expresi buněk trávicího systému (He *et al.* 2003; Hooper *et al.* 2003; Cash *et al.* 2006) a celkový metabolismus (Wostmann, Bruckner-Kardoss & Knight 1968; Bäckhed *et al.* 2004). Střevní mikroorganismy tedy ovlivňují základní fyziologické funkce svého hostitele a mohou tak zásadním způsobem ovlivnit jeho fitness. Složitost tohoto ekosystému znesnadňuje porozumění vztahu hostitele a jeho mikrobioty a klade vysoké nároky na metody využívané pro jeho výzkum. V současné době lze pro toto studium použít několik přístupů. Lze jednoduše studovat závislost fenotypu přirozeně osídleného jedince na druhovém složení jeho mikrobioty. Nevýhodou tohoto přístupu je fakt, že pozorované korelace nevyovídají o směru kauzality a mohou být navíc způsobené dalším faktorem, který je z hlediska přímého vztahu mikrobiota – fenotyp hostitele nezajímavý. Výsledky takových studií jsou závislé na kvalitě metod identifikujících jednotlivé bakteriální druhy. Dále se nabízí možnost umělé manipulace tohoto druhového složení bakteriálního společenstva podáváním látek jako jsou antibiotika (Murphy *et al.* 2013) nebo prebiotika (Schley & Field 2007) a následným studiem vlivu tohoto zásahu na fenotyp hostitele. Podávání vysokých dávek směsi širokospektrých antibiotik může o několik řádů redukovat původní mikrobiotu a navodit stav, který je po fyziologické stránce v mnoha ohledech podobný germ-free modelu (viz níže) (Reikvam *et al.* 2011). Dalším způsobem manipulace je podávání samotných bakterií, například ve formě probiotik (Fuller 1989) nebo transplantace celého mikrobiálního společenstva (Turnbaugh *et al.* 2008). Předností tohoto typu studií je, že složení bakteriálního společenstva je cíleně ovlivněno vnějším zásahem a výsledná data tudíž lépe vyovídají o směru kauzálních vztahů, nevýhodou může být v řadě případů poněkud omezená specifická a verzatilita takovýchto zásahů.

Zvláštní metodou je porovnávání fenotypu zcela sterilních (germ-free) jedinců s fenotypem přirozeně osídlených kontrol. Nevýhodami této metody jsou vysoké technické nároky na chov a fakt, že fenotyp hostitele nemusí ovlivňovat pouze střevní bakterie, ale i mikroorganismy žijící na jiném místě jeho těla. Přesto je vliv střevních bakterií vzhledem k jejich koncentraci a možnosti kontaktu s hostitelem přes jednovrstevný epitel logicky největší (Mackie *et al.* 1999), proto je tato práce zaměřena na shrnutí výsledků právě tohoto druhu studií. Germ-free jedince lze také inokulovat jedním nebo i více druhy bakterií pro studium vlivu jednotlivých bakteriálních druhů na hostitele nebo pro zjištění, zda jsou některé fenotypové znaky navozené germ-free stavem trvalé a zda existuje doba, ve které je nutné inokulaci provést, aby znak nabyl normální hodnoty.

---

<sup>1</sup> Vnitřní prostor střev.

## 2.2 Definice pojmů, metodologie

Pro odvětví experimentální biologie zabývající se pokusy s axenickými zvířaty byl zaveden termín gnotobiologie. Termínem „gnotobiont“ se rozumí organismus (získaný císařským řezem nebo líhnutím z vajec ve sterilních podmínkách), který je osídlen definovanou mikrobiotou. „Germ-free“ neboli „axenický“ organismus je pak gnotobiont prostý výskytu veškerých známek života přidružených organismů jako jsou bakterie, viry, prvoci, plísně a ostatní saprofytické nebo parazitické formy života. Živočich chovaný spolu se svou přirozenou mikrobiotou v podmínkách umožňujících kolonizaci je označován jako „konvenční“. Jako „konvenční kontrola“ je označován konvenční jedinec se stejným genetickým pozadím jako jeho germ-free protějšek, krmený stejnou definovanou sterilní stravou. Pokud je axenickému organismu v průběhu jeho života umožněna zpětná kolonizace mikroorganismy, označuje se tento jedinec jako „ex-germ-free“. V případě, že se jedná o mikroorganismy jeho konvenčních kontrol, užívá se pro takového jedince termín „konvencionalizovaný“<sup>2</sup>, (Gordon & Pesti 1971).

První pokusy chovu kuřat a potkanů ve sterilních podmínkách se uskutečnily v druhé polovině 40. let minulého století, přibližně o deset let později se podařilo úspěšně rozmnožit germ-free potkany a myši. (Gordon & Pesti 1971). Z dostupné literatury lze usoudit, že soubor taxonů používaný v gnotobiologických pokusech s obratlovci zahrnuje nejčastěji klasické modelové organismy, zejména hlodavce jako například myši, potkany a králíky (Yoshida & Pleasants 1968; Yi & Li 2012). Dále prasata domácí (Smith, McCoy & Macpherson 2007) a ptáky, například kura domácího (Lepkovsky *et al.* 1966; Maisonnier, Gomez & Bree 2003).

Chov germ-free zvířat logicky klade specifické nároky na technické zázemí laboratoří. Obvyklou metodou je chov v přetlakových izolátorech, kam je přes filtrační mechanismus přiváděn sterilní vzduch. Manipulaci s předměty uvnitř izolátoru umožňují neprodyšné plastové rukávce vsazené do jedné ze stěn tvořené pružným plastovým filmem. Transport předmětů dovnitř a ven z izolátoru probíhá přes dvojitá dvířka umožňující aseptické spojení s nádobami se sterilním obsahem (Smith *et al.* 2007). Podstatná je také úprava stravy, která je germ-free jedincům podávána. Pokud se před transportem do izolátoru autoklavuje konvenční strava, nelze vyloučit, že neobsahuje části mrtvých bakteriálních buněk, například lipopolysacharidy (dále LPS), peptidoglykan a teichoové kyseliny (Lundin *et al.* 2008), které mohou stimulovat imunitu obdobným způsobem jako živé bakteriální buňky, a je třeba tento fakt vzít v úvahu při interpretování výsledků (Macpherson & Harris 2004).

---

<sup>2</sup> z anglického „conventionalized“.

Jak bylo uvedeno výše, definování germ-free statusu se odvíjí od kvality metody, s jakou je potenciální germ-free jedinec testován na přítomnost mikroorganismů. Dříve hojně používané metody založené na pozorování bakteriálních kolonií vytvořených na definovaných médiích po kultivaci vzorku podle odhadů neodhalí 40 - 80 % druhů střevních bakterií (Suau *et al.* 1999; Tlaskalova-Hogenova *et al.* 2005). Tento jev se přisuzuje striktním nárokům mnohých mikroorganismů na koncentraci kyslíku v okolí a dosud neodhalenými požadavky na složení média umožňujícího jejich růst (Macpherson & Harris 2004). V posledních desetiletích byly vyvinuty metody nezávislé na pěstování mikrobiálních kultur, založené na analýze a porovnávání genetické informace získané přímo ze vzorku se známými sekvencemi za účelem odкрыtí pravé diverzity intestinální mikrobioty. Standardně se jedná například o analýzu genů malých ribozomálních podjednotek (Frank & Pace 2008). Tyto metody umožňují lépe ověřit, zda jedinec splňuje výše uvedenou definici, tedy že ve svém těle nehostí žádné mikroorganismy.

### 3. Vliv mikrobioty na fenotyp hostitele

Následující kapitoly obsahují shrnutí efektů mikrobioty na fenotyp hostitele, v tomto případě obratlovců zjištěných pomocí experimentů s germ-free jedinci. V uvedených studiích byly hledány rozdíly nejčastěji mezi experimentální skupinou germ-free jedinců a jejich konvenčních kontrol. Dále se jedná o komplikovanější pokusy, kdy byli germ-free jedinci navíc infikováni jedním nebo více druhy bakterií v určité fázi ontogeneze. U vybraných témat je pro představu o vztahu mikrobiota – hostitel rozveden mechanismus interakce.

#### 3.1 Úloha mikrobioty při trávení

Střevní bakterie mohou díky svému rozmanitému metabolickému aparátu chemicky měnit některé složky potravy hostitele a syntetizovat látky stravitelné hostitelem. Výhodou může být přeměna látek, pro jejichž úpravu na látky hostitelem stravitelné chybí v genomu obratlovců příslušné geny (Hooper, Midtvedt & Gordon 2002). Jde například o fermentaci celulózy (Evrard *et al.* 1964). Bakterie tak hostiteli přispívají jednak zvýšením množství energie, které hostitel z potravy může získat (Cummings *et al.* 1987), a navíc mu zprostředkovávají důležité molekuly, například některé vitamíny (Sumi *et al.* 1977). Tyto jevy jsou studovány například sledováním rozdílů ve formě a koncentraci určitých složek potravy před a po jejím strávení mezi germ-free a konvenčními jedinci (Evrard *et al.* 1964) nebo porovnáváním účinků podávání stravy ochuzené o určitou složku (Uchida, Nomura & Takase 1986).

Germ-free jedinci jsou závislí na přísunu některých vitamínů spolu se stravou. Jestliže byly například germ-free myši krmeny stravou ochuzenou o vitamin B-6<sup>3</sup>, jejich váha se oproti původním hodnotám v průběhu experimentu snižovala, zato tělesná hmotnost konvenčních kontrol, kterým byla podávána stejně ochuzená strava, zůstala neměnná (Sumi *et al.* 1977).

---

<sup>3</sup> Vitamín zajišťující aktivitu některých enzymů metabolismu sacharidů a bílkovin, chem. název Pyridoxylfosfát.



Stejně tak germ-free hlodavci trpěli nedostatkem vitamínu K<sup>4</sup> oproti svým konvenčním kontrolám při podávání výživy ochuzené o tuto složku (Wostmann 1981; cit. dle Hooper, Midtvedt & Gordon 2002). Méně markantní rozdíly byly pozorovány při porovnávání stavu germ-free a konvenčních potkanů v jiné studii, kde germ-free jedinci, stejně jako konvenční kontroly, trpěli při podávání výživy ochuzené o vitamín K stejnými symptomy spojenými s nedostatkem tohoto vitamínu, zejména sníženou koncentrací faktorů srážlivosti krve. U germ-free jedinců došlo například k prodloužení procesu srážení krve a k poklesu podílu protrombinu<sup>5</sup> v krevní plasmě oproti kontrolám. Při podávání komplexní stravy nebyl pozorován rozdíl v délce protrombinového času, ale hodnoty jiného faktoru srážlivosti (faktoru VII) v plasmě byly nižší u germ-free jedinců, kteří měli také zvýšenou koncentraci proteinů indukovaných nedostatkem vitamínu K v játrech (Uchida *et al.* 1986). Vitamín K je ve střevech syntetizován zejména bakteriemi rodu *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* a *Fusobacterium* (Hill 1997). Při podávání výživy ochuzené o vitamín A<sup>6</sup> germ-free potkanům a jejich konvenčním kontrolám umírali konvenční potkani v průměru po 50 dnech, oproti jejich germ-free protějškům, kteří se dožívali v průměru 272 dní. Vysoká úmrtnost u kontrol mohla být způsobena infekčními onemocněními nebo destabilizací procesu obnovy epiteliálních střevních buněk, k níž je vitamín A vyžadován, a která probíhá ztlačně pomaleji u germ-free jedinců (Coates 1973). Zde se tedy jedná o případ, kdy mikrobiota danou látku (vit. A) nesyntetizuje, ale její nedostatek v potravě má vliv na hostitele skrze fyziologickou funkci, která je závislá na přítomnosti mikrobioty, tedy že se nedostatek projeví v její přítomnosti.

Intestinální mikrobiota napomáhá degradovat některé složitější polysacharidy, které hostitel není schopen sám trávit. Exkrementy potkanů, kterým byla ve stravě podávána určitá dávka celulózy, obsahovaly průměrně stejné množství celulózy jako v podávané stravě. Oproti tomu u konvenčních kontrol bylo toto množství v exkrementech o 32 % nižší, část celulózy tedy byla strávena (Evrard *et al.* 1964). Celulóza je v tlustém střevě fermentována bakteriemi za vzniku tzv. mastných kyselin s krátkými řetězci (dále SCFA), zejména formátu (kys. mravenčí), butyrátu (kys. máselná) a propionátu. SCFA mohou být metabolizovány za účelem získání energie přímo střevními epiteliálními buňkami, nebo v játrech (Cummings *et al.* 1987). K bakteriální produkci SCFA dochází i u ptáků, jak potvrdilo naměření nesrovnatelně nižší koncentrace SCFA ve vzorcích střevního obsahu germ-free kuřat v porovnání s jejich konvenčními kontrolami (Maisonnier *et al.* 2003). SCFA mají také vliv na různé fyziologické funkce hostitele, působí například protizánětlivě (Maslowski *et al.* 2009) a jejich koncentrace ovlivňuje střevní motilitu<sup>7</sup> (Wichmann *et al.* 2013).

---

<sup>4</sup> Vitamín zajišťující aktivitu některých enzymů účastnících se procesu srážení krve.

<sup>5</sup> Enzym účastnící se procesu srážení krve.

<sup>6</sup> Organická molekula mající podíl na funkci imunitního systému, zrakových orgánů a tvorby epitelu.

<sup>7</sup> Aktivita hladkého střevního svalstva.

Naopak u jiného polysacharidu, škrobu, nebyl podobný rozdíl patrný. Přestože střevní mikroorganismy napomáhají jeho degradaci, enzymy pro trávení škrobu jsou běžně přítomny v genomu hostitele. Trávení škrobu ve střevech hostitele tedy není na přítomnosti mikrobioty závislé (Larner & Gillespie 1957; Yoshida & Pleasants 1968).

Při sledování poměru obsahu strávených a nestrávených aminokyselin u germ-free a konvenčních kontrolních kuřat byl sledován nevýznamný rozdíl v účinnosti trávení proteinů u germ-free jedinců. U germ-free kuřat byla naměřena nepatrně lepší schopnost trávit danou složku u všech měřených aminokyselin (Salter & Fulford 1974). Ve studii, kde byla germ-free selatům a konvenčním kontrolám podávána výživa s izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$  ochuzená o bílkoviny, se ukázalo, že v tkáních konvenčních selat se objevuje oproti germ-free jedincům signifikantní poměr lysinu s inkorporovaným izotopem  $^{15}\text{N}$ . Tento lysin byl velmi pravděpodobně mikrobiálního původu. Podařilo se tedy dokázat, že střevní bakterie mohou lysin hostiteli při jeho nedostatku v potravě poskytovat (Torrallardona *et al.* 1996). Oproti tomu využití další aminokyseliny, glutaminu, bylo v epiteliálních buňkách tlustého střeva potkanů o 50 % vyšší u germ-free jedinců než u konvenčních kontrol. Příčinou zvýšeného metabolismu této aminokyseliny u germ-free jedinců byla zvýšená aktivita enzymu fosfát-dependentní glutaminázy zprostředkávající přeměnu glutaminu na glutamát (Cherbuy *et al.* 1995).

Tím, že intestinální mikrobiota umožňuje hostiteli získávat energii z širšího spektra látek, zvyšuje také požadavky na ukládání této energie. Při porovnání celkového obsahu tělesného tuku germ-free potkaních samců a jejich konvenčních kontrol se ukázalo, že konvenční jedinci mají obsah tuku vyšší v průměru o 42 % navzdory tomu, že konzumovali o 29 % méně stravy. Po kolonizování germ-free potkanů mikrobiotou z céka jejich konvenčních protějšků se u germ-free jedinců zvýšil celkový obsah tělesného tuku o 60 % (Bäckhed *et al.* 2004). Podobně měli v porovnání se svými germ-free protějšky lépe vytvořenou tukovou tkáň konvenční selata (Waxler & Drees 1972). Mikrobiota tak může působit jako faktor prostředí modulující vytváření tukových zásob. Ne všechny studie ale potvrzují hypotézu, že mikrobiota přispívá k tělesnému růstu hostitele díky většímu množství energie získané z potravy. Opačný efekt byl pozorován u kuřat, kde byl poměr tuku na celkové váze vyšší u germ-free jedinců, přestože všechna pozorovaná kuřata byla krmena stravou o stejném složení (Furuse & Yokota 1984). U germ-free kuřat bylo také pozorováno zvýšené vstřebávání podávaných tuků oproti konvenčním kontrolám (Maisonnier *et al.* 2003). Další studie ukázala, že pokud se konvenčním kuřatům podávala strava s určitým obsahem penicilinu, jejich růstová rychlost se zvýšila oproti kontrolám se stravou bez antibiotik. Růstová rychlost germ-free kontrol nebyla přítomností antibiotik v potravě ovlivněna, ačkoli byla vyšší než u konvenčních kontrol se stravou obsahující antibiotika. To nabádá k domněnce, že v přirozeném prostředí se vyskytují mikroorganismy zpomalující růst kuřat a některé z nich jsou rezistentní vůči penicilinu (Coates & Fuller 1963).

Při studii s germ-free králíky byla pozorována změna v průběhu koprofagie, a to taková, že germ-free jedinci produkovali větší poměr měkkých exkrementů než jejich konvenční kontroly. Tyto měkké exkrementy nebyly navzdory předpokladům a hypotézám o funkci koprofagie germ-free jedinci konzumovány. Autoři této studie nenašli žádné vysvětlení této anomálie (Yoshida & Pleasants 1968).

### **3.2 Efekt na metabolismus a metabolický profil hostitele**

Z výsledků studií prezentovaných v předchozí kapitole lze usoudit, že mikrobiota zásadně ovlivňuje hostitelský metabolismus látek nejen přímo, vlastním metabolismem, ale její přítomnost má efekt i na regulaci látkové přeměny v orgánech a buňkách hostitele (El Aidy *et al.* 2013). Následující kapitola je proto zaměřena na podrobnější studie rozdílů mezi různými metabolickými vlastnostmi germ-free a konvenčních jedinců. Ve většině studií se jedná o měření rozdílů v koncentracích a aktivitách významných biomolekul v určitých tkáních, střevním obsahu a moči v závislosti na přítomnosti mikrobioty.

Při studiích zahrnujících měření bazálního metabolismu (dále BMR) skrze spotřebu kyslíku u germ-free a konvenčních myší a potkanů bylo pozorováno snížení BMR u germ-free jedinců oproti konvenčním kontrolám (Wostmann *et al.* 1968; Bäckhed *et al.* 2004). Tento rozdíl se vytratí po kolonizování germ-free jedinců mikrobiotou konvenčních kontrol po několika dnech (Bäckhed *et al.* 2004). Toto zjištění nabádá k domněnce, že přítomnost mikrobioty klade zvýšené nároky na metabolismus hostitele, což by šlo potvrdit snížením BMR konvenčních jedinců vyoperováním céka. Vyoperováním céka konvenčních potkanů se ovšem indikátory BMR (spotřeba O<sub>2</sub>, srdeční průtok) nezměnily, naopak po vyjmutí céka u germ-free jedinců se jejich BMR přiblížil hodnotám konvenčních kontrol, i když byl stále signifikantně nižší (Wostmann *et al.* 1968). Vysvětlení nabízí teorie, že v céku germ-free jedinců je zvýšená absorpce určitých chemických látek, které ovlivňují metabolismus hostitele (Wostmann *et al.* 1973).

#### **3.2.1 Metabolický profil hostitele**

Zvýšení BMR také pravděpodobně souvisí se změnou koncentrace některých molekul energetického metabolismu v tkáních a exkretech hostitele. Při porovnání složení krevního séra germ-free a konvenčních myší bylo pozorováno zvýšení koncentrace pyrohroznové, fumarové a maleinové kyseliny u konvenčních kontrol (Velagapudi & Hezaveh 2010). Porovnáváním metabolického profilu vzorků moči germ-free myší s vzorky získanými v různých časových intervalech po konvencionalizaci se ukázalo, že změny v metabolickém profilu se projeví již po 1 – 2 dnech po kolonizaci. Bylo zaznamenáno zvýšení koncentrací metabolitů jako kreatinu, formátu<sup>8</sup>, tryptofanu a fenylacetylglycinu oproti germ-free myším. Změny v koncentracích metabolitů ve vzorcích stěny tlustého střeva se plně

---

<sup>8</sup> Anion odvozený od metanové kyseliny.

projevily až po 8 – 16 dnech. Šlo o zvýšení koncentrací alaninu, fumarátu, glycinu a uracilu a snížení koncentrací glycerolu, glukózy a formátu u kontrol oproti germ-free jedincům.

Změna v intenzitě metabolismu v tkáni byla provázána rozdílem v genové expresi jednotlivých buněk (El Aidy *et al.* 2013). Přítomnost mikrobioty má tedy za následek zvýšení BMR provázené změnou koncentrace některých metabolitů a regulací genové exprese v enterocytech<sup>9</sup> tlustého střeva.

### 3.2.2 Trávicí enzymy hostitele

Dalším způsobem, jak zkoumat vliv mikrobioty na metabolismus hostitele je studium koncentrací a aktivit jednotlivých trávicích enzymů. Shrnutí raných studií srovnávajících aktivity jednotlivých trávicích enzymů gastrointestinálního traktu (žaludečních proteáz, střevních lipáz a amyláz, pankreatických enzymů atd.) u germ-free jedinců a jejich konvenčních kontrol naznačuje, že aktivita a množství těchto enzymů jsou na přítomnosti mikrobioty spíše nezávislé. Absorpce produktů aktivity trávicích enzymů je obecně vyšší u germ-free zvířat, jak bylo dokázáno u aminokyselin, xylózy a nasycených mastných kyselin (Corring, Juste & Simoes-Nunes 1981). Rozdíly byly pozorované v koncentracích pankreatické proteázy, nižší hodnoty byly naměřeny ve vzorcích obsahu céka konvenčních jedinců oproti germ-free individuům. Tento jev byl pozorován u kuřat (Lepkovsky *et al.* 1966), potkanů, myši (Loesche 1968) a zajíců (Malis *et al.* 1976). Intestinální mikrobiota tedy snižuje aktivitu tohoto enzymu v distálním trávicím traktu. U germ-free potkanů byla dále naměřena vyšší koncentrace katabolických enzymů alkalické fosfatázy a adenosin trifosfatázy (ATPázy) oproti konvenčním jedincům (Kawai & Morotomi 1978; Meslin & Sacquet 1984). Bohužel neexistuje mnoho studií, které by objasnily, zda je vliv bakterií na aktivity těchto enzymů přímý (bakterie enzym degraduje), nebo zda přítomnost mikrobioty reguluje expresi příslušných genů.

Se zvyšujícím se stářím se v enterocytech jejunu (střední část tenkého střeva) potkanů zvyšoval rozdíl v aktivitě enzymu sukrázy<sup>10</sup>, která byla vždy vyšší u germ-free jedinců při porovnání s konvenčními kontrolami. U germ-free jedinců byla nezávisle na věku měřena také signifikantně vyšší aktivita enzymu laktázy, účastníciho se trávení složek mléka (Kozáková & Štěpánková 1998). Obrat glukózy v epiteliálních buňkách tlustého střeva byl u germ-free potkanů o 25 % nižší než u konvenčních kontrol. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben sníženou aktivitou enzymu 6-Fosfofrukto-1-kinázy, jednoho z klíčových enzymů glykolýzy, v enterocytech tlustého střeva. Pokles aktivity byl provázen celkovým snížením genové exprese (Cherbuy *et al.* 1995). Vliv přítomnosti mikrobioty na aktivitu některých trávicích enzymů lze tedy shrnout jako negativní.

---

<sup>9</sup> Cylindrické buňky tvořící hlavní buněčný typ střevního epitelu, zajišťují transport molekul z lumen střeva a sekreci některých látek.

<sup>10</sup> Enzym katalyzující hydrolýzu disacharidu sukrózy za vzniku glukózy a fruktózy.

### 3.2.3 Metabolismus tuků

Zvlášť intenzivně je pomocí experimentů s axenickými jedinci studován vliv střevní mikrobioty na trávení, vstřebávání, syntézu a ukládání tuků (Bäckhed *et al.* 2004). U těchto procesů jsou postupně objasňovány i molekulární mechanismy, jako interakce bakterií se žlučovými kyselinami (Martin *et al.* 2007) nebo genová exprese v orgánech a tkáních s metabolismem tuků souvisejících (Bäckhed *et al.* 2004).

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.1, konvencionalizace germ-free potkanů vede ke zvýšení obsahu tělesného tuku. Konkrétně se tak děje zvýšením produkce triglyceridů v játrech syntézou z SCFA produkovaných bakteriemi (Bäckhed *et al.* 2007). V játrech konvenčních potkanů byla oproti germ-free pozorovaná zvýšená exprese mRNA pro dva enzymy zodpovědné za *de novo* syntézu mastných kyselin, a to acetyl-CoA karboxylázy a syntetázy mastných kyselin. Takto vzniklé mastné kyseliny jsou poté pravděpodobně ukládány v tukových tkáních. Pomocí qRT-PCR<sup>11</sup> byla u konvenčních jedinců oproti germ-free protějšků naměřena nižší hodnota exprese mRNA proteinu *Fiaf*, což je inhibitor enzymu lipoprotein-lipázy (dále LPL), jehož funkcí je akumulovat triglyceridy v adipocytech. Konvenční jedinci mají tedy zvýšenou aktivitu LPL v porovnání s germ-free, a tedy i větší potenciál pro zvýšení obsahu tuku v tukových tkáních, kosterních a srdečních svalech (Bäckhed *et al.* 2004). Konvenčním myším byla dále naměřena zvýšená koncentrace fosfatidylcholinů<sup>12</sup> v krevním séru a v játrech. Konkrétně zvýšená koncentrace fosfatidylcholinu (34:1)<sup>13</sup>, agonisty jaderného receptoru PPAR $\alpha$ , jenž indukuje oxidaci mastných kyselin, transport lipidů, ketogenezi, glukoneogenezi a expresi LPL, může hrát významnou roli ve zvýšeném metabolismu triglyceridů konvenčních jedinců (Velagapudi & Hezaveh 2010). Hostitel tedy reaguje na mikrobiální produkci SCFA zvýšením exprese genů pro syntézu lipidů z těchto molekul, které může být indukováno například zvýšenou koncentrací agonistů příslušných jaderných receptorů.

Přítomnost mikrobioty měla vliv na výskyt derivátů žlučových kyselin u germ-free a konvenčních kuřat. Ve vzorcích střevního obsahu germ-free kuřat byla naměřena vyšší koncentrace tzv. taurokonjugovaných žlučových kyselin než u jejich konvenčních kontrol (Maisonier *et al.* 2003). To poukazuje na schopnost ustáleného přirozeného bakteriálního společenství dekonjugovat žlučové kyseliny na formy se sníženou rozpustností a tedy zhoršenou schopností emulgace a absorpce dietárního tuku (Martin *et al.* 2007). Střevní mikrobiota takto působí na recyklaci žlučových kyselin a ovlivňuje signální kaskády regulující metabolismus tuků, ve kterých hrají žlučové kyseliny roli (Staggers, Frost & Wells 1982). Podobné výsledky přinesla studie zaměřující se na výskyt derivátů žlučových kyselin v intestinálním traktu konvenčních myší a jejich germ-free protějšků kolonizovaných mikrobiotou

---

<sup>11</sup> Kvantitativní PCR – sekvenační metoda umožňující odhad množství určitých sekvencí nukleové kyseliny ve vzorku.

<sup>12</sup> Druh molekul tvořící plazmatickou membránu buněk.

<sup>13</sup> Označení konkrétního typu fosfatidylcholinu, zde poměr jednoduchých a dvojných vazeb v molekule.

získanou ze zažívacího traktu dvacetidenního lidského novorozence (dále HBF). Analýza ukázala vyšší poměr tzv. tauro-konjugovaných žlučových kyselin ku nekonjugovaným u HBF myši než u konvenčních kontrol (Martin *et al.* 2007). Tento negativní efekt normální mikrobioty na aktivitu žlučových kyselin je, jak se zdá, hostitel schopen kompenzovat zvýšenou enterohepatickou cirkulací žlučových kyselin (Ukai, Tomura & Ito 1976).

Při zkoumání vlivu mikrobioty na metabolismus cholesterolu bylo zjištěno, že při podávání definované výživy obsahující 0–0,5 % cholesterolu potkanům je jeho koncentrace v játrech třikrát vyšší u germ-free než u konvenčních potkanů (Mirand & Back 1969). To může být následek snížené enterohepatické cirkulace žlučových kyselin, a tedy i sníženého katabolismu cholesterolu u germ-free jedinců souvisejícího s poklesem celkového metabolismu u germ-free zvířat (Ukai *et al.* 1976).

Z uvedených studií vyplývá, že přítomnost mikrobioty ovlivňuje energetický metabolismus hostitele mnoha způsoby, z nichž některé mají negativní vliv, například dekonjugace žlučových kyselin (Martin *et al.* 2007) nebo snížení absorpce látek z lumen střeva, jiné mají naopak pozitivní efekt, zejména produkce SCFA, ze kterých jsou v játrech hostitele syntetizovány lipidy (Bäckhed *et al.* 2004). Výsledkem je převaha pozitivních efektů, které se pravděpodobně podílí na zvýšení BMR a vyšší koncentraci některých molekul energetického metabolismu ve vzorcích z tkání a exkretů konvenčních jedinců (Wostmann *et al.* 1968; Bäckhed *et al.* 2004).

### **3.2.4 Metabolismus minerálů**

Germ-free stav ovlivňuje také metabolismus některých minerálů a iontů. Germ-free králíci krmění stravou obsahující železo ve formě minerálu měli nižší koncentraci hemoglobinu a železa v krevní plazmě než konvenční jedinci krmění stejnou stravou. Při změně formy železa v potravě z minerální na organickou se koncentrace hemoglobinu a železa u germ-free králíků po čtyřech týdnech nelišila od těch u konvenčních jedinců (Reddy *et al.* 1965). Germ-free králíci tedy nebyli schopni dostatečně vstřebávat železo v organické formě, což může poukazovat na schopnost střevních bakterií měnit formu železa z minerální na organickou.

U germ-free potkanů byla naměřena vyšší absorpce hořčíku a vápníku oproti konvenčním kontrolám, konkrétně v průměru o 20 % u vápníku a 30 % u hořčíku. Stejně byla u germ-free jedinců zvýšená exkrece vápníku a hořčíku, u fosforu byl pozorován opačný jev, jeho exkrece byla u germ-free nižší než u konvenčních kontrol. Retence všech tří prvků byla vyšší u germ-free jedinců, a to o 31–59 %. Tyto prvky se hojně ukládaly v kostních tkáních germ-free potkanů, jak potvrdila analýza složení stehenní kosti. Množství těchto prvků vyjádřené na jednotky tělesné hmotnosti bylo vyšší u germ-free jedinců, a to o 25–40 % (Reddy, Pleasants & Wostmann 1969). Dále bylo zjištěno, že absorpce sodíkových iontů přes stěnu céka je u germ-free zvířat oproti konvenčnímu stavu zvýšená a probíhá proti vyššímu koncentračnímu gradientu (Rösel & Engelhardt 1996).

Zvýšený transport sodíku u germ-free jedinců je pravděpodobně způsoben hormonální stimulací aldosteronem<sup>14</sup>, který je v krevní plasmě germ-free jedinců ve vyšší koncentraci než u konvenčních kontrol (Rösel & Engelhardt 1996). Výsledky uvedených studií jsou v souladu s jinými studiemi, které poukazují na negativní vliv přítomnosti mikrobioty na vstřebávání látek z lumen střev, viz kap. 3.2.2.

### 3.2.5 Metabolismus močoviny

Intestinální mikrobiota ovlivňuje také metabolismus dusíkatých látek hostitele, konkrétně močoviny skrze regulaci ornitinového cyklu (Saheki & Atsuko 1980). Ve studii metabolismu této molekuly byl pozorován dramatický rozdíl v množství exspirovaného C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> po subkutánní injekci močoviny s inkorporovaným izotopem uhlíku C<sup>14</sup> mezi germ-free a konvenčními potkany.

Po 6 hodinách se množství exspirovaného C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> u konvenčních kontrol rovnalo přibližně 2 % podaného C<sup>14</sup>, u germ-free jedinců se jednalo pouze o 0,05 %. Možné vysvětlení přináší hypotéza, že močovina je ve střevech konvenčních jedinců degradována bakteriálními ureázami (Levenson & Crowley 1959). Ve vzorku jater germ-free myši byla naměřena nižší koncentrace ornitinu (349 nmol/g) než u konvenčních kontrol (700 nmol/g). Vyšší koncentrace ornitinu vede ke zvýšení produkce močoviny, které je u konvenčních jedinců syntetizováno o 20 – 30 % více. Močovina je ve střevech degradována za vzniku amoniaku, ze kterého je v játrech v ornitinovém cyklu zpětně syntetizována močovina (Saheki & Atsuko 1980). Intenzivnější recyklace močoviny znamená zvýšené energetické nároky na její syntézu, což může přispívat zvýšenému BMR konvenčních jedinců.

### 3.2.6 Metabolismus xenobiotik

Rozdíly mezi germ-free a konvenčními myšmi byly pozorovány v efektivitě odbourávání xenobiotik a v účinku některých omamných látek. Bylo zjištěno, že germ-free myši mají pozměněnou expresi 112 genů podílejících se většinou na degradaci xenobiotik v játrech. Bližší analýza ukázala, že velká část těchto genů je regulována jediným proteinem, tzv. CAR jaderným receptorem, jehož exprese byla naměřena 1,6krát nižší u *specific pathogen-free*<sup>15</sup> (dále SPF) myši než u germ-free jedinců. Stejně byla u konvenčních jedinců snížena exprese genů regulovaných tímto receptorem. Podobně byla u SPF pozorována nižší exprese cytochromu P450, který se na metabolismu xenobiotik také podílí. Tento rozdíl se projevil změnou délky účinku anestezie indukovanou podáním barbiturátu<sup>16</sup> pentobarbitalu. U germ-free myši se tzv. vyrovnávací reflex<sup>17</sup> při podráždění navrátil průměrně za 53 minut po podání pentobarbitalu, u konvenčních SPF myši se tak dělo až po 81 minutách. Při testování délky anestezie u konvencionalizované myši nedošlo ani po šesti týdnech ke změně, její délka se pohybovala stále okolo 48 – 50 minut (Björkholm *et al.* 2009).

---

<sup>14</sup> Steroidní hormon pozitivně regulující retenci vody a iontů Na<sup>+</sup>, zároveň snižuje koncentraci K<sup>+</sup> v plazmě.

<sup>15</sup> Termín užívaný pro jedince prostých určitých patogenů.

<sup>16</sup> Skupina látek odvozených od kyseliny barbiturové, tlumící přenos nervového signálu v mozku, užívaná při anestezii.

<sup>17</sup> Reflex udržující tělo v normální vzpřímené poloze.

U konvencionalizovaných myší byl naměřen nejvyšší poměr hmotnosti jater ku celkové hmotnosti (4,5 – 4,6 %) oproti konvenčním (4,1 %) a germ-free jedincům (3,7 %). I přes abnormální zvětšení jater po konvencionalizaci se metabolismus xenobiotika, konkrétně pentobarbitalu, překvapivě nezměnil (Björkholm *et al.* 2009). Tedy i přes nižší hladinu BMR a nižší energetický metabolismus odbourávají germ-free jedinci xenobiotika rychleji. Přítomnost mikrobioty v určité senzitivní periodě ontogeneze hostitele má pravděpodobně negativní vliv na odbourávání xenobiotik po zbytek jeho života.

### 3.3 Regulace motility dolního trávicího traktu

Porovnáváním vlastností germ-free a konvenčních jedinců různých druhů byl dokázán pozitivní vliv přítomnosti komplexního mikrobiálního společenstva na aktivitu hladkého střevního svalstva (Bruckner, Husebye & Trappen 2003). Nicméně kolonizace germ-free jedinců čistými kulturami určitých bakteriálních druhů odhalila fakt, že regulace je druhově specifická a může být i negativní (Husebye *et al.* 2001). Mechanismus regulace pravděpodobně zahrnuje interakci produktů bakteriálního metabolismu s hormony ovlivňujícími nervový systém hladkého střevního svalstva (Wichmann *et al.* 2013).

Pomocí sledování radioaktivně označených složek potravy byl pozorován delší čas průchodu tráveniny trávicím traktem germ-free myší než konvenčních kontrol (Abrams & Bishop 1966, 1967). Částečně lze tento jev vysvětlit efektem nadměrně zvětšeného slepého střeva germ-free jedinců a stimulací jednotlivých buněk hladkého střevního svalstva látkami podmíněnými přítomností bakterií, nicméně existují studie poukazující na fakt, že zpomalení střevní motility takto zcela vysvětlit nelze a že tento jev způsobuje střevní mikrobiota ovlivňující motorickou aktivitu dolního trávicího traktu (Abrams & Bishop 1967; Husebye, Hellström & Midtvedt 1994).

Přítomnost normální mikroflóry v tenkém střevě má pozitivní vliv na frekvenci výskytu migrujícího myoelektrického komplexu<sup>18</sup> (dále MMC), tedy na výkonnost peristaltiky (Bruckner *et al.* 2003). Detailnější studie porovnávající periodu mezi jednotlivými MMC u germ-free a kolonizovaných gnotobiologických jedinců odhalila, že stimulace nebo inhibice vzniku MMC závisí na druhu kolonizující bakterie. Například u germ-free potkanů kolonizovaných bakterií *Clostridium tabificum* *vp 04* se perioda mezi MMC zkrátila z 30,5 minut při germ-free stavu na 21,2 minut po 7 – 10 dnech po kolonizaci. Naopak kolonizace bakterií *Micrococcus luteus* měla inhibiční efekt, perioda mezi MMC se po kolonizaci prodloužila z 27,7 minut při germ-free stavu na 35,9 minut po kolonizaci. Mechanismus modulace periody není dopodrobna vysvětlen, přesto bylo dokázáno, že se na něm podílejí produkty bakteriálního anaerobního metabolismu jako SCFA a produkty degradace slizničního mukusu (Husebye *et al.* 2001).

---

<sup>18</sup> Vlny svalové aktivity zodpovědné za posun střevního obsahu.



Snížený obsah SCFA v tlustém střevě zřejmě souvisí se zvýšením koncentrace hormonu GLP-1 v krevní plasmě, který stimuluje sekreci insulinu a tímto způsobem zpomaluje střevní motilitu (Wichmann *et al.* 2013).

### 3.4 Vliv na morfologii a cytologii dolního trávicího traktu

Přítomnost střevní mikrobioty má na základě experimentů s axenickými organismy zásadní vliv na některé morfologické a histologické vlastnosti dolního trávicího traktu obratlovců. Jde o dimenze orgánů zažívacího traktu hostitele a jejich segmentů, morfologický charakter střevního epitelu a fyziologii jeho buněk. Prokazatelně pozitivní vliv má přítomnost mikrobioty na podobu vaskulární sítě střevní stěny (Smith *et al.* 2007).

Obecně mají germ-free jedinci oproti konvenčním kontrolám nižší hmotnost tenkého střeva v porovnání s celkovou tělesnou hmotností. Tato skutečnost byla prokázána u kuřat a selat (Palmer & Rolls 1983). Opačným a často pozorovaným jevem je mnohonásobné zvětšení céka<sup>19</sup> germ-free hlodavců, a to až na desetinásobek objemu pozorovaného u konvenčních jedinců (Coates 1968; cit. dle Thompson & Trexler 1971). Při zpětném osídlení trávicího traktu vzorkem mikrobioty získaným z konvenčních kontrol nebo i jednotlivými druhy bakterií se velikost céka po několika týdnech zmenší na hodnotu pozorovanou u konvenčních jedinců (Martin *et al.* 2007). Tato anomálie může být výsledkem změny osmotických podmínek cékálního obsahu germ-free jedinců. Ten je znatelně řidší a obsahuje vyšší podíl nestráveného slizničního mukusu, jehož složkou jsou záporně nabitě mukopolysacharidy, které v lumen céka zadržují osmoticky aktivní kationty, například sodík. To má za následek snížení vstřebávání vody z lumen céka a tím i jeho distenzi (Rösel & Engelhardt 1996). Při výměně obsahu céka germ-free jedinců za roztok NaCl injekcí *in vivo* se absorpce vody z lumen céka přiblížila normálním hodnotám konvenčních kontrol (Donowitz & Binder 1979). Zvětšení céka germ-free jedinců nebylo ovšem pozorováno u jiných druhů zvířat, například u kuřat se velikost céka u germ-free jedinců nelišila od konvenčních kontrol (Furuse & Yokota 1984).

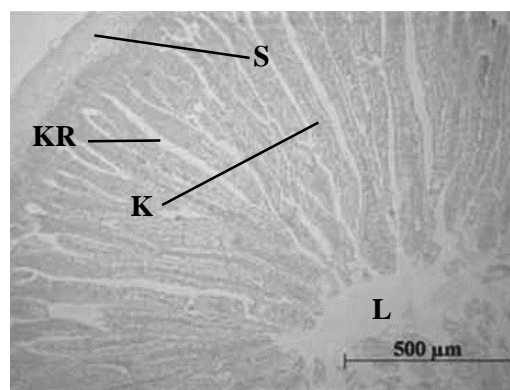
Rozdíly v morfologii byly pozorovány také na úrovni epitelu. Při porovnávání morfologie duodena (proximální část tenkého střeva) a ilea (distální část tenkého střeva) germ-free a konvenčních selat bylo pozorováno zmenšení hloubky krypt a extrémní prodloužení klků (viz obr. 1) u germ-free jedinců oproti konvenčním (Shirkey *et al.* 2006). V jejunu byly klky naopak delší u konvenčních selat (Shurson *et al.* 1990). U germ-free potkanů byly klky vyšší a krypty podobně hluboké v porovnání s jejich konvenčními protějšky (Uribe *et al.* 1991). Klky v ileu germ-free myši byly signifikantně menší, stejně jako mělčí krypty oproti výrazně delším klkům a hlubším kryptám konvenčních jedinců (Abrams, Bauer & Sprinz 1963).

---

<sup>19</sup> Slepá část tlustého střeva, která spojuje poslední oddíl tenkého střeva ileum se vzestupným tračníkem.

Tyto značné regionální a mezidruhové rozdíly jsou způsobeny pravděpodobně druhovou specifitou bakteriálních společenství osidlujících určité části tenkého střeva (Ishikawa *et al.* 1986) nebo nemikrobiálními faktory, jako je působení žlučových kyselin, pankreatických sekretů a různých složek potravy (Shirkey *et al.* 2006). Jednotným jevem je zmenšení tloušťky vazivové stěny lamina propria u germ-free zvířat oproti konvenčním (Abrams *et al.* 1963; Thompson & Trexler 1971). Rozdíl byl také pozorován v délce mikroklyk v různých segmentech tenkého střeva mezi germ-free a konvenčními potkany. V duodenu byly mikroklyky pozorovány v průměru o 5 % delší u germ-free jedinců oproti konvenčním kontrolám, o 9 % v jejunu a až o 18 % v ileu. Tloušťka mikroklyk se významně nelišila (Meslin & Sacquet 1984).

**Obr. 1.** Příčný řez ileem germ-free selete 12 dní po inokulaci bakterií *Lactobacillus fermentum*. (Shirkey *et al.* 2006). **K** – klyk, **KR** – krypta, **S** – střevní stěna, **L** – lumen střeva.



Přirozená mikrobiota navozuje také změny v glykosilaci buněk epitelu tenkého střeva. U konvenčních myší je pozorována změna terminální molekuly glykanů, a to přechod ze salicylové kyseliny na fukózu u všech typů buněk po ukončení kojení (Hooper 2004). U germ-free myší tato změna proběhla pouze u jednoho buněčného typu tenkého střeva, a to u tzv. Panethových buněk. V tlustém střevě proběhla změna ve složení glykanů stejně u germ-free jedinců jako u konvenčních kontrol. Mechanismus zahrnuje zvýšenou expresi enzymu glykosil-transferázy v buňkách tenkého střeva, která provádí změnu terminální molekuly. Změna glykosilace může být zpětně navozena kolonizací germ-free jedinců mikrobiotou konvenčních kontrol. Ke změně dochází i po inokulaci germ-free myší jediným druhem bakterie, a to *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bry *et al.* 1996). Tento druh využívá širokou paletu polysacharidů jako zdroj uhlíku, včetně fukózy. Pomocí bakteriálních transpozonů lze vytvořit kmen mutantů postrádající schopnost fukózu využívat (Salyers & Pajeau 1989). Po inokulaci germ-free myší čistou kulturou takového mutantního kmene změna glykosilace neproběhla (Bry *et al.* 1996). To může být příkladem mechanismu, který přizpůsobením vlastností hostitele pomáhá stabilizovat jeho střevní mikrobiotu oboustranně prospěšným vztahem s určitým bakteriálním druhem (Hooper 2004).

Germ-free stav u myší navozuje snížení proliferace enterocytů v kryptách tenkého střeva oproti konvenčním kontrolám, což bylo dokázáno počítáním jednotlivých dělicích se buněk označených

radioaktivním tymidinem inkorporujícím se do nově syntetizované DNA v průběhu mitózy<sup>20</sup> (Abrams *et al.* 1963). Podobně byla u konvenčních kuřat pozorována vyšší mitotická aktivita enterocytů oproti germ-free jedincům (Palmer & Rolls 1983). Stejně tak u potkanů byl čas buněčného cyklu kratší u konvenčních kontrol (13,9 hod.) než u germ-free jedinců (15 hod.) (Uribe *et al.* 1991).

Střevní bakterie ovlivňují expresi faktorů diferenciaci buněk epitelu, což bylo dokázáno jak *in vitro* kultivací tkáňových kultur v přítomnosti bakterií, tak *in vivo* porovnáním výsledků exprese mRNA těchto faktorů ve střevech germ-free myši a konvenčních kontrol. Přítomnost střevních bakterií způsobila změnu exprese některých proliferačních faktorů (Becker *et al.* 2013).

U germ-free myši byl také prodloužen čas migrace enterocytů z krypt na vrchol klků (Abrams *et al.* 1963). Prodloužený čas migrace byl později dokázán přesněji metodou zahrnující výpočet označených buněk pomocí tzv. kapalně scintilace<sup>21</sup>, která umožnila zanedbat statistickou chybu vzniklou přímým počítáním a výběrem souboru krypt. U germ-free myši trvala migrace enterocytů proximálního regionu tenkého střeva průměrně 115 hodin, u konvenčních kontrol 53 hodin. Po inokulaci germ-free myši bakterií *Lactobacillus* nebo kvasinkou *Torulopsis pintolopesii* nebyla pozorována v čase migrace změna, což podle autorů znamená, že k ovlivnění času migrace nestačí kolonizace germ-free jedince jednotlivými druhy, ale je zapotřebí souhra neznámých faktorů komplexního mikrobiálního společenství (Savage *et al.* 1981).

Přítomnost mikrobiálního společenství má také nezanedbatelný vliv na podobu vaskulární sítě epitelu tenkého střeva studovaných obratlovců. Hustota a provázanost cévního systému epitelu se v průběhu ontogeneze vyvinula ve výrazně vyšší míře u konvenčních myši než u germ-free jedinců. Konvencionalizace germ-free jedince vyústila ve vyvinutí kapilární sítě v míře pozorované u konvenčních jedinců, a to v průměrné době deseti dnů. Stejného efektu bylo dosaženo kolonizací germ-free jedince čistou kulturou bakterie *Bacteroides thetaiotaomicron* (Stappenbeck *et al.* 2002). V téže studii byl pozorován vliv Panethových buněk na angiogenezi<sup>22</sup> v závislosti na přítomnosti mikrobioty pomocí transgenicky modifikovaných myši postrádajících právě tento buněčný typ. Tyto transgenické germ-free myši měly vaskulární síť vyvinutou v ještě menší míře než germ-free jedinci s Panethovými buňkami, což prokázalo pozitivní vliv Panethových buněk na angiogenezi klků tenkého střeva i bez přítomnosti mikrobioty. Kolonizace transgenických germ-free myši bakterií *Bacteroides thetaiotaomicron* neměla na míru angiogeneze vliv, míra hustoty a provázanosti cév byla podobná jako u nekolonizovaných germ-free transgenických jedinců. Mikrobiota tedy pozitivně ovlivňuje prokrvení stěn tenkého střeva skrze faktory produkované Panethovými buňkami (Stappenbeck *et al.* 2002).

---

<sup>20</sup> Somatické buněčné dělení.

<sup>21</sup> Laboratorní metoda založená na detekci radioaktivního záření v označeném vzorku.

<sup>22</sup> Proces větvení a rozšiřování již existujících cév.

Analýza exprese jaderných receptorů (dále NR) regulujících transkripci DNA buněk stěny tlustého střeva odhalila rozdíly v mírách exprese pěti NR mezi souborem germ-free a konvenčních myší. Germ-free jedinci měli oproti konvenčním kontrolám zvýšenou expresi receptorů LXR $\alpha$ , ROR $\gamma$  a CAR a sníženou expresi Nur77 a GCNF. Tyto receptory regulují klíčové biologické funkce, jako je právě proliferace enterocytů, angiogeneze střevní stěny, vývoj lymfatických orgánů a metabolismus různých látek, například glukózy a cholesterolu. Aktivita některých těchto NR je regulována signálními kaskádami zahrnujícími speciální typ transmembránových proteinů, tzv. Toll-like receptorů (dále TLR), aktivovaných specifickými bakteriálními molekulami, například LPS. Přítomnost střevních bakterií také ovlivňuje expresi TLR, konkrétně buňky střevní stěny germ-free jedinců exprimovaly méně TLR-2 a TLR-5 než buňky konvenčních kontrol (Lundin *et al.* 2008).

Zvýšená proliferace a rychlejší migrace enterocytů konvenčních jedinců oproti germ-free protějškům kladou vyšší energetické nároky na metabolismus hostitele, což může také přispívat pozitivnímu efektu přítomnosti mikrobioty na BMR.

### **3.5 Interakce mikrobioty s imunitním systémem**

Přítomnost velkého množství cizorodých bakteriálních buněk ve střevech nutně indukuje odezvu imunitního systému hostitele. Oproti jiným místům na těle, například kůži, kde je vnitřní prostředí izolováno bariérou vícevrstevné pokožky nebo jinými ochrannými strukturami, stojí mezi miliardami bakterií a vnitřním prostředím hostitele ve střevě jednovrstevný epitel. Stimulace imunitního systému je tedy v těchto místech velmi intenzivní (Tlaskalova-Hogenova *et al.* 2005). Snížení intenzity této stimulace způsobené nepřítomností mikrobioty pak vede k nedokonalému vývoji některých komponent imunitního systému, například redukované velikosti lymfatických uzlin (Bauer & Horowitz 1963), snížené aktivitě určitých typů buněk imunitního systému (Macpherson *et al.* 2001) a nižší produkci mikrobicidních látek epiteliálními buňkami (He *et al.* 2003; Hooper *et al.* 2003; Cash *et al.* 2006). Porovnávání vlastností axenických a konvenčních jedinců umožňuje studium efektu intestinální mikrobioty právě v těchto oblastech. Protože se jedná o zásadní téma související i s lidskými nemocemi, jsou podrobněji prostudovány i některé molekulární mechanismy.

#### **3.5.1 Genová exprese epiteliálních buněk**

Na úrovni epitelu reaguje hostitel na přítomnost mikrobioty zejména zvýšením exprese genů pro různé mikrobicidní proteiny v epiteliálních buňkách střev. Mechanismus, jakým hostitel s mikrobiotou komunikuje, tj. zjišťuje její přítomnost, není zatím podrobněji vysvětlen.

Germ-free myši měly oproti konvenčním kontrolám například dramaticky sníženou expresi mRNA proteinu RELM $\beta$ , který je v konvenčních myších běžně produkován pohárkovými buňkami epitelu tlustého střeva. Po zpětné kolonizaci germ-free myší přirozenou mikrobiotou se exprese RELM $\beta$  po čtyřech dnech zvýšila na normální hodnotu (He *et al.* 2003). Protein RELM $\beta$  hraje mimo negativní

regulace mikrobioty roli v obraně hostitelského organismu proti některým parazitickým helmintům (Herbert *et al.* 2009).

V době po ukončení kojení (odstavení) se u konvenčních myší v reakci na změnu druhového složení střevní mikrobioty zvyšuje v Panethových buňkách epitelu tenkého střeva exprese proteinu ze skupiny angiogeninů<sup>23</sup>, Ang4. Ve stejné studii byly prokázány mikrobicidní účinky Ang4 vůči několika druhům střevních patogenů, jako například *Enterococcus faecalis* nebo *Listeria monocytogenes* (Hooper *et al.* 2003). Ve vzorcích epitelu tenkého střeva získaných z germ-free jedinců v době po odstavení byla naměřena nesrovnatelně nižší hladina exprese Ang4 než u konvenčních kontrol stejného věku. Zvýšení exprese bylo navozeno zpětnou kolonizací germ-free myší čistou kulturou bakterií druhu *Bacteroides thetaiotaomicron* (Hooper *et al.* 2003). Podobná situace byla pozorována u proteinu REGIII $\gamma$ , patřícího mezi lektiny<sup>24</sup>. REGIII $\gamma$  je sekretován Panethovými buňkami do lumen tenkého střeva, kde se váže na peptidoglykan, což mu umožňuje charakteristická C-koncová sekvence. REGIII $\gamma$  je účinný proti gram-pozitivním bakteriím, jejichž peptidoglykan tvoří svrchní vrstvu buněčného obalu a je tak vystaven okolnímu prostředí, tedy i přímému kontaktu s REGIII $\gamma$ . Po navázání REGIII $\gamma$  buněčnou stěnu perforuje. Relativní exprese REGIII $\gamma$  v Panethových buňkách se u konvenčních kontrol po odstavení (17 – 22 dnů po narození) zvýšila na hodnotu přibližně 31krát vyšší v porovnání s jejich stejně starými germ-free protějšky. Zpětná kolonizace germ-free jedinců komplexní mikrobiotou konvenčních kontrol způsobila zvýšení exprese REGIII $\gamma$  20krát. Podobného zvýšení exprese se nepodařilo dosáhnout kolonizací germ-free jedince čistou kulturou *Listeria innocua* a *Bacteroides thetaiotaomicron* (Cash *et al.* 2006). Proteiny rodiny REGIII také působí jako růstové faktory pozitivně regulující růst Schwannových buněk obalujících axony neuronů, takže mohou souviset se zvýšenou proliferací buněk střevního epitelu v přítomnosti bakterií (Fukushima *et al.* 2003). Hostitel tedy reaguje na přítomnost mikrobioty zvýšenou expresí a sekrecí baktericidních látek v buňkách epitelu, což mu do jisté míry umožňuje negativně regulovat populaci mikrobioty. Po konvencionalizaci germ-free jedinců se exprese těchto proteinů přiblíží k hodnotám zjištěných u konvenčních kontrol (He *et al.* 2003; Hooper *et al.* 2003; Cash *et al.* 2006).

### 3.5.2 Lymfatické orgány zažívacího traktu

Přítomnost mikrobiální populace ve střevech hostitele stimuluje proliferaci buněk imunitního systému v lymfatických orgánech v blízkosti střev. Jedná se o některé lymfatické uzliny a Peyerovy plaky, jejichž velikost je pozitivně regulována přítomností mikrobioty (Bauer & Horowitz 1963; Savidge & Smith 1991).

Peyerovy plaky germ-free myší jsou v porovnání s jejich konvenčními kontrolami signifikantně menší a jejich mikroskopická struktura je mnohem jednodušší. Rozdíly byly pozorovány také v počtu

---

<sup>23</sup> Proteiny hostitelských buněk degradující tRNA, podílejí se také na angiogenezi.

<sup>24</sup> Buněčné proteiny vážící sacharidové zbytky.

imunokompetentních buněk osidlujících lymfatické uzliny u germ-free a konvenčních myší. Mezenterické a submaxilární lymfatické uzliny germ-free jedinců obsahovaly v porovnání s konvenčními kontrolami jen zlomek imunokompetentních buněk. Při porovnání uzlin nenacházejících se ve funkčním kontaktu s orgány osídlenými bakteriemi podobné rozdíly nebyly pozorovány (Bauer & Horowitz 1963).

Slezina germ-free myší obsahovala méně plazmatických a imunoglobuliny obsahujících buněk v porovnání s konvenčními kontrolami (Bauer & Horowitz 1963). Po injekci roztoku koňského proteinu feritinu byla po 14 dní od injekce u germ-free myší pozorována vyšší hmotnost branchiálních lymfatických uzlin v porovnání s konvenčními kontrolami (Bauer & Paronetto 1966). Přítomnost mikrobioty tedy měla za následek mírnější reakci na nebakteriální stimulaci, zde injekci koňského feritinu.

Peyerovy plaky (dále PP) komunikují s lumen tenkého střeva přes speciální typ epitelu, tzv. *follicle-associated epithelium* (dále FAE) překrývající jednotlivé folikuly PP. FAE obsahuje kromě běžných enterocytů tzv. M-buňky, jejichž funkcí je transportovat částice obsahující antigeny z lumen na jejich basolaterální stranu, kde jsou prezentovány asociovaným imunitním buňkám (Yamanaka & Helgeland 2003). Po perorální inokulaci osm týdnů starých germ-free myší bakterií *Salmonella typhimurium* se po sedmi dnech populace M-buněk v FAE jednotlivých folikulů PP zvýšila z 1,6 % (počet M-buněk na 100 enterocytů) na 5,4 % na vrcholu folikulu a z 10,9 % na 21 % na periferii FAE. Zvětšení populace M-buněk (až o 3,4 %) bylo pozorováno také po podávání vody obsahující mrtvé buňky *S. typhimurium* v koncentraci  $10^9$ /ml (Savidge & Smith 1991).

### 3.5.3 Lymfocyty a protilátky

Lymfocyty jsou buňky imunitního systému zajišťující specifickou imunitní reakci, tzv. adaptivní imunitu. Přítomností mikrobioty jsou ovlivněny zvláště T-lymfocyty, zprostředkovávající rozpoznávání a eliminaci patogenů (Bandeira *et al.* 1990; Williams *et al.* 2006), a B-lymfocyty, produkující specifické protilátky indukující imunitní reakci (Cukrowska *et al.* 2001; Macpherson & Uhr 2004; Lanning, Rhee & Knight 2005). Následující kapitola shrnuje vliv intestinální mikrobioty právě na tyto typy buněk.

Střevní mikrobiota indukuje aktivitu intra-epiteliálních lymfocytů (dále IEL), tj. T-buněk imunitního systému schopných migrovat střevním epitelem a zprostředkovávat obranné reakce hostitele. Například u dvouměsíčních germ-free selat byl v epitelu tenkého střeva poměr 5,75 IEL na 100 enterocytů oproti 30 IEL na 100 enterocytů u stejně starých konvenčních selat (Rothkötter, Möllhoff & Pabst 1999). Při porovnávání germ-free a konvenčních myší byly po porodu pozorovány podobně nízké populace IEL u obou skupin. Populace IEL v tenkém střevě začala u konvenčních jedinců růst po odstavení (16. den), u germ-free jedinců byl růst pozorován až po 31 dnech. Podobné zvyšování počtu IEL bylo pozorováno po odstavení v tlustém střevě konvenčních jedinců, u germ-free se počet IEL v závislosti na věku nezměnil (Williams *et al.* 2006).

Germ-free stav také ovlivňuje zastoupení jednotlivých typů IEL. U konvenčních myší se ve fragmentech epitelu tenkého střeva vyskytuje až 20krát více CD4<sup>25</sup> nebo CD8<sup>26</sup> pozitivních  $\alpha/\beta$  T-lymfocytů než u germ-free jedinců. Rozdíl v zastoupení nebyl pozorován u typu  $\gamma/\delta$ . Tento jev poukazuje na závislost určitých typů lymfocytů na účinku bakteriálních antigenů, které ovlivňují jak jejich počet, tak i místo výskytu (Bandeira *et al.* 1990). Stejný trend byl pozorován při porovnání zastoupení typů lymfocytů u germ-free a konvenčních selat (Pabst & Rothkötter 1999).

Po intraperitoneální inokulaci germ-free a konvenčních SPF myší bakterií *Listeria monocytogenes* byla pozorována podobná míra proliferace T-lymfocytů s protilátkami proti *Listeria* v periferních lymfatických uzlinách u obou skupin. Nicméně u germ-free jedinců byl v peritoneální dutině zaznamenán snížený výskyt těchto specifických T-lymfocytů oproti konvenčním jedincům. Germ-free stav tedy navozuje vyšší náchylnost k projevům infekce *L. monocytogenes* skrze snížený výskyt antigen-specifických T-lymfocytů v místě infekce (Inagaki *et al.* 1996).

Přítomnost intestinální mikrobioty má podle výše uvedených studií negativní dopad na populaci T-lymfocytů hostitele, což má za následek neadekvátní imunitní odpověď. Jde zejména o snížení počtu IEL a změnu poměru a výskytu jednotlivých typů těchto buněk přizpůsobených ke zprostředkování imunitní reakce hostitele vůči bakteriální stimulaci.

Kromě výskytu buněk imunitního systému ve střevním epitelu a periferních lymfatických uzlinách ovlivňuje přítomnost mikrobioty také centrální vývoj B-lymfocytů a produkci protilátek (imunoglobulinů). Vzorok Lamina propria obsahuje u germ-free myší nižší počet IgA produkujících plazmatických buněk (Macpherson *et al.* 2001). U druhů jako jsou například ovce, prasata a králíci probíhá ve střevům přidružených lymfatických orgánech, tj. v Peyerových placích a slepém střevě, somatická diversifikace genů antigenových receptorů B-lymfocytů. Vznik repertoáru protilátek B-lymfocytů u těchto druhů tedy probíhá v blízkém kontaktu s obsahem střev a tedy i s mikrobiální populací (Lanning *et al.* 2005). U germ-free králíků byly pozorovány abnormality ve struktuře stěny slepého střeva, které u germ-free jedinců obsahovalo mnohem menší počet lymfocytů v porovnání s konvenčními kontrolami a postrádalo zárodečná centra PP i po 3,5 měsících po narození (Lanning *et al.* 2000). Germ-free králíci si ani po 16 týdnech věku nedokázali vytvořit přirozené mikrobicidní protilátky, a to ani v případě intravenózní imunizace suspenzí tepelně inaktivované kultury *E. coli* 086. Konvenční jedinci tyto protilátky tvořili, stejně tak reagovali na intravenózní imunizaci zvýšením koncentrace protilátek v orgánech (Tlaskalová-Hogenová & Štěpánková 1980).

---

<sup>25</sup> CD4 pozitivní (CD4+) T-lymfocyty nesou na vnější straně plazmatické membrány CD4 protein rozeznávající antigen, který prezentující buňka vystavuje pomocí proteinu MHC II. třídy.

<sup>26</sup> CD8 pozitivní (CD8+) T-lymfocyty nesou na vnější straně plazmatické membrány CD8 protein rozeznávající antigen, který prezentující buňka vystavuje pomocí proteinu MHC I. třídy.

Nutno podotknout, že konvenční jedinci byli při tomto experimentu přirozeně kojeni, čímž mohli získat některé protilátky navíc. Oproti tomu germ-free králíci byli po sterilním vyjmutí z dělohy matky krmeni umělou sterilizovanou stravou.

Koncentrace imunoglobulinů všech typů v krevním séru studovaná u germ-free selat se v průběhu ontogeneze nezvýšila, což bylo do šestého týdne po porodu pozorováno u jedinců kolonizovaných komenzální bakterií *Escherichia coli* G58-1 (Butler, Weber & Sinkora 2002). Kolonizace germ-free selat bakterií *E. coli* O86 krátce po porodu vyústila v signifikantní zvýšení počtu B-lymfocytů produkujících imunoglobuliny všech typů v mezenterických lymfatických uzlinách a ve slezině již po 4 dnech, v PP šlo ve stejné době pouze o zvýšení u IgA a IgG<sup>27</sup>. V kontrastu s těmito hodnotami se produkce imunoglobulinů v brzlíku germ-free jedinců nelišila od té v brzlíku konvenčních jedinců (Cukrowska *et al.* 2001). Výše uvedená zjištění dokazují, že intestinální mikrobiota pozitivně ovlivňuje imunitní systém skrze stimulaci vývoje B-lymfocytů a repertoáru protilátek.

### 3.5.4 Makrofágy

Makrofágy jsou tkáňové formy buněk imunitního systému nazývaných monocyty. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza cizorodého materiálu a poškozených tělních buněk. Dále pomocí prezentace fagocytovaných peptidů na vnější straně plazmatické membrány T-lymfocytům indukují specifickou imunitní reakci, mají tedy významnou roli při interakcích střevní mikrobioty s homeostázou hostitele. Stejně jako u lymfocytů je jejich aktivita u germ-free a konvenčních jedinců odlišná (Bauer & Paronetto 1966).

U konvenčních myší bylo pozorováno přibližně trojnásobné zvýšení počtu peritoneálních<sup>28</sup> makrofágů po intraperitoneální injekci dávky minerálního oleje. U germ-free jedinců se po stejné stimulaci počet peritoneálních makrofágů zvýšil pouze 1,16krát (Mørland & Midtvedt 1984). V jiné studii vykazovaly makrofágy v lymfatických uzlinách germ-free myší sníženou aktivitu při degradaci antigenu v porovnání s jejich konvenčními kontrolami. Fluorescenčně značený koňský feritin injekčně podaný germ-free a konvenčním myším přestal být detekovatelný v lymfatických uzlinách konvenčních jedinců po 4 dnech, u germ-free jedinců byla fluorescence patrná po celou dobu studie ve všech lymfatických uzlinách. Velikost makrofágů v lymfatických uzlinách nebyla při porovnání germ-free a konvenčních jedinců signifikantně odlišná, stejně jako se příliš nelišil jejich počet. Rozdíl v aktivitě makrofágů germ-free a konvenčních jedinců je tedy způsoben jiným mechanismem (Bauer & Paronetto 1966). Při enzymatické studii peritoneálních makrofágů myší bylo zjištěno signifikantní zvýšení aktivity dvou lysozomálních enzymů, a to kyselý fosfatázy a  $\beta$ -glukoronidázy u germ-free myší oproti konvenčním

---

<sup>27</sup> Imunoglobuliny určitého typu.

<sup>28</sup> Vyskytujících se v břišní dutině.



kontrolám. Čtyři týdny po konvencionalizaci germ-free myši došlo ke snížení aktivit těchto enzymů na normální hodnotu.

U germ-free jedinců bylo také pozorováno snížení fagocytózy makrofágů zprostředkované skrze receptor C3b v porovnání s mírou fagocytózy zprostředkované receptorem Fc. Po čtyřech týdnech po konvencionalizaci byl poměr fagocytózy zprostředkované těmito receptory podobný poměru u konvenčních jedinců (Mørland & Midtvedt 1984).

Peritoneální makrofágy myši infikovaných bakterií *E. coli* vykazovaly po 3 týdnech vyšší produkci interleukinů<sup>29</sup> IL-1 a IL-6 po *in vitro* stimulaci bakteriálním LPS<sup>30</sup> než makrofágy germ-free jedinců. Podobné zvýšení produkce IL-1 a IL-6 bylo pozorováno u makrofágů získaných z kostní dřeně konvencionalizovaných myši oproti germ-free (Nicaise *et al.* 1995). Při opakování stejného experimentu s bakterií *Bifidobacterium bifidum* nebyl rozdíl v produkci IL-1 a IL-6 pozorován u žádného typu makrofágů. Systémová imunitní reakce hostitele proti bakteriím je tedy pravděpodobně zprostředkovaná IL-1 a IL-6, přičemž její realizace v tomto případě závisí na druhu asociované bakterie. V případě gram-negativního druhu (*E. coli*) došlo po stimulaci makrofágů LPS ke zvýšení produkce cytokinů, v případě gram-pozitivního druhu (*B. bifidum*) nikoli (Vieira *et al.* 1998).

Imunohistochemická studie makrofágů ve vnějším hladkém svalstvu tenkého střeva germ-free a konvenčních myši v různých stádiích vývoje odhalila rozdíly v zastoupení proteinů *major histocompatibility complex* (dále MHC) třídy II. Makrofágy nesoucí MHC II, prezentující na povrchu membrány buněk extracelulární peptidy T-lymfocytům, nebyly ve svalových tkáních germ-free jedinců detekovány v žádné fázi vývoje. Makrofágy hladkého svalstva konvenčních kontrol byly oproti tomu MHC II pozitivní (Mikkelsen *et al.* 2004).

Střevní mikrobiota má podle výše uvedených tvrzení obecně pozitivní vliv na počet a aktivitu makrofágů, stimuluje například jejich schopnost fagocytovat cizorodé částice nejen bakteriálního původu. Dále mají makrofágy germ-free jedinců zřejmě sníženou schopnost zprostředkovávat sekundární imunitní reakci.

### **3.6 Vliv germ-free stavu na interakci hostitele s patogenními organismy**

Nižší aktivita složek imunitního systému vede k předpokladu, že germ-free jedinci jsou náchylnější k chorobám způsobeným patogenními organismy a že stimulace imunitního systému mikrobiotou zaručuje vyšší rezistenci. Tento předpoklad lze ověřit jednoduše porovnáváním následků vystavení germ-free jedinců a konvenčních kontrol určitým patogenním organismům (Fuller 1989).

---

<sup>29</sup> Skupina cytokinů – signálních molekul buněk imunitního systému označovaných IL.

<sup>30</sup> Molekuly vnějších povrchových struktur bakteriální membrány.

Snížená odolnost vůči bakteriální infekci byla u germ-free jedinců pozorována při jejich inokulaci některými druhy bakterií. U germ-free morčat se po orální inokulaci bakterií *Shigella flexneri* objevil zánět céka, kterému všechna zvířata podlehla do 48 hodin. U konvenčních jedinců nenastal po inokulaci tímto bakteriálním druhem žádný patologický stav (Sprinz *et al.* 1961).

Hodnota LD<sub>100</sub><sup>31</sup> subkutánně podaných spor bakterie *Bacillus anthracis* odpovídala u 5 týdnů starých germ free potkanů  $1 \times 10^{-7}$  LD<sub>50</sub><sup>32</sup> u stejně starých konvenčních jedinců. Přestože konvenční jedinci byli jiného genetického původu, autoři studie se nedomnívají, že tato skutečnost měla na zvýšenou mortalitu germ-free potkanů významný vliv (Taylor, Rooney & Blundell 1961). Po intraperitoneální inokulaci germ-free a konvenčních myší bakterií *Listeria monocytogenes* po deseti dnech podlehli infekci 3 germ-free jedinci z deseti inokulovaných. Všechny deset konvenčních kontrol přežilo ještě po 24 dnech od inokulace. (Inagaki *et al.* 1996) Orální inokulaci komenzální *E. coli* HS přežilo bez významnějších následků deset z jedenácti germ-free morčat (Formal *et al.* 1961). Tyto výsledky odpovídají předpokladu, že germ-free jedinci jsou obecně náchylnější k onemocněním způsobeným patogenními druhy bakterií a lépe se vypořádávají s infekcí nepatogenními bakteriemi.

Dále byly při porovnávání infikovaných germ-free a konvenčních kontrol prokázány rozdíly v citlivosti vůči některým eukaryotním parazitům. U germ-free myší se například neobjevil patologický projev infekce prvokem *Girdia Lamblia*. Naopak u konvenčních kontrol byly po infekci pozorovány typické projevy nákazy. Germ-free stav hostitele měl také pozitivní vliv na reprodukci tohoto prvoka, ve vzorcích exkrementů byla pozorována 10krát vyšší koncentrace cyst než u konvenčních jedinců (Torres *et al.* 1992). Patogenita *Entamoeba histolytica* se také projevila pouze u konvenčních morčat. Dalším rodem protozoí, jehož patogenita se u germ-free jedinců neprojevila, je rod *Eimeria* (Torres *et al.* 2000). U prvoka *Plasmodium berghei* se patogenita projevila u germ-free i konvenčních myší, ale v nižší míře než u konvenčních jedinců (Finerty, Evans & Hyde 1973). Intraperitoneální inokulace šesti germ-free a čtyř konvenčních myší dávkou přibližně  $8 \times 10^4$  trypanosom<sup>33</sup> *Trypanosoma cruzi* způsobila smrt všech konvenčních zvířat do 12 dnů. Dvě germ-free myši se dožily 15. dne od injekce, přestože ostatní germ-free jedinci začali v porovnání s konvenčními kontrolami umírat dříve. Při opakování pokusu se soubory germ-free a konvenčních potkanů byla po intraperitoneální inokulaci  $6 \times 10^6$  trypanosom<sup>34</sup> *T. cruzi* mortalita germ-free jedinců vyšší již od osmého dne po injekci. 21. den byla mortalita germ-free jedinců 100%. Oproti tomu se jeden konvenční jedinec dožil až 47. dne, kdy byl utracen. Germ-free stav tedy navozuje obecně vyšší náchylnost k Chagasově chorobě způsobené prvokem *T. cruzi* (Silva *et al.* 1987). Subkutánní inokulace germ-free myší dávkou  $10^5$  promastigot<sup>34</sup> *Leishmania mexicana amazonensis* vyústila v mírné projevy leishmaniózy, konkrétně byly u germ-free

---

<sup>31</sup> Množství dávky určité látky/patogenu způsobující smrt 100 % jedinců.

<sup>32</sup> Množství dávky určité látky/patogenu způsobující smrt 50 % jedinců.

<sup>33</sup> Vývojové stadium vyskytující se v krvi hostitele.

<sup>34</sup> Vývojové stadium vyskytující se ve střevech vektorů.

jedinců po 114 dnech pozorovány jen velmi nepatrné kožní léze. Symptomy leishmaniózy konvenčních kontrol inokulované dávkou  $5 \times 10^5$  promastigotů po stejné době byly mnohem závažnější.

Jednalo se o mnohé rozsáhlé záněty kůže zasahující až do kosterního svalstva (Vieira & Nicoli 1987). Naopak při porovnání projevů leishmaniózy po subkutánní inokulaci germ-free a konvenčních myši dávkou  $10^6$  promastigotů *Leishmania Major* byly u konvenčních kontrol pozorovány menší kožní léze než u germ-free jedinců.

Dále bylo možné po 13 dnech od infekce kultivovat *L. Major* ze vzorků sleziny a jater germ-free jedinců, nikoliv tak ze vzorků vnitřností konvenčních kontrol (Oliveira *et al.* 2005). Germ-free jedinci jsou podle uvedených dat odolnější vůči protozoárním střevním onemocněním, u nemocí způsobených prvoky množícími se mimo intestinální systém závisí rozdíl v mortalitě zřejmě na druhu parazita. Předpoklad, že jedinci postrádající mikrobiální stimulaci jsou náchylnější k chorobám způsobeným patogenními organismy, tedy není prokázán u všech případů.

### **3.7 Efekt na chování hostitele**

V sérii behaviorálních testů projevily germ-free myši vyšší lokomoční aktivitu a frekvenci pečovatelských aktivit než jejich konvenční protějšky. Stejně tak se germ-free myši signifikantně déle než jejich konvenční kontroly zdržovaly v osvětlené části testovacího boxu (tzv. light-box test). Germ-free myši obecně projevovaly vyšší motorickou aktivitu a redukované úzkostlivé chování oproti konvenčním myším. Konvencionalizace dospělých myši změnu v jejich chování nezpůsobila. Potomci konvencionalizovaných rodičů vykazovali pečovatelské aktivity s podobnou frekvencí a byli v behaviorálních testech srovnatelně aktivní jako konvenční jedinci. Výsledky těchto jedinců v light-box testu se podobaly spíše germ-free myším. Vyšší motorická aktivita pravděpodobně souvisí s vyššími koncentracemi neurotransmiterů noradrenalinu a dopaminu naměřenými v žíhaném jádru koncového mozku germ-free jedinců. Redukci úzkostlivého chování odráží snížená exprese genů BDNF a NGFI-A v hippocampu a amygdale mozku germ-free jedinců. Exprese těchto genů pravděpodobně přímo souvisí s vývojem úzkostlivého chování (Heijtz, Wang & Anuar 2011). Absence mikrobioty má tedy překvapivě pozitivní vliv na motorickou aktivitu hostitele, v tomto případě myši, a činí jej méně úzkostlivým. Efekt konvencionalizace se projevil až v následující generaci, a to neúplnou normalizací chování.

### **3.8 Vliv mikrobioty na oběhový systém hostitele**

Obecně pozorovaným jevem je také snížení celkového objemu krve germ-free jedinců oproti konvenčním, stejně jako snížení srdečního průtoku, krevního tlaku a zásobování orgánů jako například pokožky, jater, střev a plic krví. Na druhou stranu mají například konvenční potkani oproti germ-free nižší počet červených krvinek (Gordon, Wostmann & Bruckner-Kardoss 1963). Při porovnávání účinku stimulačních látek na hladkou svalovinu prekapilárních arteriol mezenterii byl pozorován rozdíl ve vasomotorické aktivitě mikrovaskulatury (Baez & Gordon 1971).

Cévy germ-free potkanů vykazovaly hyporeaktivitu vůči katecholaminům<sup>35</sup> adrenalinu, noradrenalinu a vasopresinu oproti normálním reakcím konvenčních kontrol (Baez & Gordon 1971). Při hledání mechanismu příčiny tohoto rozdílu byla z obsahu céva germ-free myši a potkanů izolována látka nazvaná „alfa pigment“. Tato látka dokázala redukovat senzitivitu hladkého svalstva vůči epinefrinu. Alfa pigment byl izolován také ze střevního obsahu konvenčních myši, nicméně byl biologicky inaktivní (Gordon & Kokas 1968; cit. dle Gordon & Pesti 1971).

#### 4. Využití gnotobiologie v lidské medicíně

Studium zvířecích modelů chovaných v definovaných gnotobiologických podmínkách může být přínosným způsobem při odhalování původu a vlivu mikrobioty u některých lidských onemocnění. Jedná se zejména o poruchy funkcí imunitního systému, zahrnující idiopatické záněty střev (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), revmatickou artritidu, aterosklerózu a alergie. Dále gnotobiologie může přinést prohloubení našich znalostí o rakovině tlustého střeva a cukrovky (Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2004; Yi & Li 2012). Jde zejména o porovnávání průběhu těchto chorob mezi germ-free a konvenčními jedinci, u nichž je rozvoj určité nemoci geneticky determinován (Rivera-Nieves *et al.* 2003; Wen *et al.* 2008) nebo indukován chemicky (Maslowski *et al.* 2009). Nepřítomnost mikrobioty má například u myši za následek horší průběh chemicky indukovaného zánětu tlustého střeva (ulcerózní kolitidy) (Maslowski *et al.* 2009). Naopak u germ-free myši s geneticky determinovaným rozvojem zánětu ilea s podobnými příznaky jako Crohnova choroba popsána u lidských pacientů byl průběh nemoci mírnější než u konvenčních kontrol (Bamias & Okazawa 2007).

#### 5. Závěr

Vyvinutím metod chovu některých druhů obratlovců v podmínkách zamezujících kontaktu s mikroorganismy z okolí byla kladně zodpovězena otázka, zda jsou takové podmínky slučitelné se životem. Tito germ-free jedinci vykazují v porovnání s jejich konvenčními kontrolami mnoho rozdílných znaků. Jde zejména o sníženou aktivitu složek imunitního systému (Macpherson *et al.* 2001), zmenšení některých lymfatických orgánů (Bauer & Horowitz 1963), méně intenzivní prokrvení střevních stěn (Stappenbeck *et al.* 2002), snížení metabolismu některých dietárních látek (El Aidi *et al.* 2013), nižší míru proliferace buněk střevního epitelu (Abrams *et al.* 1963) a další.

Jiné vlastnosti, jako je odbourávání některých xenobiotik (Björkholm *et al.* 2009), motorická aktivita (Abrams & Bishop 1967) a náchylnost k některým chorobám způsobeným střevními parazitickými prvky (Torres *et al.* 1992) jsou absencí mikrobioty pozitivně ovlivněny. Germ-free jedinci jsou při normálních podmínkách, jak se zdá, stejně životaschopní jako jejich konvenční kontroly. Přítomnost bakterií zapříčiňuje změny v genové expresi některých buněk hostitele (Fukushima *et al.* 2003; Cash *et*

---

<sup>35</sup> Molekuly zajišťující přenos nervového signálu.

*al.* 2006), dále mohou bakterie svými metabolickými schopnostmi ovlivňovat aktivitu některých trávicích enzymů hostitele (Corring *et al.* 1981).

Většinu těchto rozdílů lze eliminovat vystavením germ-free jedinců působení mikrobů z okolí nebo infikováním střevní mikrobiotou jejich konvenčních kontrol (Smith *et al.* 2007). Některé lze eliminovat inokulací jediným bakteriálním druhem, například proces angiogeneze (Stappenbeck *et al.* 2002) nebo genová exprese enterocytů, ostatní přetrvávají i po vystavení germ-free jedinců otevřeným podmínkám, jako například pozměněný metabolismus xenobiotika pentobarbitalu (Björkholm *et al.* 2009).

Změny ve fyziologii hostitele jsou tedy způsobeny buďto jeho interakcí s jediným druhem, nebo je k jejich indukci zapotřebí souhry více druhů bakterií nebo jiných neznámých faktorů. Záleží také na věku jedince, který mnohdy ovlivňuje následky inokulace.

Střevní mikrobiota tedy představuje pro hostitele určitou fyziologickou zátěž, na kterou je do jisté míry přizpůsoben kompenzačními mechanismy, jako je zvýšení prokrvení střevní stěny, přizpůsobení morfologie zažívacího traktu nebo zpětnovazebná regulace tvorby žlučových kyselin. Některé vlastnosti, jako je zvětšené cékum germ-free hlodavců, poukazují na evoluční přizpůsobení hostitele, který potřebuje střevní mikrobiotu pro svůj normální vývoj. Dalšími nespornými benefity zprostředkovanými střevními bakteriemi jsou schopnost metabolizovat hostitelem nestravitelné složky potravy na stravitelné látky a stimulace imunitního systému v obraně nejen proti bakteriálním patogenům. Tyto vlastnosti vztahu hostitel – mikrobiota jsou výsledkem vzájemného přizpůsobení, které se v evoluci obratlovců vyvinulo v nesmírně složitý systém, jehož podstatu lze díky diverzitě bakteriálního společenství jen stěží uchopit a popsat. Díky novým metodám genetické analýzy lze dnes identifikovat jednotlivé druhy bakterií a blíže zkoumat jejich vliv například na genovou expresi v buňkách hostitele. Lze tak pomalu odhalovat jednotlivé prvky tohoto vztahu a získat širší pohled na celou problematiku.

## 6. Seznam použitých zkratk

- BMR: hodnota basálního metabolismu jedince (z angl. *basal metabolic rate*)
- FAE: typ epitelu překrývající Peyeroovy plaky (z angl. *follicle-associated epithelium*)
- HBF: mikrobiota 20 dnů starého lidského novorozence (z angl. *human-baby flora*)
- IEL: intra-epiteliální lymfocyty
- LD<sub>100</sub>: množství dávky určité látky/patogenu způsobující smrt 100 % jedinců (z angl. *lethal dose*)
- LD<sub>50</sub>: množství dávky určité látky/patogenu způsobující smrt 50 % jedinců (z angl. *lethal dose*)
- LPL: enzym lipoprotein lipáza
- LPS: lipopolysacharidy
- MHC: hlavní histokompatibilní komplex (z angl. *main histocompatibility complex*)
- MMC: migrující myoelektrický komplex
- mRNA: ribonukleová kyselina, translatovaná do proteinu (z angl. *messenger RNA*)
- NR: jaderné receptory (z angl. *nuclear receptors*)
- PP: Peyeroovy plaky
- SCFA: mastné kyseliny s krátkými řetězci (z angl. *short-chained fatty acids*)
- SPF: termín užívaný pro jedince prostých určitých patogenů (z angl. *specific pathogen free*)
- T1D: diabetes typu 1
- TLR: Toll-like receptory
- tRNA: ribonukleová kyselina účastnící se translace mRNA do proteinu (z angl. *transfer RNA*)

## 7. Seznam literatury

- Abrams, G.D., Bauer, H. & Sprinz, H. (1963) Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. *Lab Invest*, **12**, 355–364.
- Abrams, G.D. & Bishop, J.E. (1966) Effect of the normal microbial flora on the resistance of the small intestine to infection. *Journal of Bacteriology*, **92**, 1604–1608.
- Abrams, G.D. & Bishop, J.E. (1967) Effect of the Normal Microbial Flora on Gastrointestinal Motility. *Experimental Biology and Medicine*, **126**, 301–304.
- El Aidy, S., Derrien, M., Merrifield, C. a, Levenez, F., Doré, J., Boekschoten, M. V, Dekker, J., Holmes, E., Zoetendal, E.G., van Baarlen, P., Claus, S.P. & Kleerebezem, M. (2013) Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *The ISME Journal*, **7**, 743–755.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F. & Gordon, J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 15718–15723.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F. & Gordon, J.I. (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 979–984.
- Baez, S. & Gordon, H. (1971) Tone and reactivity of vascular smooth muscle in germfree rat mesentery. *The Journal of Experimental Medicine*, **134**, 846–856.

- Bamias, G. & Okazawa, A. (2007) Commensal bacteria exacerbate intestinal inflammation but are not essential for the development of murine ileitis. *The Journal of Immunology*, **178**, 1809–1818.
- Bandeira, A., Mota-Santos, T., Itohara, S., Degermann, S., Heusser, C., Tonegawa, S. & Coutinho, A. (1990) Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *The Journal of Experimental Medicine*, **172**, 239–244.
- Bauer, H. & Horowitz, R. (1963) The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *The American Journal of Pathology*, **42**, 471–483.
- Bauer, H. & Paronetto, F. (1966) The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response – A study in Germfree mice. *The Journal of Experimental Medicine*, **123**, 1013–1024.
- Becker, S., Oelschlaeger, T. a, Wullaert, A., Vlantis, K., Pasparakis, M., Wehkamp, J., Stange, E.F. & Gersemann, M. (2013) Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. *PloS one*, **8**, e55620.
- Björkholm, B., Bok, C.M., Lundin, A., Rafter, J., Hibberd, M.L. & Pettersson, S. (2009) Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PloS one*, **4**, e6958.
- Bruckner, G., Husebye, E. & Trappen, G. (2003) Old Herborn University Seminar Monograph 9. *Gastro-Intestinal Motility: Review of the internal discussion* (eds P. Heidt, L. Kleiweg, D. van der Waaij & H. Hereweg), pp. 41–66. Verlag wissenschaftlicher Schriften und Bücher, Herborn-Dill.
- Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. (1996) A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science (New York, N.Y.)*, **273**, 1380–1383.
- Butler, J., Weber, P. & Sinkora, M. (2002) Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *The Journal of Immunology*, **169**, 6822–6830.
- Cash, H.L., Whitham, C. V, Behrendt, C.L. & Hooper, L.V. (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science (New York, N.Y.)*, **313**, 1126–1130.
- Coates, M.E. (1968) *The Germ-Free Animal in Research*. (ed ME Coates). Academic Press, Inc., London: New York.\*
- Coates, M.E. (1973) Gnotobiotic animals in nutrition research. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **32**, 53–58.
- Coates, M. & Fuller, R. (1963) A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *British Journal of Nutrition*, **17**, 141–151.
- Corring, T., Juste, C. & Simoes-Nunes, C. (1981) Digestive enzymes in the germ-free animal. *Reproduction, Nutrition, Development*, **21**, 355–370.
- Cukrowska, B., Kozáková, H., Řeháková, Z., Šinkora, J. & Tlaskalová-Hogenová, H. (2001) Specific antibody and immunoglobulin responses after intestinal colonization of germ-free piglets with non-pathogenic Escherichia coli O86. *Immunobiology*, **204**, 425–433.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P. & Macfarlane, G.T. (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, **28**, 1221–1227.
- Donowitz, M. & Binder, H.J. (1979) Mechanism of fluid and electrolyte secretion in the germ-free rat cecum. *Digestive Diseases and Sciences*, **24**, 551–559.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D. a. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, **308**, 1635–8.

- Evrard, E., Hoet, P.P., Eyssen, H., Charlier, H. & Sacquet, E. (1964) Faecal Lipids in Germ-Free and Conventional Rats. *British Journal of Experimental Pathology*, **45**, 409–414.
- Faust, K., Sathirapongsasuti, J.F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J. & Huttenhower, C. (2012) Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS computational biology*, **8**, e1002606.
- Finerty, J.F., Evans, C.B. & Hyde, C.L. (1973) Plasmodium berghei and Eperythrozoon coccoides: Antibody and immunoglobulin synthesis in germfree and conventional mice simultaneously infected. *Experimental Parasitology*, **34**, 76–84.
- Formal, S.B., Dammin, G., Sprinz, H., Kundel, D., Schneider, H., Horowitz, R.E. & Forbes, M. (1961) Experimental Shigella infections. V. Studies in germ-free guinea pigs. *Journal of Bacteriology*, **82**, 284–287.
- Frank, D.N. & Pace, N.R. (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology*, **24**, 4–10.
- Fukushima, K., Ogawa, H., Takahashi, K., Naito, H., Funayama, Y., Kitayama, T., Yonezawa, H. & Sasaki, I. (2003) Non-Pathogenic Bacteria Modulate Colonic Epithelial Gene Expression in Germ-Free Mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **38**, 626–634.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 365–378.
- Furuse, M. & Yokota, H. (1984) Protein and energy utilization in germ-free and conventional chicks given diets containing different levels of dietary protein. *British Journal of Nutrition*, **51**, 255–264.
- Gordon, H.A. & Kokas, E. (1968) A bioactive pigment (“alpha pigment”) in cecal contents of germ-free animals. *Biochemical Pharmacology*, **17**, 2333–2347.\*
- Gordon, H.A. & Pesti, L. (1971) The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological Reviews*, **35**, 390–429.
- Gordon, H.A., Wostmann, B.S. & Bruckner-Kardoss, E. (1963) Effects of microbial flora on cardiac output and other elements of blood circulation. *Experimental Biology and Medicine*, **114**, 301–304.
- He, W., Wang, M., Jiang, H. & Steppan, C. (2003) Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELM $\beta$ /FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology*, **5085**, 1388–1397.
- Heavey, P.M. & Rowland, I.R. (1999) The gut microflora of the developing infant: Microbiology and metabolism. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **11**, 75–83.
- Heijtz, R.D., Wang, S. & Anuar, F. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 3047–3052.
- Herbert, D.R., Yang, J.-Q., Hogan, S.P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q., Brombacher, F., Urban, J.F., Rothenberg, M.E. & Finkelman, F.D. (2009) Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of Experimental Medicine*, **206**, 2947–2957.
- Hill, M. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*, **6**, 43–45.
- Hooper, L.V. (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology*, **12**, 129–134.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, **22**, 283–307.
- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C. V & Gordon, J.I. (2003) Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, **4**, 269–273.



- Husebye, E., Hellström, P.M. & Midtvedt, T. (1994) Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Digestive Diseases and Sciences*, **39**, 946–56.
- Husebye, E., Hellström, P.M., Sundler, F., Chen, J. & Midtvedt, T. (2001) Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **280**, 368–380.
- Cherbuy, C., Darcy-Vrillon, B., Morel, M.T., Pégurier, J.P. & Duée, P.H. (1995) Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. *Gastroenterology*, **109**, 1890–1899.
- Inagaki, H., Suzuki, T., Nomoto, K. & Yoshikai, Y. (1996) Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation. *Infection and Immunity*, **64**, 3280–3287.
- Ishikawa, K., Satoh, Y., Tanaka, H. & Ono, K. (1986) Influence of Conventionalization on Small-Intestinal Mucosa of Germ-Free Wistar Rats: Quantitative Light Microscopic Observations. *Cells Tissues Organs*, **127**, 296–302.
- Kawai, Y. & Morotomi, M. (1978) Intestinal enzyme activities in germfree, conventional, and gnotobiotic rats associated with indigenous microorganisms. *Infection and Immunity*, **19**, 771–778.
- Kozáková, H. & Štěpánková, R. (1998) Differences in enterocyte brush border enzyme activities in ageing rats reared in germ-free and conventional conditions. *Physiological Research*, **47**, 253–258.
- Lanning, D.K., Rhee, K.-J. & Knight, K.L. (2005) Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends in Immunology*, **26**, 419–425.
- Lanning, D.K., Zhu, X., Zhai, S. & Knight, K. (2000) Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunological Reviews*, **175**, 214–228.
- Larner, J. & Gillespie, R. (1957) Gastrointestinal digestion of starch III. Intestinal carbohydrase activities in germ-free and non-germ-free animals. *Journal of Biological Chemistry*, **225**, 279–286.
- Lepkovsky, S., Furuta, F., Ozone, K., Koike, T. & Wagner, M. (1966) The proteases, amylase and lipase of the intestinal contents of germ-free and conventional chickens. *British Journal of Nutrition*, **20**, 257–261.
- Levenson, S. & Crowley, L. (1959) The metabolism of carbon-labeled urea in the germfree rat. *Journal of Biological Chemistry*, **234**, 2061–2062.
- Loesche, W.J. (1968) Protein and Carbohydrate Composition of Cecal Contents of Gnotobiotic Rats and Mice. *Experimental Biology and Medicine*, **128**, 195–199.
- Lundin, A., Bok, C.M., Aronsson, L., Björkholm, B., Gustafsson, J.-A., Pott, S., Arulampalam, V., Hibberd, M., Rafter, J. & Pettersson, S. (2008) Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cellular Microbiology*, **10**, 1093–1103.
- Mackie, R.I., Sghir, A. & Gaskins, H.R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **69**, 1035–1045.
- Macpherson, A.J. & Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews. Immunology*, **4**, 478–485.
- Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, **3**, 1021–1035.

- Macpherson, A.J. & Uhr, T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, **303**, 1662–5.
- Maisonnier, S., Gomez, J. & Bree, A. (2003) Effects of microflora status, dietary bile salts and guar gum on lipid digestibility, intestinal bile salts, and histomorphology in broiler chickens. *Poultry Science*, **82**, 805–814.
- Malis, F., Fric, P., Stěpánková, R. & Kruml, J. (1976) Trypsin and chymotrypsin activity of the intestinal content in germfree, monoassociated and conventional rabbits. *Physiologia Bohemoslovaca*, **25**, 71–74.
- Martin, F.-P.J., Dumas, M.-E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I.K.S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G.M., Cloarec, O., Lindon, J.C., Sprenger, N., Fay, L.B., Kochhar, S., van Bladeren, P., Holmes, E. & Nicholson, J.K. (2007) A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Molecular Systems Biology*, **3**, 1–16.
- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M. & Mackay, C.R. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, **461**, 1282–1286.
- Meslin, J. & Sacquet, E. (1984) Effects of microflora on the dimensions of enterocyte microvilli in the rat. *Reproduction, Nutrition, Development*, **24**, 307–314.
- Mikkelsen, H.B., Garbarsch, C., Trantum-Jensen, J. & Thuneberg, L. (2004) Macrophages in the small intestinal muscularis externa of embryos, newborn and adult germ-free mice. *Journal of Molecular Histology*, **35**, 377–387.
- Mirand, E.A. & Back, N. (eds). (1969) The Response of Germfree Rats to Dietary Cholesterol. *Germ-Free Biology Experimental and Clinical Aspects Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp. 134–141. Springer US, Boston, MA.
- Mørland, B. & Midtvedt, T. (1984) Phagocytosis, peritoneal influx, and enzyme activities in peritoneal macrophages from germfree, conventional, and ex-germfree mice. *Infection and Immunity*, **44**, 750–752.
- Murphy, E.F., Cotter, P.D., Hogan, A., O’Sullivan, O., Joyce, A., Fouhy, F., Clarke, S.F., Marques, T.M., O’Toole, P.W., Stanton, C., Quigley, E.M.M., Daly, C., Ross, P.R., O’Doherty, R.M. & Shanahan, F. (2013) Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut*, **62**, 220–6.
- Nicaise, P., Gleizes, A., Forestier, F., Sandre, C., Quero, a M. & Labarre, C. (1995) The influence of *E. coli* implantation in axenic mice on cytokine production by peritoneal and bone marrow-derived macrophages. *Cytokine*, **7**, 713–719.
- Oliveira, M.R., Tafuri, W.L., Afonso, L.C.C., Oliveira, M. a P., Nicoli, J.R., Vieira, E.C., Scott, P., Melo, M.N. & Vieira, L.Q. (2005) Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*, **131**, 477–488.
- Pabst, R. & Rothkötter, H.J. (1999) Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **72**, 167–173.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D. a & Brown, P.O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, **5**, e177.
- Palmer, M.F. & Rolls, B.A. (1983) The activities of some metabolic enzymes in the intestines of germ-free and conventional chicks. *British Journal of Nutrition*, **50**, 783–790.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. a & Stobberingh, E.E. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118**, 511–521.

- Reddy, B.S., Pleasants, J.R. & Wostmann, B.S. (1969) Effect of intestinal microflora on calcium, phosphorus and magnesium metabolism in rats. *The Journal of Nutrition*, **99**, 353–362.
- Reddy, B.S., Pleasants, J.R., Zimmerman, D.R. & Wostmann, B.S. (1965) Iron and copper utilization in rabbits as affected by diet and germfree status. *The Journal of Nutrition*, **87**, 189–196.
- Reikvam, D.H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F.L., Gaustad, P., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Meza-Zepeda, L. a & Johansen, F.-E. (2011) Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PloS one*, **6**, e17996.
- Rivera-Nieves, J., Bamias, G., Vidrich, A., Marini, M., Pizarro, T.T., McDuffie, M.J., Moskaluk, C. a, Cohn, S.M. & Cominelli, F. (2003) Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMPI/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology*, **124**, 972–982.
- Rösel, E. & Engelhardt, W. (1996) Sodium transport across the caecal and colonic epithelium of germfree and specific-pathogen free rats. *Reproduction, Nutrition, Development*, **36**, 289–299.
- Rothkötter, H., Möllhoff, S. & Pabst, R. (1999) The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scandinavian Journal of Immunology*, **50**, 31–38.
- Saheki, T. & Atsuko, U. (1980) Comparison of the urea cycle in conventional and germ-free mice. *Journal of Biochemistry*, **88**, 1563–1566.
- Salter, D.N. & Fulford, R.J. (1974) The influence of the gut microflora on the digestion of dietary and endogenous proteins: studies of the amino acid composition of the excreta of germ-free and conventional chicks. *The British Journal of Nutrition*, **32**, 625–637.
- Salyers, A. & Pajeau, M. (1989) Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2572–2578.
- Savage, D.C., Siegel, J.E., Snellen, J.E. & Whitt, D.D. (1981) Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, 996–1001.
- Savidge, T. & Smith, M. (1991) Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *The American Journal of Pathology*, **139**, 177–184.
- Shirkey, T.W., Siggers, R.H., Goldade, B.G., Marshall, J.K., Drew, M.D., Laarveld, B. & Van Kessel, a G. (2006) Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Experimental Biology and Medicine*, **231**, 1333–1345.
- Shurson, G.C., Ku, P.K., Waxler, G.L., Yokoyama, M.T. & Miller, E.R. (1990) Physiological relationships between microbiological status and dietary copper levels in the pig. *Journal of Animal Science*, **68**, 1061–1071.
- Schley, P.D. & Field, C.J. (2007) The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, **87**, 221–230.
- Silva, M.E., Evangelista, E. a, Nicoli, J.R., Bambirra, E. a & Vieira, E.C. (1987) American trypanosomiasis (Chagas' disease) in conventional and germfree rats and mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **29**, 284–288.
- Smith, K., McCoy, K.D. & Macpherson, A.J.M. (2007) Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*, **19**, 59–69.

- Sprinz, H., Kundel, D.W., Dammin, G.J., Horowitz, R.E., Schneider, H. & Formal, S.B. (1961) The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *The American Journal of Pathology*, **39**, 681–695.
- Staggers, J.E., Frost, S.C. & Wells, M.A. (1982) Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. III. Composition of bile and evidence for enterohepatic circulation of bile salts. *Journal of Lipid Research*, **23**, 1143–1151.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V & Gordon, J.I. (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15451–15455.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D. & Doré, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4799–4807.
- Sumi, Y., Miyakawa, M., Kanzaki, M. & Kotake, Y. (1977) Vitamin B-6 deficiency in germfree rats. *The Journal of Nutrition*, **107**, 1707–1714.
- Taylor, M.J., Rooney, J.R. & Blundell, G.P. (1961) Experimental anthrax in the rat. II. The relative lack of natural resistance in germ-free (Lobund) hosts. *The American Journal of Pathology*, **38**, 625–638.
- Thompson, G.R. & Trexler, P.C. (1971) Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut*, **12**, 230–235.
- Tlaskalová-Hogenová, H. & Štěpánková, R. (1980) Development of antibody formation in germ-free and conventionally reared rabbits: the role of intestinal lymphoid tissue in antibody formation to *E. coli* antigens. *Folia biologica*, **26**, 81–93.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovská, D., Řeháková, Z., Šinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. & Kokešová, A. (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, **93**, 97–108.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Mestecky, J., Kolinska, J., Rossmann, P., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Hrcir, T., Frolova, L. & Kverka, M. (2005) Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scandinavian Journal of Immunology*, **62**, 106–113.
- Torrallardona, D., Harris, C.I., Coates, M.E. & Fuller, M.F. (1996) Microbial amino acid synthesis and utilization in rats: incorporation of <sup>15</sup>N from <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl into lysine in the tissues of germ-free and conventional rats. *The British Journal of Nutrition*, **76**, 689–700.
- Torres, M.R., Silva, M.E., Vieira, E.C., Bambirra, E.A., Sogayar, M.I., Pena, F.J. & Nicoli, J.R. (1992) Intra-gastric infection of conventional and germfree mice with *Giardia lamblia*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **25**, 349–352.
- Torres, M.F., Uetanabaro, P., Costa, F., Alves, C Farias, L.M., Bambirra, E Penna, F.J., Vieira, E.C. & Nicoli, J.R. (2000) Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of Medical Microbiology*, **49**, 209–215.
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, **3**, 213–223.
- Uchida, K., Nomura, Y. & Takase, H. (1986) Effects of vitamin K-deficient diets and fasting on blood coagulation factors in conventional and germ-free rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, **40**, 115–122.
- Ukai, M., Tomura, A. & Ito, M. (1976) Cholesterol synthesis in germfree and conventional rats. *The Journal of nutrition*, **106**, 1175–1183.

- Uribe, A., Midtvedt, T., Jaramillo, E. & Theodorsson, E. (1991) Epithelial-cell proliferation in the proximal small intestine of germ-free rats. *Acta Chirurgica-The European Journal Of Surgery*, **562**, 87–92.
- Velagapudi, V. & Hezaveh, R. (2010) The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research*, **51**, 1101–1112.
- Vieira, E. & Nicoli, J. (1987) Cutaneous leishmaniasis in germfree, gnotobiotic, and conventional mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **29**, 385–387.
- Vieira, L.Q., Oliveira, M.R., Neumann, E., Nicoli, J.R. & Vieira, E.C. (1998) Parasitic infections in germfree animals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **31**, 105–110.
- Waxler, G.L. & Drees, D.T. (1972) Comparison of body weights, organ weights and histological features of selected organs of gnotobiotic, conventional and isolator-reared contaminated pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine.*, **36**, 265–274.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J. a, Gordon, J.I. & Chervonsky, A. V. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, **455**, 1109–1113.
- Wichmann, A., Allahyar, A., Greiner, T.U., Plovier, H., Lundén, G.Ö., Larsson, T., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., Cani, P.D. & Bäckhed, F. (2013) Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host & Microbe*, **14**, 582–590.
- Williams, A.M., Probert, C.S.J., Stepankova, R., Tlaskalova-Hogenova, H., Phillips, A. & Bland, P.W. (2006) Effects of microflora on the neonatal development of gut mucosal T cells and myeloid cells in the mouse. *Immunology*, **119**, 470–478.
- Wostmann, B.S. (1981) The germfree animal in nutritional studies. *Annual Review of Nutrition*, **1**, 257–279.\*
- Wostmann, B.S., Bruckner-Kardoss, E. & Knight, P.L. (1968) Cecal Enlargement, Cardiac Output, and O<sub>2</sub> Consumption in Germfree Rats. *Experimental Biology and Medicine*, **128**, 137–141.
- Wostmann, B.S., Reddy, B.S., Bruckner-Kardoss, E., Gordon, H.A. & Singh, B. (1973) Causes and possible consequences of caecal enlargement in germfree rats. *Germfree Research: Biological Effect of Gnotobiotic Environments* (ed J.B. Heneghan), p. 694. Academic Press, New York.
- Xu, J. & Gordon, J.I. (2003) Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 10452–10459.
- Yamanaka, T. & Helgeland, L. (2003) Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *The Journal of Immunology*, **170**, 816–822.
- Yi, P. & Li, L. (2012) The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Veterinary Microbiology*, **157**, 1–7.
- Yoshida, T. & Pleasants, J. (1968) Efficiency of digestion in germ-free and conventional rabbits. *British Journal of Nutrition*, **478**, 723–737.

\* sekundární citace