

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní plán: Neurobiologie



Bc. Pavla Avramová

Vliv experimentální střevní dysbiózy na behaviorální, neuroendokrinní a imunitní vlastnosti myši a možnost jejího ovlivnění podáním probiotického kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31

Influence of experimental intestinal dysbiosis on behavioral, neuroendocrine and immune properties of mice and the possibility of modifying it by administration of probiotic strain *Escherichia coli* O83:K24:H31

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. MUDr. Viktor Černý Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jiří Hrdý Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze,

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. MUDr. Viktorovi Černému Ph.D. za odbornou pomoc a nezměrnou trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře za cenné rady týkající se práce v laboratoři. Obzvláště bych ráda poděkovala Mgr. Olze Novotné za zaškolení do izolačních a PCR metod prováděných v této diplomové práci a Mgr. Elišce Krčmářové za podporu a pomoc se statistickým zpracováním dat.

Abstrakt

Střevní mikrobiota je klíčovým faktorem ovlivňujícím funkci mnoha orgánů v lidském těle, včetně nervového, imunitního a endokrinního systému. Tento proměnlivý ekosystém může být modulován stravou, věkem, prostředím i medikací. Rovnovážné složení mikrobioty je klíčové pro zdraví jedince a při jeho narušení dochází k dysbióze. Propojení mezi střevem a centrálním nervovým systémem zprostředkovává osa mikrobiota – střevo – mozek. Osa se skládá z několika drah, které jsou mezi sebou propojené a mohou tak vzájemně regulovat své funkce. Mezi hlavní části osy patří nervová dráha v čele s bloudivým nervem, imunitní dráha a endokrinní dráha spolu s HPA osou. Studie z posledních let naznačují, že probiotické bakterie mají schopnost dysbiózu do určité míry napravit a ulevit tak zbytku organismu od jejích následků.

Tato práce se soustředí na výzkum vlivu mikrobioty gastrointestinálního traktu na chování, imunitu a neuroendokrinní aspekty myši. Zabývá se experimentálním vyvoláním dysbiózy antibiotiky a jejím následným řešením probiotickou bakterií *Escherichia coli* O83:K24:H31. Cílem je zjistit, zda tato probiotika mohou omezit negativní účinky dysbiózy na imunitní a neuroendokrinní systém a regulaci chování.

Klíčová slova: Dysbióza, *Escherichia coli* O83:K24:H31, úzkost, deprese, osa střevo – mozek, HPA osa, probiotika, slizniční imunita

Abstract

The gut microbiota is a key factor influencing the function of many organs in the human body, including the nervous, immune, and endocrine systems. This dynamic ecosystem can be modulated by diet, age, environment, even medication. The balanced composition of the microbiota is crucial for individual health, and its disruption leads to dysbiosis. The connection between the gut and the central nervous system is mediated by the microbiota-gut-brain axis. This axis consists of several pathways interconnected to mutually regulate their functions. Among the major components of the axis are the neural pathway, led by the vagus nerve, the immune pathway, and the endocrine pathway, including the HPA axis. Recent studies suggest that probiotic bacteria have the ability to partially rectify dysbiosis and alleviate its consequences for the organism.

This thesis focuses on researching the impact of gastrointestinal tract microbiota on the behaviour, immunity, and neuroendocrine aspects of mice. It delves into experimentally inducing dysbiosis using antibiotics and subsequently addressing it with the probiotic bacterium *Escherichia coli* O83:K24:H31. The aim is to determine whether these probiotics can mitigate the adverse effects of dysbiosis on the immune and neuroendocrine systems, as well as behavioural regulation.

Keywords: Dysbiosis, *Escherichia coli* O83:K24:H31, anxiety, depression, gut – brain axis, HPA axis, probiotics, mucosal immunity

Seznam zkratk

5 - HT – Serotonin (5-hydroxytryptamin)

ACTH – Adrenokortikotropní hormon

ANS – Autonomní nervový systém

ATB – Antibiotika

BDNF – Brain-derived neurotrophic factor

Cldn5 – Claudin 5

CNS – Centrální nervový systém

CRH – Kortikotropní hormon

E.coli – *Escherichia coli*

EcO83 - *Escherichia coli* O83:K24:H31

EcN – *Escherichia coli* Nissle

ENS – Enterický nervový systém

GABA – Kyselina γ -aminomáselná

GIT – Gastrointestinální trakt

HEB – Hematoencefalická bariéra

HPA osa – Osa hypothalamus – hypofýza – nadledvinky

IBS – Syndrom dráždivého tračníku (irritable bowel syndrom)

IBD – Idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease)

IL-1 β – Interleukin 1- β

LPS – Lipopolysacharid

Mc2r – Melanocortin-2 receptor

Ocln – Okludin

OF – test otevřeného pole (open field)

PD – Parkinsonova choroba

PFC – Prefrontální kortex

Pomc – Proopiomelanokortin

SCFA – Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids)

Tjp1 – Tight junction protein 1

TLR – Toll-like receptor

TNF α – Tumor necrosis factor α

TST – tail suspension test

VN – Bloudivý nerv

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Mikrobiota.....	2
2.1.1. Střevní mikrobiota	2
2.1.2. Faktory ovlivňující mikrobiotu	2
2.2. Osa mikrobiota – střevo – mozek	4
2.2.1. Nervová cesta	5
2.2.2. Endokrinní cesta	6
2.2.3. Imunitní cesta	7
2.2.4. Mikrobiální metabolity.....	9
2.3. Dysbióza	11
2.3.1. Vznik dysbiózy.....	11
2.3.2. Osa mikrobiota – střevo – mozek a dysbióza.....	13
2.3.3. Dopad na kognitivní a behaviorální funkce	15
2.4. Probiotika.....	17
2.4.1. Možnosti využití probiotických bakterií k nápravě dysbiózy	17
2.4.2. <i>Escherichia coli</i> jako probiotická bakterie	18
3. Cíle diplomové práce.....	20
4. Materiály a metody	21
4.1. Laboratorní zvířata.....	21
4.2. Chemikálie.....	21
4.3. Probiotické bakterie.....	21
4.4. Roztoky a pufry.....	21
4.5. Plasty.....	21
4.6. Kity a sety.....	22
4.7. Sondy	23
4.8. Nástroje, přístroje a software.....	23
4.9. Design experimentu.....	24
4.10. Testování behaviorálních parametrů	26
4.11. Odběr tkání	27
4.12. Izolace RNA	28
4.13. Reverzní transkripce	28
4.14. Kvantitativní RT-qPCR.....	29
4.15. Statistická analýza dat.....	29
5. Výsledky.....	31

5.1.	Behaviorální testy	31
5.1.1.	Test otevřeného pole	31
5.1.2.	Tail suspension test	32
5.1.3.	Porovnání behaviorálních výsledků – samci a samice	33
5.2.	Genová exprese	36
5.2.1.	Prefrontální kortex	36
5.2.2.	Hypothalamus	39
5.2.3.	Hypofýza	42
5.2.4.	Nadledvinky	45
5.3.	Porovnání genové exprese – samci a samice	47
5.3.1.	Prefrontální kortex	47
5.3.2.	Hypothalamus	49
5.3.3.	Hypofýza	51
5.3.4.	Nadledvinky	52
6.	Diskuze	53
6.1.	Vliv experimentálně navozené dysbiózy a následné korekce probiotickou bakterií <i>Escherichia coli</i> O83:K24:H31 na vybrané aspekty chování	53
6.2.	Vliv experimentálně navozené dysbiózy a následné korekce probiotickou bakterií <i>Escherichia coli</i> O83:K24:H31 na expresi vybraných genů	55
6.3.	Mezipohlavní rozdíly ve zkoumaných parametrech a shrnutí diskuse	57
7.	Závěr	59
8.	Literatura	60

1. Úvod

Střevní mikrobiota je důležitou součástí lidského těla, která ovlivňuje funkci řady orgánů, včetně nervového, imunitního a endokrinního systému. Jedná se o proměnlivý ekosystém, který může být příznivě či nepříznivě modulován stravou, věkem, prostředím, ale i medikací. V rovnováze, tedy ve stavu homeostázy, má mikrobiota rozmanité složení, což má klíčový význam pro zdraví člověka.

Při narušení homeostázy se mikrobiota dostává do stavu tzv. dysbiózy. Ta bývá nejčastěji vyvolána opakovaným či dlouhodobým užíváním antibiotik, ale také nevhodnou dietou nebo nadměrným pitím alkoholu. Tento stav není člověku prospěšný, naopak je původcem nebo součástí řady fyzických i psychických onemocnění. Toto propojení střev se zbytkem těla zprostředkovává tzv. osa mikrobiota – střevo – mozek. Osa se skládá z několika drah, které jsou mezi sebou propojené a mohou tak vzájemně regulovat své funkce. Mezi hlavní části osy patří nervová dráha v čele s bloudivým nervem, imunitní dráha a endokrinní dráha spolu s HPA osou.

Studie z posledních let naznačují, že probiotické bakterie mají schopnost dysbiózu do určité míry napravit a ulevit tak zbytku organismu od jejích následků. Mezi probiotické bakterie se řadí i *Escherichia coli* O83:K24:H31, která je obsažena v komerčním probiotickém přípravku Colinfant Newborn. Tato probiotická bakterie je jedním ze zkoumaných prvků v této práci.

Práce je zaměřena na výzkum mikrobů gastrointestinálního traktu a jejich vliv na behaviorální, imunitní a neuroendokrinní vlastnosti myši. Konkrétně se práce zabývá experimentálním navozením dysbiózy pomocí antibiotik a jejím vlivem na vybrané aspekty chování. Dysbióza bude následně napravována pomocí probiotické bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31 s cílem zjistit, zda probiotický efekt této *E.coli* částečně či úplně zabrání negativním následkům dysbiózy na neuroendokrinní a imunitní systém, včetně jejich vlivu na regulaci chování.

2. Literární přehled

2.1. Mikrobiota

Mikrobiota je složena z mnoha různých mikroorganismů. Lze ji přesně definovat jako soubor jednotlivých živých mikroorganismů žijících v určitém prostředí. Pro naši práci je obzvláště důležitá kolonizující mikrobiota, která osídluje vnější nebo vnitřní povrch makroorganismů. Lidské (resp. každé mnohobuněčné) tělo je domovem bakterií, hub, malého počtu archeí, ale také méně prozkoumaných parazitických prvoků a různých typů virů (Laforest-Lapointe & Arrieta, 2018). Tyto organismy se vyskytují po celém těle od ústní dutiny až po kůži. V současné době je nejvíce prozkoumaná střevní a kožní mikrobiota. Vztah mezi hostitelem a jeho kolonizující mikrobiotou můžeme nazvat symbiotickým vztahem. Může jít a často jde o vztahy na celé ekologické škále; nejčastěji je to komenzálismus, ale pro naši práci jsou naopak velice důležité další alternativy – mutualismus, tj. oboustranně výhodné soužití, a také negativní formy, které vidíme u patobiontů nebo dysbiózy.

Termínu mikrobiom se v dnešní době používá ve 2 významech. První popisuje mikrobiom jako charakteristickou komunitu, která obývá konkrétní vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami. Druhý, méně přesný, mikrobiom vymezuje jako soubor genů všech mikroorganismů, které se nachází v určitém prostředí (Černý et al., 2023).

2.1.1. Střevní mikrobiota

Střevní mikrobiota je složena převážně z velkého množství anaerobních bakterií. Hraje důležitou roli ve zpracování potravy a produkci metabolitů, ovlivňujících lokální i systémové funkce makroorganismu. Složení i počty bakterií se v jednotlivých částech střeva liší v závislosti na dostupnosti kyslíku a dalších látek (Frank et al., 2007). Ve střevech najdeme nejvíce zastoupené bakterie kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, na rozdíl od *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Cyanobacteria*, které jsou zastoupeny v menších počtech (Jethwani & Grover, 2019). Diverzitu mikrobioty i její složení ovlivňuje celá řada faktorů.

2.1.2. Faktory ovlivňující mikrobiotu

Složení střevní mikrobioty není konstantní a podléhá vlivům mnoha vnějších i vnitřních faktorů. Těchto faktorů je celá řada, počínaje genetickými predispozicemi, přes prostředí, ve kterém jedinec žije, až po věk jedince.

Jako má každý jedinec odlišnou genetickou výbavu, má i odlišné složení mikrobioty. Ukázalo se ale, že členové rodiny mají podobnější mikrobiotu než nepříbuzní jedinci, kteří konzumují podobnou stravu a mají podobné návyky (Yatsuneneko et al., 2012). Dobrým příkladem genetického vlivu je větší náchylnost některých jedinců k zánětlivým onemocněním střev (Goodrich et al., 2014). Další studie naznačují, že strava, životní styl a prostředí mají na mikrobiotu větší vliv než geny (Rothschild et al., 2018). Strava je jedním z nejdůležitějších faktorů. Změna ve stravování dokáže velmi rychle změnit složení mikrobioty a její funkce. V současné době jsou intenzivně zkoumány různé typy diet, např. Western-style diet a ketogenní dieta (Beckett et al., 2013; Turnbaugh & Gordon, 2008). Ke stravě se úzce pojí i prostředí, ve kterém jedinec žije. Podle charakteristických vzorců v mikrobiotě a geografické oblasti bylo stanoveno několik tzv. enterotypů, které se vyznačují převládáním charakteristického rodu či typických skupin bakterií (Arumugam et al., 2011). Dalším nezanedbatelným faktorem je medikace, konkrétně antibiotika (viz kapitola o dysbióze)(Rinninella et al., 2019).

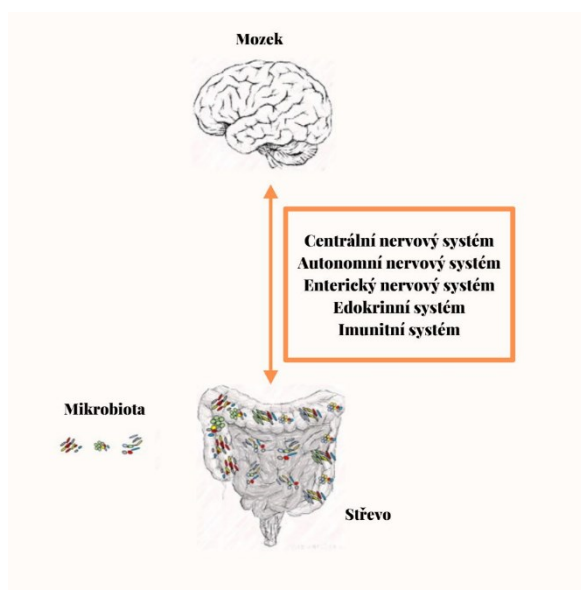
Všechny tyto faktory mohou mikrobiotu ovlivnit pozitivně či negativně a zasáhnout tak do diverzity mikrobioty, což může mít následky pro celý organismus.

2.2. Osa mikrobiota – střevo – mozek

Osa střevo – mozek představuje komplexní soubor regulačních cest a procesů, které zajišťují propojení mezi centrální nervovou soustavou a střevním systémem. Komunikace v rámci této osy je obousměrná a zprostředkována několika přímými a nepřímými cestami. Může být také označována jako osa mikrobiom – střevo – mozek.

Interakce mezi mikrobiotou a mozkem zajišťují tři hlavní cesty, nervová, endokrinní a imunitní. Nejdůležitější je nervová cesta, kam spadá autonomní nervový systém (ANS), především rozsáhlá inervace bloudivým nervem (VN) a enterický nervový systém (ENS), který inervuje střevní oblast. Významné role dále hrají endokrinní dráha společně s hypothalamo – hypofyzární osou (HPA osa) a nakonec imunitní cesta.

Všechny tyto cesty se mohou navzájem ovlivňovat a mít tak významný pozitivní či negativní vliv na mozek i střevo.



Obrázek 1. Přepřacováno podle (Strandwitz, 2018). Komunikace mezi střevní mikrobiotou a mozkem je zprostředkována pomocí CNS, ANS, ENS, endokrinního systému a imunitního systému. Všechny tyto cesty se navzájem prolínají a vytváří komplexní osu mikrobiota – střevo – mozek.

2.2.1. Nervová cesta

Nervová cesta je zprostředkována pomocí dvou neuroanatomických drah. První je ANS spolu s bloudivým nervem. Bloudivý nerv inervuje slizniční a svalové vrstvy střeva, kde sbírá podněty a vede signály až do mozku. Druhou dráhou je enterický nervový systém, přes který probíhá obousměrná výměna ve střevní oblasti.

2.2.1.1 Autonomní nervový systém

Autonomní nervový systém je nervová síť, která je součástí periferního nervového systému i CNS. Řídí aktivitu tkání s hladkou svalovinou (sekrece žláz, stěna cév, funkce GIT) a funkce bez vědomého úsilí (dýchání, trávení, srdeční tep). ANS také kontroluje důležité funkce gastrointestinálního traktu: permeabilitu střevního epitelu, střevní motilitu, tvorbu hlenu, imunitní odpověď sliznice, sekreci žluči a další.

Zahrnuje dvě základní větve, sympatickou a parasympatickou, které mohou fungovat jako antagonisté, synergisté nebo nezávisle na sobě řídit některé autonomní tělesné funkce. Sympatický a parasympatický systém dokáží ovlivnit enterický nervový systém, což může vést ke změnám v motilitě a dalších funkcích GIT.

2.2.1.2 Bloudivý nerv

Bloudivý nerv je hlavním parasympatickým nervem autonomního nervového systému. Pomocí aferentních a eferentních vláken zajišťuje obousměrnou komunikaci mezi mikrobiotou a mozkiem. Bloudivý nerv je schopen přenášet signály mikrobiálních metabolitů do CNS a zpětně zprostředkovat centrálně koordinovanou adaptaci (Vangay et al., 2015). Bylo zjištěno, že enterické buňky mají přímé synapse s VN. Přenos signálu je zprostředkován glutamátem (Reinshagen, 2019).

Prostřednictvím vláken VN byla také popsána cholinergní protizánětlivá dráha, která je schopna tlumit periferní zánět a snižovat střevní propustnost, čímž moduluje střevní mikrobiotu (Costantini et al., 2012).

2.2.1.3 Enterický nervový systém

Enterický nervový systém je síť neuronů, které jsou lokalizovány ve střevní stěně. Zakončení neuronů sahá až do slizniční epitelální bariéry a tím je zajištěn přímý kontakt s mikrobiotou. Enterický systém se skládá z nervových pletení a malých ganglií ve stěně střevní trubice, přibližně od žaludku až k hornímu okraji vnitřního svěrače anu. Systém umožňuje posouvání střevního obsahu díky koordinovaným pohybům, reguluje sekreci enzymů, kyselin a některých gastrointestinálních hormonů (Gershon, 1999).

Neurony a gliové buňky jsou organizovány do dvou vzájemně propletených pletení, myenterické a submukózní. Submukózní se nachází v submukóze, reguluje sekreci a má kontrolu nad vaskulárním systémem, zatímco myenterická pleteň se nachází mezi hladkými svaly a reguluje motilitu (Gershon & Erde, 1981). ENS je soběstačný a funguje na základě reflexů, ale často také přijímá vstupy od sympatiku a parasympatiku a poskytuje jim zpětnou vazbu (Hansen, 2003).

2.2.2. Endokrinní cesta

Endokrinní cesta úzce souvisí s nervovým systémem, dohromady jsou odpovědné za regulaci některých fyziologických funkcí. Střevní mikrobiota napomáhá dozrání neuroendokrinního systému a její složení může ovlivnit imunitní odpověď a tím ovlivnit i neuroendokrinní funkce.

Střevní sliznice a HEB umožňují průchod imunitních a endokrinních molekul, které mohou modulovat střevní i mozkové funkce. Nejdůležitější součástí endokrinní cesty je HPA osa, jejímž koncovým efektozem je kortizol.

2.2.2.1 HPA osa

HPA osa je hlavním neuroendokrinním systémem, který reguluje stresové reakce, ale i tělesné funkce jako je trávení, imunitní systém a emoce. Úlohou této osy je mimo jiné sledovat a integrovat funkce střev a také propojovat emocionální a kognitivní centra mozku s periferními střevními funkcemi. Osa se skládá z hypofýzy, hypothalamu a nadledvinek. Osa začíná v hypothalamu, který produkuje a uvolňuje corticotropin-releasing hormon (CRH). Tento hormon je uvolňován při reakci na stresové podněty a přenášen do hypofýzy. Hypofýza

jako reakci na CRH produkuje adrenokortikotropní hormon (ACTH), který poté putuje do nadledvinek. Tam stimuluje produkci kortizolu a jeho uvolňování do krve.

Kortizol je hlavní stresový hormon, který je produkován kortikotropními buňkami v kůře nadledvinek. Při dlouhodobě zvýšené hladině kortizolu může vznikat dysbióza jako reakce na dlouhodobý stres. Střevní mikrobiota má na druhou stranu schopnost do určité míry HPA osu regulovat, především produkcí metabolitů. To znamená, že mikrobiota a HPA osa se ovlivňují navzájem a komunikace je obousměrná (Cussotto et al., 2018).

Střevní mikrobiota je důležitá pro postnatální vývoj HPA osy v reakci na stres (Clarke et al., 2013). Dozrávání HPA osy je komplexní proces. U plodu je HPA osa částečně funkční již v prenatálním období, ale její plné dozrání nastává v průběhu prvních let života. V tomto období dochází ke zlepšování komunikace mezi hypothalamem, hypofýzou a nadledvinami, což umožňuje adekvátní odpověď na stresové podněty. Správný vývoj HPA osy může ohrozit například zánět a produkce prozánětlivých cytokinů (Schmidt et al., 2003). Zhoršená funkčnost HPA osy bývá často spojena s neuropsychiatrickými poruchami, ale i se zánětlivými onemocněními, jako je syndrom dráždivého tračníku (Kinlein et al., 2019).

2.2.3. Imunitní cesta

Imunitní cesta zprostředkovává komplexní interakce mezi střevní mikrobiotou, střevní sliznicí, imunitním systémem a centrálním nervovým systémem. Tato cesta zahrnuje komunikaci prostřednictvím různých signálních molekul a drah, které umožňují vzájemné ovlivňování mezi těmito systémy (Ma et al., 2019).

Střevní mikrobiota je nezbytná pro správný vývoj imunitního systému na periférii i v rámci CNS. Má vliv na produkci cytokinů, imunoglobulinů, ale i na správnou diferenciaci T lymfocytů. Nejdůležitějšími faktory v rámci osy jsou modulace zánětu a diferenciaci mikroglií (Erny et al., 2015; Langgartner et al., 2018).

Cytokiny produkované ve střevu se mohou krevním řečištěm dostávat až do mozku a ovlivňují systémovou imunitní reakci. To může měnit imunitní signalizaci a modulovat zánět na periférii i v mozku, kde může být spojen s neuropsychiatrickými onemocněními, jako je deprese, úzkost a poruchy autistického spektra (Braniste et al., 2014). Cytokiny procházejí za klidového stavu přes HEB jen velmi málo, ale uvolňování LPS z gramnegativních mikroorganismů či produkce některých cytokinů indukují změnu bariérové funkce HEB a ta

se stává propustnější pro řadu látek (Braniste et al., 2014). Důkazem propojení střeva a mozku je imunologická senzibilizace v integritě HEB, což je charakteristický rys neuropatologických symptomů (Aidy et al., 2014). V hypothalamu prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-6 aktivují HPA osu a indukují uvolňování kortizolu z nadledvinek (Aidy et al., 2014).

2.2.3.1 Mikroglie

Mikroglie jsou specializovanou formou tkáňových makrofágů, která prenatalně osidluje CNS a tvoří v něm první obranou linii při zranění nebo infekci (Aloisi, 2001; Casano & Peri, 2015). Mají schopnost pomocí produkce cytokinů a chemokinů rekrutovat z periferní cirkulace monocyty. Ty pak pomáhají při odklizení buněčných trosek. Aktivita mikroglíí je řízená cytokiny, chemokiny, neurotransmitery a jinými metabolity (př. mastné kyseliny s krátkými řetězci – SCFA).

Střevní mikrobiota může ovlivnit diferenciaci a funkci mikroglíí, především působením mikrobiálních metabolitů (Erny et al., 2015). Bylo zjištěno, že bezmikrobní myši mají zvýšený počet nezralých mikroglíí (méně rozvinuté větvení, délka dendritů, větší a méně definované tělo) (Erny et al., 2015). Léčba komplexní mikrobiotou nebo SCFA může jejich počet snížit a vrátit počty zralých mikroglíí do normálu (Y. Huang et al., 2023). Dále může mikrobiota řídit mikroglíální imunitní funkce a komunikaci mezi mikroglíemi a astrocyty (Y. Huang et al., 2023).

2.2.3.2 Zánět

Zánět je fyziologická obranná reakce na poškození tkáně, která zároveň může mít negativní dopad na organismus. Většina střevních onemocnění je spojována se zánětem střevní sliznice. Narušení střevní sliznice vede ke zvýšení propustnosti střevní stěny a pronikání mikroorganismů a jejich metabolitů jako je LPS do krevního řečiště (Leclercq et al., 2012). Periferní zánět může také zvýšit permeabilitu HEB, což umožňuje proniknutí zánětlivých a imunitních buněk do CNS (Varanoske et al., 2022).

Zánět v nervové tkáni nazýváme *neuroinflammace* či *neurozánět*. Je popisována jako zánětlivá reakce v mozku a míše, která je modulována mikroglíemi, astrocyty, endotelovými buňkami a imunitními buňkami, které produkují cytokiny, chemokiny a další látky. Studie ukazují, že neuroinflammace je rozhodujícím faktorem při rozvoji neurodegenerace a ztráty neuronů u neurodegenerativních onemocnění (Zhu et al., 2020). U Alzheimerova onemocnění

se prozánětlivé mikroglie podílí na poškozování neuronálních sítí a způsobují tím mozkovou dysfunkci (Leng et al., 2023). Předpokládá se, že neurozánětlivé procesy přispívají i k patologii Parkinsonovy choroby (PD). U pacientů s PD bylo posmrtně zjištěno, že měli zvýšené počty aktivovaných mikroglíí v amygdale, což by nasvědčovalo zánětlivé reakci. Dalším důležitým ukazatelem bylo zvýšení prozánětlivého cytokinu interleukinu-1 β (IL-1 β) v prefrontálním kortexu a substantia nigra v porovnání s kontrolami (Kouli et al., 2020).

V současné době se zdá, že zánět bývá nedílnou součástí dysbiózy a s ní spojených onemocnění. Některé studie dokonce naznačují, že dysbióza může spouštět kaskádu prozánětlivých drah a být tak příčinou systémového zánětu (Mayerhofer et al., 2017).

2.2.4. Mikrobiální metabolity

Střevní mikrobiota dokáže produkovat široké spektrum různých látek, které mohou ovlivňovat řadu fyziologických a metabolických procesů. Mohou být ve formě různých malých molekul – metabolitů, signálních molekul, strukturních elementů jako LPS, neuromediátorů nebo peptidů. Konkrétní široce bioaktivní molekuly zahrnují SCFA, biogenní aminy (dopamin, serotonin, katecholaminy) nebo metabolity odvozené od aminokyselin (GABA). Podle schopnosti procházet HEB mohou přímo nebo nepřímo ovlivňovat funkci mozku.

2.2.4.1 SCFA

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou hlavní metabolity produkované mikrobiotou v tlustém střevě prostřednictvím anaerobní fermentace nestravitelných polysacharidů, jako je vláknina a škroby. Jejich tvorba je ovlivněna prostředím, stravovacími návyky hostitele a dalšími faktory. Patří mezi nejdůležitější metabolity a bylo prokázáno, že mohou aktivovat sympatickou aktivitu autonomního nervového systému a zmírnit střevní zánět (Silva et al., 2020).

SCFA jsou ve střevu absorbovány kolonocyty pomocí H⁺ dependentních monokarboxylátových transportérů nebo pomocí na sodíku závislých monokarboxylátových transportérů (Kekuda et al., 2013). Dále se dostávají do krve a lokálně interagují s imunitními buňkami nebo se krví dostávají do jater, sleziny ale také mozku, kde působí přes receptory spojené s G proteiny (Erny et al., 2015). V mozku se SCFA účastní zrání mikroglíí (Y. Huang et al., 2023), ale kromě toho se zdá, že mohou mít vliv i přímo na funkci neuronů. Konkrétně

acetát ovlivňuje hladiny dopaminu, glutamátu a GABA v hypothalamu a zvyšuje expresi anorektických neuropeptidů (Frost et al., 2014). Propionát a butyrát pak mají vliv na intracelulární hladinu draslíku a na neurochemické procesy v mozku (Oleskin & Shenderov, 2016).

2.2.4.2 Neurotransmitery

GABA

Kyselina γ -aminomáselná (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmiter v hostitelském CNS. Některé druhy bakterií ve střevní mikrobiotě mají schopnost produkovat velké množství GABA a aktivovat dráhy produkující GABA. Mezi tyto mikroorganismy patří bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Hladiny GABA v mozku jsou poté zvýšeny a v některých částech mozku dochází ke změně exprese GABA receptorů (Stenman et al., 2020).

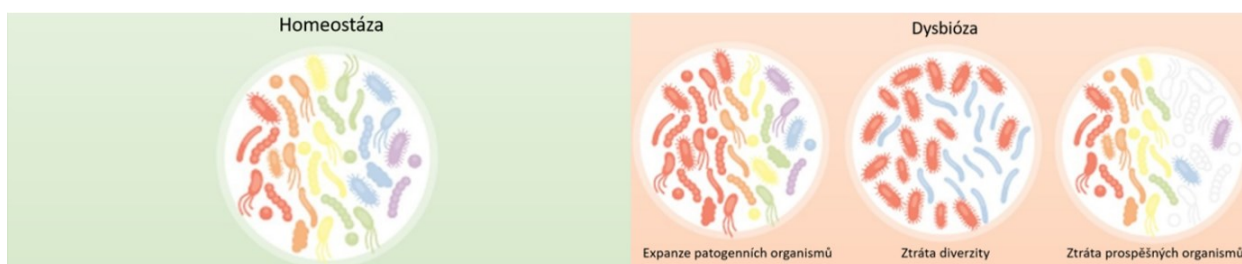
Serotonin, Tryptofan

Serotonin je neurotransmiter syntetizovaný z tryptofanu. Serotonin se váže na mikroglie přes 5-HT receptory a tím indukuje uvolnění exozomů s cytokiny (Glebov et al., 2015). Pomáhá tak modulovat neurozáněť. Mezi další důležité funkce patří modulace střevní motility nebo ovlivnění chování hostitele (Glebov et al., 2015). Mikrobiota může produkovat i prekurzor serotoninu, tryptofan. Při jeho metabolismu vzniká neurotoxin kyselina chinolinová, která je spojena s neuropatologickými stavy (Rothhammer et al., 2018). Ukázalo se, že při metabolismu tryptofanu vznikají ještě jiné metabolity, které mohou tlumit prozánětlivé reakce v astrocytech vyvolané mikroglie (Rothhammer et al., 2018). Tryptofan má schopnost pronikat přes HEB a může tak ovlivňovat množství serotoninu přímo v mozku.

2.3. Dysbióza

Dysbióza je stav změny rovnováhy mikrobioty ve smyslu funkčních schopností, celkového složení, ale také produkce mikrobiálních metabolitů. Zpravidla je termínem myšlena střevní dysbióza.

Hlavním příznakem dysbiózy je narušení funkce střev. To se může projevit silnými průjmy, častými příznaky jsou také nadměrná tvorba plynů a nepříjemné pocity tlaku v břišní dutině. Dysbióza může mít řadu dalších příznaků, lišících se u jednotlivců a podle příčiny vzniku.



Obrázek 2. Přepřacováno podle (Petersen & Round, 2014). Homeostatický stav mikrobioty je stabilní stav, který je prospěšný zdraví a poskytuje hostiteli zdravotní benefit. Vyznačuje se zejména vysokou diverzitou mikroorganismů. Při užívání antibiotik nebo nevhodné dietě dojde k narušení homeostázy a vzniká dysbióza. Dysbióza může mít několik podob. 1. Expanze patogenních organismů: Tato dysbióza se vyznačuje přemnožením patogenních mikroorganismů, které jsou v malém množství neškodné, ale při vyšším výskytu mohou napáchat velké škody. 2. Ztráta diverzity: Tento druh dysbiózy se vyznačuje malou mírou diverzity, což může mít vliv na vztahy mezi bakteriemi, ale také na osu mikrobiota-střevo-mozek. 3. Ztráta prospěšných bakterií: Druh dysbiózy, který se vyznačuje ztrátou komenzálních bakterií. Tento pokles může být celkový nebo omezený na konkrétní symbiotické taxony.

2.3.1. Vznik dysbiózy

Ke vzniku dysbiózy může přispět řada faktorů, počínaje vzorci uloženými v mikrobiotě z raného dětství, přes nadměrnou konzumaci alkoholu a nedostatek pohybu až po psychologický stres. Jednou z nejdůležitějších příčin je medikace, konkrétně především konzumace antibiotik.

2.3.1.1 Antibiotika

Ačkoli jsou antibiotika nezastupitelná v boji proti infekcím, jejich užívání může doprovázet celá řada nežádoucích účinků včetně změn chování. Některá antibiotika jsou schopna systémového průniku a přestupu přes HEB, takže mohou CNS ovlivňovat přímo. Nevstřebatelná antibiotika jako neomycin a vankomycin se při perorálním podání nedostávají do systémové cirkulace, takže nemají přímý účinek na CNS a mohou pouze měnit složení mikrobioty. Naproti tomu další antibiotika jako metronidazol mohou vstupovat do CNS a mají přímý účinek na CNS. V CNS mají vliv na chování spojené s úzkostí (Soto et al., 2018). Dále bylo prokázáno, že antibiotická léčba je spojena s neurologickými poruchami jako je deprese, panické záchvaty a úzkostné stavy (Cryan et al., 2019).

Konzumace antibiotik poškozuje střevní mikrobiotu a je příčinou vzniku dysbiózy, ačkoli míra a způsob tohoto poškození se mezi antibiotiky liší. Obvykle se jedná o narušení metabolické homeostázy změnou hladiny střevních metabolitů v důsledku ovlivnění množství metabolicky aktivních bakterií. Snížená bakteriální diverzita zároveň činí jedince náchylnějšího k nemocem. Komplexní a dlouhodobé užívání antibiotik může vést k trvalým změnám a napáchat velké škody. Studie na myších z roku 2016 ukázala, že při podávání antibiotik je odstraněna nejen většina patogenních mikroorganismů, ale také významná část komenzálních bakterií. Od toho se mohou odvíjet změny v produkci mikrobiálních metabolitů. Tímto způsobem mají antibiotika vliv například na hladiny SCFA nebo syntézu žlučových kyselin (Fröhlich et al., 2016a). Dysbióza vyvolaná antibiotiky je také spojena s dráhou FXR-FGF, což je důležitý mechanismus zapojený do syntézy a regulace žlučových kyselin. Tento mechanismus má jemnou rovnováhu a léčba antibiotiky jí může velmi rychle narušit. FXR (farnesoidní X receptor) je jaderný receptor exprimovaný v játrech i ve střevě. Reguluje syntézu, konjugaci a transport žlučových kyselin a je aktivován žlučovými kyselinami, které působí jako ligand (Guo et al., 2017).

Antibiotická léčba u novorozenců může mít nežádoucí vliv na střevní mikrobiotu několik měsíců a dokonce roků po ukončení léčby, potenciálně celoživotně. Také bylo zjištěno, že antibiotika u novorozenců mají dlouhodobý vliv na osu mikrobiota – střevo – mozek, konkrétně na regulaci myelinu v oblasti PFC (Keogh et al., 2021). Ve dlouhodobém horizontu dochází ke zhoršení kognitivních funkcí, přetrvávající dysbióze a v některých případech k obezitě v pozdějším věku. Dalším dopadem antibiotické léčby u novorozenců jsou poruchy chování v dospělosti (Kaliannan et al., 2016). V menší míře je dlouhodobý negativní efekt

antibiotik přítomný i při podávání později v dětském věku, jak popisuje studie z r. 2016 (Yassour et al., 2016).

Neomycin

Neomycin snižuje počty *Firmicutes*, a to hlavně klostridií. Dysbióza u myší léčených neomycinem byla charakteristická vyššími počty bifidobakterií a enterokoků a sníženým počtem laktobacilů. (Zhang et al., 2014).

Ampicilin

Užívání ampicilinu zvyšuje počty *Proteobacterií* a snižuje počty *Firmicutes* i *Actinobacterií* (Fouhy et al., 2012). Ve studii z roku 2015 byl potkanům podáván ampicilin, který vyvolal zvýšení hladiny glukokortikoidů, což bylo spojeno s dysfunkcemi paměti, úzkostným chováním a snížením BDNF v mozku (Wang et al., 2015).

Vlivem různých antibiotik na rozvoj dysbiózy a její charakteristiky se zabývá řada studií. Například (Bistoletti et al., 2019) ve své studii podával adolescentním myším pro navození dysbiózy antibiotický mix složený z ampicilinu, vankomycinu, neomycinu a metronidazolu.

2.3.2. Osa mikrobiota – střevo – mozek a dysbióza

Hlavní negativní dopad dysbiózy na osu spočívá ve změnách hladiny metabolitů. Další následky se odvíjejí od zvýšené permeability střevní bariéry, kterou pak tyto metabolity pronikají ve větším množství do krevního oběhu.

U zdravého jedince je přestup mikrobiálních metabolitů a patogenních látek do krve regulován střevní bariérou, tvořenou epiteliálními buňkami, které jsou vzájemně propojeny tzv. těsnými spoji. Těsné spoje jsou složité multiproteinové struktury, kterými spolu sousední buňky interagují. Tvoří je několik různých transmembránových proteinů, jako je okcludin, claudin, zonulin a adhezivní molekuly. Správná funkce těsných spojů je důležitá pro udržení integrity a nepropustnosti střevní stěny. Porucha těchto spojů může hrát klíčovou roli v rozvoji střevních zánětů a souvisejících onemocnění (Bhat et al., 2019).

Při narušení této bariérové funkce dojde k rozvolnění těsných spojů a průniku patogenních látek, metabolitů, neurotransmiterů a toxinů do krevního oběhu. To má za následek rozvoj

systémového zánětu a navazující neurologické symptomy. Dysfunkci těsných spojů v intestinální bariéře mohou způsobovat antibiotika a zvyšovat tak permeabilitu bariéry. Nemusí to být nicméně důsledkem jejich přímého poškozujícího vlivu. Antibiotická léčba z principu vždy odstraní část bakterií z povrchu sliznice a uvolní na ní tak místo pro nové agresivnější bakterie. Ty mohou poškozovat sliznici a zvyšovat její propustnost. V narušování střevní bariéry hrají roli také cytokiny, jako IFN- γ a TNF- α (Bruewer et al., 2005; T. Y. Ma et al., 2005).

Další bariéra, kterou musí metabolity a jiné látky překonat je hematoencefalická bariéra. Bylo zjištěno, že i zde je exprese proteinů těsných spojů regulována střevní mikrobiotou. Při dysbióze dochází ke zvýšení propustnosti HEB, a to na základě snížení exprese okcludinu a claudinu 5 (Braniste et al., 2014).

Kromě střeva a HEB je dysbiózou ovlivňován také bloudivý nerv. V první řadě působí na bloudivý nerv bakteriální metabolity, které mohou narušit komunikaci přes aferentní neurony bloudivého nervu. Další možností je systémový zánět, který snižuje zpětnou vazbu zprostředkovanou bloudivým nervem a přispívá k remodelaci neuronů. Poškození této důležité části osy je spojeno s aktivací mikroglíí v CNS a neuroinflamací (Cawthon & de La Serre, 2018).

Příkladem negativního dopadu dysbiózy na osu mikrobiota-střevo-mozek jsou choroby jako například syndrom dráždivého tračníku (IBS) nebo idiopatické střevní záněty (IBD) (Chassard et al., 2012; Sokol et al., 2018). IBS je funkční gastrointestinální porucha, která bývá doprovázena psychologickými problémy jako je úzkost a poruchy nálad. IBD představují střevní záněty ze skupiny chronických autoimunitních onemocnění. Patří sem Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Jde o onemocnění vyvolená nepřiměřenou imunitní aktivitou vůči komponentům kolonizující mikrobioty, která způsobuje chronické záněty. Tyto záněty jdou často ruku v ruce s dysbiózou, která zhoršuje stav zánětu. U IBS se dysbióza vyznačuje převládajícími bakteriemi kmeny *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria*. Podobně je tomu u dysbiózy u IBD, tam převládají bakterie z kmenů *Proteobacteria* a *Firmicutes* (Casén et al., 2015).

Dalším příkladem je deprese, u které může docházet k zesílené aktivaci HPA osy z důvodu narušení střevního prostředí při reakci na stres. To je také spojeno s nadměrným uvolňováním

adreno-kortikotropního hormonu z hypofýzy a kortikosteronu z nadledvinek (Y. B. Kang et al., 2017).

2.3.3. Dopad na kognitivní a behaviorální funkce

Některé studie naznačují, že dysbióza může být spojena s různými kognitivními poruchami, jako je například zhoršená kognitivní flexibilita, snížená paměťová funkce a vyšší riziko rozvoje depresivních poruch (Settanni et al., 2021). Další výzkumy také ukazují, že neurotransmitery produkované mikrobiotou mohou mít vliv i na behaviorální funkce (Hoban et al., 2016).

V současné době se zdá, že kognitivní dysfunkce může být způsobena abnormalitami v rámci několika drah, včetně imunitní, zánětlivé a nervové.

Co se zánětu týče, dysbióza je brána jako počáteční patofyziologický proces systémového zánětu. V důsledku chronického zánětu GIT dochází k narušení střevního epitelu, což může pomoci úniku patogenů do krevního oběhu. Patogeny a jejich složky jako LPS dále přispívají k systémovému zánětu a ovlivňují mozek (Asano et al., 2012; Chunchai et al., 2018). V mozku dochází k neurodegenerativním změnám například prostřednictvím apoptózy nervových buněk, zvýšeným oxidačním stresem nebo zvýšenou aktivací mikroglíí (Saiyasit et al., 2020).

Vliv na kognitivní dysfunkci mohou mít i mikrobiální metabolity, a to především SCFA (acetát, butyrát a propionát). Zvýšení hladin SCFA bylo spojeno se snížením neurozánětu (Hoffman et al., 2019). Dalším možným vysvětlením souvislosti mezi střevní dysbiózou a kognitivním poklesem jsou změny nebo dysfunkce HPA osy, resp. změny v produkci neurotransmiterů (Rea et al., 2016).

Nejčastěji bývá s dysbiózou spojována deprese a poruchy chování. Můžeme sem ale zařadit i poruchy paměti nebo úzkostné stavy. Stejně jako u kognitivní dysfunkce zde hraje významnou roli zánět. Mezi patologické mechanismy deprese vyvolané dysbiózou patří změna mikrobioty a mikrobiálních metabolitů, narušení integrity střevní bariéry, translokace mikrobiálních toxinů do krevního oběhu a chronický zánět, včetně neuroinflammace (Fleshner et al., 2017).

Nervovou cestu potvrzuje studie z roku 2011, kde bylo u myší vyvoláno úzkostné chování pomocí chemické kolitidy, s níž je spojena i dysbióza. Pomocí vagotomie bylo zjištěno, že v patologii úzkostného chování hraje velkou roli bloudivý nerv. Ve stejné studii se myším podávala i probiotická bakterie, jejíž příznivé účinky byly opět spojeny s bloudivým nervem (Bercik et al., 2011).

Jak bylo popsáno výše, dysbióza podporuje zánětlivé procesy a přispívá k systémovému zánětu. To může mít negativní vliv na mozkové funkce a spojitost s různými neurologickými a psychiatrickými poruchami včetně deprese a úzkostných stavů (Zhu et al., 2020). To potvrzuje studie (S. Liu et al., 2020b), kde byla potkanům transplantována mikrobiota pacientů s depresí. Po transplantaci začali potkani vykazovat depresivní chování, a byly u nich zjištěny zvýšené hladiny ACTH a CRH, což ukazuje na hyperaktivitu HPA osy. U potkanů také došlo k výraznému zvýšení prozánětlivých cytokinů.

Se zánětem se pojí i zvýšení střevní permeability, což může dále přispívat k systémovému zánětu. Do oběhu se dostává LPS a ten pak narušuje HEB. LPS má také schopnost aktivovat imunitní systém pomocí TLR4 receptorů a při stresové reakci hyperaktivuje HPA osu (Mayerhofer et al., 2017). To naznačuje, že dysbióza spouští kaskádu prozánětlivých drah, které mohou vést k depresivnímu chování.

Studie (Hoban et al., 2016) potvrzuje dopad dysbiózy na kognitivní i behaviorální funkce. Myším byla způsobena dysbióza pomocí antibiotického mixu (ampicilin, vankomycin, ciprofloxacin, imipenem a metronidazol) a poté byly podrobeny behaviorálním testům. Výsledky této studie naznačují, že dysbióza má za následek deficity prostorové paměti nebo zvýšenou viscerální citlivost. Zároveň byla zjištěna změněná koncentrace serotoninu v CNS, což mělo za následek změny v chování.

2.4. Probiotika

Probiotika můžeme definovat jako živé mikroorganismy, které při podání v adekvátních dávkách přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Probiotické bakterie mohou být konzumovány jako doplňky stravy nebo spolu s potravou. V potravě jsou často součástí mléka a mléčných či kvašených výrobků.

Mezi nejčastěji užívané probiotické bakterie patří bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tyto bakterie se řadí mezi nejbezpečnější a nejvíce prozkoumané, a proto je jejich kombinace ve většině komerčně dostupných probiotických přípravků. Mezi probiotické bakterie patří i členové jiných druhů. Dobrým příkladem jsou některé kmeny *Escherichia coli*, které jsou obsaženy v několika probiotických přípravcích.

Probiotické suplementy se mohou skládat z jednoho nebo více druhů probiotických bakterií. U jednodruhových preparátů je snazší určit přesný mechanismus účinku na mikrobiotu hostitele. Oproti tomu u smíšených preparátů je často pozorován silnější účinek na hostitele (Yong et al., 2020).

2.4.1. Možnosti využití probiotických bakterií k nápravě dysbiózy

Probiotika mohou přispět k nápravě dysbiózy hned několika způsoby. Probiotika mohou obnovit rovnováhu mezi komenzálními a patogenními mikroorganismy. Obnovení rovnováhy může mít dále pozitivní účinek na hladiny metabolitů a propustnost střevní bariéry. Bylo také zjištěno, že probiotika mohou mít významný vliv na psychické zdraví a snížení depresivního chování (Chahwan et al., 2019).

Existuje mnoho preklinických studií na myších či potkanech, které potvrzují pozitivní vliv probiotických bakterií nejen na střeva a mikrobiotu, ale také na kognitivní a behaviorální funkce. To ukazuje například studie (Roy Sarkar et al., 2020), kde byla myším experimentálně navozena dysbióza antibiotiky a současně s antibiotiky byla podávána i probiotika. Probiotika byla schopna ochránit hipokampální neurony před zánětlivým poškozením a napravit dysbiózu.

Ve studii z roku 2016 byla myším podávána probiotická bakterie *Lactobacillus plantarum*. U myší došlo k poklesu prozánětlivých cytokinů a naopak zvýšení protizánětlivých cytokinů. U behaviorálních testů byl pozorován pokles úzkostného a depresivního chování u myší

s probiotickou léčbou (Y. W. Liu et al., 2016). Další studie (Abildgaard et al., 2017) na potkanech ukazuje, že pro ovlivnění deprese a depresivního chování je klíčová HPA osa. Potkanům byl podáván probiotický mix (*B. bifidum*, *B. lactis*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. lactis* W19 a *L. lactis* W58) a poté byli potkani vystaveni testu nuceného plavání. U zvířat, která podstoupila probiotickou léčbu, bylo výrazně sníženo depresivní chování, a to až o 34%.

Potenciál probiotik pro léčbu deprese a s ní spojené dysbiózy potvrzují i klinické studie. Například studie z roku 2011, která zkoumala vliv probiotické léčby na zdravé jedince. Po 4 týdny byl probandům podáván probiotický mix obsahující *Lactobacillus helveticus* R0052 a *Bifidobacterium longum* R0175 a byl pozorován pokles úzkostného chování (Messaoudi et al., 2011). Novější studie také potvrzují pozitivní účinky probiotické léčby v kontextu neuropsychiatrických onemocnění.

Jedna z novějších studií z roku 2020 byla zaměřena na vliv probiotik na stárnutí a změny v kognitivních funkcích. Osoby s kognitivní poruchou vykazovaly při konzumaci probiotik větší celkové zlepšení kognitivního skóre než jedinci s placebem (Sanborn et al., 2020). Další studie zkoumala zmírňující, jejímž účelem bylo prozkoumat zmírňující účinky probiotického kmene *Lactobacillus plantarum* na IBS. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin (placebo/oligosacharidy/probiotika). Po 8týdenní intervenci probiotická léčba významně snížila skóre IBS, snížila závažnost symptomů spojených se střevními záněty a obnovila diverzitu mikrobioty (Y. Liu et al., 2021). Ve studii (Y. Kang et al., 2022) dostávaly myši, které byly krměny dietou s vysokým obsahem tuků, probiotickou bakterií *Lactobacillus acidophilus*. Po podání probiotické bakterie došlo ke snížení tělesné hmotnosti, systémového zánětu a propustnosti střevní bariéry.

2.4.2. *Escherichia coli* jako probiotická bakterie

Escherichia coli (*E. coli*) je bakterie, která se běžně vyskytuje v lidském střevě. Existuje mnoho různých kmenů *E. coli*, které zahrnují kmény jednoznačně patogenní, komenzální ale i probiotické. Většina kmenů *E. coli* je součástí přirozené střevní mikrobioty. Zástupci jsou jedni z prvních kolonizátorů střev a *E. coli* je dominantním druhem u zdravých novorozenců (Secher et al., 2016).

Určité kmeny *E. coli* byly identifikovány jako probiotika a mají potenciál poskytovat zdravotní přínos. Příkladem je kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 (známý také jako *E. coli* Nissle), který byl izolován ze zdravého jedince a je známý pro svou schopnost konkurovat patogenním bakteriím a inhibovat jejich růst ve střevě. *E. coli* Nissle (EcN) se často používá jako součást probiotických přípravků a byla prokázána účinnost při léčbě určitých střevních onemocnění, jako je například ulcerózní kolitida (Matthes et al., 2010).

E. coli je součástí 3 komerčně dostupných probiotických přípravků (Mutaflor, Symbioflor 2 a Colinfant). Mutaflor obsahuje životaschopné buňky EcN. Symbioflor obsahuje koncentrát šesti genotypů *E. coli*. A nakonec Colinfant obsahuje jeden konkrétní kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO83) a je určen pro novorozence a kojence (Wassenaar, 2016).

Existuje několik studií, které potvrzují příznivé účinky *E. coli* na střevní dysbiózu. (Rodríguez-Nogales et al., 2018) zjistili, že podávání *E. coli* myším s ulcerózní kolitidou zlepšilo střevní dysbiózu, a to hlavně díky zvýšení bakteriální diverzity. To potvrzuje i studie z roku 2021, která se zaměřila na zhodnocení různých probiotik a jejich protizánětlivých účinků na modelu ulcerózní kolitidy. Myším byla nejdříve experimentálně navozena kolitida pomocí rektálního podání TNBS a následně byla podána probiotika. Bylo zjištěno, že nejvyšší protizánětlivé účinky ve střevech měly EcN a *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (Algieri et al., 2021). Další studie se zaměřuje nejen na dysbiózu, ale také na neuropsychiatrické účinky *E.coli*. Tato studie hodnotila změny chování spojené s úzkostí na myším modelu dysbiózy a následnou nápravu pomocí probiotické bakterie EcN. Po podání antibiotik a navození dysbiózy vykazovaly myši úzkostné chování. Podání probiotik úzkostné chování snížilo (Park et al., 2021).

3. Cíle diplomové práce

Hlavním cílem práce bylo objasnit a charakterizovat vliv perinatálně navozené experimentální dysbiózy na neuroendokrinní a imunitní regulaci vybraných aspektů chování.

Dále byl studován dopad navazujícího podání probiotické *Escherichia coli* O83:K24:H31 na léčbu dysbiózy. Konkrétně bylo naším cílem zjistit, zda *Escherichia coli* O83:K24:H31 úplně nebo alespoň částečně odvrátí negativní účinky dysbiózy.

4. Materiály a metody

4.1. Laboratorní zvířata

Experimenty byly prováděny na samcích a samicích myši BALB/c z Czech Center of Phenogenomics (CCP), BIOCEV, Vestec. Myši byly chovány v boxech se standardní podestýlkou a přístupem k vodě a krmivu *ad libitum*. Světelný režim byl nastaven na 12h/12h a teplota na 22 ± 2 °C.

4.2. Chemikálie

Antibiotika: Ampicilin (Carl Roth, Německo, kat. č. k0292)

Neomycin sulfát (Carl Roth, Německo, kat. č. r86682)

Isofluran (Abbot Laboratories, UK)

Ethanol (96%) (Dr. Kulich Pharma, CZ)

2-merkптоethanol (Sigma-Aldrich, USA)

RNAprotect (QIAGEN, Německo)

4.3. Probiotické bakterie

***Escherichia coli* O83:K24:H31** (Dyntec, CZ)

4.4. Roztoky a pufry

PBS

Gavážovací pufr (0,5 % glukóza + 0,2 M NaHCO₃ v PBS)

4.5. Plasty

Eppendorfkы 2 ml/1,5 ml (SSIbio, USA)

PCR 96 and 384 well Reaction Plates (Applied Biosystems, USA)

4.6. Kity a sety

RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Německo, kat. č. 74106)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA, kat. č. 4368814)

Luna® Universal qPCR master Mix (New England BioLabs, UK, kat. č. M3003)

4.7. Sondy

Zkratka	Název	Kat. číslo	Výrobce
Act β	Aktin beta	Mm00607939_s1	Applied Biosystems USA
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Mm01334047_m1	Applied Biosystems USA
Crh	Corticotropin releasing hormone	Mm01293920_s1	Applied Biosystems USA
Cldn5	Claudin 5	Mm00722013_s1	Applied Biosystems USA
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm01336189_m1	Applied Biosystems USA
Mc2r	Melanocortin 2 receptor	Mm01262510_m1	Applied Biosystems USA
Ocln	Occludin	Mm00500912_m1	Applied Biosystems USA
Pomc	Proopiomelanocortin (ACTH)	Mm00435874_m1	Applied Biosystems USA
Tjp1	ZO-1 (Tight junction protein 1)	Mm00493699_m1	Applied Biosystems USA
Tlr4	Toll-like receptor 4	Mm00445274_m1	Applied Biosystems USA
Tnf α	Tumor necrosis factor alpha	Mm99999068_m1	Applied Biosystems USA

Tabulka 1. Sondy použité na qPCR.

4.8. Nástroje, přístroje a software

Pipety: Finnpipette (Thermo Scientific™, USA)

PIPETMAN concept (Gilson, USA)

Laminární box: MSC-Advantage™ Class II Biological Safety Cabinets (Thermo Scientific™, USA)

Centrifuga: Micro 22 R, Universal 30 RF, Universal 320R (Hettich, Německo)

Homogenizátor: FastPrep-24 TM 5G instrument (MP Biomedicals, USA)

Reverzní transkripce: Reverse Transcription Thermal Cycler Peltier Cycler 200 (MJ Research, Singapore)

qPCR: LightCycler® 480 II Real-Time PCR System (Roche Molecular Systems, USA)

Nanodrop: NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

Vortex: Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, CZ)

Tail suspension test: BIO-TST 4.0.2.1 (Bioseb, Francie)

Open field test: Viewer (Biobserve GmbH, Německo)

Software:

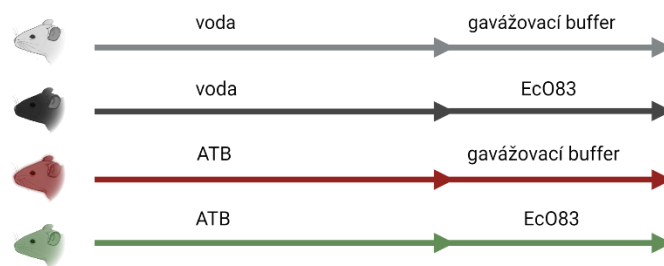
BIO-TST v4.0.2.1 (Bioseb, USA)

BioRender

GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, USA)

4.9. Design experimentu

Myším byla perinatálně navozena experimentální dysbióza, která byla posléze korigována podáním probiotické EcO83. Po ukončení této procedury byla zvířata ve věku 11 týdnů podrobena behaviorálnímu testování (open field test, tail suspension test) a po jeho absolvování (v den provádění tail suspension test) byla usmrcena a byly odebrány relevantní tkáně a orgány. Myši byly náhodně rozděleny do 4 skupin (K, EcO83, ATB, EcO83+ATB; viz Obrázek 3).



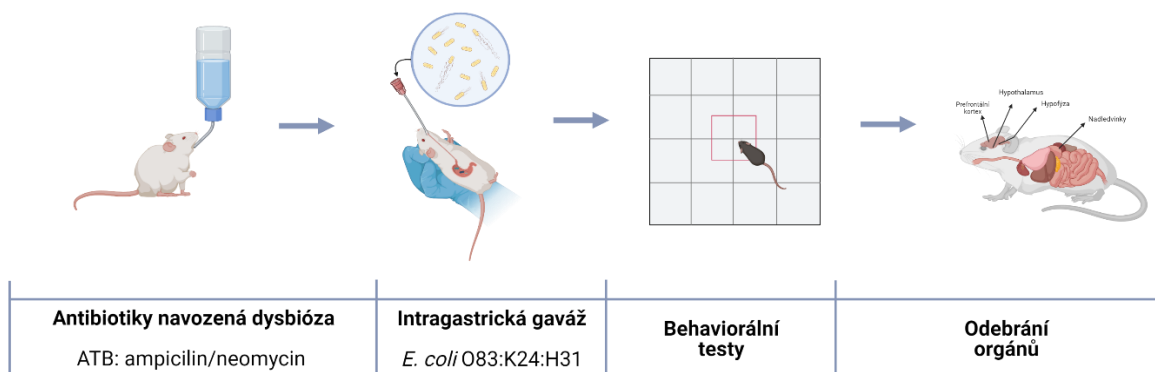
Obrázek 3. Náhled skupin.

Experimentální schéma – studium vlivu navození a korekce perinatální dysbiózy na relevantní parametry měřené v dospělosti (myši kmene BALB/c – analogické pro samce a samice).

Týden před očekávaným vrhem byla březím samicím ve skupinách ATB a EcO83+ATB podána voda s antibiotiky, viz níže. Během období kojení byla myším dále podávána antibiotika po dobu prvních tří týdnů věku. V pátek 3. týden po narození byla antibiotika odstraněna. Myším ve skupinách EcO83 a EcO83+ATB bylo od pondělí 4. týdne věku po dobu 5 dní intragastrickou gaváží podáváno 10^9 CFU EcO83 v objemu 50 μ l gavážovacího pufu. Zbylé skupiny (tzn. ATB a K) dostávaly dobu 5 dní stejné množství gavážovacího pufu bez probiotické bakterie. Následně byly myši ponechány bez experimentálního zásahu do 11. týdne věku, kdy počínaje pondělím byly testovány v behaviorální laboratoři.

4.9.1.1 Podávání antibiotik

Pro navození experimentální dysbiózy se u příslušných skupin používala perorálně podávaná směs antibiotik Ampicilinu a Neomycinu v koncentraci 1 mg/ml (1 g/l). Antibiotika byla podávána prostřednictvím pitné vody, ke které měly myši přístup *ad libitum*. Antibiotika byla do pitné vody přidávána ve formě 100 \times koncentrovaného roztoku (100 mg/ml), připraveného rozpuštěním práškové formy (Carl Roth) v destilované H₂O. Voda s antibiotiky byla vyměňována vždy v pátek (150 ml vody s antibiotiky), v pondělí (100 ml vody s antibiotiky) a ve středu (100 ml vody s antibiotiky). Během podávání antibiotik byly myši pravidelně každý druhý den váženy.



Obrázek 4. Design experimentu.

4.9.1.2 Příprava *Escherichia coli* O83:K24:H31

Probiotický kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO83) přítomný v probiotické vakcíně Colinfant Newborn vyráběné společností Dyntec byl pěstován v bujónu Luria Bertani. Pro *in vivo* podávání byla bakteriální suspenze promyta a zředěna v gavážovacím pufru na 5×10^{10} CFU/ml (jedna dávka obsahovala 10^9 CFU ve 20 μ l).

4.9.1.3 Podávání *Escherichia coli* O83:K24:H31

Vybraným skupinám bylo podáno 1×10^9 CFU probiotické EcO83 perorální intragastrickou gaváží plastovou sondou. EcO83 byla myším podávána v 20 μ l gavážovacího pufru (0,5 % glukóza + 0,2 M NaHCO₃ v PBS). Během podávání probiotické bakterie byly myši denně váženy.

4.10. Testování behaviorálních parametrů

Ve věku 11 týdnů byly myši podrobeny baterii behaviorálních testů. Ta obsahovala test otevřeného pole (zaměřený na hodnocení úzkosti experimentálních zvířat) a tail suspension test (hodnotící míru depresivního chování). Testy byly vždy provedeny v průběhu jednoho týdne.

4.10.1.1 Test otevřeného pole

Pohyb zvířat v novém prostředí a úroveň úzkosti byly hodnoceny ve stejně osvětleném otevřeném poli (OF) s intenzitou osvětlení 200 lux. Plocha OF byla čtvercová o rozměrech 42 x 42 cm. Plocha byla virtuálně rozdělena na periferní a centrální zóny, přičemž centrální zóna tvořila 38 % celé arény. Každá myš byla umístěna do jednoho z rohů této plochy po dobu 10 minut. Čas strávený v každé zóně i celkový aktivní čas, ušlá vzdálenost, průměrná rychlost a další odvozené parametry byly automaticky vypočteny na základě sledování videa pomocí systému sledování (Viewer, Biobserve GmbH, Německo). Po skončení testování byla každá myš vrácena do svého boxu. Po každé myši byla aparatura vyčištěna a vydezinfikována 70 % isopropylalkoholem.

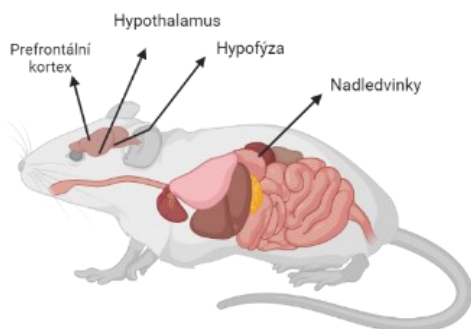
4.10.1.2 Tail suspension test

Před samotným testováním byly myši ponechány 60 minut v testovací místnosti k aklimatizaci a poté zváženy. K testu byla použita aparatura na automatické zavěšení ocasu (TST System, Bioseb, Francie), na které se testují 3 myši současně. Před začátkem testu byl myši omotán ocas lepící páskou ve stálé poloze ve $\frac{3}{4}$ vzdálenosti od kořene ocasu. Myš byla po dobu 6 minut zavěšena za lepící pásku, tak aby byla v jedné linii s ocasem a přibližně 10 cm od podložky. Měřila se doba, kdy se myš pokoušela uniknout a dosáhnout na zem, než se přestala hýbat. V tomto testu byla každá myš testována pouze jednou a mimo dohled ostatních myší. Po skončení testování byla myš vrácena do svého boxu. Po každé myši byla aparatura vyčištěna a vydezinfikována 70 % isopropylalkoholem.

4.11. Odběr tkání

Cca hodinu po dokončení baterie behaviorálních testů byly myši uspány inhalační anestetickou směsí s 5% isofluranových par a usmrceny exsanguinací. Posléze byly odebrány vzorky na navazující analýzy:

Do RNA Protect Buffer (RNA Protect Buffer, Sigma) pro následující qPCR analýzu genové exprese – hypofýza, hypothalamus, prefrontální kortex, nadledvinky



Obrázek 5. Odběr tkání.

4.12. Izolace RNA

Tkáň byla zvážena, vložena do směsi lyzačního pufru a 2-merkaptoethanolu (1/10) a zhomogenizována. Po homogenizaci tkáně byl použit QIAGEN RNeasy® Mini Kit pro izolaci RNA. Izolace byla provedena podle instrukcí v přiloženém protokolu. Koncentrace a čistota získané RNA byla měřena spektrofotometricky pomocí technologie Nanodrop.

4.13. Reverzní transkripce

Pro účely této práce byla zvolena metoda obecné reverzní transkripce. Na přepis RNA do cDNA byl použit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Reverzní transkripce byla provedena podle přiložených instrukcí pomocí Thermal Cycler 200 viz Tabulka 2.

RT-PCR		qPCR	
složka	množství (μl)	složka	množství (μl)
RT buffer	2	Master mix	5
DNT mix	0,8	probe	0,5
Random primers	2	RNase free H ₂ O	2,5
Reverse Transcriptase	1	cDNA	2
RNase inhibitor	1		
RNA (5μg)			
+ RNase free H ₂ O	13,2		

Tabulka 21. Jednotlivé složky reakcí RT-PCR a qPCR

4.14. Kvantitativní RT-qPCR

Byla měřena genová exprese vybraných genů v jednotlivých mozkových strukturách a strukturách HPA osy. Vzorky cDNA byly napipetovány do 384-jamkových mikrotitračních destiček dle schématu uvedeného v Tabulce 2. Ze získaných hodnot Ct (threshold cycle) byla s použitím metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) vypočtena relativní míra exprese zkoumaných genů.

4.15. Statistická analýza dat

4.15.1.1 Statistické zpracování dat z behaviorálních testů

Statistická analýza dat z behaviorálních testů byla provedena v programu GraphPad Prism 8.4.3. Nejprve byla hodnocena normalita dat pomocí Kolmogorov – Smirnov normality testu. Pro vyloučení odlehlých hodnot byl použit Dixon's test – $p < 0.2$. V závislosti na rozložení dat byl pro určení signifikance použit test One Way ANOVA. Grafy byly vytvořeny v témže programu. Hodnoty na grafu označují aritmetické průměry u jednotlivých pozorování a chybové úsečky označují střední chybu průměru (SEM). Hodnoty označené * jsou s úrovní signifikance 0,05. Hodnoty označené ** jsou s úrovní signifikance 0,01. Hodnoty označené *** jsou s úrovní signifikance 0,001.

4.15.1.2 Statistické zpracování dat genové exprese

První část zpracování dat byla provedena v programu Microsoft Office Excel pomocí metody $2^{-\Delta\Delta CT}$. V několika krocích byla vypočítána relativní hodnota exprese zkoumaných genů a výsledné hodnoty byly přeneseny do programu GraphPad Prism 8.4.3, kde byly

udělány finální analýzy (test normality, One Way ANOVA test). Výsledné grafy byly vytvořeny v témže programu.

5. Výsledky

5.1. Behaviorální testy

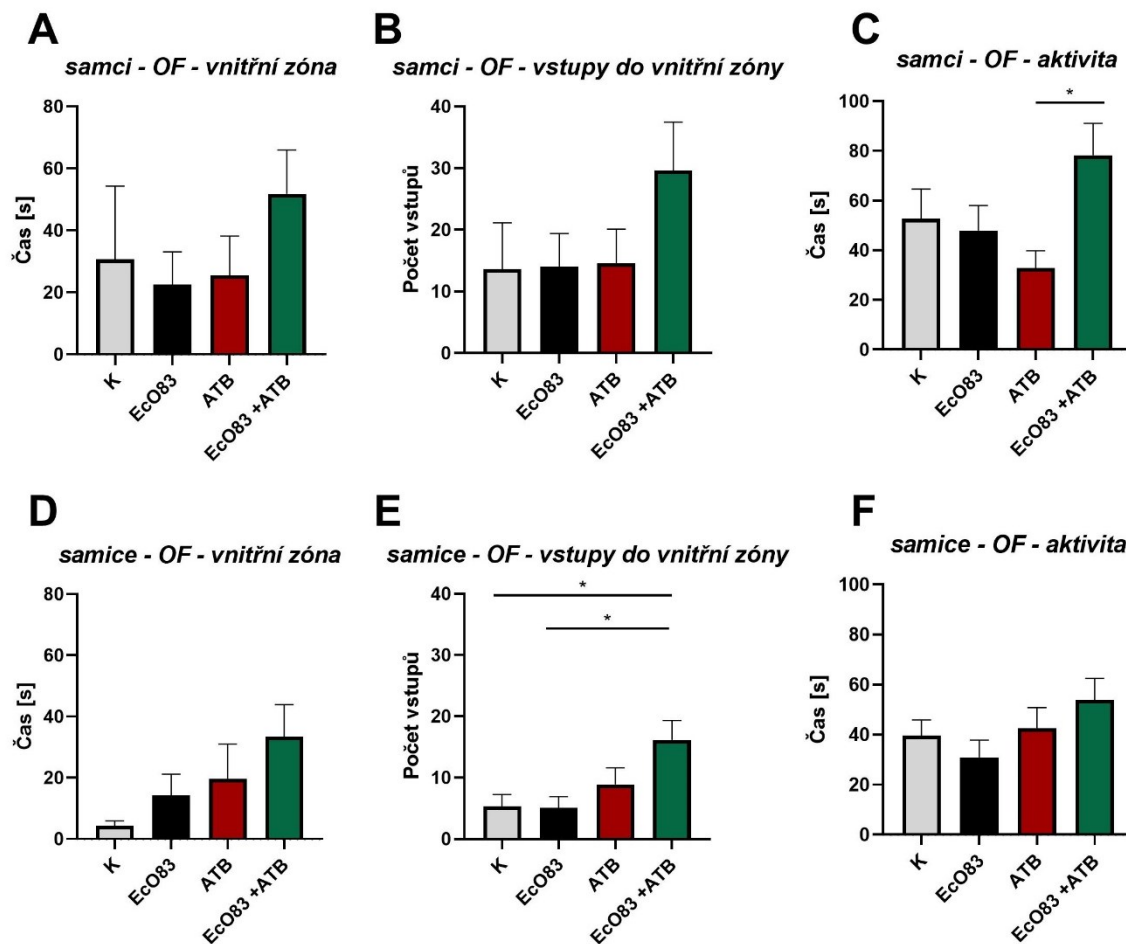
Navození a korekce perinatální dysbiózy a její vliv na parametry behaviorálních testů měřené v dospělosti. V první části byly porovnány výsledky behaviorálních testů mezi experimentálními skupinami u jednotlivých pohlaví. V další části byly parametry porovnány mezi pohlavími za účelem zjistit, zda pohlaví experimentálních zvířat ovlivňuje indukci dysbiózy, její dopad na výsledky behaviorálních testů a její korekci probiotickou EcO83.

5.1.1. Test otevřeného pole

Test otevřeného pole využívá přirozené tendence hlodavců zkoumat nová prostředí. Tato explorace je řízena konfliktem mezi přiblížením a vyhýbáním se, kdy zvířata volí mezi zkoumáním nového prostředí a vyhýbáním se možnému nebezpečí. Otevřené pole se skládá z bezpečných a rizikových oddělení, tedy z periferie a středu. Hlodavci přirozeně upřednostňují tmavá a uzavřená místa před otevřenými, vysoko položenými a dobře osvětlenými oblastmi. Snížená aktivita a explorace rizikových/anxiogenních částí otevřeného pole, vyjádřená snížením počtu návštěv a délky návštěv, nebo zvýšená prodleva před první návštěvou, charakterizují chování zvířat podobné úzkosti.

5.1.1.1 Samci a samice

Obrázek 6 ukazuje výsledky testu otevřeného pole u samců a samic. U samců byl nalezen signifikantní efekt probiotické korekce dysbiózy na celkový čas aktivity (obr. 6C). Ve zbylých parametrech byl pozorován trend, který koreluje se signifikancí u celkové aktivity. Samice, kterým byla indukovaná experimentální dysbióza posléze korigovaná podáním probiotické EcO83, vykazovaly signifikantní rozdíl v parametru počtu vstupů do vnitřní zóny oproti kontrolním samicím a samicím, které dostaly pouze EcO83 (obr. 6E). Obdobný trend byl pozorován i v dalších parametrech.



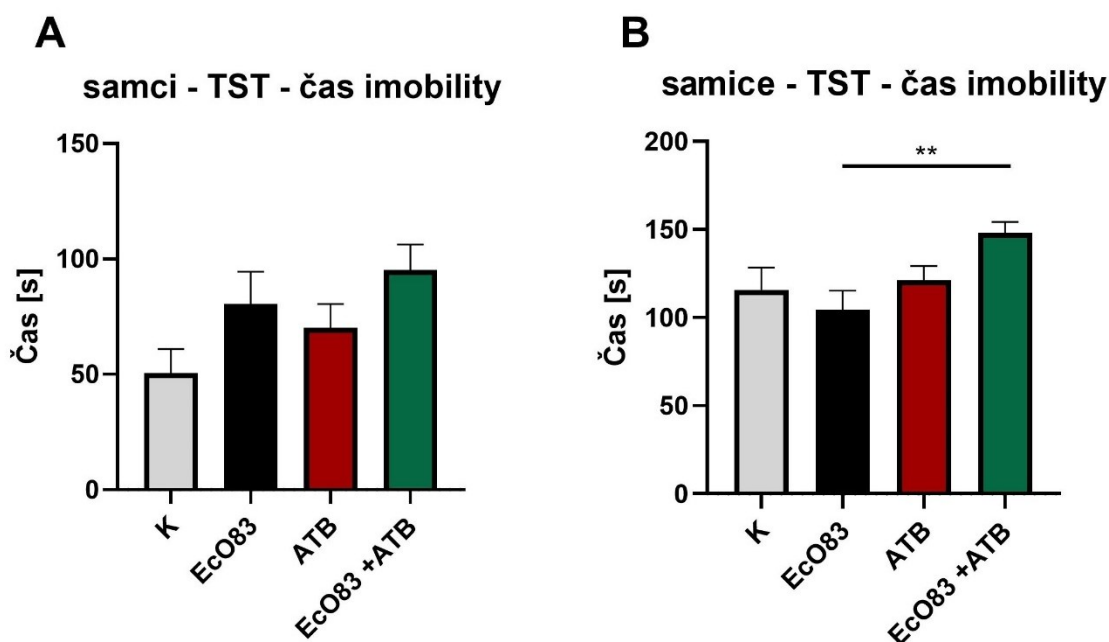
Obrázek 6. Výsledky testu otevřeného pole u samců a samic ve skupině. Grafy znázorňují porovnání jednotlivých parametrů měřených v OF testu. Sledované parametry: čas strávený ve vnitřní zóně (A,D), počet vstupů do vnitřní zóny (B,E) a celková aktivita myši (C,F). Signifikance byla nalezena u samců v celkové aktivitě (C) a samic v počtu vstupů do vnitřní zóny (E). K – kontrola, Eco83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, Eco83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05.

5.1.2. Tail suspension test

Tento test měří zoufalství zvířat v situaci, ze které nedokáží uniknout. Po tom, co jsou myši zavěšeny za ocásek se po počátečním období živé aktivity stávají nehybnými. Délka nehybnosti ukazuje na míru zoufalství a depresivního chování. Hlavním měřeným parametrem v tomto testu byl čas imobility v posledních čtyřech minutách testu.

5.1.2.1 Samci a samice

Na obrázku 7 jsou výsledky TST u samců i samic. U samic (obr. 7B) byl nalezen signifikantní rozdíl v čase imobility za poslední 4 minuty mezi skupinou EcO83 a skupinou EcO83+ATB.



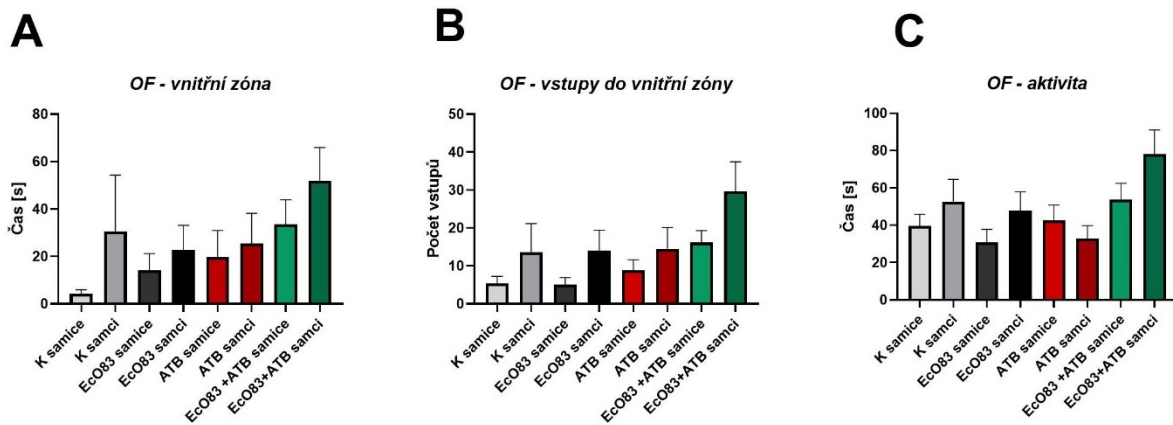
Obrázek 7. Výsledky TST u samců a samic. Graf znázorňuje porovnání času imobility za poslední 4 minuty samců (A) a samic (B) mezi experimentálními skupinami. Signifikance byla nalezena u samic (B). K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené ** jsou s úrovní statistické významnosti 0,001 – 0,01.

5.1.3. Porovnání behaviorálních výsledků – samci a samice

5.1.3.1 Test otevřeného pole

Obrázek 8 ukazuje grafy s porovnáním výsledků samců a samic v testu otevřeného pole. Z grafů byl vypořodován trend sníženého úzkostného chování u skupin EcO83+ATB

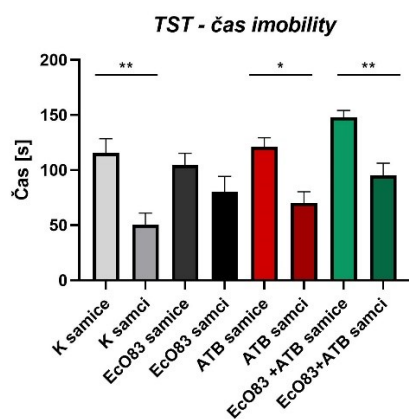
(skupiny, které dostávaly antibiotika i EcO83). Z výsledků vyplývá, že větší míru úzkostného chování vykazovaly samice. Signifikance nicméně nebyla nalezena.



Obrázek 8. Porovnání výsledků testu otevřeného pole mezi samci a samicemi. Grafy znázorňují porovnání jednotlivých parametrů měřených v OF testu mezi samci a samicemi (světle samice, tmavě samci). Sledované parametry: čas strávený ve vnitřní zóně (A), počet vstupů do vnitřní zóny (B) a celková aktivita myši (C). Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.1.3.2 Tail suspension test

Na obrázku 9 jsou výsledky z TST, kde byl měřen čas imobility za poslední 4 minuty. Signifikantní efekt pohlaví byl pozorován u tří ze čtyř skupin. Z výsledků vyplývá, že větší míru imobility vykazovaly samice.



Obrázek 9. Porovnání výsledků TST mezi samci a samicemi. Graf znázorňuje porovnání času imobility za poslední 4 minuty mezi samci a samicemi (světle samice, tmavě samci). Signifikance byla nalezena. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05. Hodnoty s ** jsou s úrovní statistické významnosti 0,01.

5.2. Genová exprese

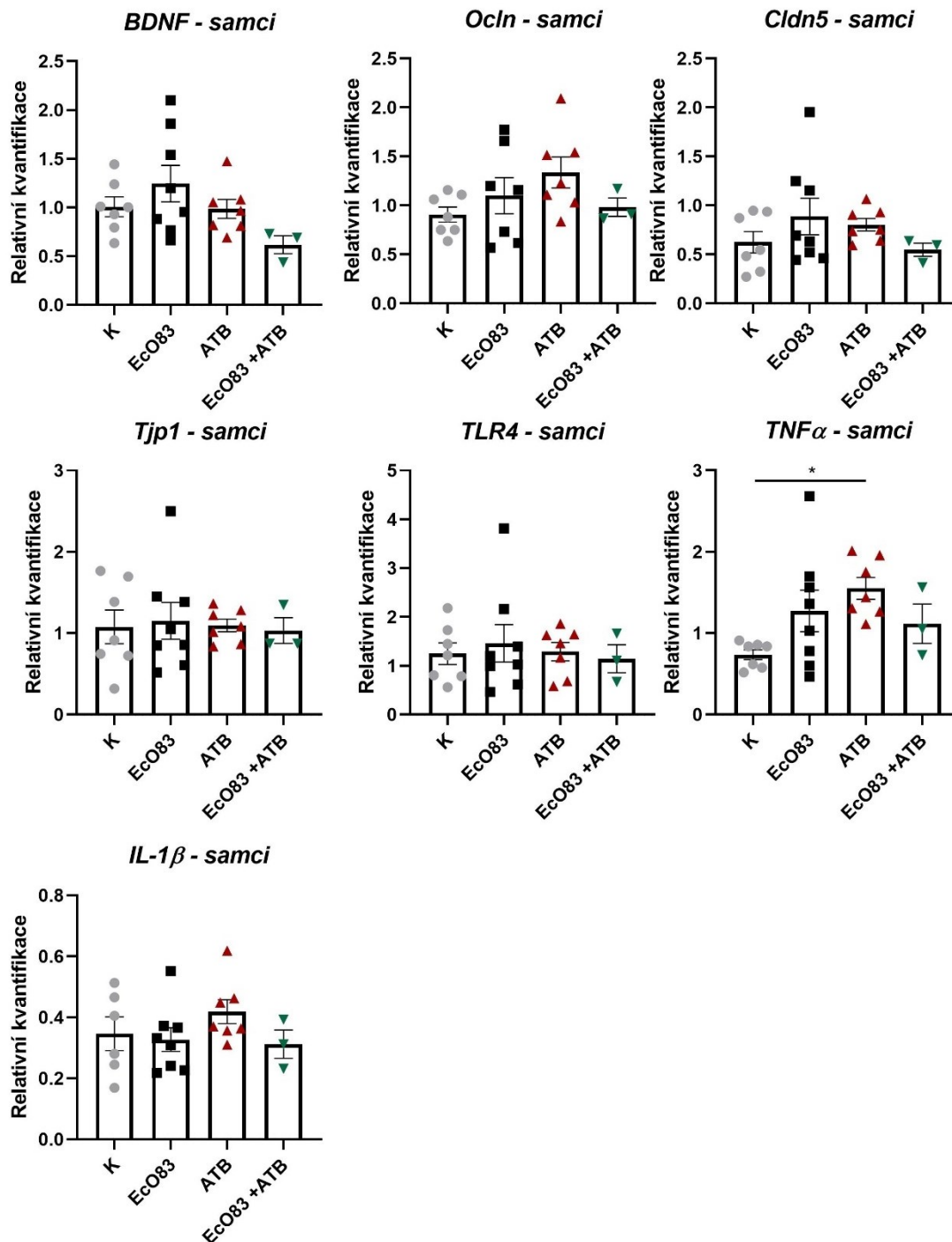
Genová exprese byla měřena ze čtyř odebraných orgánů (PFC, hypothalamus, hypofýza a nadledvinky) u samců i samic. Cílem této části bylo porovnat genovou expresi vybraných genů mezi kontrolami a experimentálními skupinami u jednotlivých pohlaví a posléze i mezi samci a samicemi. Vybraná tkáň byla homogenizována a exprese konkrétních genů byla kvantifikována pomocí qPCR.

5.2.1. Prefrontální kortex

Naším cílem bylo porovnat expresi vybraných genů mezi kontrolami a experimentálními skupinami. U dospělých myší byly analyzovány geny spojené s osou mikrobiota – střevo – mozek a aktivací imunitního systému na základě perinatálního navození dysbiózy a její následné reparace pomocí EcO83. V první části byly porovnány exprese genů mezi experimentálními skupinami v rámci jednotlivých pohlaví. V další části byly exprese genů porovnány mezi pohlavími za účelem zjistit, zda má pohlaví vliv na dysbiózu a její korekci pomocí EcO83.

5.2.1.1 Samci

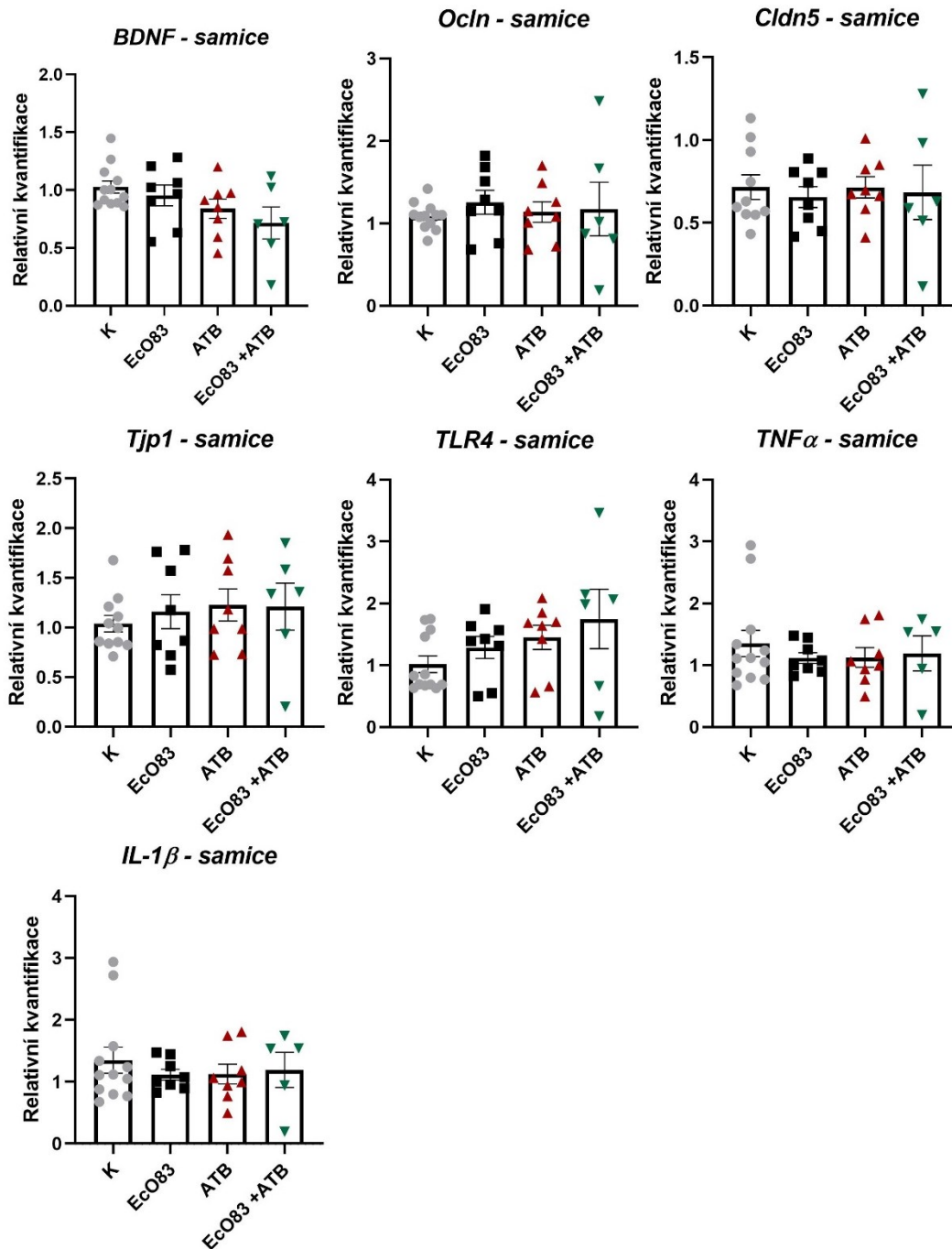
Na obrázku 10 jsou znázorněny genové exprese vybraných genů v PFC samců v různých experimentálních skupinách. Signifikantní rozdíl lze pozorovat u exprese $TNF\alpha$, a to mezi kontrolní skupinou a skupinou s antibioticky navozenou dysbiózou.



Obrázek 10. Genová exprese vybraných genů v prefrontálním kortexu samců. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance byla nalezena u exprese TNF α . K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05.

5.2.1.2 Samice

V grafech na obrázku 11 jsou zobrazeny změny v expresi genů v PFC v různých experimentálních skupinách u samic. Signifikance nebyla prokázána u žádného genu.



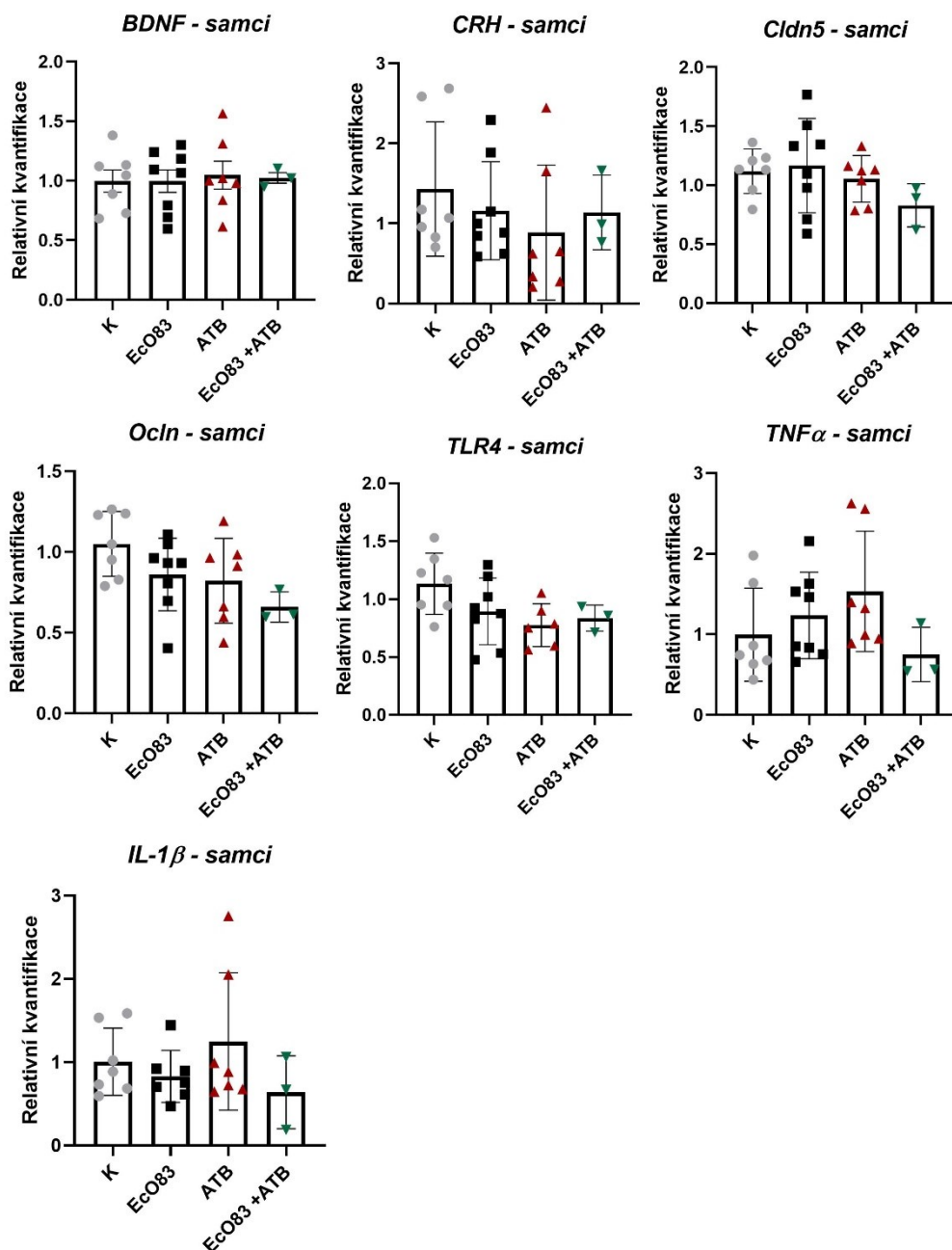
Obrázek 11. Genová exprese vybraných genů v prefrontálním kortexu samic. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.2.2. Hypothalamus

Dále jsme porovnávali expresi vybraných genů v hypothalamu mezi experimentálními skupinami (K, EcO83, ATB, EcO83+ATB). Geny k analýze byly zvoleny tak, abychom byli schopni vypořádat aktivaci HPA osy a určit, zda došlo po navození dysbiózy a její následné reparaci k zánětlivé reakci či ne.

5.2.2.1 Samci

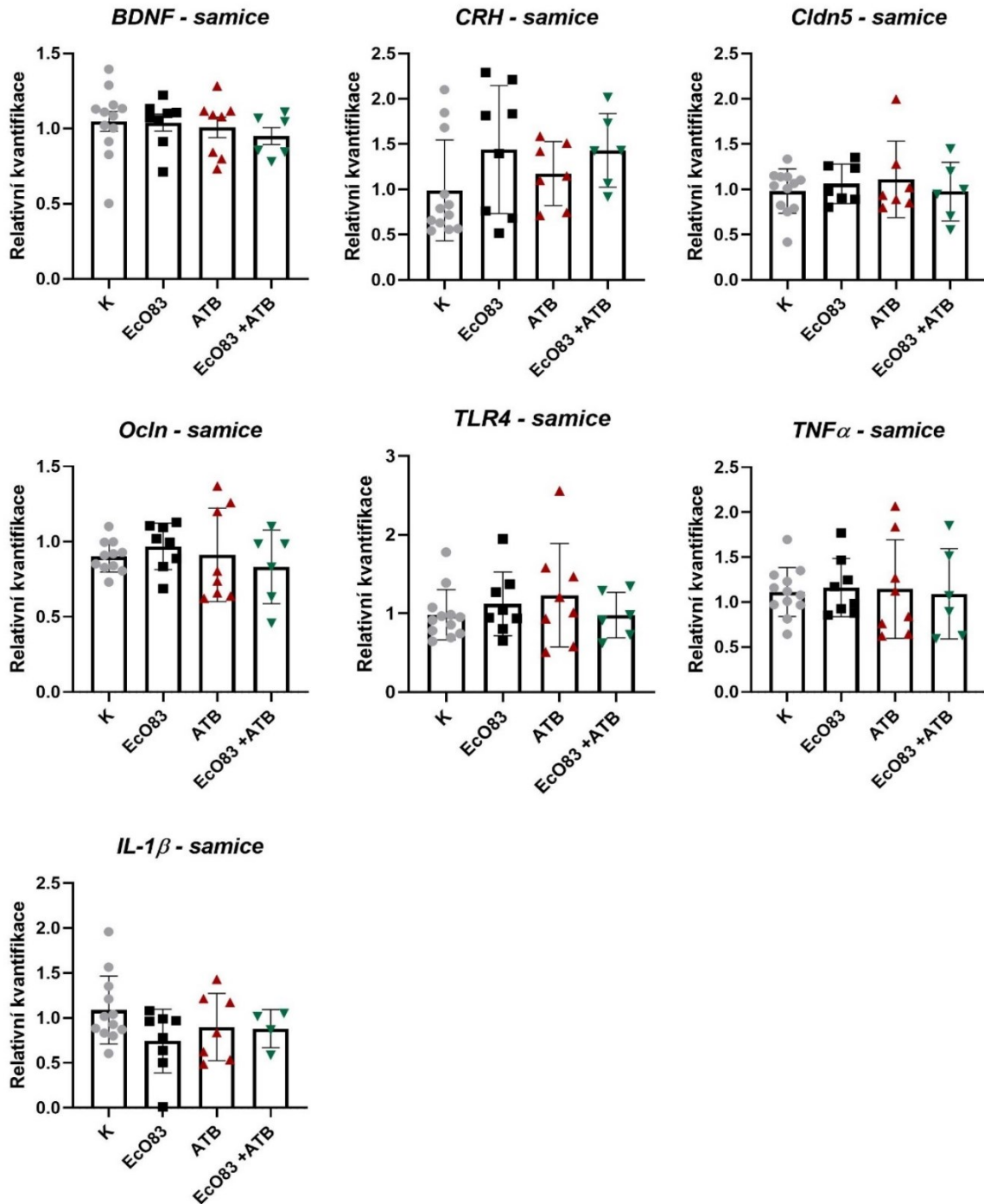
Grafy na obrázku 12 naznačují expresi vybraných genů v hypothalamu u různě experimentálně ovlivněných skupin. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly pozorovány.



Obrázek 12. Genová exprese vybraných genů v hypothalamu samců. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcoO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcoO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.2.2.2 Samice

Obrázek 13 ukazuje genovou expresi vybraných genů v hypothalamu samic v různých experimentálních skupinách. Žádná signifikance nebyla pozorována.



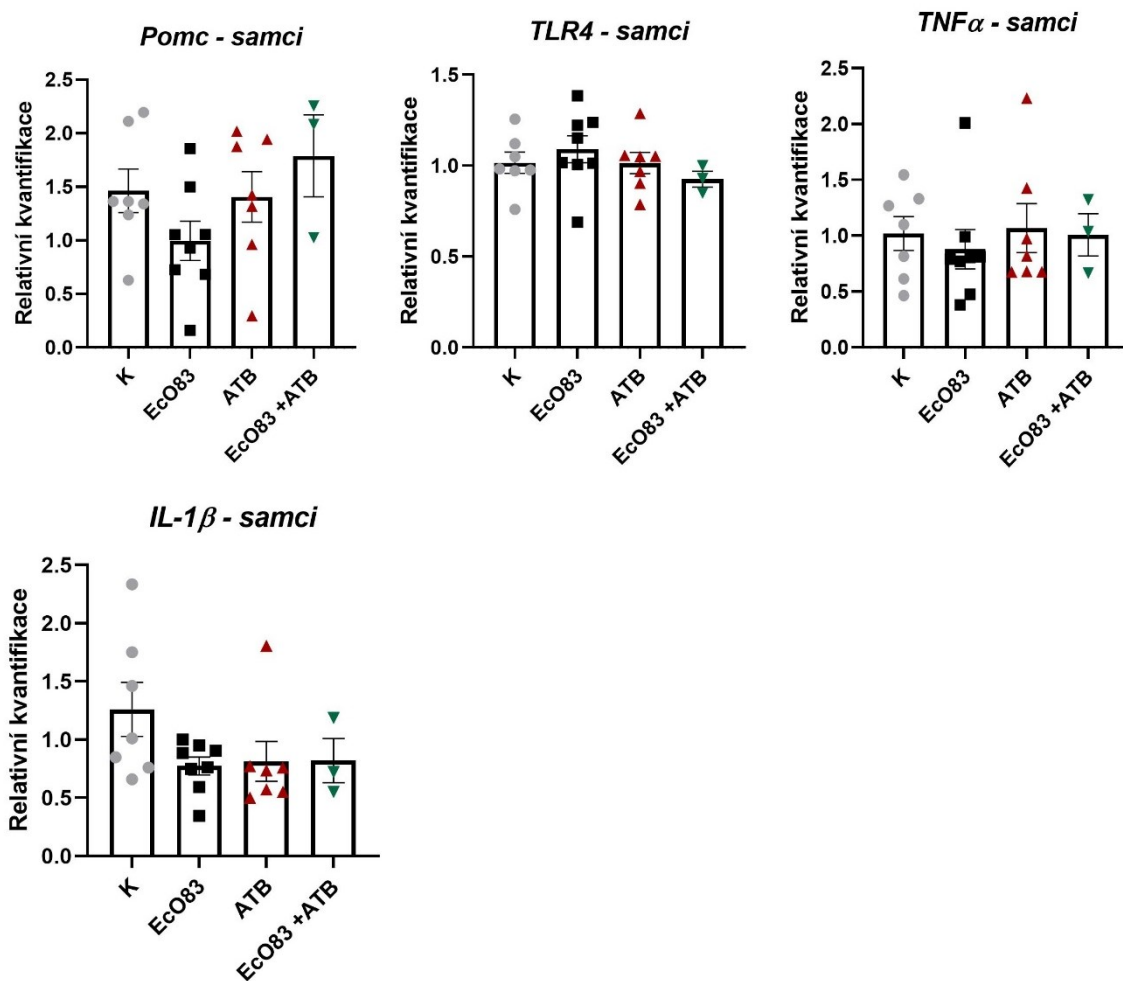
Obrázek 13. Genová exprese vybraných genů v hypothalamu samic. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.2.3. Hypofýza

Dalším cílem bylo studium exprese vybraných genů v dalším orgánu HPA osy, hypofýze. Geny k analýze byly zvoleny tak, abychom mohli určit aktivaci HPA osy a zánětlivé procesy spojené s navozením dysbiózy a následnou korekcí.

5.2.3.1 Samci

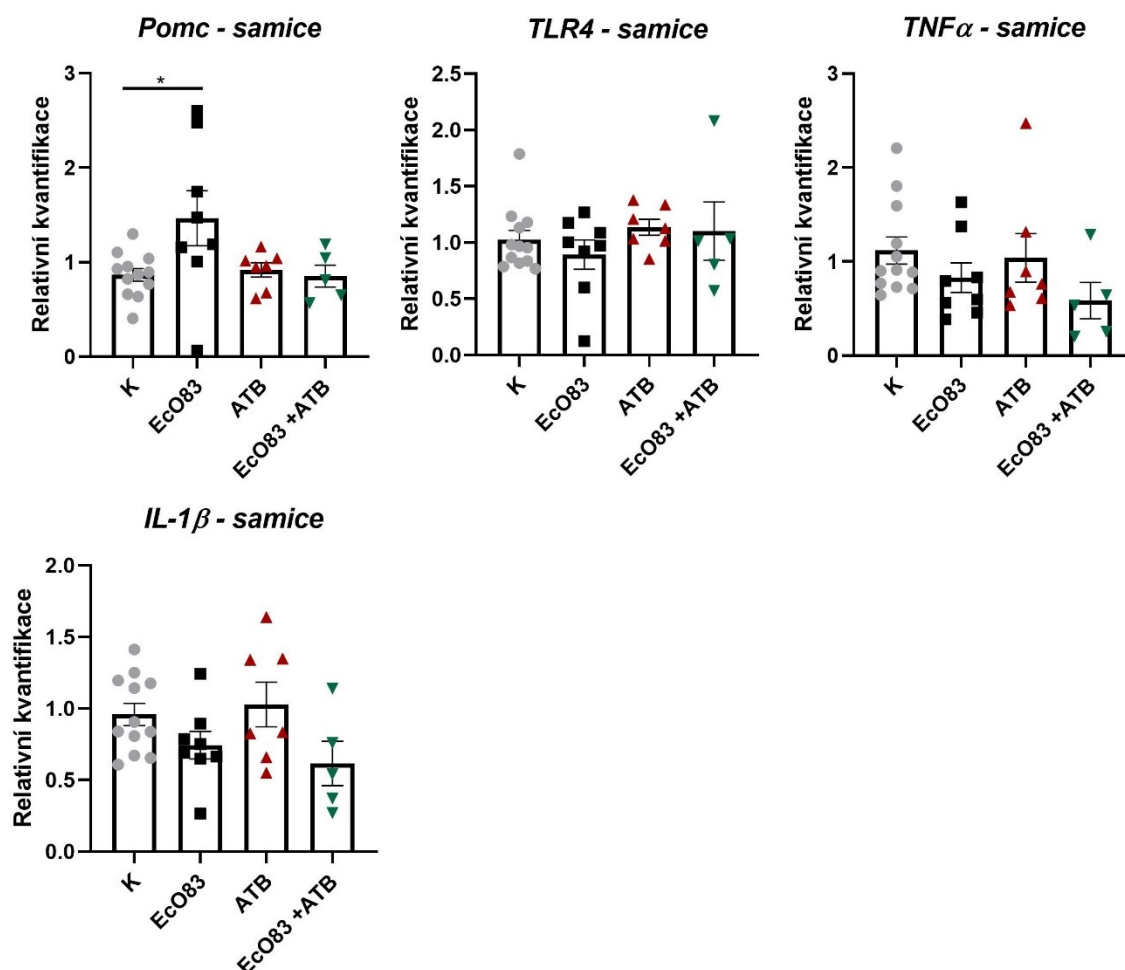
Obrázek 14 ukazuje expresi vybraných genů v hypofýze samců v různých experimentálních skupinách. U žádného genu nebyla nalezena signifikance.



Obrázek 14. Genová exprese vybraných genů v hypofýze samců. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcoO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcoO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.2.3.2 Samice

Na obrázku 15 je zobrazena exprese vybraných genů u samic v hypofýze. Na obrázku je vidět porovnání mezi experimentálními skupinami. Signifikance byla pozorována mezi kontrolní skupinou a skupinou s probiotiky v expresi *Pomc*, který je prekurzorem ACTH.



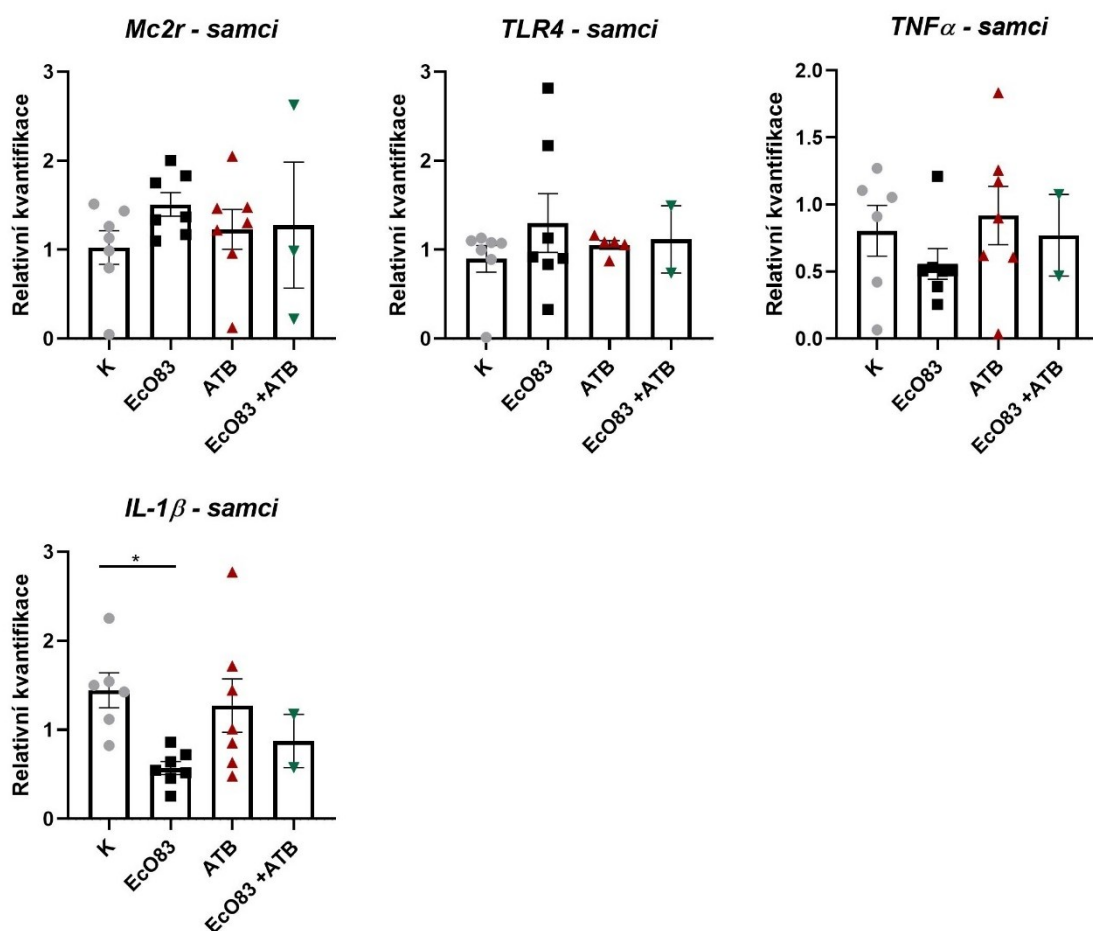
Obrázek 15. Genová exprese vybraných genů v hypofýze samic. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance byla nalezena u *Pomc* mezi kontrolní skupinou a skupinou EcO83. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05.

5.2.4. Nadledvinky

Posledním záměrem bylo sledovat expresi vybraných genů v nadledvinkách jakožto koncovém efektorovém orgánu HPA osy. Expresie vybraných genů měla ukazovat zapojení nadledvinek do dysbiózy a osy mikrobiota – střevo – mozek.

5.2.4.1 Samci

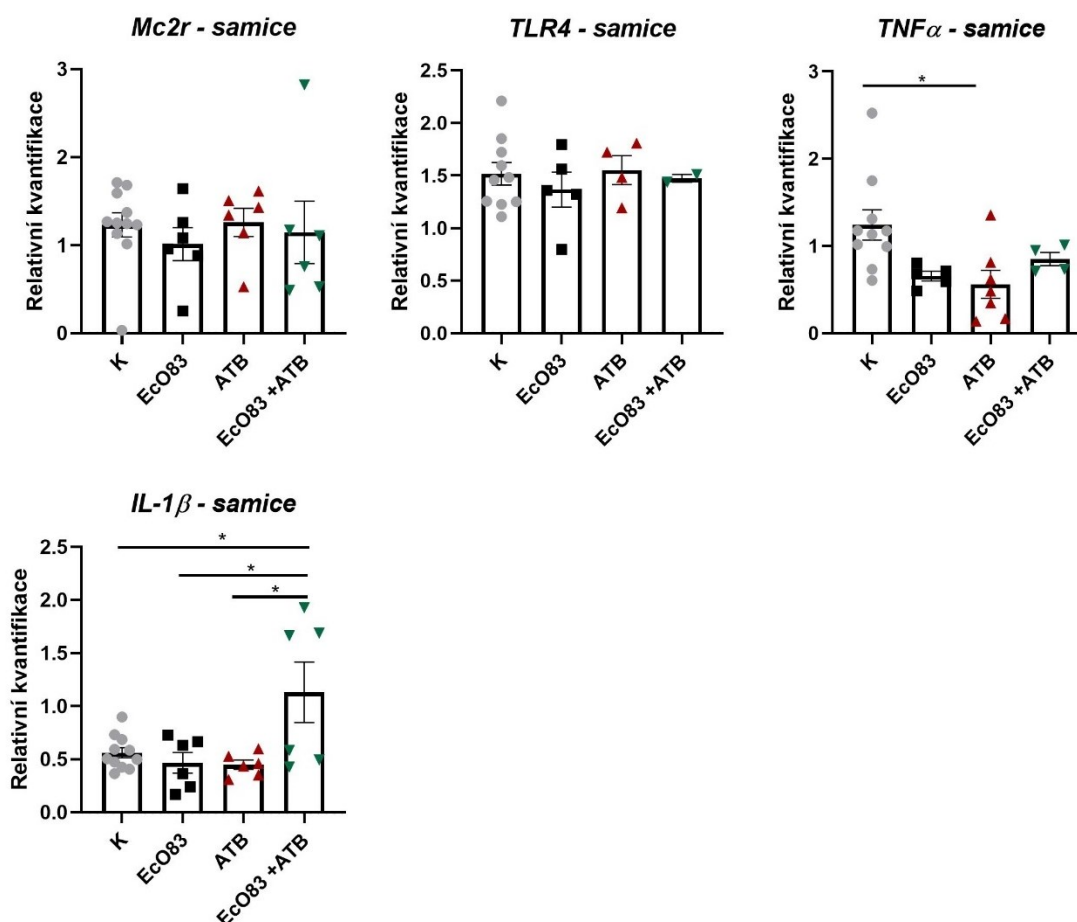
Obrázek 16 ukazuje rozdíl genových expresí vybraných genů mezi jednotlivými skupinami. Signifikantní efekt podávání Eco083 vůči kontrolní skupině byl pozorován v expresi IL-1 β .



Obrázek 16. Genová exprese vybraných genů v nadledvinkách samců. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance byla pozorována u IL-1 β . K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05.

5.2.4.2 Samice

Na obrázku 17 jsou vidět změny v expresi genů mezi skupinami u samic v nadledvinkách. Signifikantní efekt byl u TNF α mezi kontrolní skupinou a skupinou s dysbiózou. Další signifikance byla pozorována u IL-1 β mezi skupinou EcO83+ATB a všemi ostatními skupinami.



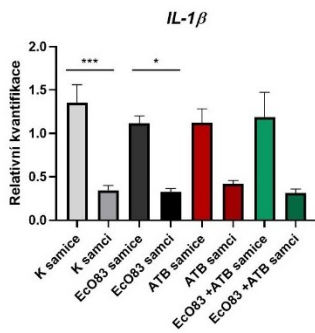
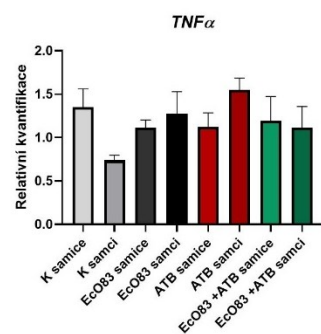
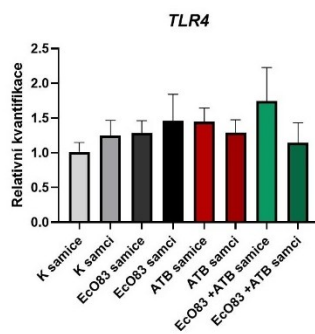
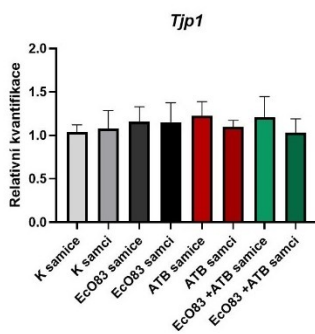
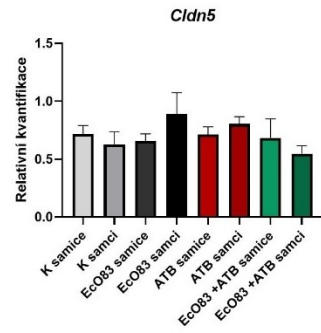
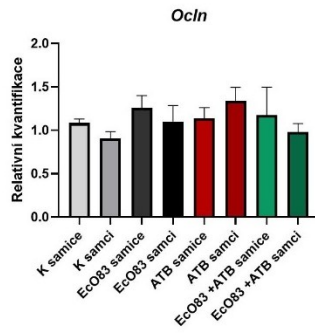
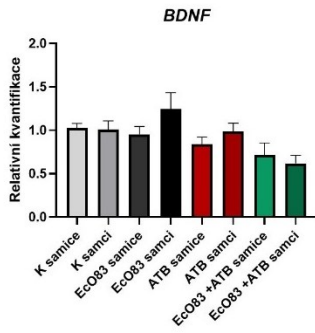
Obrázek 17. Genová exprese vybraných genů v nadledvinkách samic. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami. V grafech jsou znázorněny jednotlivé myši pomocí bodových znaků. Signifikance byla zjištěna u $TNF\alpha$ a $IL-1\beta$. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05.

5.3. Porovnání genové exprese – samci a samice

Vzhledem k výrazným mezipohlavním rozdílům v hormonální regulaci mezi samci a samicemi byla v odebraných orgánech porovnána genová exprese jednotlivých genů mezi pohlavími. Cílem této části studie bylo zjistit, jaký vliv má pohlaví testovaných zvířat na aktivitu osy mikrobiota – střevo – mozek v našem experimentálním modelu.

5.3.1. Prefrontální kortex

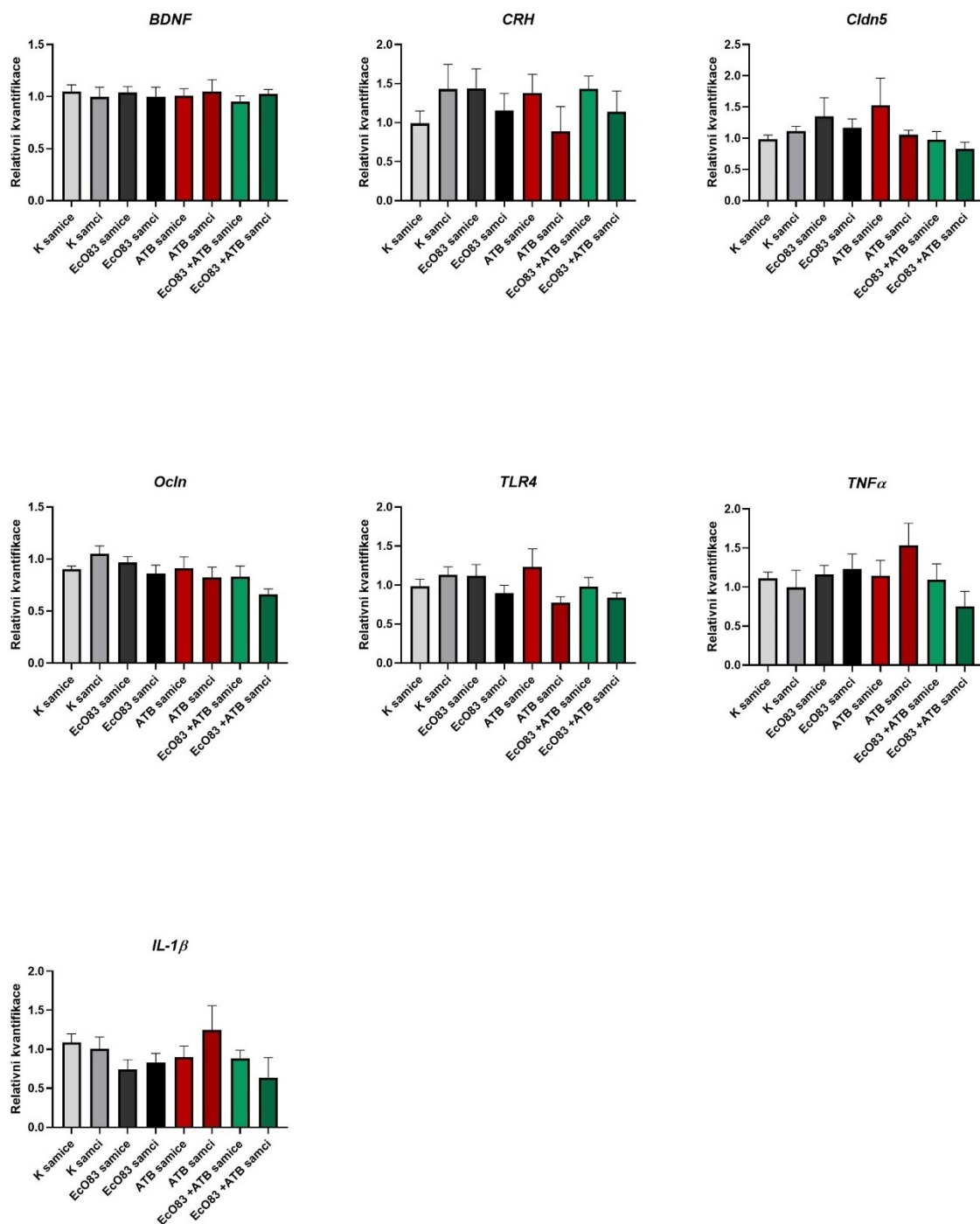
Obrázek 18 obsahuje grafy s porovnáním genové exprese samců a samic v jednotlivých experimentálních skupinách. Signifikantní efekt pohlaví byl pozorován v expresi $IL-1\beta$ u kontrolní skupiny a skupiny s EcO83, u nichž je detekovatelná vyšší míra exprese $IL-1\beta$ u samic.



Obrázek 18. Porovnání genové exprese vybraných genů v prefrontálním kortexu. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami a pohlavím (samice světle, samci tmavě). Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Signifikantní rozdíl mezi pohlavími byl nalezen u exprese u IL-1 β . K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05. Hodnoty s *** jsou s úrovní statistické významnosti 0,001.

5.3.2. Hypothalamus

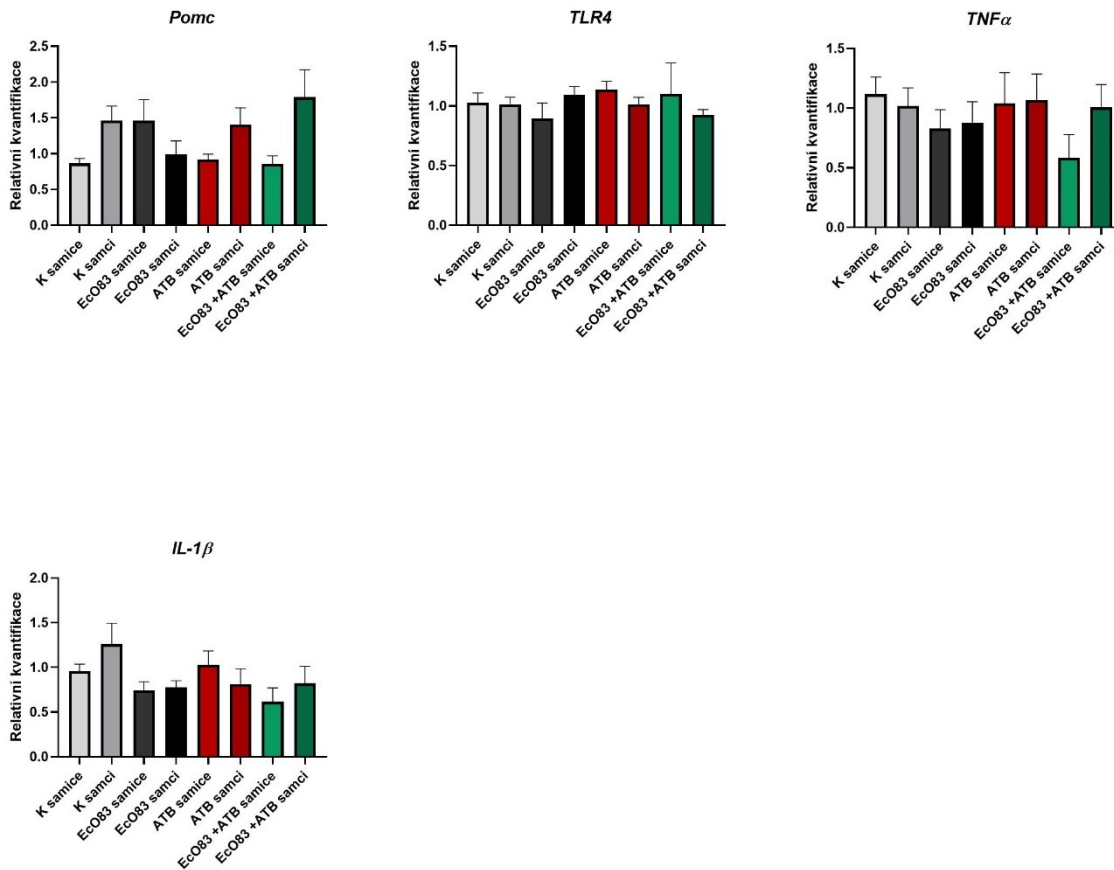
Obrázek 19 ukazuje rozdíl v expresi genů v hypothalamu samců a samic. Porovnání samců a samic neukázalo žádné signifikantní rozdíly.



Obrázek 19. Porovnání genové exprese vybraných genů v hypothalamu. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami a pohlavími (světle samice, tmavě samci). Grafy ukazují průměr hodnot ± střední chyba průměru SEM. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, Eco83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, Eco83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.3.3. Hypofýza

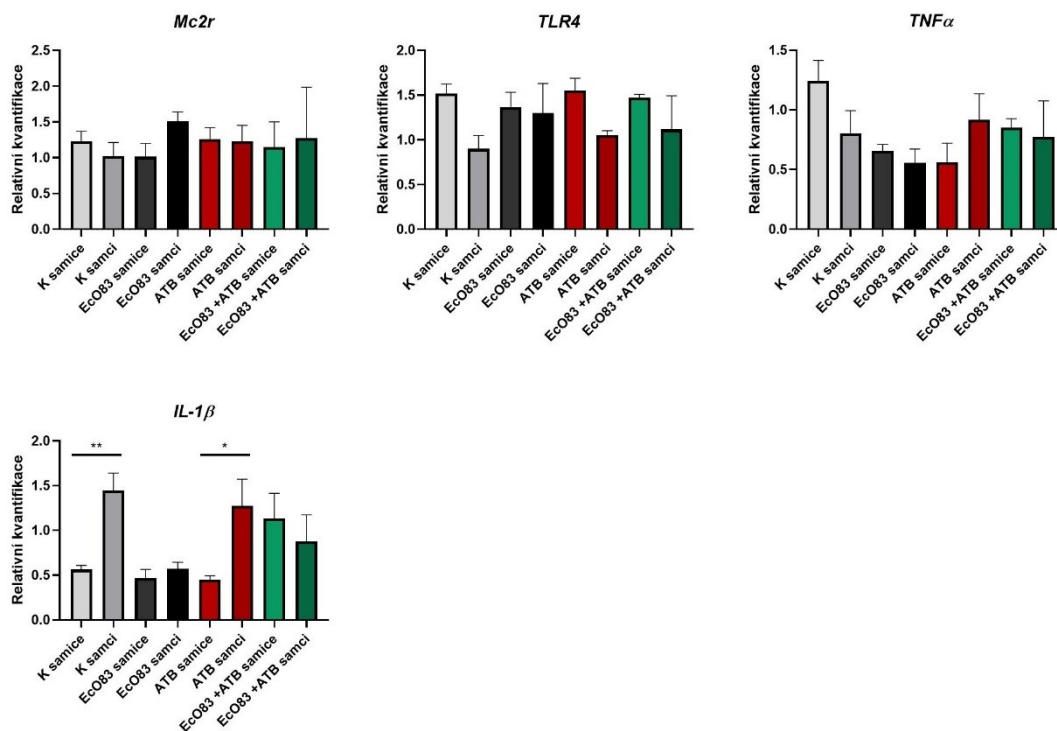
Obrázek 20 ukazuje, že porovnání exprese genů z hypofýzy samců a samic nevykazovalo žádné signifikantní efekty ani náznaky trendu.



Obrázek 20. **Porovnání genové exprese vybraných genů v hypofýze.** Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami a pohlavími (světle samice, tmavě samci). Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Signifikance nebyla nalezena. K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3.

5.3.4. Nadledvinky

Na obrázku 21 jsou znázorněny grafy s porovnáním genové exprese mezi samci a samicemi v nadledvinkách. Byla zjištěna signifikantně vyšší míra exprese IL-1 β u samců, a to u kontrolní skupiny a skupiny s nekorigovanou experimentální dysbiózou.



Obrázek 21. Porovnání genové exprese vybraných genů v nadledvinkách. Grafy znázorňují porovnání genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami a pohlavími (světle samice, tmavě samci). Grafy ukazují průměr hodnot \pm střední chyba průměru SEM. Signifikantní efekt pohlaví byl zjištěn u IL-1 β . K – kontrola, EcO83 – pouze probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31, ATB – pouze antibiotika, EcO83+ATB – antibiotika a probiotická bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H3. Hodnoty označené * jsou s úrovní statistické významnosti 0,05. Hodnoty s ** jsou s úrovní statistické významnosti 0,01.

6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo za pomoci antibiotik navodit experimentální dysbiózu u myší kmene BALB/c a sledovat její vliv na vybrané aspekty chování za pomoci behaviorálních testů. Dalším cílem byla následná reparace dysbiózy za použití probiotické bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31 a zjistit, zda probiotický efekt zabrání negativním dopadům dysbiózy na neuroendokrinní a imunitní systém. Vše výše popsáno bylo zkoumáno na modelu perinatální antibiotické léčby s včasnou nápravou probiotickou bakterií v juvenilním stádiu života.

6.1. Vliv experimentálně navozené dysbiózy a následné korekce probiotickou bakterií *Escherichia coli* O83:K24:H31 na vybrané aspekty chování

K navození dysbiózy byly použity antibiotické přípravky Ampicilin a Neomycin. Oba tyto přípravky se hojně užívají ve studiích s experimentální dysbiózou, většinou v kombinaci s dalšími druhy antibiotických přípravků. Například (Bistoletti et al., 2019) podával k navození dysbiózy mix antibiotik z ampicilinu, vankomycinu, neomycinu a metronidazolu. V jiné studii byl použit antibiotický mix o pěti přípravcích (ampicilin, vankomycin, ciprofloxacin, imipenem a metronidazol) (Hoban et al., 2016). V naší studii jsme zvolili model perinatálně navozené dysbiózy, především vzhledem k citlivosti GIT a imunitního systému k ovlivnění v raném dětství, kdy se formuje střevní mikrobiota a její složení je tak více náchylné k dlouhodobému zafixování negativních (př. antibiotika) (Arbolea et al., 2015) i pozitivních vlivů (př. probiotické bakterie) (Rodríguez-Nogales et al., 2018).

Na základě publikovaných studií (Arslanova et al., 2021; S. Liu et al., 2020a) Klikněte nebo klepněte sem a zadejte text.jsme předpokládali, že skupiny myší s navozenou dysbiózou budou vykazovat vyšší míru úzkostného chování. Naše výsledky nicméně ukazují, že zvířata, která dostávala pouze antibiotika a byla jim tímto způsobem navozena dysbióza, nebyla nijak poznamenána a nebyl pozorován rozdíl v chování oproti kontrolní skupině. Při porovnání samců a samic s dysbiózou byl pozorovatelný drobný, byť nesignifikantní trend – samci trávili delší čas ve vnitřní zóně než samice. Stejný trend byl pozorován i u počtu vstupů do vnitřní zóny. Samci byli tedy v našem experimentálním schématu méně úzkostní. Výsledky TST pak neukazují žádný trend ani signifikantní rozdíly mezi zvířaty, která dostávala antibiotika a zvířaty z kontrolní skupiny. Zajímavý je opět výrazně signifikantní efekt pohlaví.

V grafech porovnávajících pohlaví je vidět, že samice byly výrazně delší čas nehybné. To by ukazovalo na větší míru zoufalství a depresivního chování. Výsledky jednotlivých behaviorálních testů jsou tedy v podstatě v souladu – mezi dysbiotickými zvířaty a zvířaty z kontrolní skupiny nebyly pozorovány rozdíly v úzkostném a depresivním chování; detailnějšímu rozboru vlivu pohlaví na behaviorální testy i genovou expresi se budeme věnovat níže. To by mohlo být způsobeno nevhodným výběrem antibiotických přípravků, kdy navozená dysbióza nemusela být dostatečně silná, aby došlo k významnému ovlivnění chování zvířat (C. Huang et al., 2022).

Pro korekci dysbiózy byla použita EcO83, která byla podávána intragastrickou gaváží. Abychom zjistili, zda má tato bakterie nějaký vliv na normální, nedysbiotickou mikrobiotu, byla bakterie podána zvířatům, která nedostávala antibiotika. Dále byla tato bakterie podávána zvířatům s experimentálně navozenou dysbiózou za účelem nápravy dysbiózy. Na výsledcích z OF testu i TST je vidět, že samotné podání EcO83 nemá ani pozitivní ani negativní vliv na vybrané aspekty chování. To samo o sobě není příliš překvapivé – podávání EcO83 probíhalo až ve 4. týdnu, tj. relativně pozdě. Gastrointestinální trakt laboratorních zvířat, chovaných v specific pathogen free (SPF) podmínkách, v té době již je plně kolonizovaný. Krátkodobě podávaný jednosložkový probiotický přípravek v tomto terénu nemá ideální podmínky pro zprostředkování výrazného efektu, mj. kvůli jevu tzv. kolonizační rezistence (Caballero et al., 2017). U výsledků můžeme pozorovat obdobný trend vlivu pohlaví, jako u antibiotik – tzn. vyšší úzkostnost v OF a vyšší depresivitu v TST u samic než u samců.

Zajímavé výsledky jsme pozorovali u skupiny zvířat, která dostávala antibiotika a poté i probiotickou bakterii EcO83. V testu otevřeného pole byla tato zvířata nejvíce aktivní, měla největší počet vstupů do vnitřní zóny a také ve vnitřní zóně strávila nejdelší čas, lze tedy říci, že byla nejméně úzkostná. Výsledky tail suspension testu překvapivě ukazovaly opačný efekt. Zvířata, která dostala antibiotika i probiotickou bakterii EcO83, byla v posledních čtyřech minutách testu delší čas nehybná než zvířata ze zbylých skupin. Samice opět vykazovaly větší míru úzkostného a depresivního chování. Nezanedbatelné je pozorování signifikantně delšího času imobility u skupiny ATB + EcO83 oproti skupině EcO83 u samic. Ten by šel vysvětlit větší citlivostí zvířat s dysbiózou k následnému „druhému zásahu“ po podání probiotické bakterie, případně omezením efektu kolonizační rezistence, jak byl zmíněn výše.

6.2. Vliv experimentálně navozené dysbiózy a následné korekce probiotickou bakterií *Escherichia coli* O83:K24:H31 na expresi vybraných genů

Pro posouzení vlivu dysbiózy a EcO83 na aktivaci HPA osy, byla měřena genová exprese u následujících genů. CRH, klíčový hormon regulující HPA osu, byl měřen v hypothalamu. Pomc byl měřen v hypofýze, kde je prekurzorem několika důležitých hormonů, včetně ACTH. A konečně v nadledvinkách byla měřena exprese genu Mc2r kódujícího hlavní receptor pro ACTH, který hraje roli v syntéze steroidních hormonů.

Signifikantní rozdíl byl prokázán pouze u samic v expresi Pomc mezi kontrolní skupinou a EcO83. EcO83 měla k našemu překvapení výrazně vyšší expresi Pomc v hypofýze. To by naznačovalo aktivaci HPA osy po podání probiotické bakterie EcO83. Tomu nasvědčuje i naznačený trend zvýšené exprese CRH v hypothalamu u stejné skupiny. Tento jev by mohl být způsoben přítomností potenciálně silně bioaktivního LPS u *E. coli*, které ve většině případů aktivuje jeden z hlavních pattern recognition receptorů TLR4 a spouští tak zánětlivou kaskádu (Steimle et al., 2016). Vzhledem k různému složení LPS u různých bakterií není aktivace TLR4 receptoru nicméně vždy stejně intenzivní. Strukturní modifikace LPS významně omezují imunogenicitu komenzálních mikroorganismů (Ciesielska et al., 2021), LPS obsažené v racionálně podávaných gramnegativních probiotických bakteriích navíc pravděpodobně nepředstavuje pro imunokompetentní organismus žádné bezpečnostní riziko (Wassenaar & Zimmermann, 2018). Bezpečnost námi použité probiotické EcO83 je navíc dobře prokázána a dostatečná pro registraci probiotického přípravku Colinfant jako léčiva, EcO83 by tedy neměla mít v tomto ohledu příliš silný prozánětlivý vliv. V každém případě je nicméně důležité brát při použití probiotických bakterií vždy zřetel na to, že se jedná o živé mikroorganismy, které mohou nepředvídaným způsobem ovlivňovat imunitní systém i další funkce hostitelského organismu.

U žádné další skupiny nebyl znatelný výrazný rozdíl v expresi zmíněných genů oproti kontrolní skupině. Lze tedy uvažovat o tom, že HPA osa nebyla u skupin s dysbiózou výrazně aktivována. Tento výsledek je překvapivý, protože předchozí studie ukazují na zvýšenou aktivitu HPA osy při dysbiotickém stavu mikrobioty (S. Liu et al., 2020a). Je ovšem nutné zmínit, že ve studiích je řada metodických rozdílů. V první řadě (S. Liu et al., 2020a) pracoval s laboratorními potkany, zatímco naše studie probíhala na myších. Kromě toho v případě zmíněné studie nebyla dysbióza navozována antibioticky, ale pomocí transplantace

dysbiotické mikrobioty od depresivních pacientů. Dalším významným rozdílem je věk myši, kdy byla dysbióza indukována – nikoli perinatálně ale v dospělosti. I vzhledem k delší době mezi indukcí dysbiózy a měřením aktivity HPA osy lze v naší studii očekávat, že přechodný efekt již nebude zaznamenán. Posledním rozdílem pak jsou vlastní měřené parametry – zatímco naše studie se zabývala genovou expresí, (S. Liu et al., 2020a) přímo stanovili hladiny CRH, ACTH a kortizolu z krve. To, že se nám nepodařilo dysbiózou aktivovat HPA osu, mohlo být dále způsobeno nedostatečným navozením dysbiózy, jak bylo zmíněno již výše.

Na základě studií, které uvádí zvýšenou propustnost HEB při dysbiotickém stavu střev jako významnou složku s ní spojené neuropatologie, jsme ve vybraných orgánech dále měřili expresi genů spojených s integritou HEB. Zajímala nás exprese Ocln, Cldn5 a Tjp1 v PFC a Ocln a Cldn5 v hypothalamu. Naznačený trend vyšší genové exprese oproti kontrolní skupině byl pozorován u Ocln u samců v PFC, kterým byla podávána antibiotika. Zvýšení exprese Ocln může být kompenzačním efektem v reakci na narušení HEB. Přítomnost zánětu a zvýšená exprese tight junction genů mohou být důsledkem narušení propustnosti střevní bariéry, což sekundárně může ovlivnit i integritu HEB a vést k její zvýšené propustnosti pro různé molekuly a signály, které mohou ovlivnit funkci mozku a behaviorální reakce (Braniste et al., 2014). U zbylých genů v PFC samců, v PFC samic ani v hypothalamu nebyl pozorován žádný větší rozdíl mezi skupinami. Tento trend byl v souladu se studií (Fröhlich et al., 2016b), kde myši s antibiotiky také nevykazovaly zvýšenou genovou expresi Ocln, Cldn5 a Tjp1 v prefrontálním kortexu a hypothalamu.

V současné době se zdá, že zánět bývá nedílnou součástí dysbiózy a s ní spojených onemocnění. Některé studie dokonce naznačují, že dysbióza může spouštět kaskádu prozánětlivých drah a být tak příčinou systémového zánětu (Mayerhofer et al., 2017) Proto jsme se zaměřili také na zánětlivé markery. K zjištění systémového zánětu a aktivace imunitního systému jsme si vybrali geny pro TLR4 (hlavní receptor pro LPS) a základní prozánětlivé cytokiny TNF α a IL-1 β . Expresi těchto tří genů jsme pozorovali ve všech odebraných orgánech, tzn. PFC, hypothalamu, hypofýze a nadledvinkách.

Signifikantní rozdíl v genové expresi byl pozorován u samců v expresi TNF α v PFC, konkrétně mezi skupinou s antibiotiky a kontrolní skupinou. Expresi TNF α měli tito samci zvýšenou i v hypothalamu. To může indikovat aktivaci imunitního systému, odrážející imunitní reakce v mozku spojené s dysbiózou. Tento jev podporuje i zvýšená exprese IL-1 β

u samců v PFC a hypothalamu u téže skupiny a je v souladu i s naznačeným trendem zvýšené exprese Ocln v PFC u téže skupiny. Dalším zajímavým jevem u samců v PFC je lehce zvýšená exprese TNF α u EcO83 oproti kontrolní skupině, která by opět mohla být následkem působení LPS EcO83, jak bylo diskutováno výše. U samic byl v PFC pozorován pouze lehký náznak vyšší exprese TLR4 u skupiny s antibiotiky, jinak nebyly nalezeny žádné významné rozdíly. U zbylých orgánů jsme neviděli žádný rozdíl v expresi těchto tří genů.

Vzhledem k zaměření práce nás nejvíce zajímal zánět v nervových tkáních, za účelem hodnocení míry jejich poškození jsme proto zjišťovali míru exprese BDNF v PFC a hypothalamu. BDNF je na jedné straně produkován jako součást obranné reakce na poškození nebo zánět, a tím podporuje regeneraci a opravu nervových buněk. Na druhé straně, chronický zánět může ovlivnit produkci BDNF a jeho účinek na plastické procesy, což může mít negativní dopad na zdraví mozku (Carniel & da Rocha, 2021). Studie poukazují na souvislost mezi nízkými hladinami BDNF a některými neurologickými a duševními poruchami, jako jsou deprese a úzkostné poruchy (Wang et al., 2015). V expresi BDNF nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami, ale byl pozorován mírný trend snížené exprese u skupiny EcO83+ATB v PFC u samců i samic. V hypothalamu nebyl vidět náznak trendu ani signifikantní rozdíly.

6.3. Mezipohlavní rozdíly ve zkoumaných parametrech a shrnutí diskuse

Protože je známo, že existují značné pohlavně podmíněné rozdíly mezi imunitními, neuroendokrinními i behaviorálními vlastnostmi, byl experiment proveden na samcích i samicích. Nedílnou součástí analýzy bylo tudíž i posouzení vlivu pohlaví. U behaviorálních testů jsme se dívali na to, zda jsou samci a samice ve stejných skupinách v jednotlivých parametrech stejně úzkostní či depresivní. U výsledků testu otevřeného pole byl pozorován trend zvýšené úzkostlivosti samic u všech skupin. S jednou výjimkou antibiotické skupiny, kde byli samci méně aktivní než samice. U TST byl nalezen signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi u kontrolní skupiny a skupin ATB a EcO83+ATB. I v tomto případě byli samci více odolní než samice. Tento efekt pohlaví mohl být způsoben lišící se endokrinní regulací, případně také známým faktem, že samice snáze a silněji reagují na stimulaci imunitního systému rozvojem zánětu, který se mohl promítnout do dlouhodobého ovlivnění behaviorálních parametrů. Zajímavé je, že i samice z kontrolní skupiny vykazovaly vyšší úzkostlivost než samci z kontrolní skupiny. To nás nutí zvážit i možnost, že mezipohlavní

rozdíly mohly být zvýrazněny mechanismem podávání probiotické bakterie intragastrickou gaváží. K té docházelo u relativně mladých myší krátce po odstavu, nemůžeme tedy vyloučit, že vzhledem k velikosti takto mladých myší mohlo dojít k jisté míře traumatizace i při použití nejmenších sond pro žaludeční gaváž. Vzhledem k pohlavnímu dimorfismu jsou samice o něco menší než samci a mohly být traumatizovány tímto stresujícím mechanismem handlingu více než samci. Pro další experimenty by tedy bylo vhodné zavést ještě jednu kontrolní skupinu, která by byla ušetřena tohoto stresujícího handlingu, aby bylo možné jeho vliv vyloučit.

U genové exprese výsledky porovnání neodhalily mnoho rozdílů mezi pohlavími. Signifikantní rozdíl byl nalezen u IL-1 β v PFC u kontrolní skupiny a skupiny EcO83, kde měly samice vyšší expresi zánětlivého IL-1 β ; u ostatních skupin byl naznačen stejný trend, ačkoli bez signifikance. Naopak v nadledvinkách byl pozorován opačný jev, tzn. vyšší exprese IL-1 β u samců u kontrolní skupiny a skupiny ATB. Jiné jevy či trendy nebyly ve výsledcích nalezeny. Celkově výsledky neukázaly žádný významný efekt dysbiózy na chování ani na změnu genové exprese. Dále jsme nevyozorovali žádný pozitivní, ale ani negativní efekt probiotické bakterie EcO83, což není překvapivé, protože podávání jednosložkových probiotik zvířatům v SPF podmínkách nemívá dlouhodobý efekt. Jediný znatelný rozdíl oproti kontrolní skupině byl vidět v chování u skupiny, která dostávala antibiotika a probiotickou EcO83. Z porovnání výsledků bylo zjištěno, že pohlaví nehraje příliš velkou roli v reakci na terapeutické intervence. Pohlaví samo nicméně poměrně značně ovlivnilo výsledky behaviorálních testů i markerů zánětu v PFC, pravděpodobně v důsledku komplexních mezipohlavních rozdílů v neuroendokrinních, imunologických i behaviorálních vlastnostech.

Rozdíly mezi naší studií a publikovanými výsledky jiných skupin lze také vysvětlit rozdíly mezi experimentálními zvířaty a jejich mikrobiomem. Některé studie byly prováděny na jiných kmenech laboratorních myší, např. C57BL/6, či dokonce jiných druzích laboratorních zvířat, nejčastěji potkanech. Složení mikrobioty a tím i reakce experimentálního systému na antibiotickou či probiotickou intervenci jsou významně závislé nejen na kmenech myší (v našem případě BALB/c), ale i na dodavateli experimentálních zvířat a prostředí zvěřince (Ericsson et al., 2015). Studie navíc ukazují, že i u geneticky identických zvířat stejného původu chovaných v rozdílných částech jediného zvěřince probíhá v průběhu času rozrůžňování střevní mikrobioty (Rogers et al., 2014).

7. Závěr

Tato práce se zabývala působením dysbiózy na osu mikrobiota – střevo – mozek a jejím vlivu na vybrané aspekty chování. Dále jsou zde zmíněna probiotika a jejich pozitivní vliv na organismus a korekci dysbiózy.

Z předložených výsledků vyplývá, že námi perinatálně navozená experimentální dysbióza nevykazovala výrazný vliv na neuroendokrinní regulaci vybraných aspektů chování, ačkoli některé změny v chování byly zaznamenány. Zajímavým zjištěním bylo, že samotné podávání probiotické bakterie *Escherichia coli* O83:K24:H31 neprokázalo signifikantní účinek na chování ani na expresi genů. Nicméně reparace dysbiózy pomocí této specifické probiotické bakterie ukázala pozitivní efekty, zejména snížení úzkostného chování. Tento výsledek naznačuje potenciál *E. coli* O83:K24:H31 v léčbě negativních následků dysbiózy na neuroendokrinní a imunitní systém, a tím i na chování resp. poruchy nálady.

Pokud přihlédneme k vlivu pohlaví, bylo zjištěno, na terapeutické intervence. Samci projevovali nižší míru úzkostného chování ve všech experimentálních skupinách.

Celkově se tedy dá říci, že práce přispívá k lepšímu pochopení vztahu mezi střevní dysbiózou, osou mikrobiota – střevo – mozek a neuropsychiatrickými poruchami. Výsledky naznačují, že *E. coli* O83:K24:H31 může mít potenciál jako probiotická bakterie pro zmírnění negativních dopadů dysbiózy na neurologické a behaviorální funkce. Pro úplné porozumění mechanismům, které se v rámci při dysbióze odehrávají, je nicméně nutný další výzkum.

8. Literatura

- Abildgaard, A., Elfving, B., Hokland, M., Wegener, G., & Lund, S. (2017). Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology*, *79*, 40–48.
- Aidy, S. El, Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR), 3–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00146>
- Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Rodríguez-Sojo, M. J., Rodríguez-Cabezas, M. E., Olivares, M., García, F., Gálvez, J., Morón, R., & Rodríguez-Nogales, A. (2021). Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs. *European Journal of Nutrition*, *60*(5), 2537–2551. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02441-8>
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, *36*(2), 165–179. <https://doi.org/10.1002/glia.1106>
- Arbolea, S., Sánchez, B., Milani, C., Duranti, S., Solís, G., Fernández, N., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Ventura, M., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2015). Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *Journal of Pediatrics*, *166*(3), 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.041>
- Arslanova, A., Tarasova, A., Alexandrova, A., Novoselova, V., Shaidullov, I., Khusnutdinova, D., Grigoryeva, T., Yarullina, D., Yakovleva, O., & Sitdikova, G. (2021). Protective effects of probiotics on cognitive and motor functions, anxiety level, visceral sensitivity, oxidative stress and microbiota in mice with antibiotic-induced dysbiosis. *Life*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/life11080764>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, *473*(7346), 174–180.
- Asano, Y., Hiramoto, T., Nishino, R., Aiba, Y., Kimura, T., Yoshihara, K., Koga, Y., & Sudo, N. (2012). Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *303*, 1288–1295. <http://www.ajpgi.org>
- Beckett, T. L., Studzinski, C. M., Keller, J. N., Paul Murphy, M., & Niedowicz, D. M. (2013). A ketogenic diet improves motor performance but does not affect β -amyloid levels in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Brain Research*, *1505*, 61–67.
- Bercik, P., Park, A. J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., & Deng, P. A. (2011). The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001. *Neurogastroenterol Motil*, *23*(12), 1132–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x>
- Bhat, M. I., Sowmya, K., Kapila, S., & Kapila, R. (2019). *Escherichia coli* K12: An evolving opportunistic commensal gut microbe distorts barrier integrity in human intestinal cells. *Microbial Pathogenesis*, *133*.
- Bistoletti, M., Caputi, V., Baranzini, N., Marchesi, N., Filpa, V., Marsilio, I., Cerantola, S., Terova, G., Baj, A., Grimaldi, A., Pascale, A., Frigo, G., Crema, F., Giron, M. C., & Giaroni, C. (2019). Antibiotic treatment-induced dysbiosis differently affects BDNF and TrkB expression in the brain and in the gut of juvenile mice. *PLoS ONE*, *14*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212856>

- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Guan, N. L., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, *6*(263), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Brewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2005). Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *The FASEB Journal*, *19*(8), 923–933.
- Caballero, S., Kim, S., Carter, R. A., Leiner, I. M., Sušac, B., Miller, L., Kim, G. J., Ling, L., & Pamer, E. G. (2017). Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host and Microbe*, *21*(5), 592-602.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.002>
- Carniel, B. P., & da Rocha, N. S. (2021). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inflammatory markers: Perspectives for the management of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *108*(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110151>
- Casano, A. M., & Peri, F. (2015). Microglia: Multitasking specialists of the brain. *Developmental Cell*, *32*(4), 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.018>
- Casén, C., Vebø, H. C., Sekelja, M., Hegge, F. T., Karlsson, M. K., Cierniejewska, E., Dzankovic, S., Frøyland, C., Nestestog, R., Engstrand, L., Munkholm, P., Nielsen, O. H., Rogler, G., Simrén, M., Öhman, L., Vatn, M. H., & Rudi, K. (2015). Deviations in human gut microbiota: A novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *42*(1), 71–83. <https://doi.org/10.1111/apt.13236>
- Cawthon, C. R., & de La Serre, C. B. (2018). Gut bacteria interaction with vagal afferents. *Brain Research*, *1693*, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.012>
- Černý, V., Hrdý, J., Beneš, J., & Tlaskalová, H. (2023). *Slovo o mikrobiomu : úvaha nad historií , současným stavem a pojmoslovím vzkvétajícího oboru*. 112–119.
- Chahwan, B., Kwan, S., Isik, A., van Hemert, S., Burke, C., & Roberts, L. (2019). Gut feelings: A randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of probiotics for depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders*, *253*, 317–326.
- Chassard, C., Dapoigny, M., Scott, K. P., Crouzet, L., Del’Homme, C., Marquet, P., Martin, J. C., Pickering, G., Ardid, D., Eschalier, A., Dubray, C., Flint, H. J., & Bernalier-Donadille, A. (2012). Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *35*(7), 828–838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x>
- Chunchai, T., Thunapong, W., Yasom, S., Wanchai, K., Eaimworawuthikul, S., Metzler, G., Lungkaphin, A., Pongchaidecha, A., Sirilun, S., Chaiyasut, C., Pratchayasakul, W., Thiennimitr, P., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018). Decreased Microglial Activation Through Gut-brain Axis by Prebiotics, Probiotics, or Synbiotics Effectively Restored Cognitive Function in Obese-insulin Resistant Rats. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1055-2>

- Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(4), 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, *18*(6), 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- Costantini, T. W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G. A., Putnam, J. G., Hageny, A.-M., Lopez, N., Eliceiri, B. P., Bansal, V., & Coimbra, R. (2012). Targeting α -7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Enteric Nervous System. *The American Journal of Pathology*, *181*(2), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.005>
- Cryan, J. F., O’riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Cusotto, S., Sandhu, K. V., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *51*(April), 80–101. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.04.002>
- Ericsson, A. C., Davis, J. W., Spollen, W., Bivens, N., Givan, S., Hagan, C. E., McIntosh, M., & Franklin, C. L. (2015). Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116704>
- Erny, D., De Angelis, A. L. H., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahoi, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- Fleshner, M., Frank, M., & Maier, S. F. (2017). Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, *42*(1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.125>
- Fouhy, F., Guinane, C. M., Hussey, S., Wall, R., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(11), 5811–5820. <https://doi.org/10.1128/AAC.00789-12>
- Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34).
- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., & Holzer, P. (2016a). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020>

- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., & Holzer, P. (2016b). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 140–155.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L., & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, *5*, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Gershon, M. D. (1999). The enteric nervous system: A second brain. *Hospital Practice*, *34*(7), 31–52.
<https://doi.org/10.3810/hp.1999.07.153>
- Gershon, M. D., & Erde, S. M. (1981). The nervous system of the gut. *Gastroenterology*, *80*(6), 1571–1594. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(81\)90275-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(81)90275-4)
- Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P., Steinhäuser, C., & Walter, J. (2015). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia*, *63*(4), 626–634.
<https://doi.org/10.1002/glia.22772>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, *159*(4), 789–799.
- Guo, Y., Yang, X., Qi, Y., Wen, S., Liu, Y., Tang, S., Huang, R., & Tang, L. (2017). Long-term use of ceftriaxone sodium induced changes in gut microbiota and immune system. *Scientific Reports*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep43035>
- Hansen, M. B. (2003). The enteric nervous system I: Organisation and classification. *Pharmacology and Toxicology*, *92*(3), 105–113. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.t01-1-920301.x>
- Hoban, A. E., Moloney, R. D., Golubeva, A. V., McVey Neufeld, K. A., O'Sullivan, O., Patterson, E., Stanton, C., Dinan, T. G., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2016). Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience*, *339*, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003>
- Hoffman, J. D., Yanckello, L. M., Chlipala, G., Hammond, T. C., McCulloch, S. D., Parikh, I., Sun, S., Morganti, J. M., Green, S. J., & Lin, A. L. (2019). Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. *PLoS ONE*, *14*(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221828>
- Huang, C., Feng, S., Huo, F., & Liu, H. (2022). Effects of Four Antibiotics on the Diversity of the Intestinal Microbiota. *Microbiology Spectrum*, *10*(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01904-21>
- Huang, Y., Wu, J., Zhang, H., Li, Y., Wen, L., Tan, X., Cheng, K., Liu, Y., Pu, J., Liu, L., Wang, H., Li, W., Perry, S. W., Wong, M. L., Licinio, J., Zheng, P., & Xie, P. (2023). The gut microbiome modulates the transformation of microglial subtypes. *Molecular Psychiatry*, February.
<https://doi.org/10.1038/s41380-023-02017-y>

- Jethwani, P., & Grover, K. (2019). Gut Microbiota in Health and Diseases – A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(08), 1586–1599. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.187>
- Kaliannan, K., Wang, B., Li, X. Y., Bhan, A. K., & Kang, J. X. (2016). Omega-3 fatty acids prevent early-life antibiotic exposure-induced gut microbiota dysbiosis and later-life obesity. *International Journal of Obesity*, 40(6), 1039–1042.
- Kang, Y. B., Cai, Y., & Zhang, H. (2017). Gut microbiota and allergy/asthma: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Allergologia et Immunopathologia*, 45(3), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.004>
- Kang, Y., Kang, X., Yang, H., Liu, H., Yang, X., Liu, Q., Tian, H., Xue, Y., Ren, P., Kuang, X., Cai, Y., Tong, M., Li, L., & Fan, W. (2022). Lactobacillus acidophilus ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. *Pharmacological Research*, 175(December 2021), 106020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106020>
- Kekuda, R., Manoharan, P., Baseler, W., & Sundaram, U. (2013). Monocarboxylate 4 mediated butyrate transport in a rat intestinal epithelial cell line. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(3), 660–667. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2407-x>
- Keogh, C. E., Kim, D. H. J., Pusceddu, M. M., Knotts, T. A., Rabasa, G., Sladek, J. A., Hsieh, M. T., Honeycutt, M., Brust-Mascher, I., Barboza, M., & Gareau, M. G. (2021). Myelin as a regulator of development of the microbiota-gut-brain axis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 91(November 2020), 437–450. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.001>
- Kinlein, S. A., Phillips, D. J., Keller, C. R., & Karatsoreos, I. N. (2019). Role of corticosterone in altered neurobehavioral responses to acute stress in a model of compromised hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Psychoneuroendocrinology*, 102(September 2018), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.12.010>
- Kouli, A., Camacho, M., Allinson, K., & Williams-Gray, C. H. (2020). Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01083-5>
- Laforest-Lapointe, I., & Arrieta, M.-C. (2018). Microbial Eukaryotes: a Missing Link in Gut Microbiome Studies. *MSystems*, 3(2).
- Langgartner, D., Vaihinger, C. A., Haffner-Luntzer, M., Kunze, J. F., Weiss, A. L. J., Foertsch, S., Bergdolt, S., Ignatius, A., & Reber, S. O. (2018). The role of the intestinal microbiome in chronic psychosocial stress-induced pathologies in male mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00252>
- Leclercq, S., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Stärkel, P., Jamar, F., Mikolajczak, M., Delzenne, N. M., & De Timary, P. (2012). Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(6), 911–918. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.04.001>
- Leng, F., Hinz, R., Gentleman, S., Hampshire, A., Dani, M., Brooks, D. J., & Edison, P. (2023). Neuroinflammation is independently associated with brain network dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 28(3), 1303–1311. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01878-z>

- Liu, S., Guo, R., Liu, F., Yuan, Q., Yu, Y., & Ren, F. (2020a). <p>Gut Microbiota Regulates Depression-Like Behavior in Rats Through the Neuroendocrine-Immune-Mitochondrial Pathway</p>. *Neuropsychiatric Disease and Treatment, Volume 16*.
- Liu, S., Guo, R., Liu, F., Yuan, Q., Yu, Y., & Ren, F. (2020b). Gut microbiota regulates depression-like behavior in rats through the neuroendocrine-immune-mitochondrial pathway. *Neuropsychiatric Disease and Treatment, 16*, 859–869. <https://doi.org/10.2147/NDT.S243551>
- Liu, Y. W., Liu, W. H., Wu, C. C., Juan, Y. C., Wu, Y. C., Tsai, H. P., Wang, S., & Tsai, Y. C. (2016). Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research, 1631*, 1–12.
- Liu, Y., Yu, X., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Qian, L., Wang, Q., Xue, Z., Zhai, Q., & Chen, W. (2021). *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 Alleviates Irritable Bowel Syndrome and Prevents Gut Microbiota Dysbiosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Clinical Trial. *Engineering, 7*(3), 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.026>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods, 25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Q., Xing, C., Long, W., Wang, H. Y., Liu, Q., & Wang, R. (2019). gut and CNS. *Journal of Neuroinflammation, 16*, 53–66.
- Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A., & Said, H. M. (2005). Mechanism of TNF-modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 288*, 422–430. <http://www.ajpgi.org>
- Matthes, H., Krummenerl, T., Giensch, M., Wolff, C., & Schulze, J. (2010). Clinical trial: Probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complementary and Alternative Medicine, 10*. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-13>
- Mayerhofer, R., Fröhlich, E. E., Reichmann, F., Farzi, A., Kogelnik, N., Fröhlich, E., Sattler, W., & Holzer, P. (2017). Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. *Brain, Behavior, and Immunity, 60*, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.011>
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejd, A., Bisson, J. F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition, 105*(5), 755–764.
- Oleskin, A. V., & Shenderov, B. A. (2016). Neuromodulatory effects and targets of the SCFAs and gasotransmitters produced by the human symbiotic microbiota. *Microbial Ecology in Health & Disease, 27*(0), 1–12. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30971>
- Park, K., Park, S., Nagappan, A., Ray, N., Kim, J., Yoon, S., & Moon, Y. (2021). Probiotic *Escherichia coli* ameliorates antibiotic-associated anxiety responses in mice. *Nutrients, 13*(3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/nu13030811>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. In *Cellular Microbiology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 1024–1033). Blackwell Publishing Ltd.

- Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiology of Stress*, *4*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.001>
- Reinshagen, M. (2019). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, *57*(3), 335. <https://doi.org/10.1055/a-0821-1865>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, *7*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., Fernández-Caballero, J. A., García, F., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Gálvez, J. (2018). The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00468>
- Rogers, G. B., Kozłowska, J., Keeble, J., Metcalfe, K., Fao, M., Dowd, S. E., Mason, A. J., McGuckin, M. A., & Bruce, K. D. (2014). Functional divergence in gastrointestinal microbiota in physically-separated genetically identical mice. *Scientific Reports*, *4*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep05437>
- Rothhammer, V., Borucki, D. M., Tjon, E. C., Takenaka, M. C., Chao, C. C., Ardura-Fabregat, A., De Lima, K. A., Gutiérrez-Vázquez, C., Hewson, P., Staszewski, O., Blain, M., Healy, L., Neziraj, T., Borio, M., Wheeler, M., Dragin, L. L., Laplaud, D. A., Antel, J., Alvarez, J. I., ... Quintana, F. J. (2018). Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*, *557*(7707), 724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P. I., Godneva, A., Kalka, I. N., Bar, N., Shilo, S., Lador, D., Vila, A. V., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B. C., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, *555*(7695), 210–215.
- Roy Sarkar, S., Mitra Mazumder, P., & Banerjee, S. (2020). Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. *Journal of Neuroimmunology*, *348*.
- Saiyasit, N., Chunchai, T., Prus, D., Suparan, K., Pittayapong, P., Apaijai, N., Pratchayasakul, W., Sripetchwandee, J., Chattipakorn, M.D., Ph.D., N., & Chattipakorn, S. C. (2020). Gut dysbiosis develops before metabolic disturbance and cognitive decline in high-fat diet-induced obese condition. *Nutrition*, *69*, 110576. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110576>
- Sanborn, V., Azcarate-Peril, M. A., Updegraff, J., Manderino, L., & Gunstad, J. (2020). Randomized clinical trial examining the impact of *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotic supplementation on cognitive functioning in middle-aged and older adults. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *16*, 2765–2777. <https://doi.org/10.2147/NDT.S270035>
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van Der Mark, M., Levine, S., De Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2003). The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *21*(3), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(03\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(03)00030-3)

- Secher, T., Brehin, C., & Oswald, E. (2016). Early settlers: Which E. coli strains do you not want at birth? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *311*(1), G123–G129. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2016>
- Settanni, C. R., Ianiro, G., Bibbò, S., Cammarota, G., & Gasbarrini, A. (2021). Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 109). Elsevier Inc.
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, *11*(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Sokol, H., Jegou, S., McQuitty, C., Straub, M., Leducq, V., Landman, C., Kirchgerner, J., Le Gall, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Richard, M. L., & Beaugerie, L. (2018). Specificities of the intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease and *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, *9*(1).
- Soto, M., Herzog, C., Pacheco, J. A., Fujisaka, S., Bullock, K., Clish, C. B., & Kahn, C. R. (2018). Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Molecular Psychiatry*, 2287–2301. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0086-5>
- Steimle, A., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, *306*(5), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.001>
- Stenman, L. K., Patterson, E., Meunier, J., Roman, F. J., & Lehtinen, M. J. (2020). Strain specific stress-modulating effects of candidate probiotics: A systematic screening in a mouse model of chronic restraint stress. *Behavioural Brain Research*, *379*(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112376>
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, *1693*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2008). An Invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. *Cell*, *134*(5), 708–713.
- Vangay, P., Ward, T., Gerber, J. S., & Knights, D. (2015). Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 17, Issue 5, pp. 553–564). Cell Press.
- Varanoske, A. N., McClung, H. L., Sepowitz, J. J., Halagarda, C. J., Farina, E. K., Berryman, C. E., Lieberman, H. R., McClung, J. P., Pasiakos, S. M., & Philip Karl, J. (2022). Stress and the gut-brain axis: Cognitive performance, mood state, and biomarkers of blood-brain barrier and intestinal permeability following severe physical and psychological stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, *101*(January), 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.02.002>
- Wang, T., Hu, X., Liang, S., Li, W., Wu, X., Wang, L., & Jin, F. (2015). *Lactobacillus fermentum* NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. *Beneficial Microbes*, *6*(5), 707–717. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0177>
- Wassenaar, T. M. (2016). Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *6*(3).

- Wassenaar, T. M., & Zimmermann, K. (2018). Lipopolysaccharides in food, food supplements, and probiotics: Should we be worried? *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(3), 63–69. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00017>
- Yassour, M., Vatanen, T., Siljander, H., Hämäläinen, A. M., Härkönen, T., Ryhänen, S. J., Franzosa, E. A., Vlamakis, H., Huttenhower, C., Gevers, D., Lander, E. S., Knip, M., & Xavier, R. J. (2016). Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Science Translational Medicine*, 8(343). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad0917>
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. In *Nature* (Vol. 486, Issue 7402, pp. 222–227).
- Yong, S. J., Tong, T., Chew, J., & Lim, W. L. (2020). Antidepressive Mechanisms of Probiotics and Their Therapeutic Potential. *Frontiers in Neuroscience*, 13.
- Zhang, Y., Limaye, P. B., Renaud, H. J., & Klaassen, C. D. (2014). Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 277(2), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.03.009>
- Zhu, S., Jiang, Y., Xu, K., Cui, M., Ye, W., Zhao, G., Jin, L., & Chen, X. (2020). The progress of gut microbiome research related to brain disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1).