Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra etologie a zájmových chovů

Česká zemědělská univerzita v Praze

Vliv dlouhodobého pobytu v útulku na složení střevního mikrobiomu u psa domácího

Bakalářská práce

Markéta Junková

Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty

Ing. Ivona Svobodová, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv dlouhodobého pobytu v útulku na složení střevního mikrobiomu u psa domácího" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1.5. 2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivoně Svobodové, Ph.D. za pomoc při vedení bakalářské práce. Mé poděkování patří též Ing. Jakubovi Mrázkovi, Ph.D. za cenné rady a odborný dohled při práci v laboratoři Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR. V neposlední řadě také děkuji své rodině a blízkým za podporu během psaní mé práce a celého studia.

Vliv dlouhodobého pobytu v útulku na složení střevního mikrobiomu u psa domácího

Souhrn

Se současnými vědeckými poznatky není udržování zdravého střevního mikrobiomu pouze o správné funkci trávicího systému, ale o celkovém zdraví jedince. Střevní mikrobiom a nervová soustava tvoří rozsáhlou komunikační síť, která je ovlivňována oběma směry. Každé narušení této složité sítě a vybočení z její rovnováhy může mít na jedince negativní dopad.

Složení střevního mikrobiomu může být ovlivněno mnoha faktory. Takovými nejčastěji uváděnými faktory je strava, antibiotika, probiotika, životní prostředí. Některé z nich mohou střevní mikrobiotu podpořit, jiné poškodit. U psů v útulku je nevyvratitelným, negativně působícím vlivem stres. Cílem práce bylo porovnat, zda psi ze stresujícího prostředí útulku mají odlišné složení mikrobiomu než psi trvale žijící v domácím prostředí.

Analýza střevního mikrobiomu byla provedena běžně využívanými metodami molekulární biologie. Nejdůležitějším krokem byla izolace DNA ze 49 odebraných vzorků psích exkrementů. Následovala polymerázová řetězová reakce (PCR) s ověřením úspěšnosti amplifikace úseku genu 16S ribozomální RNA agarózovou elektroforézou. Ke kvalitativnímu určení bakterií byla využita metoda denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a komerční osekvenování vybraných 17 úseků z gelu dle Sangera. Pro kvantitativní určení byla použita metoda qPCR se specifickými primery pro kmeny bakterií Firmicutes, Bacteroidetes a Fusobacteria.

Při zkoumání diverzity střevních bakterií denaturační gradientovou gelovou elektroforézou se rozdíl mezi skupinou psů z útulku a psy z domácího prostředí projevil ve výpočtu a grafickém znázornění analýzou hlavních koordinát pomocí bio-informatického softwaru Bionumerics. Rozdíl v relativním počtu buněk bakteriálních kmenů, zjišťován metodou qPCR, se projevil pouze u kmene Firmicutes ($p < 0,002$), kdy významně nižší zastoupení bylo u skupiny psů z útulků.

Dlouhodobý stres má negativní dopad na celkové zdraví jedince a projeví se i na zastoupení bakterií ve střevním mikrobiomu. Možnosti, které nám nabízejí úpravu mikrobiomu, jako jsou probiotika, psychobiotika, úprava stravy, by při podrobnějším prostudování mohly pomoci zmírňovat stres u psů v útulcích, a tím celkově zlepšit jejich welfare.

Klíčová slova: střevní mikrobiom, stres, pes domácí, psí útulek

The effect of a long-term stay in an animal shelter on the composition of the intestinal microbiome in a domestic dog

Summary

With current scientific knowledge, maintaining a healthy intestinal microbiome is not only about the proper function of the digestive system, but about the overall health of the individual. The intestinal microbiome and the nervous system form an extensive communication network that is affected in both directions. Any disruption of this complex and deviation from the balance can have a negative impact on the individual.

The composition of the intestinal microbiome can be affected by many factors. Such the most frequently mentioned factors are diet, antibiotics, probiotics, the environment. Some of them can support the intestinal microbiota, others can damage it. For dogs in a shelter, stress has an irrefutable negative effect. The aim of this work was to compare whether dogs from the stressful environment of the shelter have a different composition of the microbiome than dogs living permanently at home.

The analysis of the intestinal microbiome was performed by commonly used methods of molecular biology. The most important step was the isolation of DNA from 49 samples of dog excrement. This was followed by polymerase chain reaction (PCR) and the success of amplification of the 16S gene region was verified by ribosomal RNA by agarose electrophoresis. The method of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and commercial sequencing of selected 17 sections of the gel according to Sanger were used for qualitative determination of bacteria. The qPCR method with specific primers for Firmicutes, Bacteroidetes and Fusobacteria strains was used for quantification.

When examining the diversity of intestinal bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis, the difference between a group of dogs from a shelter and dogs from the domestic environment was reflected in the calculation and graphical representation by analysis of the main coordinates using software Bionumerics. The difference in the relative number of cells of bacterial strains, determined by the qPCR method, was manifested only in the Firmicutes strain ($p < 0,002$), when the proportion was significantly lower in the group of dogs from shelters.

Long-term stress has a negative impact on the overall health of the individual and affects the presence of bacteria in the intestinal microbiome. The possibilities offered by microbiome modification, such as probiotics, psychobiotics, diet modification, could, when examined in more detail, help to alleviate stress in dogs in shelters, and thus improve their overall welfare.

Keywords: intestinal microbiome, stress, domestic dog, animal shelter

Obsah

1 Úvod 8

2 Cíl práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Střevní mikrobiom psa domácího 10

3.1.1 Postupné osídlování střev mikrobiomem 10

3.1.2 Složení střevního mikrobiomu 11

3.1.3 Funkce střevního mikrobiomu v těle hostitele 12

3.1.4 Faktory ovlivňující složení střevního mikrobiomu 13

3.2 Komunikace mezi střevním mikrobiomem a mozkem 15

3.2.1 Osa střevo-mozek 16

3.2.2 Schopnost mozku působit na střevní mikrobiom 16

3.2.3 Schopnost střevního mikrobiomu působit na mozek 18

3.3 Behaviorální projevy ovlivňované střevním mikrobiomem 20

3.3.1 Složení střevního mikrobiomu při působení stresu 21

3.3.2 Složení střevního mikrobiomu při úzkostech, depresi 22

3.3.3 Složení střevního mikrobiomu při fobiích a agresivitě 22

3.4 Behaviorální projevy psů a pobyt v útulku 23

3.5 Molekulárně biologické metody pro analýzu střevního mikrobiomu 24

3.5.1 Izolace DNA 24

3.5.2 Stanovení kvality a koncentrace DNA 25

3.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 25

3.5.4 Elektroforetické separace nukleových kyselin 26

3.5.5 Real-time PCR (qPCR) 26

3.5.6 Sekvenování nukleových kyselin dle Sangera 26

3.5.7 Sekvenování nové generace (NGS) 27

4 Metodika 28

4.1 Výběr psů pro výzkum 28

4.2 Sběr a skladování exkrementů pro analýzu střevního mikrobiomu 28

4.3 Izolace DNA 28

4.4 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE 29

4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 29

4.4.2 Agarózová elektroforéza 30

4.4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) 31

4.5 Příprava vzorků DNA pro Sangerovo sekvenování 32

4.5.1 PCR a agarózová elektroforéza významných bandů 32

4.5.2 Purifikace DNA 33
4.6 Zpracování sekvencí 33
4.7 Kvantitativní metoda qPCR 33
5 Výsledky 35
5.1 Izolace DNA 35
5.2 Ověření úspěšnosti PCR reakce agarózovou elektroforézou 35
5.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza 36
5.4 Vyhodnocení Sangerova sekvenování 37
5.4.1 Identifikace bakterií 37
5.4.2 Přehled identifikovaných bakterií 38
5.5 Vyhodnocení kvantitativní metody qPCR 39
6 Diskuse 40
7 Závěr 43
8 Literatura 44
9 Seznam použitých zkratek a symbolů 51
10 Samostatné přílohy I

1 Úvod

Střevní mikrobiom je nedílnou součástí trávicí soustavy živočichů. Jeho význam v těle nelze zlehčovat už jen proto, že počet mikroorganismů ve střevech přesahuje až desetinásobně množství všech buněk těla dohromady (Suchodolski 2011). Při vyváženém fungování je vztah mezi jedincem a jeho střevním mikrobiomem oboustranně prospěšný. Střeva tvoří mikrobiálním druhům ideální prostředí pro život a ty zase pomáhají živočichům například lépe rozkládat celulózu a cukry z potravy a jsou zásadní pro vývoj a funkci imunitního systému a při ochraně proti patogenům.

Význam střevního mikrobiomu však nemá dosah jen v oblasti střev, ale díky produkci hormonů a schopnosti komunikovat s nervovým systémem, i mimo ně. Pokrok současné techniky a objevování nových laboratorních metod, či vylepšování metod starších v sekvenování DNA, dovoluje střevní mikrobiom stále více prozkoumávat. Výzkumy se zaměřují převážně na bakteriální osídlení střev, protože tvoří nejvíce zastoupenou a nejvýznamnější složku. Zastoupení ve střevním mikrobiomu mají ale i houby, viry a další eukaryotické mikroorganismy. Faktory ovlivňující složení střevního mikrobiomu, důsledky změn a způsob, jakým spolu mozek a mikrobiom komunikuje bude rozebrán v této práci.

U studia střevního mikrobiomu je však věda stále v počátcích. Jaký dosah mají například změny ve složení střevního mikrobiomu v souvislosti s chováním hostitele, působením stresorů a jeho psychickým stavem dosud není dokonale prozkoumáno. Spousta studií tvořených na toto téma je odrazovým můstkem pro podrobnější studie.

Z pohledu zachování welfare zvířat je eliminace stresu žádoucí. Ne vždy je však možné s jistotou zhodnotit, zda je dané zvíře stresováno. U psů z útulku je však mnoha studiemi dokázáno, že jsou vzhledem k neznámým a proměnlivým podmínkám útulků, stresu vystavováni. Dlouhodobý stres může negativně ovlivnit zdravotní stav, a tím i chování psa. Zda se střevní mikrobiom psů z útulku vystavovaným stresu odlišuje od psů chovaných v domácím prostředí bude pomocí molekulárně biologických metod zkoumáno v této práci. Lepší porozumění mechanismům probíhajícím mezi mikrobiomem, nervovou soustavou a výsledným chování psa, by mohlo vést k metodám, pomocí kterých by se dal stres, a s ním související problémové chování, řešit.

2 Cíl práce

Pobyt v útulku je pro psy mimořádnou zátěžovou situací zejména vzhledem k sociální izolaci a stále se měnícím okolním podmínkám. Stres je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících rozmanitost střevního mikrobiomu.

Cílem této bakalářské práce je na základě analýzy psích exkrementů zhodnotit, zda se složení střevního mikrobiomu psů držených dlouhodobě v útulcích odlišuje od psů žijících s lidmi v jejich domácnostech.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiom psa domácího

Střevní mikrobiom je nedílnou součástí střev všech savců (Barko et al. 2018) a každý savec má svůj mikrobiom jedinečný (Suchodolski et al. 2005). Jedinečnost střevního mikrobiomu závisí na mnoha faktorech a vyvíjí se a mění se během života. Funkční aspekty mikrobiomu jsou si však u jednotlivých savců podobné, a tak funkce mikrobiomu zůstává, i přes individuální rozdíly, stejná (Guard & Suchodolski 2016).

V posledních letech, kdy se díky novým technologiím v sekvenování DNA rozmohly výzkumy střevního mikrobiomu se ukazuje, že střevní mikrobiom psa je velmi podobný tomu lidskému. V porovnání s typickými laboratorními zvířaty, jako je například myš nebo prase, má mikrobiom psa nejvíce společných rysů s člověkem (Coelho et al. 2018). Svou podobností, týkající se struktury a funkce střevního mikrobiomu, mohou být psi ideálními modelovými zvířaty pro výzkum například poruch nálad u lidí (Shafquat et al. 2014; Sarviaho et al. 2019).

Společné znaky střevního mikrobiomu psa a člověka se mohly začít vyvíjet přibližně v době, kdy započala domestikace psa, tedy cca před 15 000 lety (Larson et al. 2012). Od té doby se pes stal nerozlučitelným společníkem člověka a začal s ním sdílet nejen prostředí, ale i potravu. Tato změna ve výživě, kdy pes začal přijímat více rozmanité a rostlinné stravy, v porovnání se svými předky, mohla zapříčinit změny trávicího a metabolického systému. Trávicí soustava se tak mohla měnit a přizpůsobovat potravinám bohatším na škrob, a tím ovlivňovat dokonce i chování psů (Ollivier et al. 2016).

3.1.1 Postupné osídlování střev mikrobiomem

V počátcích výzkumu mikrobiomu, se věřilo, že k prvnímu osídlování bakteriemi dochází u novorozence až při průchodu mateřským porodním kanálem a plod se tedy vyvíjí ve sterilním prostředí. Tato domněnka přetrvávala až do druhé poloviny 19. století (Funkhouser & Bordenstein 2013). Mnohé nedávné studie využívající moderní sekvenační technologie u lidí toto dogma vyvrací. Naznačují, že jak děloha, tak i placenta, plodová voda, mekonium, pupeční krev u prospívajících těhotenství obsahuje bakteriální komunity, které se mohou dostat až k plodu (Hansen et al. 2015; Perez-Muñoz et al. 2017; Zhu et al. 2018). Mikrobiom placenty může započít kolonizaci plodu a prostoupit placentární bariérou, což je součástí normálního vývojového procesu (Aagaard et al. 2014).

Vliv typu porodu na střevní mikrobiom

Dalším faktorem, který má vliv na složení střevního mikrobiomu je typ porodu. Děti narozené přirozenou cestou, tedy vaginálně, mají střevní mikrobiom složený z bakterií přítomných ve vagíně matky, ale i z bakterií přítomných v matčiných střevech (Dominguez-Bello et al. 2010). Děti narozené císařským řezem mají složení střevního mikrobiomu podobné tomu,

které najdeme na kůži matky nebo v ústní dutině. Vzorky u těchto studií nebyly odebírány bezprostředně po porodu, ale až s odstupem několika dní, což mohlo výsledky zkreslit (MacIntyre et al. 2015).

Zakošek Pipan et al. (2020) ve své studii s 96 novorozenými štěňaty od 17 fen potvrdil hypotézu zkoumanou u lidí, že mikrobiom se vytváří v závislosti na typu porodu. Štěňata narozená císařským řezem vykazovala jiný vlastní bakteriální mikrobiom než štěňata narozená přirozenou cestou. I u štěňat dochází k časné kolonizaci plodu bakteriemi, které prostupují placentou. Placenta a mekonium nejsou tedy vždy sterilní, jak se dříve myslelo. Způsob porodu a osídlování bakterií ovlivňují také přírůstek hmotnosti u narozených štěňat.

Vývoj mikrobiomu u narozených štěňat

Mikrobiom štěňat získaný od matky se dále vyvíjí s přibývajícím věkem, přechodem z tekuté stravy na pevnou a změnou prostředí. Vilson et al. (2018) zkoumal vývoj mikrobiomu u různě starých štěňat. Štěňata do 7 týdnů věku měla velmi podobné složení střevního mikrobiomu jako březí nebo kojící feny. Převládajícími kmeny byly Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes. Během laktace přibývá množství i druhové zastoupení bakterií, vlivem obsahu mikroorganismů a oligosacharidů v mléce. Štěňata ze stejného vrhu mají podobnější mikrobiom ve srovnání se štěňaty nepříbuznými. Různorodost bakterií se začíná lišit od 7. týdne (nejhojnější čeledí Erysipelotrichaceae) věku do 15. ± 18. týdne věku (nejhojnější čeledí Clostridiaceae). Když jsou štěňata předána svým majitelům, mikrobiom začíná ovlivňovat také nové prostředí. Psi žijící ve městech mají větší rozmanitost bakterií než psi žijící na venkově.

3.1.2 Složení střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom psů je velmi komplexní a skládá se z bakterií, hub, virů a prvoků (Suchodolski 2016). Největší zastoupení v mikrobiomu mají bakterie, z nichž kmeny Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Fusobacteria jsou kmeny hlavními, které tvoří přibližně 99 % všech střevních bakterií u psů a koček (Handl et al. 2011; Chaban et al. 2012; Omatsu et al. 2018; Mondo et al. 2020a). Dalším méně zastoupeným kmenem bakterií je Actinobacteria (Mondo et al. 2020a). Houby tvoří přibližně 2 % mikrobiálních buněk ve fekálních vzorcích a jejich role není ještě dostatečně prozkoumána. Viry jsou také důležitými členy mikrobiomu a jejich význam ve střevním mikrobiomu je také stále předmětem výzkumu (Swanson et al. 2011; Foster et al. 2013).

Bakterie osídlující střeva

Jak bylo zmíněno výše, nejhojnější zastoupení ve střevním mikrobiomu, zjištěné z výkalů, mají kmeny Firmicutes, Bacteroidetes a Fusobacteria. Dále najdeme kmeny Actinobacteria a Proteobacteria. Na úrovni tříd jsou nejhojněji zastoupeny Bacteroidia, Clostridia a Fusobacteria. Na úrovni řádů jsou to Bacteroidales, Clostridiales, Lactobacillales a Fusocteriales (Mondo et al. 2020a). Na úrovni čeledí jsou nejčastěji Enterobacteriaceae,

Bacteroidaceae a Lachnospiraceae (Omatsu et al. 2018). Zastoupení bakterií střevního mikrobiomu je však závislé na mnoha parametrech, které mohou tvořit rozdíly, z nichž nejvýznamnější je například věk, strava, prodělané nemoci, antibiotika, probiotika, prostředí ve kterém jedinec žije, ale i plemeno psa.

Bakteriální kmen Firmicutes, hlavní složka střevní mikrobioty, obsahuje mnoho fylogeneticky odlišných bakteriálních skupin. Tyto skupiny (např. *Ruminococcus, Faecalibacterium* a *Dorea* spp.), spolu s Bacteroidetes a Actinobacteria (tj. *Bifidobacterium* spp.), jsou považovány za důležité producenty metabolitů, které mají příznivý dopad na zdraví hostitele. Zdrojem živin bakterií jsou komplexní uhlohydráty (např. škrob, celulóza, pektin a inulin) a fermentace těchto substrátů vede hlavně k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (např. acetát, propionát a butyrát), ty působí jako zdroj energie pro hostitele. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) regulují motilitu střeva a jsou důležitými růstovými faktory pro epitelové buňky (Arpaia et al. 2013).

3.1.3 Funkce střevního mikrobiomu v těle hostitele

Vyvážený mikrobiální ekosystém ve střevech hraje zásadní roli ve zdraví jedince, protože poskytuje podněty pro imunitní systém, pomáhá v obraně proti patogenům a metabolizuje nutričně důležité látky. Přítomnost bakterií je také důležitá pro správné fungování, motilitu a vývoj střevní struktury (Suchodolski 2016). Díky sekvenování DNA, u mikrobiomu nejčastěji pomocí 16S rRNA (Goodrich et al. 2016), je možné blíže zkoumat do jaké míry a jakým způsobem mikrobiom ovlivňuje vznik zánětlivého onemocnění střev, astmatu, obezity, metabolického syndromu, kardiovaskulárního onemocnění, poruch autistického spektra (Barko et al. 2018).

Vliv mikrobiomu na imunitní systém

Interakce mezi střevními bakteriemi a vrozeným imunitním systémem jsou zprostředkovány buď přímým kontaktem mezi bakteriemi a imunitním systémem nebo prostřednictvím mikrobiálních metabolitů (Pavlidis et al. 2015). Mezi metabolity, které bakterie přímo produkují patří např. vitaminy (H) a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA). Tyto bakteriální metabolity zprostředkovávají komunikaci právě mezi mikrobiomem hostitele a imunitním systémem, což ovlivňuje rovnováhu mezi zánětlivými a protizánětlivými mechanismy. U myší například mastná kyselina s krátkým řetězcem, butyrát, produkovaná střevními mikroorganismy během fermentace škrobu, usnadnila tvorbu regulačních T-lymfocytů, které potlačují rozvinutí autoimunitních chorob (Arpaia et al. 2013).

Bakterie ve střevech jsou také schopny pomocí enzymů přeměnit primární metabolity hostitele na sekundární metabolity. Příkladem je přeměna primárních žlučových kyselin na sekundární. Žlučové kyseliny vstupující do tlustého střeva dokážou přeměnit z primárních na sekundární pouze přítomné bakterie, konkrétně. Optimální poměr těchto žlučových kyselin je velmi důležitým regulátorem střevní homeostázy. Žlučové kyseliny předchází zánětům,

spravují metabolismus glukózy a inzulinu a potlačují klíčení spor *Clostridium difficile*, které narušují střevní mikroflóru, oslabenou užíváním antibiotik, a způsobují průjmová onemocnění (Pavlidis et al. 2015).

3.1.4 Faktory ovlivňující složení střevního mikrobiomu

Výčet faktorů, které ovlivňují složení střevního mikrobiomu najdeme výše. Pro zopakování, mikrobiální změny mohou nastat vlivem rozdílného stravování, s rostoucím věkem, př prodělání nemoci, užíváním antibiotik, užíváním probiotik, vlivem prostředí, ve kterém žijeme. Sám mikrobiom může být dán i geneticky, s ohledem na pohlaví, či plemeno psa (Omatsu et al. 2018).

Vliv stravy na střevní mikrobiom

Množství a složení stravy ovlivňuje střevní mikrobiom u psů. Pokud pes bude delší dobu hladovět, v provedené studii to bylo 5 dní, dojde k významným změnám ve složení mikrobiomu tenkého střeva a to může mít vliv na jeho metabolickou funkci. Během půstu došlo k poklesu druhů *Betaproteobacteria* a *Bacteroidales*. S návratem pravidelného krmení se i mikrobiom vrátil do původních hodnot (Kasiraj et al. 2016). Do útulků se často dostávají podvyživení psi. Pozměněný mikrobiom u těchto psů může mít za následek další problémy, jako jsou poruchy chování, či jiné zdravotní potíže.

Krmivo s přídavkem vlákniny také ovlivňuje formování mikrobiomu a ze studie Middelbose et al. (2010) vyplynulo, že zastoupení bakteriálního kmene Firmicutes je u psů krmených stravou s doplňkovou vlákninou vyšší a naopak u kmene Fusobacteria nižší. Přidanou vlákninou by se tedy mohlo ovlivňovat zastoupení bakteriálních kmenů v případě potřeby.

Rizikovým příkladem změny mikrobiomu je krmení psů i koček syrovými potravinami připravovanými doma. Syrové krmivo běžně překračuje hygienické limity pro počty bakterií čeledi Enterobacteriaceae. Tyto bakterie při vniknutí do trávicí soustavy hostitele způsobují rezistenci vůči širokospektrálním antibiotikům (cefalosporiny) a vylučováním těchto bakterií z těla napomáhají roznášení a vytváření rezistence i u jiných psů, či koček. Mezi další infekční organismy, které mohou být předmětem obav, patří *Listeria, Escherichia coli*. Dále paraziti jako je *Toxoplasma gondii* nebo *Brucella suis*, patřící mezi zoonózy (Davies et al. 2019a).

Vliv stáří na střevní mikrobiom

Mikrobiální rozmanitost má se stárnutím tendenci klesat, což by mohlo souviset s nemocemi, které se se stárnutím projevují. Studie Mizukamiho et al. (2019) provedená s plemenem shiba inu však neprokázala statisticky významné změny v majoritní skupině mikroorganismů, ale v méně zastoupené skupině střevních mikroorganismů se pokles diverzity s věkem projevil.

Vliv onemocnění a antibiotik na střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom je spojován s akutními i chronickými gastrointestinálními záněty, u psů konkrétně se zánětlivým onemocněním střev (IBD). Nejběžnějšími mikrobiálními změnami pozorovanými při střevním zánětu jsou poklesy bakteriálních kmenů Firmicutes (tj. Lachnospiraceae, Ruminococcaceae a Faecalibacterium) a Bacteroidetes, kdy současně dochází ke zvýšení kmene Proteobacteria, kam se řadí například *Escherichia coli* (Guard & Suchodolski 2016).

Řešením pro velké množství zánětlivých onemocnění jsou antibiotika. Antibiotika jsou velmi účinná, ale pro mikrobiální ekosystém škodlivá. Pokud se antibiotika používají příliš často a jsou zneužívána, může dojít k vyvolání nemocí spojených s poškozením střevního mikrobiomu. Wang et al. (2020) sledovali rozmanitost střevního mikrobiomu u myší léčených širokospektrálními antibiotiky. Léčba antibiotiky po 14 dnech užívání značně snížila rozmanitost a složení mikroorganismů ve střevech, konkrétně bakteriálních kmenů Actinobacteria, Bacteroidetes a Firmicutes. U rodů bakterií došlo k nejvýznamnějšímu snížení u *Clostridium, Intestinimonas, Lactobacillus, Lactococcus* a *Staphylococcus*. Naopak zastoupení kmenu Proteobacteria po léčbě antibiotiky stouplo. Stejně jako u rodů *Enterococcus, Escherichia, Klebsiella* a *Parasutterella*.

Vliv probiotik na střevní mikrobiom

Probiotika jsou kultury živých mikroorganismů účinkující ve střevech, které jsou prospěšné pro organismus příjemce, jsou-li podávány v adekvátním množství. Vlastnosti, kterými probiotika oplývají jsou: ochrana střevní bariéry a snížení propustnosti (Carabotti et al. 2015), zvýšení sekrece mucinu pohárkovými buňkami, zvýšení sekrece defenzinů, které zabraňují přemnožení patogenů, produkcí mastných kyselin s krátkými řetězci, stimulací sekrece imunoglobulinu A, který neutralizuje patogeny na sliznici, snížením pH a podporou imunitních buněk v boji s patogeny (Gallo et al. 2016).

Probiotika, které při požití vhodného množství mají pozitivní vliv na psychiku, se nazývají psychobiotika. Nejčastěji využívanými jsou rody grampozitivních bakterií *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Sarkar et al. 2016). V jedné dřívější studii dokonce bylo zjištěno, že *Bifidobacterium infantis* má antidepresivní účinky na myší modely jako antidepresivum citalopram (Desbonnet et al. 2010). Při studiích na myších bylo pozorováno, že podávání probiotik s *Lactobacillus rhamnosus* a *Bacteroides fragilis* zmírňuje chování podobné úzkosti a strachu (Bravo et al. 2011; Hsiao et al. 2013). Podávání probiotik má tedy vliv i na zlepšení stavu při úzkostech a snižuje odezvu stresových hormonů, glukokortikoidů. Tento fakt byl pozorován také při podávání probiotik *L. rhamnosus,* které modulací exprese mRNA receptoru GABA ve specifických oblastech mozku, ovlivnily úzkostné chování u myší (Bravo et al. 2011).

Vliv plemene na střevní mikrobiom

To, že má plemeno vliv na složení střevního mikrobiomu dokázali ve studii Reddy et al. (2019), kde porovnávali 3 psí plemena chovaná za stejných podmínek. Jednalo se o pudly, knírače malé a maltézské psíky. Maltézský psík měl značně nižší zastoupení kmene Firmicutes oproti dvěma sledovaným plemenům. Zastoupení kmene Fusobacteria bylo u maltézských psíků vyšší než u knírače malých. Množství zastoupení i jiných taxonomických kategorií se značně rozcházelo.

Při studiu střevního mikrobiomu zdravých německých ovčáků, kteří jsou označováni jako psi trpící depresemi, v porovnání se zdravými kříženými jedinci, bylo zjištěno, že kmen Bacteroidetes se významně liší a u kříženců je zastoupení vyšší. Naopak u kmenu Proteobacteria bylo zastoupení vyšší u německých ovčáků (Mondo et al. 2020b).

3.2 Komunikace mezi střevním mikrobiomem a mozkem

Několik nedávných studií prokázalo schopnost střevního mikrobiomu savců komunikovat s centrálním nervovým systémem několika kanály mezi něž patří mechanismy bloudivého nervu, neuroimunitní a neuroendokrinní signalizace a produkce neuroaktivních látek, konkrétně kyseliny gama-aminomáselné (GABA), serotoninu, noradrenalinu a dopaminu (Neuman et al. 2015; Fung et al. 2020)

Komunikační kanály nefungují pouze jednostranně, ale tak, jako dokáže centrální nervová soustava ovlivnit mikrobiom, tak mikrobiom dokáže ovlivnit centrální nervovou soustavu (Mayer 2011; Carabotti et al. 2015; Mondo et al. 2020a).

S rozvojem technik pro analýzu střevní mikrobioty je stále více uznáván význam mikrobiomu pro fyzické a duševní zdraví. Mozek a střeva interagují prostřednictvím osy mozek-střeva. Působící stres vede k sekreci kortizolu přes osu HPA a mění propustnost střevní stěny a prostředí pro střevní mikroorganismy. Dochází i k aktivaci autonomního nervového systému, který je také spojen se změnami gastrointestinální motility a syntézou různých neurotransmiterů. Dysbióza, narušení normálního stavu střevního mikrobiomu, zvyšuje střevní propustnost a různé metabolity a zánětlivé látky se dostávají cirkulací do mozku, což má za následek psychologické příznaky, jako je deprese, úzkost, potlačení kognitivních funkcí a sociálního fungování. Aktivace imunitní odpovědi způsobená změnami střevní mikroflóry způsobuje sekreci různých zánětlivých cytokinů, které se dostávají do mozku a ovlivňují psychologické funkce. Střevní mikrobiom je schopen produkovat nebo se účastnit analýzy různých neurotransmiterů a neromodulátorů. Všechna tato fakta dokazují, že by měla být osa střevo-mozek zkoumána jako obousměrná dráha, spíše než zdůrazňovat význam obou směrů zvlášť (Jang et al. 2020).

3.2.1 Osa střevo-mozek

Pro obousměrnou komunikaci mezi mozkem a střevním mikrobiomem je podstatná tzv. osa střevo-mozek. Osa střevo-mozek je komunikační systém mezi centrálním nervovým systémem a gastrointestinálním traktem (Bravo et al. 2011; O'Mahony et al. 2015; Capuco et al. 2020). Tato osa tvoří jakousi síť vzájemně se ovlivňujících a spolupracujících systémů, kde jakékoliv vybočení z rovnováhy se odrazí na zdraví jedince (Rieder et al. 2017).

Rolí osy střevo-mozek je sledovat a sjednocovat funkce střev a také spojovat emoční a kognitivní centra mozku s periferními střevními mechanismy, jako je imunitní aktivace, střevní propustnost, enterický reflex a entero-endokrinní signalizace. Mechanismy, které jsou základem komunikace osy střevo-mozek, zahrnují neuroimunoendokrinní mediátory. Tato obousměrná komunikační síť zahrnuje centrální nervový systém (CNS), mozek i míchu, autonomní nervový systém (ANS), enterický nervový systém (ENS) a osu hypotalamo-hypofyzární-adrenální (HPA). Autonomní systém se sympatickými a parasympatickými vlákny řídí oba aferentní signály, vycházející z lumen střeva a přenášené enterickými, spinálními a vagálními cestami do CNS a eferentními signály z CNS do střevní stěny. Osa HPA je považována za základní eferentní osu stresu, která koordinuje adaptivní reakce organismu na stresory jakéhokoli druhu (Carabotti et al. 2015).

Potenciální neurobiologické mechanismy, jejichž prostřednictvím může narušení této sítě ovlivnit zdraví jedince, zahrnují aktivaci HPA osy a změnu aktivity neurotransmiterů a imunitních systémů. Změnám ve střevním mikrobiomu je přisuzováno mnoho nemocí hostitele jako je obezita, diabetes a záněty trávicího traktu. Nedávné výzkumy k tomu přiřadily ještě vliv osy střevo-mozek na vznik neuropsychických poruch, jako je deprese a úzkost (Rieder et al. 2017).

Osa má dopad na fyziologické vlastnosti ovlivňující chování savců. Ve studii provedené Sudem et al. (2004) je prokázáno, že tzv. germ-free myši měly abnormální fungování osy HPA s vyššími hladinami adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a kortikosteronu než u myší s normální kolonií mikroorganismů ve střevech. Tyto abnormální hormonální hladiny se vrátily do normálních hodnot po kolonizaci komensálními bakteriemi. Další studie na myších potvrdila souvislost změn chování s rodem *Ruminococcaceae* (O'Malley et al. 2010).

3.2.2 Schopnost mozku působit na střevní mikrobiom

Mozek může ovlivnit střevní mikrobiom prostřednictvím nervových a endokrinních cest (Järbrink-Sehgal & Andreasson 2020). Konkrétně je centrální nervová soustava schopná ovlivnit strukturu střevního mikrobiomu, prostředí, dokáže působit také na pohyblivost střev, sekreci látek a propustnost, prostřednictvím autonomního nervového systému (Mayer 2011). Tyto účinky mohou být zprostředkovány pomocí paralelních neuroendokrinních výstupních eferentních systémů, tedy autonomním nervovým systémem (ANS) a hypotalamo-hypofyzární-adrenální osou (HPA), a to jak přímo prostřednictvím hostitelského střevního

mikrobiomu, tak nepřímo prostřednictvím změn ve střevním prostředí. Tyto eferentní nervové dráhy spojené s endogenními pochody tvoří takzvaný „emoční motorický systém“. Přímý vliv je zprostředkován sekrecí signálních molekul pod regulací mozku neurony, imunitními buňkami a enterochromafinními buňkami produkující serotonin, které by mikrobiom mohly ovlivnit.

Komunikace mezi efektory centrální nervové soustavy a bakteriemi závisí na přítomnosti neurotransmiterových receptorů na bakteriích. Vazebná místa pro enterické neurotransmitery produkované hostitelem jsou přítomny na bakteriích a mohou ovlivňovat funkci mikrobiomu, což přispívá ke zvýšení predispozice k zánětlivým a infekčním onemocněním. Vysoká afinita k neurotransmiteru GABA byla popsána u *Pseudomonas fluorescens* s vazebnými vlastnostmi podobnými vlastnostem mozkového receptoru. *Escherichia coli* má receptor pro hostitelský adrenalin a noradrenalin, který může být specificky blokován adrenergními antagonisty.

Mozek má také významnou roli v ovlivňování střevních funkcí, jako je propustnost, sekrece kyselin, hydrogenuhličitanů a hlenu, vstřebávání vody a imunitní odpovědi. Rovnováha ve střevním prostředí je důležitá pro udržení vrstvy mikrobiomu, kde jednotlivé skupiny bakterií rostou na sliznici. Dysregulace osy střevo-mozek pak může ovlivnit střevní mikrobiom narušením normálního slizničního prostředí. Stres vyvolává rozdíly v množství a kvalitě sekrece hlenu. Změny v průchodu gastrointestinálním traktem mohou mít zásadní vliv na dodávku důležitých živin, zejména prebiotik a vlákniny ke střevnímu mikrobiomu. Mozek může také ovlivnit složení a funkci mikrobioty změnou střevní propustnosti, což umožní bakteriálním antigenům proniknout do epitelu a stimulovat imunitní odpověď ve sliznici (Carabotti et al. 2015).

Funkce SAM osy

Sympato-adrenomedulární osa zprostředkovává rychlou reakci na stresor. Aktivací sympatiku dochází k vyplavování adrenalinu a noradrenalinu z dřeně nadledvin. SAM osa snižuje funkci trávicího, vylučovacího a rozmnožovacího systému. Naopak dochází ke zvýšení činnosti srdce a prohlubuje se dýchání (Herman & Tasker 2016).

Funkce HPA osy

Hypothalamo-hypofyzární-adrenální osa vykonává svoji velmi důležitou funkci při spuštění stresové reakce tím, že koordinuje adaptivní reakce na stresory. HPA osa je součástí limbického systému a je nezbytná pro regulaci mozkových funkcí včetně paměti a emocí. Když je osa HPA aktivována v důsledku působení stresoru z vnějšího prostředí nebo došlo ke zvýšení prozánětlivých cytokinů v těle, je z hypotalamu vylučován kortikotropin, stimulující sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z hypofýzy. Adrenokortikotropin ovlivňuje produkci glukokortikoidů z nadledvin, zejména kortizol, který je jedním z hlavních stresových hormonů.

Glukokortikoidy působí v těle jako iniciátoři energetického metabolismu, který zásobuje organismus a jeho orgány energií, pro zvládnutí stresu (Myers et al. 2015). Glukokortikoidy také potlačují funkci imunity (Herman & Tasker 2016). Mozek proto může koordinovat funkci gastrointestinálního traktu integrací signalizace prostřednictvím nervů a hormonů (Jang et al. 2020).

Bloudivý nerv

Nervus vagus neboli bloudivý nerv je X. hlavový nerv, který přímo spojuje střevo a mozek. Je to párový nerv, který přenáší aferentní a eferentní senzorické informace mezi CNS a periferií. Prostřednictvím primárních aferentních vláken tohoto nervu dokáže střevní mikrobiom komunikovat s mozkem (Rieder et al. 2017).

3.2.3 Schopnost střevního mikrobiomu působit na mozek

Střevní mikrobiom může ovlivnit funkci mozku prostřednictvím nervových, endokrinních a imunitních drah (Cryan & Dinan 2012; Rieder et al. 2017). Studie odhalují, jak změny a rozmanitost ve složení střevního mikrobiomu ovlivňují normální fyziologii a přispívají k chorobám od zánětů až po obezitu. Střevní mikrobiom může narušit celistvost střevní bariéry, tím jsou do mozku, buď prostřednictvím bloudivého nervu nebo absorpcí do krve, uvolňovány látky cytokiny, které ho následně nepříznivě ovlivňují (Cryan & Dinan 2012).

V posledních letech došlo k množení experimentálních prací prováděných hlavně na zvířatech, jejichž cílem bylo prozkoumat příspěvek mikrobiomu k modulaci osy střevo-mozek. Byly použity různé technologické strategie spočívající v použití germ-free zvířat (zvířat bez cizích organismů). Studie na zvířatech GF ukázaly, že bakteriální kolonizace střeva je ústřední pro vývoj a zrání jak ENS, tak CNS. Absence mikrobiální kolonizace je spojena se změnou exprese a obratu neurotransmiterů v nervových systémech a také se změnami senzoricko-motorických funkcí střev, které spočívají ve zpožděném vyprazdňování žaludku a střevním průchodu. Všechny tyto anomálie se obnoví po kolonizaci zvířat specifickým bakteriemi. Studie prováděné na germ-free zvířatech také prokázaly, že mikrobiom ovlivňuje stresovou reaktivitu a chování podobné úzkosti a reguluje nastavenou hodnotu aktivity HPA. Tato zvířata obecně vykazují sníženou úzkost a zvýšenou stresovou reakci se zvýšenými hladinami ACTH a kortizolu.

Mikrobiom může interagovat s osou střevo-mozek také prostřednictvím modulace aferentních senzorických nervů. Důkazem toho je *Lactobacillus reuteri*, který zvyšuje jejich dráždivost inhibicí otevírání draslíkových kanálů závislých na vápníku a moduluje střevní propustnost a vnímání bolesti (Carabotti et al. 2015).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)

Jedním z hlavních produktů bakteriálního metabolismu jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jako je kyselina máselná, kyselina propionová a kyselina octová, které jsou

schopné stimulovat sympatický nervový systém, uvolňovat serotonin ve sliznici a ovlivňovat paměť a proces učení (Carabotti et al. 2015). Propionát produkovaný mikrobiomem chrání hematoencefalickou bariéru před oxidačním stresem (Hoyles et al. 2017) .

Neurotransmitery

Mikrobiom reguluje biologickou dostupnost různých látek nezbytných pro syntézu neurotransmiterů. Dokáže metabolizovat esenciální aminokyselinu tryptofan jako prekurzor syntézy indolu, serotoninu a melatoninu. Dopamin je nejdůležitější neurotransmiter, který koordinuje motivaci založenou na odměnách a hraje prekurzorovou roli při syntéze katecholaminů, jako jsou noradrenalin a adrenalin. V současnosti se řadí mezi funkce noradrenalinu vzrušení a bdělost při detekci senzorických signálů a stavu bdění. V nedávných studiích se uvádí, že hraje důležitou roli v kognitivních funkcích, jako je chování, paměť, učení a koncentrace. Na syntéze a funkci katecholaminů se podílejí různé bakterie (Jang et al. 2020).

Kromě kyselin s krátkými řetězci (SCFA) působí i další metabolity vytvořené mikrobiomem jako základní neuroaktivní molekuly v centrálním nervovém systému (CNS). *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. syntetizují neurotransmitery, jako je acetylcholin a gama-amino-butyrát (GABA), zatímco *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. a *Escherichia* spp. dokáží syntetizovat serotonin, dopamin a noradrenalin (Hoyles et al. 2017).

Také konkrétně *Pseudomonas* spp. syntetizují serotonin z tryptofanu, který slouží pro mezibuněčnou signalizaci. Snížení cirkulujícího tryptofanu spojené se střevními mikroby proto ovlivňuje serotonergní přenos a funkci CNS a enterického nervového systému a metabolismus tryptofanu indukovaný mikrobiomem ovlivňuje produkci tryptaminu působením tryptofan dekarboxylázy. Tryptamin moduluje inhibiční reakci buněk na serotonin zvýšením sekrece serotoninu z buněk neuroendokrinních. Metabolismus tryptofanu spojený se střevní mikrobiotou poskytuje řadu látek ovlivňujících mozek a chování, včetně kynureninu, chinolinátu, indolu a derivátů indolu. Kynurenin a chinolinát mohou ovlivnit funkci mozku, což vede k depresivním příznakům a nedostatku tryptofanu u hostitele. Produkce kynureninu a chinolinátu snižuje koncentraci tryptofanu v krvi a inhibuje produkci hlavních neurotransmiterů jako je serotonin v mozku. Proto je tryptofanový katabolismus spojený s mikrobiomem nejdůležitějším regulátorem mozkové osy (Jang et al. 2020).

Přítomnost mikrobiomu upravuje funkci serotoninergního systému V limbickém systému germ-free zvířat bylo zjištěno zvýšení produkce serotoninu a změny hladiny souvisejících metabolitů (Carabotti et al. 2015). Serotonin funguje jako klíčový neurotransmiter na obou stranách sítě střevo-mozek. Střevní mikrobiom dokáže regulovat hladinu esenciální aminokyseliny tryptofanu, který je potřebný pro syntézu serotoninu. Metabolismus serotoninu je tedy velmi náchylný na změny v mikrobiálním složení a změny v jeho metabolismu mohou vést k psychickým poruchám jako např. úzkostem, bipolární poruše (O'Mahony et al. 2015), depresi a stresu (Sudo et al. 2004).

GABA

Kyselina gama-aminomáselná (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmiter CNS, jejíž účinky jsou zprostředkovány dvěma hlavními třídami receptorů – receptory $GABA_A$, které existují jako řada podtypů vytvořených společným sestavením různých podjednotek a receptory $GABA_B$, které jsou spojeny s G proteinem a sestávají z heterodimeru tvořeného dvěma podjednotkami ($GABA_{B1}$ a $GABA_{B2}$), které jsou nezbytné pro funkčnost receptoru $GABA_B$. Na tyto receptory cílí farmakologie pro tvorbu léků proti úzkosti (např. benzodiazepiny působící na receptory $GABA_A$) a změny v GABAergním systému mají důležitou roli ve vývoji psychiatrických stavů souvisejících se stresem (Bravo et al. 2011). GABAergní neurotransmise je důležitá pro různé funkce CNS, jako je chování, bolest a spánek, stejně jako funkce gastrointestinálního traktu, jako je střevní motilita, vyprazdňování žaludku, nocicepce a sekrece kyselin (Jang et al. 2020).

Členové rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* se podílejí na syntéze GABA. Když byl *Lactobacillus rhamnosus* injekčně podán myším, došlo ke snížení depresivních příznaků a úzkosti v souvislosti s aktivitou vagového nervu, byly pozorovány změny v mozkové GABAergické aktivitě (Feehily & Karatzas 2013). Produkce GABA je schopna také *Escherichia coli* (Jang et al. 2018).

Transplantace střevního mikrobiomu

Za zmínku stojí zmínit také možnost transplantace střevního mikrobiomu (FMT), neboli fekální bakterioterapii (FBT). Při FMT dochází k přenosu obsahu střev s vitálními mikroorganismy dárce do střev příjemce. V současné době se FMT využívá při diagnostice klostridiové kolitidy (CDI) jako alternativa léčby antibiotiky (Juszczuk et al. 2017).

Studie na myších odhalily, že fekální transplantace může mít dalekosáhlejší dopady. Při studii Bercika et al. (2011) byla provedena fekální transplantace mezi dvěma skupinami myší. Skupině myší s extrovertními vlastnostmi byl transplantován obsah střev od myší introvertních, úzkostlivějších a naopak. Při pokusech provedených před i po transplantaci bylo jasně dokázáno, že transplantace změnila chování myší. Dříve extrovertní myši vykazovaly známky úzkosti a dříve introvertní myši jevily známky typické pro skupinu extrovertních myší. Pro důkaz, že složení mikrobiomu související se stresem hraje roli při změnách chování, byl proveden experiment fekální transplantace mezi myšmi vystavenými chronickému stresu a normálními myšmi. Stresovaná zvířata a zdravá zvířata, u kterých byla provede FMT od stresovaných zvířat, vykazovala změny chování a docházelo ke zvýšení neuroaktivních látek (cytokinů). Při provedení opačné fekální transplantace od zdravých jedinců, se u stresovaných myší veškeré měřené parametry zlepšily (Marcondes Ávila et al. 2020).

3.3 Behaviorální projevy ovlivňované střevním mikrobiomem

Poruchy chování psa, jako je agresivita, úzkost, deprese, strach, jsou častými problémy, které mohou být příčinou toho, proč tolik psů končí v útulcích. Útulky musí těmto problémům čelit

a vymýšlet, jak chování psa napravit, aby mu byli schopni najít nový domov. Nápravné programy a interakce se psy ne vždy končí úspěchem (Salman et al. 2000). Cestou ke změně by mohlo být zjištění, že střevní mikrobiom je schopen ovlivňovat chování savců a nalezením správného řešení přispět k regulaci problémového chování (Foster et al. 2016).

Různé typy psychologických stresorů mění složení a celkovou biomasu střevního mikrobiomu různě, vzhledem k časovému působení. Dlouhodobé působení stresorů mění významně a závažně složení mikrobiomu, které se odráží na celkovém zdravotním stavu jedince. Ve skutečnosti má ale na složení mikrobiomu dopad i krátkodobé působení stresorů. Vystavení stresoru na pouhé 2 hodiny změnilo profil střevní komunity a snížilo zastoupení hlavních kmenů u zkoumaných myší (Galley et al. 2014).

3.3.1 Složení střevního mikrobiomu při působení stresu

Stres je reakce organismu na stresor, při které je narušena homeostáza. Selye (1952) pojmenoval reakci na stres (nespecifickou) jako generalizovaný adaptační syndrom a rozdělil ho do tří fází. První fáze, poplachová, kdy je tělo vystaveno stresoru a začínají působit obranné mechanismy. Druhá fáze, rezistentní, nastává, pokud stresor přetrvává a tělo se na něj snaží adaptovat. Třetí fází je fáze vyčerpání, která nastává při dlouhodobém působení stresoru, které tělo není schopno zvládnout, například z důvodu vyčerpání energie. Pokud tělo stres zvládne, jeho funkce se obnoví. Stresory H. Selye rozdělil na fyzikální, chemické a psychologické. Studiem stresu se Selye zabýval celý život, během kterého došel k několika zásadním poznáním. Uznal, že stres nemá jen negativní dopady na organismus, ale i pozitivní a zavedl pojmy eustres, pro pozitivní stres a distres pro negativní (Szabo et al. 2012). Dříve se zásadní role při zvládání stresové reakce přiřazovala katecholaminům a sympato-adrenomedulární ose, později se však ukázalo, že zásadní roli hraje i hypothalamo-hypofyzární-adrenální osa (Selye 1952).

HPA osa a autonomní nervový systém jsou hlavními činiteli při stresové reakci. Tělo se vyrovnává se situací „bojuj nebo uteč“ (Kvetnansky et al. 2009). Organismus začíná zvyšovat výkonnost srdce, pro rychlejší prokrvení a okysličení svalů, zvyšuje se hladina glukózy. Roli ve zvýšeném zisku energie hrají také hormony katecholaminy a glukokortikoidy. Dochází také k potlačení funkce trávicí a rozmnožovací soustavy, imunitních reakcí. Pokud stresor působí dlouho může být organismus, v rámci akutního stresu, poškozen. Pokud je organismus vystaven chronickému stresu, dochází k poškození tkání a může dojít až vyčerpání organismu a ohrožení na životě (Herman & Tasker 2016). Vystavením dlouhodobému stresu dochází, vlivem zapojení osy střevo-mozek, ke změnám i ve střevním mikrobiomu (Bravo et al. 2011; Mondo et al. 2020b). Při expozici stresoru došlo u myší ke snížení počtu bakterií rodu *Bacteroides* a zvýšení počtu bakterií rodu *Clostridium* (Bailey et al. 2011).

3.3.2 Složení střevního mikrobiomu při úzkostech, depresi

Úzkost je vnímána jako stav těla, které se uvede do poplašného režimu, bez zjevné příčiny (Walker et al. 1997). Chování spojené s úzkostmi u psů zahrnuje zvýšenou srdeční frekvenci, třes, nervozitu, zvýšené slinění a drbání, nadměrnou vokalizaci, destruktivní chování, kálení a močení ve vnitřních prostorech. U psů je nejčastější úzkost separační (Stelow 2018). Střevní mikrobiom německých ovčáků, psů trpícími depresemi, vykazuje podobnou hladinu mastných kyselin, která je typická pro lidi s depresemi (Mondo et al. 2020b).

Studie prováděné s pacienty s generalizovanou úzkostnou poruchou mají nižší bakteriální diverzitu a snížené množství Firmicutes a Tenericutes, bakterií produkující mastné kyseliny s krátkým řetězcem a vyšší množství *Escherichia-Shigella, Fusobacterium* a *Ruminococcus gnavus* ve srovnání se zdravými jedinci. Víc závažné stavy úzkosti byly navíc spojeny s nižším výskytem skupiny *Eubacterium coprostanoligenes*, *Ruminococcaceae* a *Prevotella* a vyšším výskytem bakterií a *Escherichia, Shigella* (Jiang et al. 2018b; Chen et al. 2019).

Bakterie patřící do rodu *Streptococcus* jsou známé jako producenti serotoninu, bakterie *Lactobacillus* jsou výrobci kyseliny gama-aminomáselné (GABA). Tyto molekuly jsou známé jako neurotransmitery schopné regulovat emoční chování (Bravo et al. 2011; Evrensel & Ceylan 2015; Yunes et al. 2016). Rod *Bacteroides* je spojeným s metabolickými změnami běžnými u deprese (Bangsgaard Bendtsen et al. 2012).

Třída Enterobacteriaceae zahrnuje enterosolventní patogeny, které vyvolávají zánětlivý stav a zvyšují propustnost střevní stěny, což umožňuje bakteriím přemisťovat se do mezenterických lymfatických uzlin. To vede ke zvýšení plazmatického imunoglobulinu A nebo M, což je běžné u pacientů trpících depresí (Maes et al. 2012). Hromadné důkazy naznačují, že střevní mikrobiom působí na nervový systém a ovlivňuje afektivní poruchy, jako je úzkost a deprese (Clapp et al. 2017).

3.3.3 Složení střevního mikrobiomu při fobiích a agresivitě

Fobie a agresivita se řadí mezi úzkostné poruchy, které jsou jasnou známkou nepohody zvířat (Rosado et al. 2010).

Agresivita představuje problém nejen pro samotného psa, ale i pro jeho okolí. Agresivita psů vůči lidem často končí umístěním psa do útulku nebo v horším případě utracením, pokud je náprava chování nad lidské síly (Moxon et al. 2016). Zkoumání propojení chování, fyziologických procesů, nervové soustavy a střevního mikrobiomu by mohlo pomoci tento problém vyřešit (Mondo et al. 2020a). Při hledání řešení bylo zjištěno, že podávání širokospektrálních antibiotik narušilo střevní mikrobiom a snížilo agresivní chování u sibiřských křečků (Sylvia et al. 2017).

Serotonin a steroidní hormony jsou důležitými látkami při ovlivňování chování, jako je právě agrese (Rosado et al. 2010). Studie ukazují, že hladina serotoninu je u agresivních psů nízká a naopak hladina kortizolu vysoká (Rosado et al. 2010; Roth et al. 2016).

Mondo et al. (2020a) provedli rozsáhlou studii se psy, ve které porovnávali střevní mikrobiom psů zdravých, agresivních a psů s fobiemi. Rozdíly ve složení střevního mikrobiomu u psů s fobií oproti psům bez těchto potíží jsou spekulativní. Výjimku tvoří čeleď Rikenellaceae a rod *Lactobacillus* se známými probiotickými vlastnostmi, které se u fobických psů vyskytovaly v mírně zvýšeném počtu. Naopak psi s fobiemi od agresivních bylo možné rozlišit díky různým poměrům v počtu čeledí Mogibacteriaceae a Veillonellaceae. Rozdíl v mikrobiomu u psů agresivních v porovnání s neagresivními potvrdil i Kirchoff et al. (2019). Agresivní psi nejen že měli jedinečný střevní mikrobiom, ale celková struktura byla pozměněna.

Mikrobiom psů je navíc spojován s dalšími zdravotními stavy, jako je zánětlivé onemocnění střev a akutní průjem (Suchodolski 2016), což vede k nepohodlí nebo bolesti, které by také mohli přispět k podrážděnosti nebo agresi psa.

3.4 Behaviorální projevy psů a pobyt v útulku

Nevhodné chování psů je běžným problémem, proč je lidé opouštějí a umísťují do útulků. Pracovníci v útulcích musí těmto problémům s chováním čelit, ale ne vždy jsou pokusy o nápravu úspěšné (Mondo et al. 2020a). Pobyt v útulku je pro psa velmi stresující (Hennessy 2013; Shiverdecker et al. 2013; Hoffman et al. 2019; Righi et al. 2019; Amaya et al. 2020). Stresory pro psy v útulku jsou nové zvuky, pachy, lidé a cizí psi i denní program typický pro útulek (Titulaer et al. 2013; Hoffman et al. 2019).

Mezi nejčastěji pozorovanou poruchu chování psa patří agresivita, následuje separační úzkost a různé fobie. Agresivita je osobnostní rys psů ovlivňovaný nejen enviromentálními složkami jako je nedostatečná socializace a učení, ale také geneticky. Charakteristické jsou projevy ohrožení, což zahrnuje vrčení, vyceněné zuby, zvednutý ocas, které může přerůst až v napadení a kousnutí. Fobie je charakterizována jako strach z konkrétní věci, kterou si jedinec může během života zvýšit intenzitou vystavení se té věci, nebo náhlým panickým vzrušením. Při fobiích pes prožívá dlouhodobý, intenzivní pocit strachu. Jak agrese, tak fobie jsou projevy úzkostných poruch a jsou pro organismus psa velmi stresující (Walker et al. 1997; Sherman & Mills 2008). Působící stresor ovlivňuje homeostázu organismu, který reaguje aktivací HPA osy a produkcí glukokortikoidů. Pokud stresor působí dlouhodobě, dochází ke změnám ve střevním mikrobiomu ovlivňované osou střevo-mozek (Mondo et al. 2020a).

Bylo zjištěno, že interakce s člověkem je schopna snížit glukokortikoidní odezvy psů na přesunutí do útulku a také na další stresory, kterými jsou psi v útulcích vystaveni. Kromě snížení koncentrace kortizolu vykazovali psi v menší míře i strach, nervózní chování a méně vokalizovali (Hennessy 2013; Shiverdecker et al. 2013). Toto snížení hladiny glukokortikoidů bylo pozorováno jak během interakce s člověkem, tak i delší dobu po ní. Bylo zjištěno, že doba

interakcí trvající kolem 30 minut má pozitivní účinky. Spolu s pokračujícím pokrokem v porozumění mechanismům a zprostředkovatelům HPA odpovědí nabízejí tyto nové informace příslib nalezení stále praktičtějších prostředků ke snížení fyziologického dopadu stresu, a tím ke zlepšení pohody psů (Hennessy 2013).

3.5 Molekulárně biologické metody pro analýzu střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom je složitý a dynamický ekosystém, proto nejlepším diagnostickým přístupem by byla kombinace molekulárních metod, které po izolaci DNA zahrnují PCR amplifikaci 16S rRNA genů pomocí širokých univerzálních bakteriálních primerů. Použití 16S rRNA genů je užitečným nástrojem pro hodnocení střevního mikrobiomu, protože tento přístup poskytuje taxonomický přehled všech bakteriálních skupin celého mikrobiomu. Následovala by analýza amplikonů sekvenováním nové generace (NGS) a přímá kvantifikace specifických bakteriálních taxonů pomocí kvantitativní PCR (qPCR) (Suchodolski 2016).

3.5.1 Izolace DNA

Izolace DNA mikrobiální komunity ze vzorku má zásadní význam pro úspěšné zjištění zastoupení jednotlivých mikroorganismů. Zastoupení mikroorganismů ve střevech je velmi různorodé a je potřeba provést izolaci co nejefektivněji, aby se různé struktury jednotlivých buněčných obalů mikroorganismů rozpadly. Metod pro izolaci DNA je několik, některé se zaměřují přímo na určitou komunitu mikroorganismů, jiné univerzálně na všechny mikroorganismy zastoupené ve vzorku (Šmarda 2005).

Izolace DNA je proces získávání buněčné DNA ze zkoumaných vzorků (výkaly, sliny, trávenina, …). Aby se nedošlo k degradaci DNA je potřeba mít vzorek čerstvý, lyofilizovaný nebo zamražený. Před samotnou izolací je také vhodné vzorek zbavit větších částic, homogenizovat, promýt. Základním krokem při izolaci DNA je rozbití, lyze, buněčné stěny všech buněk, a to buď mechanicky, teplotně nebo chemicky. Nejčastěji je lyze prováděna pomocí detergentů, chaotropních látek rozrušujících vodíkové můstky a rozpouštědel. Konkrétně u bakteriální buněčné stěny je využíván enzym lysozym, detergenty pro rozrušení cytoplazmatické membrány a jako činidlo pro destabilizaci vnější buněčné stěny se využívá ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Lyze buněčné stěny vede k uvolnění buněčného obsahu do záchytného roztoku. Speciální kolonky s filtrem oddělují nukleové kyseliny od nežádoucích složek, jako jsou zbytky buněčné stěny, lipidy, proteiny, sacharidy a inhibitorů PCR. Je potřeba zachytávané nukleové kyseliny několikrát promývat. Izolovaná DNA je uchovávána ve vhodném pufru (Inglis et al. 2012).

K izolaci DNA jsou v laboratořích často využívány komerčně dostupné sady, které obsahují všechny potřebné materiály a roztoky k provedení izolace.

3.5.2 Stanovení kvality a koncentrace DNA

Kvalita a přesná koncentrace izolované DNA je velmi důležitá pro další analýzy. Pro ověření, zda se DNA podařilo ze vzorku izolovat, se používá přímá fotometrie v UV oblasti nejčastěji pomocí přístroje spektrofotometru. Přibližná koncentrace DNA se vypočítá z hodnot naměřené absorbance při 260 nm, což je vlnová délka, kterou jsou nukleové kyseliny schopny absorbovat. Absorbance rovna 1,0 odpovídá 50 μg/ml dsDNA. Kvalitu, tedy zda DNA obsahuje kontaminanty lze určit z poměru hodnot absorbance 260 nm a 280 nm. Záření o vlnové délce absorbují některé bílkoviny, které jsou hlavní nežádoucí složkou v čistotě DNA. Optimální hodnoty absorbance pro čistou DNA jsou 1,8-2,0. K určení čistoty DNA bývá využíván i poměr absorbancí při 230 nm a 260 nm. Vlnová délka 260 nm určuje absorbanci nukleových kyselin a vlnová délka 230 nm je specifická pro absorbanci nízkomolekulárních látek jako je například fenol, polysacharidy, kyselinu edetovou (EDTA). Optimální hodnota poměru absorbancí by v tom případě u čisté DNA měla přesáhnout 2,0 (Šmarda 2005).

3.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Při studiu střevního mikrobiomu je pro identifikaci bakterií podstatná pouze část genetické informace a to konkrétně gen 16S rRNA. Tento gen obsahuje oblasti specifické pro konkrétní skupiny nebo druhy bakterií. Aby se tento gen získal, je potřeba použít metodu zvanou polymerázová řetězová reakce (PCR). Při této metodě dochází k amplifikaci (množení) malých segmentů vybrané části DNA použitím enzymu DNA polymerázy. Gen pro amplifikaci se ohraničí pomoci primerů, krátkých oligonukleotidů DNA. Aby reakce proběhla správně je potřeba dodat také stavební jednotky DNA, nukleotidy adenin, cytosin, thymin, guanin a také ionty pro vytvoření ideálního prostředí pro správnou funkci enzymu. Metoda PCR probíhá za tepla, proto je pro reakce potřeba použít termostabilní enzym DNA polymerázu, která byla izolována z bakterií žijících v horkých pramenech (Inglis et al. 2012).

Reakce se uskutečňuje v termocykleru. Je to přístroj, který v určitých intervalech mění teplotu a tím zajišťuje optimální podmínky pro práci DNA polymerázy. Reakce probíhá v cyklech a každý cyklus za ideálních podmínek zdvojnásobí počet kopií daného genu. Každý cyklus začíná denaturací, tedy rozpadem vodíkových můstků mezi nukleotidy DNA při teplotě 95°C. Následuje hybridizace, nasednutí primerů na správné sekvence při teplotě kolem 55°C. Poslední fází cyklu je elongace, tedy syntéza nových řetězců při vyšší teplotě kolem 70°C. Teplota každé fáze se upravuje dle konkrétních primerů (Bacchetti De Gregoris et al. 2011).

Purifikace DNA

Purifikací, neboli přečišťováním, jsou nukleové kyseliny zbavovány nežádoucích kontaminantů vzorku, jako jsou proteiny, detergenty, soli aj. Purifikace se provádí jako součást procesů při izolaci DNA, elektroforetické separaci nebo po PCR reakci (Šmarda 2005).

3.5.4 Elektroforetické separace nukleových kyselin

Principem elektroforetických separací je pohyb nukleových kyselin ve stejnosměrném elektrickém poli, kdy nukleové kyseliny, které mají záporný náboj, se pohybují ke kladně nabité anodě (Šmarda 2005).

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza využívá gelu, nejčastěji agarového, případně polyakrylamidu, který zpomalí pohyb DNA a to se začne dělit dle velikosti jednotlivých fragmentů nukleových kyselin. Kratší fragmenty putují gelem rychleji než delší. Při elektroforéze se využívá velikostních standardů, markerů, podle kterých se snadněji určí velikost sledovaného DNA. Ke zviditelnění průběhu elektroforézy se do gelu přidává např. ethidium bromid, který pod UV světlem zviditelní fragmenty DNA (Šmarda 2005). Gelová elektroforéza se využívá jako kontrola, zda PCR proběhla správně.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza je kvalitativní metoda a dělí stejně dlouhé fragmenty DNA dle rozdílných sekvencí, s přesností až jednoho páru bazí. DGGE je vertikálně probíhající elektroforéza. Náplní je polyakrylamidový gel obsahující lineárně rostoucí gradient denaturantů, které rozplétají dvojvlákno DNA. Rychlost denaturace závisí na sekvenci DNA, guanin-cytosin páry bazí jsou pevnější kvůli třem vodíkovým můstkům, které je spojují, na rozdíl od páru adenin-thymin, který spojují dva vodíkové můstky. Vzniklé pásy tvoří elektroforetický profil mikrobiomu z analyzovaného vzorku (Jiang et al. 2018a).

3.5.5 Real-time PCR (qPCR)

Real-time PCR je kvantitativní verzí metody klasické PCR a umožňuje nám rychlou a vysoce výkonnou kvantifikaci a detekci cílových mikrobiálních skupin. Při kvantitativní PCR je možnost sledovat tvorbu amplikonu v reálném čase. Koncentrace amplifikovaného genu je přímo úměrná rychlosti probíhající reakce. Při qPCR je monitorována fluorescence v jednotlivých cyklech. Fluorescenční barviva např. SYBR se zabudovávají do PCR produktů během reakce (Kralik & Ricchi 2017).

3.5.6 Sekvenování nukleových kyselin dle Sangera

Sekvenováním DNA se stanoví pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Sangerovo sekvenování je založeno na specifické inhibici enzymové syntézy řetězců DNA, modifikace klasické PCR. Fragmenty DNA získané z PCR s přesně definovanými konci jsou podmínkou pro úspěšné sekvenování. Pokud by do reakce vstoupily dva nebo více templátových fragmentů DNA, nebylo by ve výsledku možné určit, které bakterii daný nukleotid patří.

Do reakce dle Sangera vstupuje DNA, která má být pomoci DNA polymerázy kopírována. DNA polymeráza syntetizuje nové vlákno DNA od primeru a umísťuje stavební jednotky podle komplementarity bazí templátového vlákna. Stavebními jednotkami jsou nukleotidy (dNTP), které DNA polymeráza přikládá a pokračuje v syntéze. Do reakce vstupují také modifikované nukleotidy (ddNTP), které jsou fluorescenčně značené a při připojení DNA polymerázou k templátovému vláknu zastavují reakci. Výsledkem je směs různě dlouhých produktů, které jsou zakončeny fluorescenčně zbarvenými nukleotidy. Po separaci v kapilární elektroforéze je detekovaná fluorescence a z délky a signálu se skládá sekvence DNA (Šmarda 2005)

3.5.7 Sekvenování nové generace (NGS)

Na rozdíl od sekvenování dle Sangera lze při sekvenování nové generace sekvenovat neomezený počet různých fragmentů DNA. Dochází k sekvenování několika vláken až celého genomu současně. Tato metoda umožňuje nejpodrobnější pohled na zkoumanou DNA a v současné době je považována za vrcholnou molekulárně genetickou analýzu (Suchodolski 2016).

4 Metodika

4.1 Výběr psů pro výzkum

Výzkumu se zúčastnilo celkem 49 psů, od kterých byly odebrány vzorky exkrementů pro analýzu střevního mikrobiomu. U vybraných psů bylo sledováno plemeno, věk, kastrace, kondice, typ krmiva, chování. Podrobný přehled všech psů viz Příloha 1 a 2.

Vzorky se odebíraly u psů z Útulku pro opuštěná zvířata Městské policie hl. m. Prahy (n = 18) a z Útulku pro opuštěné a zatoulané psy v Trutnově (n = 8). Podmínky ubytování psů byly v obou útulcích shodné. Psi byli umístěni jednotlivě. Kotec měl vnitřní uzavřený prostor v budově s možností vylézt do venkovního kotce s mřížemi. Pokud to bylo v zájmu ochrany sebe i psa možné, denně byli psi přibližně hodinu venčeni a byli v kontaktu s ošetřovateli.

Chování psů z útulků bylo subjektivně hodnoceno zkušenostmi pracovníků a veterináře a jednotlivá zvířata byla dělena na agresivní (n = 12), fobická (n = 3) a nevykazující abnormální chování (n = 11). U psů z útulku bylo podmínkou, aby v něm zvíře pobývalo min. 4-6 měsíců. Do výzkumu se nezapojovala zvířata, která dostávala antibiotika v méně než třech týdnech před sběrem exkrementu.

U psů z domácího prostředí (n = 23) bylo podmínkou, aby nebyli chováni ve venkovním kotci, ale v domácnosti chovatelů. Opět bez užívání léčiv, které by mohly ovlivnit složení střevního mikrobiomu.

4.2 Sběr a skladování exkrementů pro analýzu střevního mikrobiomu

Celkem bylo sesbíráno 49 vzorků z nichž 26 od psů z útulků a 23 od psů z domácího prostředí během měsíců od září do prosince.

Vzorky exkrementů u skupiny psů v útulcích byly odebírány v ranních hodinách před úklidem kotců kolem 7. hodiny ranní. Exkrementy se sbíraly do sterilních kontejnerů a následně byly zamrazeny při -20 °C až -40 °C a uchovány až do následného zpracování v laboratoři.

Vzorky exkrementů u skupiny psů z domácího prostředí byly odebírány bezprostředně po defekaci při ranním, či večerním venčení. Exkrementy byly sbírány do stejných sterilních kontejnerů a shodně zamrazeny až do zpracování v laboratoři.

Vzorky byly zpracovávány v laboratoři Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky.

4.3 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byla použita komerční sada QIAamp® PowerFecal® DNA Kit. Postupovalo se dle přiloženého protokolu (Qiagen 2017) výrobce s menšími úpravami, které budou uvedeny

níže v postupu. Výrobce doporučuje použít množství do 0,25 g fekálního vzorku. Přesné složení využívaných roztoků pro izolaci výrobce neuvádí.

Odvážené množství vzorku mezi 0,15 g a 0,20 g bylo vloženo do zkumavky Dry Bead Tube (dodáno výrobcem), která obsahuje kuličky pro lepší mechanickou homogenizaci vzorku. Do zkumavky se přidalo 750 µl PowerBead roztoku a 60 µl roztoku C1, který obsahuje detergent narušující buněčné stěny a denaturuje bílkoviny, vše se promíchalo. Zkumavky se poté 10 minut zahřívaly ve vodní lázni při 70 °C (výrobce uvádí 65 °C), kdy zvýšená teplota podporuje reakci pro rozklad buněk a k homogenizaci se použil přístroj FastPrep-24™ při rychlosti 6,5 m/s a délce vortexování 1 min. Tyto dva kroky se opakovaly ještě jednou. Poté se zkumavky centrifugovaly při 13 000 rcf po dobu 1 minuty.

Supernatant o objemu 500 µl byl přemístěn do čisté 2 ml zkumavky a přidáno 250 µl roztoku C2. Směs byla inkubována při 2-8 °C po dobu 1 minuty a poté centrifugována při 13 000 rcf po dobu 1 minuty. Supernatant o objemu 600 µl se opět přesunul do čisté 2 ml zkumavky a přidalo se 200 µl roztoku C3. Směs se opět inkubovala při 2-8 °C po dobu jedné minuty a při stejných otáčkách centrifugována. Supernatant o maximálním objemu 750 µl se přesunul do čisté zkumavky a přidalo se 1200 µl roztoku C4. Roztok C4 je činidlo zajišťující vysrážení anorganické a organické složky neobsahující DNA. 650 µl této směsi se přesunulo na kolonku s filtrem umístěnou ve zkumavce a centrifugovala se opět při 13 000 rcf po dobu 1 minuty a směs, která protekla se vylila. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován.

Do kolonky bylo přidáno 500 µl roztoku C5 a centrifugována při stejných podmínkách. Roztok C5 obsahoval ethanol, který slouží k čistění DNA od solí a jiných kontaminantů. Obsah ve zkumavce pod kolonkou byl vylit a zkumavka s kolonkou ještě jednou centrifugována. Poté byla kolonka opatrně přemístěna do čisté 2 ml zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 100 µl roztoku C6 (eluční činidlo), který centrifugací uvolnil DNA zachycenou ve filtru do zkumavky. Takto izolovaná DNA je připravena k dalšímu použití.

Na přístroji NanoDrop One byla změřena koncentrace izolované DNA.

Izolace DNA byla provedena u 49 vzorků a následně skladována při teplotě – 26 °C do dalšího použití.

4.4 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE

4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro zjištění bakteriálního zastoupení ve střevním mikrobiomu je potřeba amplifikovat úsek DNA kódující 16S rRNA, který obsahuje variabilní úseky, které jsou specifické pro jednotlivé bakterie.

Tabulka 1: Složky a množství pro přípravu PCR reakce

izolovaná DNA	1 µl
PCR mix – OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	15 µl
forward primer (10× 338GC)	1 µl
reverse primer (10× 534R)	1 µl
dH_2O	12 µl

Do 1,5 ml zkumavky se smíchaly všechny složky dle Tabulky 1 pro 49 vzorků, kromě izolované DNA. Do 49 mikrozkumavek se poté napipetovalo 29 µl směsi a přidala se izolovaná DNA. Mikrozkumavky byly umístěny do termocykleru Biometra TAdvanced a byl spuštěn program s parametry uvedenými v Tabulce 2. Kontrola správně proběhnuté PCR reakce byla ověřena agarózovou elektroforézou.

Tabulka 2: Přesný průběh PCR reakce

krok	délka trvání	teplota (°C)	počet opakování
1	5 min	95	
2	30 s	95	34×
3	20 s	58	
4	40 s	72	
5	5 min	72	
6	∞	8	

4.4.2 Agarózová elektroforéza

Agarózový gel (1,5%) pro předpokládanou velikost fragmentů DNA 200 pb (párů bazí) byl připraven dle Tabulky 3. TBE pufr s agarózou byly míchány a zahřívány v kádince na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění a provaření. Kádinka byla odstavena z míchadla, aby zchladla a mohl se přidat ethidium bromid, který slouží jako barvivo pro zvýraznění DNA pod UV světlem.

Gel zchladlý na přibližně 40-50 °C byl přelit do vaničky a byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro vzorky DNA. Po 20 minutách gel ztuhl, vytáhl se hřebínek, a gel byl přemístěn do elektroforetické vany. Ta byla naplněna 0,5% TBE pufrem do úplného ponoření gelu. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl standardu DNA Markeru 200-1500 col. od firmy Top-Bio s.r.o. Do dalších jamek se postupně pipetovaly 3 µl vzorků získaných z PCR reakce. Vzorky je potřeba nanášet co nejrychleji, aby nedocházelo k jejich degradaci.

Tabulka 3: Složky a množství potřebné pro přípravu 1,5% agarózového gelu

PCR agaróza	1,5 g
pufr TBE 0,5%	100 ml
ethidium bromid	3 µl

Po naplnění jamek se elektroforetická vana zavřela víkem, propojili se elektrody a nastavilo se napětí na 100 V po dobu 30 minut. Záporně nabité DNA se tak začalo prostupovat gelem ke kladně nabité elektrodě. Po skončení elektroforézy se gel přemístil do transiluminátoru BIO RAD Molecular Imager Gel DocTM XR+ a pomocí programu Image Lab byl gel vyfocen. U všech 49 vzorků byly jasné úseky o velikosti 200 pb v porovnání se standardem. Tím se potvrdila úspěšná PCR reakce.

4.4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Základem DGGE byla příprava akrylamidového gelu s gradientem a spuštění DGGE proběhlo v zařízení DCode™ Universal Mutation Detection System. Protokol postupu přípravy celé metody byl proveden dle Muyzera et al. (1993).

Tabulka 4: Složky a množství potřebné pro přípravu roztoků na gel

	denaturační síla	
chemikálie	**35%**	**60%**
40% akrylamid (ml)	5,560	5,560
50× TAE (ml)	0,500	0,500
formamid (ml)	3,500	6,000
močovina (g)	3,675	6,300
dH_2O (ml)	12,250	9,500

Dle Tabulky 4 se připravují dva roztoky o různé denaturační síle, která je potřebná k vytvoření gradientu gelu. Denaturační síla gelu je v rozmezí 35–60 % a způsobuje postupnou denaturaci DNA. Složky, které zapříčiňují denaturaci DNA jsou formamid a močovina. Rychlost pohybu dsDNA v síťovaném gelu závisí na její molekulové hmotnosti.

Vzhledem k vyššímu počtu vzorků, na který bylo potřeba vytvoření tří gelů, se do zásobovacích nádob připravilo trojnásobné množství jednotlivých roztoků. Roztoky vydrží uchovávané v lednici až jeden měsíc.

Zařízení pro DGGE je potřeba složit a připravit před vytvořením gelu. DGGE je vertikální elektroforéza, které probíhá v tanku o objemu 7 l naplněný 1% TAE pufrem (tris-acetátový pufr). Pufr vede proud a musí být zahřát na teplotu 60 °C. Gel se připravuje mezi dvě skla upevněná rameny z obou stran. Na stranách mezi skly jsou gumové vložky, které vytvoří mezeru pro gel a zároveň zabrání vytečení gelu. Celá sestavená aparatura se po ztuhnutí gelu vloží do připraveného tanku.

Pro přípravu gelu bylo potřeba nalít připravené roztoky dle Tabulky 4 do dvou nádob propojených spojnicí, aby se roztoky mohly promíchat a vytvořit potřebný gradient. 25 ml koncentrovanějšího roztoku bylo nalito do nádoby blíže výpusti a 25 ml slabšího roztoku do druhé nádoby. Obě spojené nádoby se umístily na magnetickou míchačku a promíchávaly se. Do obou roztoků bylo přidáno 20 µl TEMEDu 200 µl 10% peroxodisíranu amonného pro začátek polymerizace gelu. Poté byla spojnice mezi roztoky otevřena. Na nádoby je

napojeno také čerpadlo, které přečerpávalo gel skrz hadičku s jehlou mezi připravená skla. Po naplnění byl do gelu vložen hřeben pro vytvoření jamek pro nanesení vzorků. Polymerace gelu trvala 50 minut.

Po uplynutí doby byl z gelu vyjmut hřeben pro vytvoření jamek a celá aparatura byla vložena do připraveného tanku se zahřátým 1% TAE pufrem na 60 °C. Jamky byly vypláchnuty pufrem, aby v nich nezůstaly bubliny, které by zkreslovaly výsledek. Poté bylo do jamek postupně pipetováno 25 vzorků o objemu 27 µl. Po nanesení vzorků byl tank uzavřen a zapnulo se zahřívání s přívodem proudu. Do dosažení 60 °C bylo napětí 30 V, po dosažení teploty 60 °C v tanku se napětí zvýšilo na 60 V a takto to běželo přibližně 18 hodin.

Po ukončení DGGE byl gel opatrně vyjmut z tanku a vložen do čtvercové plastové nádoby. Ke gelu se přidalo 50 ml 1% pufru TAE a 5 µl barviva SYBR Green. Gel se s barvivem pomalu promíchával 30 minut, aby došlo k navázání barviva na nukleové kyseliny.

Obarvený gel byl přemístěn do transiluminátoru BIO RAD Molecular Imager Gel DocTM XR+ a pomocí programu Image Lab byl gel vyfocen. Fotka gelu byla barevně konvertována, aby byly bandy DNA černé na bílém pozadí. Byl také upraven kontrast, aby bandy lépe vynikly. Fotka gelu byla vytisknuta a byly vybrány významné výrazné bandy pro další zpracování.

U krajů gelu dochází k tzv. smile efektu (zkreslení výsledků). Vzhledem k počtu vzorků tak musely být stejným způsobem pro všechny vzorky připraveny ještě další dva gely a celkem se tedy metoda DGGE dělala třikrát.

4.5 Příprava vzorků DNA pro Sangerovo sekvenování

Celkem 17 vybraných významných úseků z gelu po provedené DGGE bylo skalpelem vyříznuto na desce s UV zářením a umístěno do 1,5 ml zkumavky se 100 µl dH_2O.

4.5.1 PCR a agarózová elektroforéza významných bandů

Vyříznuté bandy s dH_2O byly centrifugovány 10 min při 10 000 rpm a použity jako templát pro PCR. Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 5. Průběh PCR byl stejný jako je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 5: Složky a množství pro přípravu PCR reakce

templát	4 µl
PCR mix – EliZyme™ FAST Taq MIX Red	15 µl
forward primer (10× 341FP)	1 µl
reverse primer (10× RP534)	1 µl
dH_2O	9 µl

Úspěšnost PCR reakce byla zkontrolovány agarózovou elektroforézou stejným způsobem viz oddělení 4.4.2. Všechny produkty PCR reakce byla v porovnání se standardem výrazné při 200 pb.

4.5.2 Purifikace DNA

Pro purifikaci DNA byl použit komerčně dostupný kit Monarch® PCR DNA Cleanup. Postupovalo se přesně dle návodu od výrobce. Přesné složení používaných roztoků není uvedeno.

Jako produkt PCR bylo získáno 27 µl roztoku DNA, ke kterému bylo přidáno dle poměru 5:1 135 µl roztoku Cleanup Binding Buffer. Poměr 5:1 je určen pro dsDNA 2 < kb (amplikony, fragmenty). Promíchaný vzorek byl přesunut do kolonky s filtrem, umístěné ve zkumavce, a centrifugován při 16 000 rcf po dobu 1 minuty. Proteklý obsah byl vylit. Poté se do kolonky přidalo 200 µl roztoku DNA Wash Buffer a znovu centrifugovalo při 16 000 rcf po dobu 1 minuty. Tento krok byl opakován ještě jednou a proteklý obsah znovu vylit. Poté byla kolonka opatrně přemístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a nechána otevřena 1 minuty, aby vyprchal zbytkový ethanol, který obsahoval roztok DNA Wash Buffer, který sráží DNA. Pro uvolnění DNA z kolonky bylo použito 25 µl roztok DNA Elution Buffer a znovu centrifugováno při 16 000 rcf po dobu 1 minuty. Ve zkumavce zůstala pročištěná DNA, jejíž koncentrace byla změřena na přístroji NanoDrop One.

Pro sekvenační reakci bylo potřeba smíchat 3 µl vzorku s 2,5 µl primeru a 4,5 dH_2O do 200 µl zkumavek. Využilo se dvou typů primerů (10× 341FP, 10× 534RP), jednotlivě pro všechny vzorky, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků. Vzniklo tedy 17 vzorků s kódujícím primerem (forward) a 17 vzorků s nekódujícím primerem (reverse). Všech 34 vzorků bylo vloženo do obálky a byly poslány sekvenovací firmě SEQme s.r.o.

4.6 Zpracování sekvencí

Firma SEQme s.r.o. posílá výsledky ze Sangerova sekvenování v několika formátech. Použil se formát AB1, kde byla sekvence nukleotidů zapsána příslušnými písmeny bazí v řadě za sebou.

Každý vzorek byl sekvenován dvakrát s rozdílnými primery. Sekvenace proběhla z obou stran daného fragmentu. Od každého vzorku byly získány tedy dvě sekvence nukleotidů, které se pomocí bioinformatického softwaru Geneious prime (dostupný na webové stránce www.geneious.com) spojily dohromady, na základě komplementarity bazí. Cílem bylo získat co nejpřesnější sekvenci.

Program Geneious generuje chromatogramy s písmenným zápisem sekvence nukleotidů. Výsledný zápis sekvence byl exportován do genetické databáze NCBI a porovnáván algoritmem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dostupným na webové stránce https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Pro porovnávání byla vybrána ribosomální RNA databáze, konkrétně 16S rRNA bakteriální databáze.

4.7 Kvantitativní metoda qPCR

Pro qPCR byla použita izolovaná DNA naředěná na cca 20 ng/ µl.

Směs pro průběh kvantitativní polymerázové řetězové reakce se připravuje podobně jako pro klasickou PCR dle Tabulky 6. Celkový objem pro jeden vzorek v reakci byl 20 µl. Nejdříve se připravovala směs všech složek, kromě izolované DNA, pro 50 reakcí. Do této směsi bylo přidáno 10 µl barviva (10× R OX Additive). Tato směs byla pipetována do destičky po 19 µl, ke které bylo později přidáno po 1 µl 49 vzorků izolované DNA.

Tabulka 6: Složky a množství pro přípravu qPCR reakce

izolovaná DNA	1 µl
Elizyme qPCR green MIX	10 µl
forward primer	0,5 µl
reverse primer	0,5 µl
dH_2O	8 µl

Reakce, dle postupu výše, se dělaly celkem čtyři podle toho, který kmen bakterií byl kvantifikován. Nejdříve byl použit univerzální primer pro celkový počet bakterií, dále pro kmeny Firmicutes, Bacteroidetes a Fusobacteria. Použité primery 10× naředěné pro kmeny bakterií jsou sepsány v Tabulce 7.

Tabulka 7: Typy primerů použitých v qPCR reakci pro kmeny kvantifikovaných bakterií

kmen bakterií	**univerzální**	***Firmicutes***	***Bacteroidetes***	***Fusobacteria***
forward primer	10× 926F	10× 928F	10× 798cfbF	10× Fuso1
reverse primer	10× 1062R	10× 1040FirmR	10× cfb967R	10× Fuso2

Naplněná destička se zalepila folií, aby se tekutina z ní neodpařovala v průběhu reakce, a vložila se do přístroje QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System. Průběh celé qPCR reakce je uveden v Tabulce 8. Průběh qPCR a použité primery byly vybrány dle studie Bacchetti De Gregoris et al. (2011).

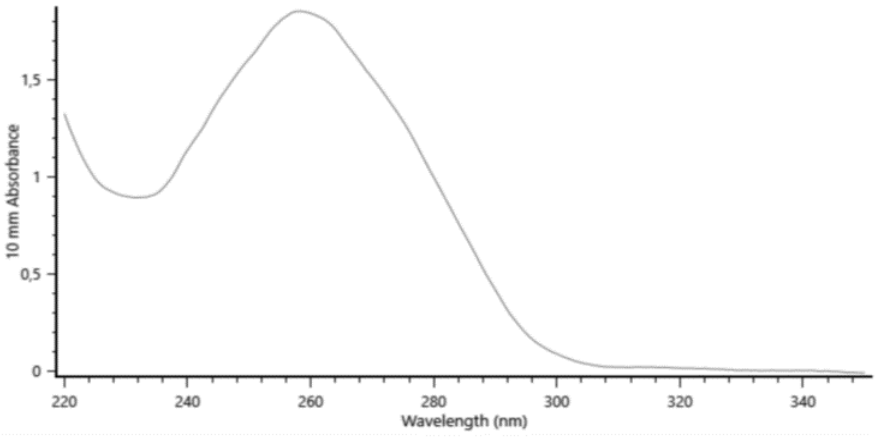
Tabulka 8: Přesný průběh qPCR

krok	**délka trvání**	**teplota (°C)**	**počet opakování**
1	5 min	95	
2	15 s	95	32×
3	15 s	61,5	
4	20 s	72	

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena u všech 49 získaných vzorků pomocí komerční sady QIAamp® PowerFecal® DNA Kit. Získaná koncentrace DNA byla změřena na přístroji NanoDrop One při vlnové délce 260 nm (Obrázek 1). Naměřené koncentrace izolované DNA se pohybovaly v rozmezí od 15,812 ng/µl do 170,772 ng/µl.

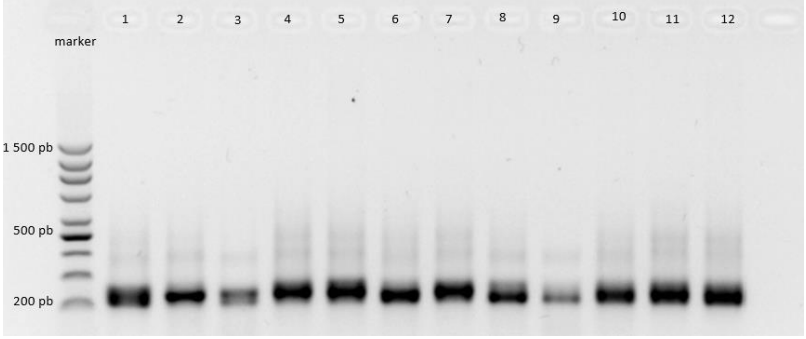


Obrázek 1: Absorpční spektrum nukleové kyseliny vzorku č. 16 o naměřené koncentraci 92,01 ng/µl, A260/280 = 1,85 a A260/230 = 2,05. Změřené na přístroji NanoDrop One.

Čistotu DNA určuje poměr absorbancí A260/A280. Ideální je rozpětí mezi 1,8-2,0, pokud je číslo nižší, DNA je kontaminována bílkovinami nebo jinými reagenciemi.

5.2 Ověření úspěšnosti PCR reakce agarózovou elektroforézou

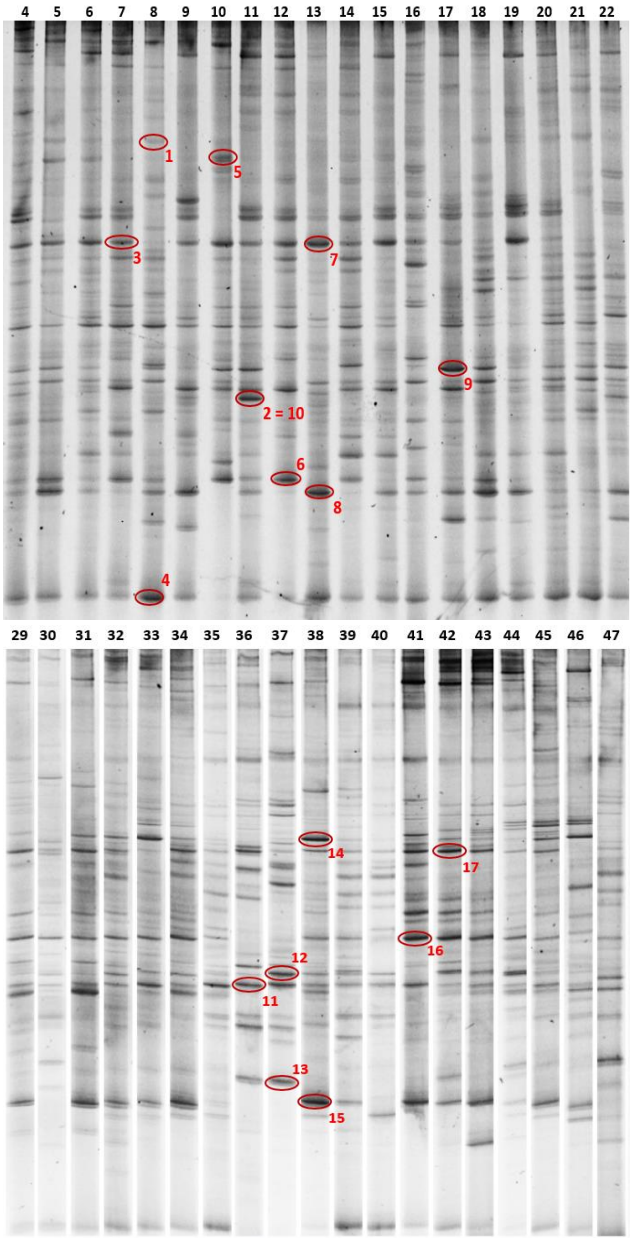
Úspěšnost PCR reakce potřebná před metodou DGGE byla ověřena agarózovou elektroforézou. Namnožené úseky DNA byly obarveny ethidium bromidem a pod UV světlem vyfoceny. Na Obrázku 2 vlevo byl nanesen standard (velikostní marker firmy Top-Bio s.r.o.), podle kterého se určuje velikost DNA ze vzorku. Jasně viditelné černé úseky jsou požadované úseky DNA o velikosti 200 pb. Všechny produkty PCR reakce obsahovaly dostatečné množství pro další analýzu.



Obrázek 2: Kontrolní agarózová elektroforéza prvních 12 vzorků po PCR.

5.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza byla kvůli kapacitě zařízení provedena třikrát. Z vizualizovaného profilu pod UV světlem bylo vybráno 17 významných úseků (viz Obrázek 3) DNA pro sekvenaci.

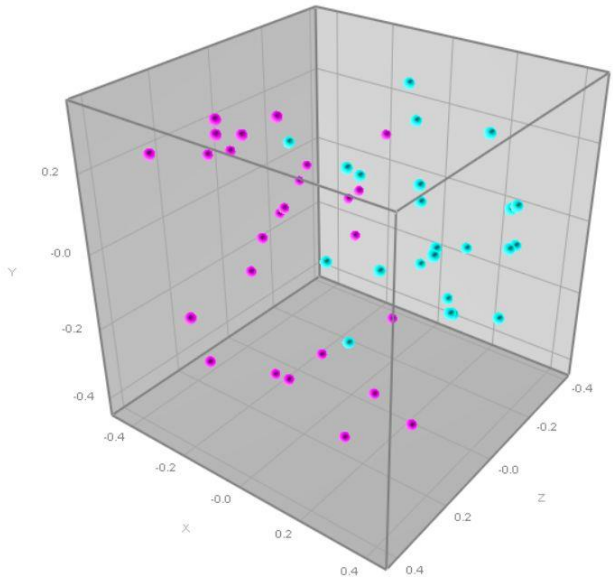


Obrázek 3: Výsledné DGGE s vyznačenými 17 úseky, které byly vyjmuty a sekvenovány firmou SEQme s.r.o. Co svislý pás, to jeden vzorek označený svým číslem pro analýzu.

Předpokládalo se, že v jedné vodorovné linii se vyskytují shodné bakterie. Čím jasnější úsek byl, tím větší koncentrace DNA obsahovala a byla větší pravděpodobnost úspěšné identifikace. Reprezentativní úseky byly vybírány dle shodného výskytu u více zvířat, případně ty, které byly ojedinělé. Všech 17 vybraných úseků bylo připraveno dle pokynů firmy SEQme s.r.o., kam byly zaslány a sekvenovány metodou Sangerova sekvenování.

Výsledné profily z DGGE byly v bioinformatickém softwaru Bionumerics sloučeny dohromady, srovnány a na základě vložených dat porovnány rozdíly mezi jednotlivými skupinami zvířat.

Na Obrázku 4 je pomocí metrické techniky vícerozměrného škálování (PCoA) vizualizován skupinový rozdíl. Modré body představují jedince z domácího prostředí, fialové body jedince z útulků. Čím blíže jsou si jednotlivé body, tím více jsou si podobné.



Obrázek 4: Metrická technika vícerozměrného škálování vytvořená pomocí softwaru Bionumerics (PCoA). Modré body – jedinci z domácího prostředí, fialové body– jedinci u útulků.

5.4 Vyhodnocení Sangerova sekvenování

Již při sestavování chromatogramu a výsledné sekvence v bioinformatickém softwaru Geneious bylo patrné, že zpracování úseků DNA z gelu nebylo zcela přesné. Charakteristické značení bazí DNA čtyřmi písmeny v nukleotidové sekvenci (A, C, G, T) bylo při nerozpoznatelné bázi nahrazeno písmenem zcela jiným (W, Y, ...), které poukazovalo na chybu při čtení sekvence. Tím vznikala v sekvenci neidentifikovatelná místa, která znemožňovala přesné určení druhů bakterií.

5.4.1 Identifikace bakterií

K identifikaci bakterií dle jejich nukleotidových sekvencí připravených ze softwaru Geneious bylo využito genetické databáze NCBI a algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), online dostupné na webové stránce https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Algoritmus BLAST porovnává vloženou sekvenci se sekvencemi bakterií již dříve identifikovanými. K porovnávání nabízí několik databází.

Nukleotidová sekvence každého úseku byla vložena do databáze, konkrétně do bakteriální databáze 16S rRNA, se kterou byly sekvence porovnávány.

Například nukleotidová sekvence úseku zpracovávaného pod č. 4 měla po vyhodnocení algoritmem BLAST 99% shodu s druhem bakterie *Peptacetobacter (Clostridium) hiranonis.*

5.4.2 Přehled identifikovaných bakterií

Při identifikaci bakterií algoritmem BLAST byla hledána největší shoda nukleotidové sekvence s již identifikovanými mikroorganismy v databázi. Tato shoda je udávána jako „identita" a při shodě více jak 97 % je výsledek hledání považován za reprezentativní. Pokud je identita méně než 96 %, předpokládá se, že buď identifikovaný mikroorganismus není v databázi nebo kvalita analyzovaného vzorku nebyla dostatečně reprezentativní.

U analyzovaných 17 úseků DNA (viz Tabulka 9) byly s jistotou určen pouze 1 přesný druh (*Peptacetobacter hiranonis*) a 1 přesný rod (*Faecalicatena sp.*). S menší mírou přesnosti se dále identifikoval 1 konkrétní druh bakterie u 7 úseků se podařilo identifikovat rod. Vzhledem k tomu, že u většiny analyzovaných úseků byla v nukleotidových sekvencích vysoká chybovost, bylo znemožněno určit přesný druhy nebo rody bakterií. Byli jsme schopni zařadit úseky pouze na úrovni čeledí, řádů u úseku č. 14 pouze na úrovni kmenu. Nezdařená identifikace bakterií mohla být způsobena znečištěním vzorku nebo nevhodnými složkami přidanými v průběhu přípravy pro Sangerovo sekvenování.

Při identifikaci se ukázalo, že některé vybrané úseky jsou shodné. Úsek 2 je shodný s úsekem 10, úsek 3 s úsekem 16 a úsek 6 s úsekem 15.

Tabulka 9: Identifikace bakterií a taxonomické zařazení dle algoritmu BLAST a databáze NCBI.

identifikace (NCBI Blast)	identita	úsek	číslo vzorku zvířete	kmen
Prevotella sp.	91%	1	8	*Bacteroidetes*
Lactobacillus sp.	82%	2	11	*Firmicutes*
Fusobacterium sp.	93%	3	7	*Fusobacteria*
Peptacetobacter hiranonis	99%	4	8	*Firmicutes*
Lactobacillus johnsonii	93%	5	10	*Firmicutes*
Bacteroidales		6	12	*Bacteroidetes*
Megamonas sp.	94%	7	13	*Firmicutes*
Erysipelotrichales		8	13	*Firmicutes*
Streptococcus sp.	94%	9	17	*Firmicutes*
Lactobacillaceae		10	11	*Firmicutes*
Blautia sp.	82%	11	36	*Firmicutes*
Faecalicatena sp.	98%	12	37	*Firmicutes*
Enterobacteriaceae		13	37	*Proteobacteria*
Firmicutes		14	38	*Firmicutes*
Bacteroidaceae		15	38	*Bacteroidetes*
Fusobacterium sp.	87%	16	41	*Fusobacteria*
Fusobacteriaceae		17	42	*Fusobacteria*

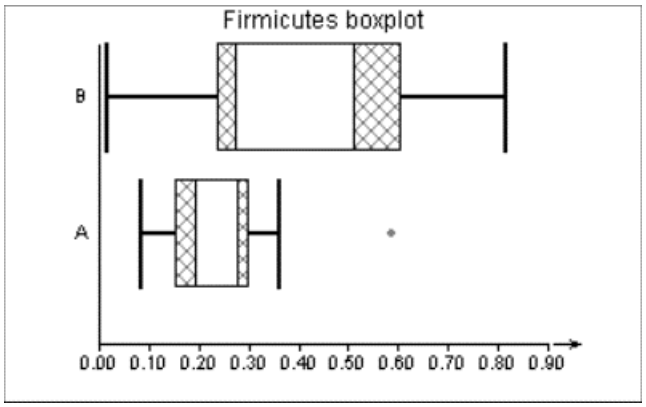
5.5 Vyhodnocení kvantitativní metody qPCR

Metodou qPCR bylo zjišťováno množství 3 bakteriálních kmenů v izolované DNA o objemu 100 µl, které bylo převedeno na počet buněk v 1 gramu výkalů. Zjišťován byl také celkový počet bakterií a konkrétně vybranými kmeny pro kvantifikaci bakterií byly Firmicutes, Bacteriodetes a Fusobacteria.

Nejhojnějším ze tří detekovaných kmenů ve všech vzorcích byl Firmicutes (relativní hojnost 81,4 % - 1,42 %), následoval kmen Bacteroidetes (relativní hojnost 38,06 % - 1,63 %) a nejméně zastoupený byl kmen Fusobacteria (relativní hojnost 10,72 % - 0,02 %).

Pomocí analytického nástroje ANOVA (analýza rozptylu) se porovnávaly relativní počty kmenů mezi skupinami psů z domácího prostředí a útulků. Konkrétně byl použit ANOVA – jeden faktor, který se používá k testování nulové hypotézy na základě F-poměru. Velké hodnoty F-poměru mají za následek nízkou hodnotu p-hodnoty (v tomto případě $p < 0,05$), což znamená zamítnutí nulové hypotézy.

Statisticky významná diverzita se vyskytla pouze u kmene Firmicutes ($p < 0,002$). Zastoupení kmene Firmicutes bylo významně vyšší u psů z domácího prostředí. Znázornění rozdílu je na Obrázku 5. Nulová hypotéza dle nástroje ANOVA nebyla možná zamítnout u kmene Bacteroidetes ($p > 0,655$) a kmene Fusobacteria ($p > 0,157$). Rozdíly v celkovém absolutním počtu buněk na 1 g výkalu mezi skupinami také nebyl statisticky významný ($p > 0,933$) a průměrná hodnota počtu buněk v 1 g výkalu u obou skupin byla 1,42E+10.



Obrázek 5: Krabicový graf znázorňující rozdíly dat kmene Firmicutes mezi skupinou psů z útulku (A) a skupinou psů z domácího prostředí (B).

6 Diskuse

Cílem práce bylo zhodnotit, zda se složení střevního mikrobiomu psů držených v útulcích odlišuje od psů z domácího prostředí. Střevní mikrobiální diverzita z psích exkrementů byla stanovena pomocí metod molekulární biologie. Práce byla zaměřena výhradně na bakterie osídlující střeva, ale součástí střevní mikrobioty jsou i houby, viry a další mikroorganismy. Složení a množství mikroorganismů ve střevech se mění během života v závislosti na aktuálním stavu jedince, jeho stravě, prostředí, onemocnění aj. Dokonce i působení stresorů, kterým jsou psi v útulcích dlouhodobě vystavováni, má značný vliv na skladbu mikrobiomu. Předpokladem tedy bylo, že psi z útulků budou mít odlišnou skladbu střevního mikrobiomu oproti psům z domácího prostředí.

Výběr psů

Jak bylo řečeno, vliv na složení střevního mikrobiomu má nespočet faktorů. Do výzkumu byli vybráni jedinci, kteří se mezi sebou v mnohém lišili, což mohlo mít určitý vliv na konečné výsledky. Studie zmiňují, že vliv na mikrobiom má i věk zvířete, dle studie Vilsona et al. (2018) se střevní mikrobiom od narození štěněte mění až do 18. měsíce věku a s přibývajícím věkem diverzita střevního mikrobiomu má tendenci klesat (Mizukami et al. 2019). Věkové rozpětí jedinců zařazených to tohoto výzkumu bylo od 1 roku do 17 let.

Další vliv na složení střevního mikrobiomu má jednoznačně strava, která u jedinců ve výzkumu také nebyla jednotná a tudíž mohla ovlivňovat složení mikrobiomu jedinců a tím i pohled na výsledky. Převážná většina všech vybraných psů byla krmena granulemi doplňovanými o konzervované maso, či směsi masa a zeleniny. Někteří byli krmeni striktně granulemi a dva jedinci byli krmeni tzv. BARFem, doma připravovaným syrovým masem s různými doplňky jako jsou kosti, zelenina, ovoce atd. Doma připravované syrové maso s sebou nese určitá rizika přenosu nebezpečných druhů bakterií, které negativně ovlivňují střevní mikrobiom (Davies et al. 2019b). Případná přítomnost těchto nebezpečných druhů by měla také vliv na výsledný profil bakterií.

Vliv plemene dle studie Mondo et al. (2020b) nebo Reddy et al. (2019) hraje ve složení mikrobiomu také určitou roli. Němečtí ovčáci měli ve studii z roku 2020 nižší zastoupení kmene bakterií Bacteroidetes než kříženci. Tento trend se v této práci ovšem nepotvrdil. Počet zástupců plemene však nebyl významný. Nicméně není zavrženo, že různorodost plemen mohla výsledky také ovlivnit.

Pro podobnou studii by bylo přínosné ověřit si u psů z útulku, zda opravdu vykazují známky stresu i jinak, než využít pouze subjektivního hodnocení ošetřovatelů. Například studie Titulaera et al. (2013) hodnotila stres u psů v útulku na základě kognitivního testu (s pozitivní a negativní zkouškou s plnou nebo prázdnou miskou krmení), na základě projevů chování při procházení cizí osoby kolem klece, měření hladiny kortizolu a hodnocení pracovníků útulku.

Použité metody

Z psích exkrementů byla izolována pomocí komerčního kitu DNA QIAamp® PowerFecal® DNA Kit. Tento kit využívá pro extrakci DNA ze vzorků mechanickou homogenizaci pomocí kuliček ve speciálních tubičkách, které ve studii Yu & Morrison (2004) dosáhlo nejlepších výsledků pro následné využití v PCR metodách. Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí od 15,812 ng/µl do 170,772 ng/µl, což bylo dostatečné množství pro další použití.

K zisku dostatečného množství bakteriální DNA byla izolovaná DNA amplifikována metodou PCR, polymerázové řetězové reakce. Při zkoumání bakteriální komunity se zaměřuje na nukleotidovou sekvenci genu kódující 16S rRNA o délce přibližně 1 500 pb. V této práci se pomocí specifických primerů amplifikace zaměřila na úsek dlouhý 200 pb. Pro fylogenetické studie je jako alternativa možné zacílit na cpn60 gen a rpoB gen (Inglis et al. 2012).

Pro kvalitativní výsledky složení střevního mikrobiomu byla použita metoda PCR-DGGE a následné Sangerovo sekvenování, které bylo provedeno firmou SEQme s.r.o. Pro kvantitativní výsledky byla použita metoda qPCR. Limitací při metodě qPCR může být výběr primerů, zaměřující se na konkrétní kmeny bakterií. Tím, že množství odesílaných sekvencí 16S rRNA do veřejných databází bakteriálních taxonů narůstá, je vyžadováno přehodnocování využívaných primerů. Pro potřeby této práce byly využity primery pro celkové bakterie, kmen Firmicutes a Bacteroidetes dle studie Bacchetti De Gregoris et al. (2011), které při jejich výzkumu zlepšily pokrytí taxonů bez ztráty specifity ve srovnání s dříve hojně využívanými primery pro tyto taxonomické kategorie.

PCR-DGGE a identifikace bakterií

Provedení zpracovávání vzorků metodou PCR-DGGE a následného Sangerova sekvenování nebylo zcela zdařilé. S velkou pravděpodobností došlo při vyřezávání významných úseků z gelu k jejich znehodnocení jinými úseky. Výsledné sekvence bakterií totiž obsahovaly velké množství neidentifikovatelných úseků v sekvenci, které znemožnily přesnou identifikaci bakteriálních druhů.

Jediným s jistotou identifikovaným druhem dle databáze NCBI a algoritmu BLAST byla bakterie *Peptacetobacter (Clostridium) hiranonis.* Tato bakterie je normální složkou zdravých psích střev. *Peptacetobacter hiranonis* provádí přeměnu žlučových kyselin z primárních na sekundární a přispívá k rezistenci vůči infekci způsobující *Clostridium difficile* (Stone et al. 2021). Byla přítomna u většiny jedinců. Vzhledem k nízké identitě identifikovaných nižších taxonomických kategorií u zbylých úseků nebyly tvořeny žádné další závěry.

I přes to, že se nepodařilo u všech vybraných úseků konkrétně identifikovat druhy bakterií, bylo možné alespoň přiřadit kmen. Zastoupení kmenů bakterií z provedené DGGE se shoduje s těmi nejvýznamnějšími, které ve střevním mikrobiomu psů je možno nalézt. Nejčastěji zastoupen byl kmen Firmicutes, následovaný kmeny Bacteroidetes a Fusobacterium,

zastoupen byl i méně početný kmen Proteobacterium, stejně jako uvedli ve svých studiích například autoři Omatsu et al. (2018) a Mondo et al. (2020a).

Z výsledků DGGE bylo také možné pomocí techniky vícerozměrného škálování (PCoA) a bioinformativního softwaru Bionumerics graficky rozdělit obě skupiny dle podobnosti úseků (viz Obrázek 3). Oddělení obou skupin od sebe potvrdilo, že mezi skupinami byl určitý rozdíl.

Kvantifikace pomocí qPCR

Izolovaná DNA byla podrobena také kvantifikační metodě qPCR. Cílem bylo zjistit, zda se skupiny liší v počtu buněk bakterií celkových, či v množství buněk kmenů Firmicutes, Bacteroidetes a Fusobacteria. Z výsledku bylo patrné, že jediný významný rozdíl nastal u kmene Firmicutes, kdy psi z domácího prostředí měli vyšší množství zastoupení kmene (relativní četnost 41,5 %) než psi z útulku (relativní četnost 24,4 %). Na úrovni kmenů, kdy byl podobně zaznamenám pokles kmene Firmicutes oproti kontrolní skupině byl ve studii Jiang et al. (2018b) u pacientů s generalizovanou úzkostnou poruchou.

Předpoklad, že střevního mikrobiom u psů z útulku se bude lišit od mikrobiomu psů z domácího prostředí, byl potvrzen. Přesný profil druhů bakterií ze vzorků by mohla zajistit metoda sekvenování nové generace, která vzhledem k rozsahu práce a náročnosti metody nebyla použita. K získání informací, které by přispěly k přesnějšímu a konkrétnějšímu odůvodnění rozdílu ve složení střevního mikrobiomu mezi psy v útulku a psy v domácím prostředí, by tak mohly posloužit další studie.

7 Závěr

Střevní mikrobiom tvoří složitý systém, který při jakémkoliv odchýlení z rovnovážného fungujícího stavu dokáže ovlivnit celkové zdraví jedince. Mikrobiom nemusí být ovlivňován pouze vnějšími vlivy, ale i vnitřními, prostřednictvím nervového a imunitního systému. Střevní mikrobiom i CNS tvoří obousměrnou, vzájemně se ovlivňující komunikační síť, která reaguje na různé změny prostředí. Kromě vlivu stáří, stravy, antibiotik aj. má na skladbu mikrobiomu vliv i stres. U psů vyvolává stres behaviorální projevy jako je agresivita, úzkost, fobie, které dle studií mění složení střevního mikrobiomu.

Cílem této práce bylo porovnat složení střevního mikrobiomu psů dlouhodobě umístěných v útulcích se psy z domácího prostředí. Předpokládalo se, že vlivem stresu, kterému jsou psi v útulcích vystavováni, budou rozdíly ve složení střevní mikrobioty nalezeny. K ověření byly psům odebrány vzorky výkalů, které byly následně zpracovávány v laboratoři pomocí molekulárně biologických metod typických pro analýzu střevního mikrobiomu. Metody byly zaměřeny na bakteriální zastoupení ve střevech.

Výzkumem bylo prokázáno, že je rozdíl ve složení střevního mikrobiomu psů dlouhodobě umístěných v útulku a psů z domácího prostředí. Hlavní rozdíl byl mezi skupinami v podobnosti zastoupení druhů bakterií, vizualizovaný pomocí analýzy hlavních koordinát, a v počtu zastoupení bakterií kmene Firmicutes, kdy u psů z útulku bylo relativní zastoupení téměř o polovinu nižší než u psů z domácího prostředí. Toto zjištění může být podkladem pro další podrobnější studie s využitím dalších metod, které odhalí přesné rozdíly v zastoupení bakteriálních rodů a druhů mezi skupinami. Zda byl rozdíl způsobený právě stresem, nebylo možné přesně dokázat, vzhledem k velké rozmanitosti vlastností vybraných psů, které mohli mít vliv na složením mikrobiomu, pouze subjektivního hodnocení, zda pes v útulku projevuje známky stresu a nemožnosti porovnat konkrétní identifikované druhy bakterií s jinými výsledky studií, kvůli nepřesným výsledkům kvalitativní metody. Nicméně mnoha studiemi bylo potvrzeno, že pobyt pro psy v útulku stresující je a dlouhodobý stres má negativní dopad na celkové zdraví.

Zjištění, jaké konkrétní změny stres způsobuje ve složení střevního mikrobiomu u psů v útulku, by mohl být základ pro další studie, které by zkoumaly, zda například konkrétní úpravou stravy, podáváním specifických probiotik (psychobiotik), či fekální transplantací, by se stres, a s ním související problémové chování, u zvířat zmírnilo. Dožení takovýchto výsledků by mělo velký vliv na welfare psů nejen v útulcích, ale i u těch, u kterých je podezření, že jsou stresu vystavováni (psi využívaní k práci s člověkem).

8 Literatura

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. Science Translational Medicine **6**.

Amaya V, Paterson MBA, Phillips CJC. 2020. Effects of Olfactory and Auditory Enrichment on the Behaviour of Shelter Dogs. Animals **10**:581.

Arpaia N et al. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature **504**:451–455. Nature Publishing Group.

Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. Journal of Microbiological Methods **86**:351–356.

Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Rebecca G, Lyte M. 2011. Exposure to social stressors alters the structure of the intestinal microbiota. Brain Behav Immun . 2011 March ; 25(3): 397–407. doi:10.1016/j.bbi.2010.10.023 **25**:397–407.

Bangsgaard Bendtsen KM, Krych L, Sørensen DB, Pang W, Nielsen DS, Josefsen K, Hansen LH, Sørensen SJ, Hansen AK. 2012. Gut Microbiota Composition Is Correlated to Grid Floor Induced Stress and Behavior in the BALB/c Mouse. PLoS ONE **7**.

Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. Journal of Veterinary Internal Medicine **32**:9–25.

Bercik P et al. 2011. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. Gastroenterology **141**:599–609.

Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 2011. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**:16050–16055.

Capuco A et al. 2020. Gut Microbiome Dysbiosis and Depression: a Comprehensive Review. Current Pain and Headache Reports **24**:1–14.

Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. 2015. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Annals of Gastroenterology **28**:203–209.

Chaban B, Links MG, Hill JE. 2012. A Molecular Enrichment Strategy Based on cpn60 for Detection of Epsilon-Proteobacteria in the Dog Fecal Microbiome. Microbial Ecology **63**:348–357.

Chen Y huan, Bai J, Wu D, Yu S fen, Qiang X ling, Bai H, Wang H ning, Peng Z wu. 2019. Association between fecal microbiota and generalized anxiety disorder: Severity and early treatment response. Journal of Affective Disorders **259**:56–66.

Clapp M, Aurora N, Herrera L, Bhatia M, Wilen E, Wakefield S. 2017. Gut microbiota's effect on mental health: the gut-brain axis. Clinics and Practice **7**.

Coelho LP et al. 2018. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. Microbiome **6**:72.

Cryan JF, Dinan TG. 2012. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on

brain and behaviour. Nature Reviews Neuroscience **13**:701–712. Nature Publishing Group.

Davies RH, Lawes JR, Wales AD. 2019a. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. Journal of Small Animal Practice **60**:329–339.

Davies RH, Lawes JR, Wales AD. 2019b. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. Journal of Small Animal Practice **60**:329–339.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. 2010. Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression. Neuroscience **170**:1179–1188.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**:11971–11975.

Evrensel A, Ceylan ME. 2015. The gut-brain axis: The missing link in depression. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience **13**:239–244.

Feehily C, Karatzas KAG. 2013. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. Journal of Applied Microbiology **114**:11–24.

Foster JA, Lyte M, Meyer E, Cryan JF. 2016. Gut microbiota and brain function: An evolving field in neuroscience. International Journal of Neuropsychopharmacology **19**:1–7.

Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, Steiner JM, Suchodolski JS. 2013. Characterization of the fungal microbiome (Mycobiome) in fecal samples from dogs. Veterinary Medicine International **2013**:1–9.

Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. 2020. Systems in Health and Disease **20**:145–155.

Funkhouser LJ, Bordenstein SR. 2013. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. PLoS Biology **11**:1–9.

Galley JD, Nelson MC, Yu Z, Dowd SE, Walter J, Kumar PS, Lyte M, Bailey MT. 2014. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. BMC Microbiology **14**:1–13.

Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, Landolfi R, Montalto M. 2016. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An uptodate. World Journal of Gastroenterology **22**:7186–7202.

Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley RE. 2016. Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. Science **352**:532–535.

Guard BC, Suchodolski JS. 2016. Horse species symposium: Canine intestinal microbiology and metagenomics: From Phylogeny to function. Journal of Animal Science **94**:2247–2261.

Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. FEMS Microbiology Ecology **76**:301–310.

Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, Stevenson M, Okpapi A, Munro MJ, Hold GL. 2015. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. PLoS ONE **10**:1–10.

Hennessy MB. 2013. Using hypothalamic-pituitary-adrenal measures for assessing and reducing the stress of dogs in shelters: A review. Applied Animal Behaviour Science **149**:1–12.

Herman JP, Tasker JG. 2016. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. Frontiers in Endocrinology **7**:1–10.

Hoffman CL, Ladha C, Wilcox S. 2019. An actigraphy-based comparison of shelter dog and owned dog activity patterns. Journal of Veterinary Behavior **34**:30–36.

Hoyles L, Snelling T, Umlai UK, Nicholson JK, Carding SR, Glen RC, McArthur S. 2017. Microbiome–host systems interactions: Protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. bioRxiv:1–13. Microbiome.

Hsiao EY et al. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. Cell **155**:1451–1463. Elsevier Inc.

Inglis GD, Matthew CT, Dallas KT, Martin LK, Brooks SPJ, Selinger LB. 2012. Molecular methods to measure intestinal bacteria: A review. Journal of AOAC International **95**:5–23.

Jang HM, Lee KE, Lee HJ, Kim DH. 2018. Immobilization stress-induced Escherichia coli causes anxiety by inducing NF-κB activation through gut microbiota disturbance. Scientific Reports **8**:1–14.

Jang SH, Woo YS, Lee SY, Bahk WM. 2020. The brain–gut–microbiome axis in psychiatry. International Journal of Molecular Sciences **21**:1–17.

Järbrink-Sehgal E, Andreasson A. 2020. The gut microbiota and mental health in adults. Current Opinion in Neurobiology **62**:102–114.

Jiang H, Huang L, Yang J, Wu G. 2018a. A Microbial Analysis Primer for Biogeochemists. Page Environmental Geochemistry: Site Characterization, Data Analysis and Case Histories: Second Edition, 2nd edition.

Jiang H yin, Zhang X, Yu Z he, Zhang Z, Deng M, Zhao J hua, Ruan B. 2018b. Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder. Journal of Psychiatric Research **104**:130–136.

Juszczuk K, Grudlewska K, Mikucka A, Gospodarek-Komkowska E. 2017. Przeszczepienie mikrobioty jelitowej – metoda leczenia nawracających zakażeń o etiologii Clostridium difficile i innych chorób Fecal microbiota transplantation – methods of treatment of recurrent Clostridium difficile infections and other diseases:220–226.

Kasiraj AC, Harmoinen J, Isaiah A, Westermarck E, Steiner JM, Spillmann T, Suchodolski JS. 2016. The effects of feeding and withholding food on the canine small intestinal microbiota. FEMS Microbiology Ecology **92**:1–10.

Kirchoff NS, Udell MAR, Sharpton TJ. 2019. The gut microbiome correlates with conspecific aggression in a small population of rescued dogs (Canis familiaris). PeerJ **2019**.

Kralik P, Ricchi M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. Frontiers in Microbiology **8**:1–9.

Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. 2009. Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches. Physiological Reviews **89**:535–606.

Larson G et al. 2012. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and

biogeography. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**:8878–8883.

MacIntyre DA et al. 2015. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. Scientific Reports **5**:1–9.

Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M. 2012. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. Journal of Affective Disorders **141**:55–62.

Marcondes Ávila PR et al. 2020. Effects of microbiota transplantation and the role of the vagus nerve in gut–brain axis in animals subjected to chronic mild stress. Journal of Affective Disorders **277**:410–416.

Mayer EA. 2011. Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication. Nature Reviews Neuroscience **12**:453–466.

Middelbos IS, Boler BMV, Qu A, White BA, Swanson KS, Fahey GC. 2010. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. PLoS ONE **5**.

Mizukami K, Uchiyama J, Igarashi H, Murakami H, Osumi T, Shima A, Ishiahra G, Nasukawa T, Une Y, Sakaguchi M. 2019. Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony. FEMS Microbiology Letters **366**:1–7.

Mondo E, Barone M, Soverini M, D'Amico F, Cocchi M, Petrulli C, Mattioli M, Marliani G, Candela M, Accorsi PA. 2020a. Gut microbiome structure and adrenocortical activity in dogs with aggressive and phobic behavioral disorders. Heliyon **6**:e03311.

Mondo E, De Cesare A, Manfreda G, Sala C, Cascio G, Accorsi PA, Marliani G, Cocchi M. 2020b. Depression and microbiome-study on the relation and contiguity between dogs and humans. Applied Sciences (Switzerland) **10**.

Moxon R, Whiteside H, England GCW. 2016. Incidence and impact of dog attacks on guide dogs in the UK: An update. Veterinary Record **178**:367.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology **59**:695–700.

Myers B, Mcklveen JM, Herman JP. 2015. Implications for the energetics of stress **35**:180–196.

Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. 2015. Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. FEMS Microbiology Reviews **39**:509–521.

O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Behavioural Brain Research **277**:32–48.

O'Malley D, Julio-Pieper M, Gibney SM, Dinan TG, Cryan JF. 2010. Distinct alterations in colonic morphology and physiology in two rat models of enhanced stress-induced anxiety and depression-like behaviour. Stress **13**:114–122.

Ollivier M et al. 2016. Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. Royal Society Open Science **3**.

Omatsu T, Omura M, Katayama Y, Kimura T, Okumura M, Okumura A, Murata Y, Mizutani T.

2018. Molecular diversity of the faecal microbiota of toy poodles in Japan. Journal of Veterinary Medical Science **80**:749–754.

Pavlidis P, Powell N, Vincent RP, Ehrlich D, Bjarnason I, Hayee B. 2015. Systematic review: Bile acids and intestinal inflammation-luminal aggressors or regulators of mucosal defence? Alimentary Pharmacology and Therapeutics **42**:802–817.

Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. Microbiome **5**:1–19.

Qiagen. 2017. QIAamp ® PowerFecal ® DNA Kit Handbook. Tutirialis e Manuais.

Reddy KE et al. 2019. Impact of Breed on the Fecal Microbiome of Dogs under the Same Dietary Condition. Journal of microbiology and biotechnology **29**:1947–1956.

Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC. 2017. Microbes and mental health: A review. Brain, Behavior, and Immunity **66**:9–17.

Righi C, Menchetti L, Orlandi R, Moscati L, Mancini S, Diverio S. 2019. Physiological and Immunological Parameters:1–14.

Rosado B, García-Belenguer S, León M, Chacón G, Villegas A, Palacio J. 2010. Blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in aggressive dogs. Applied Animal Behaviour Science **123**:124–130.

Roth LSV, Faresjö Å, Theodorsson E, Jensen P. 2016. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. Scientific Reports **6**:1–7. Nature Publishing Group.

Salman MD, Hutchison J, Ruch-Gallie R, Kogan L, New JC, Kass PH, Scarlett JM. 2000. Behavioral Reasons for Relinquishment of Dogs and Cats to 12 Shelters. Journal of Applied Animal Welfare Science **3**:93–106.

Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. 2016. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. Trends in Neurosciences **39**:763–781.

Sarviaho R, Hakosalo O, Tiira K, Sulkama S, Salmela E, Hytönen MK, Sillanpää MJ, Lohi H. 2019. Two novel genomic regions associated with fearfulness in dogs overlap human neuropsychiatric loci. Translational Psychiatry **9**. Springer US.

Selye H. 1952. Allergy and the general adaptation syndrome. International Archives of Allergy and Immunology **3**:267–278.

Shafquat A, Joice R, Simmons SL, Huttenhower C. 2014. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. Trends in Microbiology **22**:261–266.

Sherman BL, Mills DS. 2008. Canine Anxieties and Phobias: An Update on Separation Anxiety and Noise Aversions. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice **38**:1081–1106.

Shiverdecker MD, Schiml PA, Hennessy MB. 2013. Human interaction moderates plasma cortisol and behavioral responses of dogs to shelter housing. Physiology and Behavior **109**:75–79.

Stelow E. 2018. Diagnosing Behavior Problems: A Guide for Practitioners. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice **48**:339–350.

Stone NE, Nunnally AE, Roe CC, Hornstra HM, Wagner DM, Sahl JW. 2021. Complete Genome Sequence of Peptacetobacter (Clostridium) hiranonis Strain DGF055142, Isolated from Dog Feces from Flagstaff, Arizona, USA, 2019 . Microbiology Resource Announcements **10**:20–21.

Suchodolski JS. 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. Veterinary Journal **215**:30–37.

Suchodolski JS. 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: A Bigger World than We Thought. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice **41**:261–272.

Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fets K, Williams DA. 2005. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. American Journal of Veterinary Research **66**:1556–1562.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. Journal of Physiology **558**:263–275.

Swanson KS et al. 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. ISME Journal **5**:639–649. Nature Publishing Group.

Sylvia KE, Jewell CP, Rendon NM, St. John EA, Demas GE. 2017. Sex-specific modulation of the gut microbiome and behavior in Siberian hamsters. Brain, Behavior, and Immunity **60**:51–62.

Szabo S, Tache Y, Somogyi A. 2012. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the Editor# of Nature. Stress **15**:472–478.

Šmarda J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 9788021038417.

Titulaer M, Blackwell EJ, Mendl M, Casey RA. 2013. Cross sectional study comparing behavioural, cognitive and physiological indicators of welfare between short and long term kennelled domestic dogs. Applied Animal Behaviour Science **147**:149–158.

Vilson Å et al. 2018. Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. PLoS ONE **13**:1–16.

Walker R, Fisher J, Neville P. 1997. The treatment of phobias in the dog. Applied Animal Behaviour Science **52**:275–289.

Wang S, Qu Y, Chang L, Pu Y, Zhang K, Hashimoto K. 2020. Antibiotic-induced microbiome depletion is associated with resilience in mice after chronic social defeat stress. Journal of Affective Disorders **260**:448–457.

Yu Z, Morrison M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. BioTechniques **36**:808–812.

Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina O V., Orlova VS, Danilenko VN. 2016. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. Anaerobe **42**:197–204.

Zakošek Pipan M, Kajdič L, Kalin A, Plavec T, Zdovc I. 2020. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. Theriogenology **152**:18–28.

Zhu L, Luo F, Hu W, Han Y, Wang Y, Zheng H, Guo X, Qin J. 2018. Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy. Frontiers in Microbiology **9**:1–6.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ANOVA – Analysis of Variance

ANS – autonomní nervová soustava

ACTH – adrenokortikotropní hormon

CNS – centrální nervová soustava

ddNTP – dideoxyribonukleotid trifosfát

DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ENS – enterická nervová soustava

FMT – fekální transplantace

FBT – fekální bakterioterapie

GABA – kyselina gama-aminomáselná

GF – germ-free

HPA – osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny

IBD – idiopatické střevní záněty

mRNA – messenger RNA

NGS – sekvenování nové generace

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

SAM – osa sympato-adrenomedulární

SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem

TBE – tris/borate/EDTA

TEMED – tetramethylethylendiamin

UV – ultrafialové

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Informace o vybraných psech z útulku.

č. vzorku	lokace	pohlaví	věk (roky)	kastrace	plemeno	krmivo	kondice	chování
1	ÚPOZ Troja	pes	9	ne	labradorský retrívr	mix	lehká nadváha	
2	ÚPOZ Troja	pes	9	ne	kříženec	mix	norma	agresivní
3	Útulek TU	pes	3	ne	kříženec	mix	norma	agresivní
4	ÚPOZ Troja	pes	6	ne	kříženec	mix	norma	
5	ÚPOZ Troja	pes	9	ne	kříženec	mix	norma	agresivní
6	ÚPOZ Troja	pes	3	ne	německý ovčák	mix	norma	
7	ÚPOZ Troja	pes	11	ne	kříženec	mix	norma	
8	ÚPOZ Troja	pes	17	ne	miniaturní pinč	mix	norma	
9	ÚPOZ Troja	pes	15	ne	americký pitbulteriér	granule	norma	
10	ÚPOZ Troja	pes	2	ne	německý ovčák	mix	lehká podváha	agresivní
11	ÚPOZ Troja	pes	6	ne	německý ovčák	mix	norma	agresivní
12	ÚPOZ Troja	pes	6	ne	argentinská doga	mix	norma	agresivní
13	ÚPOZ Troja	pes	10	ne	německý boxer	mix	norma	agresivní
14	ÚPOZ Troja	pes	10	ne	kříženec	mix	norma	strach
15	ÚPOZ Troja	fena	13	ne	německý ovčák	mix	norma	
16	ÚPOZ Troja	pes	1	ne	kříženec	mix	norma	
17	ÚPOZ Troja	fena	12	ano	německý ovčák	granule	norma	strach
18	ÚPOZ Troja	pes	4	ne	kříženec	mix	norma	
19	ÚPOZ Troja	pes	5	ne	kavkazský pastevecký pes	mix	norma	agresivní
20	Útulek TU	pes	8	ano	kříženec	mix	norma	
21	Útulek TU	pes	6	ano	kříženec	mix	norma	strach
22	Útulek TU	pes	9	ne	kříženec	mix	norma	
23	Útulek TU	fena	3	ne	kavkazský pastevecký pes	mix	norma	agresivní
24	Útulek TU	pes	2	ne	kříženec	mix	norma	agresivní
25	Útulek TU	fena	1	ne	kříženec	granule	norma	agresivní
26	Útulek TU	pes	3	ne	kříženec	granule	norma	agresivní

Příloha 2: informace o vybraných psech z domácího prostředí.

č. vzorku	lokace	pohlaví	věk (roky)	kastrace	plemeno	krmivo	kondice	chování
27	domácí	fena	5	ne	německý ovčák	granule	norma	
28	domácí	pes	7	ne	kříženec	mix	norma	
29	domácí	pes	3	ne	jezevčík	mix	norma	
30	domácí	pes	10	ne	kříženec	mix	norma	
31	domácí	pes	8	ano	kříženec	granule	lehká nadváha	
32	domácí	pes	7	ano	kříženec	mix	norma	
33	domácí	fena	4	ne	jack russel teriér	mix	norma	
34	domácí	pes	8	ne	kříženec	mix	norma	
35	domácí	pes	1	ne	american bully	mix	norma	
36	domácí	fena	9	ne	Biewer teriér	mix	norma	strach
37	domácí	pes	7	ne	jack russel teriér	granule	norma	
38	domácí	pes	4	ne	jorkšírský teriér	granule	norma	
39	domácí	pes	7	ne	jorkšírský teriér	mix	norma	
40	domácí	pes	6	ne	německý ovčák	granule	norma	
41	domácí	fena	4	ano	kříženec	granule	norma	
42	domácí	fena	5	ano	staffordšírský bulteriér	BARF	norma	
43	domácí	pes	3	ne	staffordšírský bulteriér	BARF	norma	
44	domácí	pes	1	ne	švýcarský ovčák	granule	norma	
45	domácí	fena	3	ne	kříženec	granule	norma	
46	domácí	pes	5	ne	jezevčík	mix	norma	
47	domácí	pes	7	ne	jorkšírský teriér	granule	norma	
48	domácí	pes	7	ne	jorkšírský teriér	granule	norma	
49	domácí	pes	9	ano	kříženec	granule	norma	