

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Toll-like receptor 4

a jeho úloha při střevních infekcích gramnegativními bakteriemi

Diplomová práce

The University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Toll-like receptor 4
and its role in enteric infections with gram-negative bacteria

Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Poláková**
Osobní číslo: **C21460**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Toll-like receptor 4 a jeho úloha při střevních infekcích gramnegativními bakteriemi**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části se studentka zaměří na popis a význam Toll-like receptoru (TLR) 4 při střevních infekcích, zejména bakterií *S. Typhimurium*. Popíše strukturu a fungování receptoru, jeho expresi a změny exprese u gnotobiotických zvířat v souvislosti s bakteriálním osídlením střevní sliznice.

Experimentální část:

1. Seznámit se se získáním a odchovem gnotobiotických zvířat, jejich osidlováním definovanou bakteriální mikrobiotou, infekcí *Salmonella Typhimurium*, odběrem vzorků a jejich přípravou pro jejich následné analýzy.
2. U vybraných vzorků provést izolaci celkové RNA a syntézu cDNA, analýzu metodou ELISA.
3. Vyhodnotit a diskutovat získané výsledky.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázích *Web of Science*, *NCBI*, *PubMed*, *Google Scholar*, atd. Další dle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Bc. Igor Šplíchal, CSc.**
Laboratoř gnotobiologie, Mikrobiologický ústav AV ČR,
v.v.i., Nový Hrádek

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Toll-like receptor 4 a jeho úloha při střevních infekcích gramnegativními bakteriemi jsem vypracoval(a) samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5. 2024

Kateřina Poláková v.r.

Poděkování:

Chtěla bych vyjádřit hlubokou vděčnost všem, kteří mi pomohli při realizaci této diplomové práce. Nejprve bych ráda poděkovala panu doc. Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. za jeho neuvěřitelnou odbornou podporu, trpělivost a nekonečnou motivaci. Jeho vedení a cenné rady byly pro mě klíčové při řešení obtížných problémů. Zároveň bych chtěla vyjádřit hluboký dík i MUDr. Alle Šplíchalové, PhD., která mi poskytla cenné rady pro moji laboratorní práci. Velký dík patří paní doc. RNDr. Lucii Korecké, která nade mnou držela ochrannou ruku na univerzitě. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu. Nakonec bych ráda poděkovala laborantkám Bc. Janě Machové a Haně Sychrovské, které mi poskytli pomoc při získávání a zpracovávání vzorků. Bez jejich ochoty a účasti by tato práce nemohla být realizována.

Děkuji všem za jejich nezištnou podporu a přínos, kterými jste mi umožnili dosáhnout tohoto cíle.

ANOTACE

Diplomová práce se zaměřuje na studium vztahu mezi Toll-like receptory (TLR) a gramnegativními infekcemi reprezentovanými střevním patogenem *Salmonella* Typhimurium za využití modelu gnotobiotického selete. TLR jsou klíčové receptory imunitního systému, kterými rozpoznává organismus hostitele cizí i vlastní nebezpečné molekulární struktury, což vede k aktivaci nespecifické imunitní odpovědi. Na základě použitých metod real-time PCR, ELISA a xMAP technologie popisujeme expresi mRNA Toll-like receptorů (TLR) 2, 4 a 9 a s nimi spjatých molekul – koreceptorů MD-2 a CD14, adaptorových proteinů MyD88 a TRIF a lipopolysacharid-binding proteinu (LBP) v ileu a kolonu. Aktivace TLR signálních drah je hodnocena hladinami zánětlivých cytokinů interleukinů (IL)-6, IL-12/23p40 a jaderného proteinu high mobility group box 1 (HMGB1). Výsledky těchto experimentů byly publikovány ve dvou impaktovaných vědeckých časopisech. Součástí práce bylo také snažení o zavedení detekce proteinů těsných spojů claudin-1 a okludin metodou ELISA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Toll-like receptor; střevní infekce; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; *Salmonella* Typhimurium; cytokiny; gnotobiotické sele.

TITLE

Toll-like receptor 4 and its role in enteric infections with gram-negative bacteria

ANNOTATION

The diploma thesis focuses on studying the relationship between Toll-like receptors (TLR) and gram-negative infections represented by the intestinal pathogen *Salmonella* Typhimurium using the gnotobiotic piglet model. TLRs are key receptors of the immune system, by which the host organism recognizes both foreign and its own dangerous molecular structures, which leads to the activation of a non-specific immune response. Based on the methods of real-time PCR, ELISA, and xMAP technology, we described the mRNA expression of Toll-like receptors (TLR) 2, 4, and 9 and their associated molecules - co-receptors MD-2 and CD14, adapter proteins MyD88 and TRIF and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the ileum and colon. Activation of TLR signaling pathways is assessed by the levels of inflammatory cytokines interleukin (IL)-6, IL-12/23p40, and nuclear protein high mobility group box 1 (HMGB1). The results of these experiments were published in two high-impact scientific journals. Part of the work was also an effort to introduce the detection of tight junction proteins claudin-1 and occludin by the ELISA method.

KEYWORDS

Toll-like receptor; enteric infection; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; *Salmonella* Typhimurium; cytokines; gnotobiotic piglet.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK.....	12
SEZNAM GRAFŮ	13
SEZNAM ZKRATEK.....	15
ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Hostitel a jeho mikrobiální kolonizátoři	18
1.2 Prvotní mikrobiom.....	18
1.3 Úvod do gnotobiologie	19
1.4 Prase jako zvířecí model v biomedicíně	19
1.5 Střevní bariéra.....	20
1.6 Receptory rozlišující nebezpečné molekulární struktury	21
1.7 Toll-like receptory	22
1.8 Toll-like receptor 4	23
1.9 TLR4 signální dráha	24
1.10 High mobility group box 1	25
1.11 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	25
1.12 Principy použitých Metod	26
1.12.1 Izolace celkové RNA	26
1.12.2 Syntéza cDNA.....	26
1.12.3 Real-time polymerázová řetězová reakce	26
1.12.4 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi	27
1.12.5 Extended Multi-Analyte Profiling technologie	27
1.13 Práce se zvířaty a vyhodnocení výsledků	28
1.13.1 Princip 3R.....	28
1.13.2 Vyhodnocení pokusů.....	28
2 CÍLE PRÁCE.....	29
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Přístrojové vybavení a pomůcky	30
3.2 Reagencie a kity.....	31
3.2.1 Další pomůcky, přístroje a software.....	31

3.3	Příprava bakteriálních suspenzí	32
3.4	Osazování selat bakteriemi	32
3.4.1	Donošená selata – schéma experimentu	32
3.4.2	Nedonošená selata – schéma experimentu	33
3.5	Odběry vzorků	34
3.6	Izolace RNA	34
3.6.1	Měření koncentrace celkové RNA	36
3.7	Syntéza cDNA	36
3.8	Real-time pcr	38
3.9	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi	40
3.9.1	Stanovení koncentrace celkového proteinu	40
3.9.2	ELISA claudin – 1 a okludin	40
3.10	Extended Multi-Analyte Profiling technologie	42
3.11	Práce se zvířaty a vyhodnocení výsledků	44
3.11.1	Projekty pokusů	44
3.11.2	Vyhodnocení pokusů	44
4	VÝSLEDKY	45
4.1	Izolace RNA	45
4.2	ELISA claudin – 1 a Okludin	49
4.2.1	Celková koncentrace proteinů	49
4.2.2	ELISA claudinu-1 a okludinu	53
4.3	TLR4 signální dráha v ileu a kolonu u gnotobotických selat	57
4.3.1	Expese TLR4 mRNA	57
4.3.2	Expese MD-2 mRNA	58
4.3.3	Expese CD14 mRNA	59
4.3.4	Expese MyD88 mRNA	60
4.3.5	Expese TRIF mRNA	61
4.3.6	Expese LBP mRNA	63
4.3.7	Expese TLR2-2 mRNA	64
4.3.8	Expese TLR9 mRNA	65
4.3.9	Zánětlivé cytokiny IL-12/23p40 a IL-6 v krevní plazmě	67
4.4	TLR4 signální dráha v ileu a kolonu u nedonošených gnotobotických selat	68
4.4.1	Expese TLR4 mRNA	68

4.4.2	Expres MyD88.....	69
4.4.3	Expres TRIF	70
4.4.4	Expres TLR2 mRNA.....	72
4.4.5	Expres TLR9 mRNA.....	74
4.4.6	HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v ileu, kolonu a krevní plazmě	75
5	DISKUZE	78
5.1	Mikroorganizmy, Infekce a antibiotika	78
5.2	Translační zvířecí modely	78
5.3	TLR ve zdraví a nemoci	80
5.4	Relativní exprese mRNA pro TLR4 a molekuly mající k TLR4 bezprostřední vztah 81	
5.4.1	Donošená gnotobiotická selata.....	82
5.4.2	Nedonošená gnotobiotická selata	82
5.5	Donošená selata	83
5.6	Nedonošená selata	84
5.7	TLR4 signalizace a další.....	86
6	ZÁVĚR	87
7	POUŽITA LITERATURA	88
8	PŘÍLOHY	98
8.1	Příloha 1.....	98
8.2	Příloha 2.....	98
8.3	Příloha 3.....	98

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Střevní bariéra a interakce střevních buněk a buněk imunitního systému.....	21
Obrázek 2 TLR signální dráhy.	22
Obrázek 3 TLR4 signalizace při sepsi.....	24
Obrázek 4 Schéma osazování donošených selat.	33
Obrázek 5 Schéma osazování nedonošených selat.	33
Obrázek 6 Homogenizace vzorku pro izolaci RNA.....	35
Obrázek 7 Eliminace genomové DNA v SPE kolonce	35
Obrázek 8 Promývací kroky při Izolaci RNA	35
Obrázek 9 Eluce RNA z SPE kolonky	36
Obrázek 10 Příprava roztoků pro odmytí zbytkové gDNA.....	37
Obrázek 11 Vlastní reverzní transkripce izolované RNA	37
Obrázek 12 Kalibrační řada standardu pro xMAP	43
Obrázek 13 TLR a onemocnění.	80
Obrázek 14 MyD88-závislá a TRIF-závislá signalizace TLR4	82
Obrázek 15 Znaký nedonošených selat.	98

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Reakční směs pro PCR.....	38
Tabulka 2 Nastavení cyklu PCR reakce	38
Tabulka 3 Primery a jejich sekvence a odpovídající LNA sondy	39
Tabulka 4 Data izolace RNA z ilea nedonošených selat.....	45
Tabulka 5 Data izolace RNA z kolonu nedonošených selat	46
Tabulka 6 Data izolace RNA z ilea donošených selat.....	47
Tabulka 7 Data izolace RNA z kolonu donošených selat	48
Tabulka 8 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé homogenizační materiály	49
Tabulka 9 Výpočet koncentrace standardu BCA	50
Tabulka 10 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé centrifugační síly.....	50
Tabulka 11 Hodnoty koncentrace celkového proteinu po rozdílné centrifugační síle	51
Tabulka 12 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé lyzační roztoky.....	52
Tabulka 13 Koncentrace celkového proteinu při použití rozdílných lyzačních roztoků.....	52
Tabulka 14 Hodnoty absorbancí standardu claudinu-1 pro různé lyzační roztoky	53
Tabulka 15 Koncentrace claudinu-1 při použití různých lyzačních pufrů	54
Tabulka 16 Hodnoty absorbancí standardu okludinu pro různé lyzační roztoky.....	55
Tabulka 17 Koncentrace okludinu při použití různých lyzačních pufrů	55
Tabulka 18 Slepé vzorky ředících a lyzačních roztoků.....	56

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro homogenizační materiály	50
Graf 2 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro centrifugační síly	51
Graf 3 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro různé lyzační roztoky	52
Graf 4 Rozdíl koncentrací celkového proteinu stejných vzorků za použití různých lyzačních roztoků.....	53
Graf 5 Vliv absorbance na koncentraci claudinu-1 pro různé lyzační roztoky	54
Graf 6 Koncentrace claudinu-1 při použití různých lyzačních pufrů.....	54
Graf 7 Vliv absorbance na koncentraci okludinu pro různé lyzační roztoky	55
Graf 8 Koncentrace okludinu při použití různých lyzačních pufrů.....	56
Graf 9 Relativní exprese TLR4 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	57
Graf 10 Relativní exprese TLR4 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.	58
Graf 11 Relativní exprese MD-2 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.....	58
Graf 12 Relativní exprese MD-2 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.....	59
Graf 13 Relativní exprese CD14 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	59
Graf 14 Relativní exprese CD14 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	60
Graf 15 Relativní exprese MyD88 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	60
Graf 16 Relativní exprese MyD88 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.	61
Graf 17 Relativní exprese TRIF mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	62
Graf 18 Relativní exprese TRIF mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.....	62
Graf 19 Relativní exprese LBP mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	63
Graf 20 Relativní exprese LBP mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.	64
Graf 21 Relativní exprese TLR2 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	64
Graf 22 Relativní exprese TLR2 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.	65
Graf 23 Relativní exprese TLR9 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat.	66
Graf 24 Relativní exprese TLR9 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat.	66
Graf 25 Hladiny IL-12/23p40 v krevní plazmě donošených gnotobiotických selat.	67
Graf 26 Hladiny IL-6 v krevní plazmě donošených gnotobiotických selat.	67
Graf 27 Relativní exprese TLR4 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat.	68
Graf 28 Relativní exprese TLR4 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat.	68
Graf 29 Relativní exprese TLR4 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat.....	69

Graf 30 Relativní exprese MyD88 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat.	69
Graf 31 Relativní exprese MyD88 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat. ...	70
Graf 32 Relativní exprese MyD88 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat.	70
Graf 33 Relativní exprese TRIF mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat.	71
Graf 34 Relativní exprese TRIF mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat.	71
Graf 35 Relativní exprese TRIF mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat.	72
Graf 36 Relativní exprese TLR2 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat.	72
Graf 37 Relativní exprese TLR2 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat.	73
Graf 38 Relativní exprese TLR2 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat.	73
Graf 39 Relativní exprese TLR9 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat.	74
Graf 40 Relativní exprese TLR9 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat.	74
Graf 41 Relativní exprese TLR9 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat.	75
Graf 42 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v ileu nedonošených gnotobiotických selat..	76
Graf 43 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v kolonu nedonošených gnotobiotických selat..	76
Graf 44 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v krevní plazmě nedonošených gnotobiotických selat.	77

SEZNAM ZKRATEK

AIM 2	absent in melanoma 2
ALR	absent in melanoma 2 like receptors
BB12	<i>Bifidobacterium bovis</i> 12
BCA	Bicinchoninic Acid Protein Assay
CD14	diferenciační antigen 14 (cluster differentiation 14)
cDNA	komplementární kyselina deoxyribonukleová
CLR	lektinové C receptory (C-type lectin receptors)
COL	kolon
DAMP	molekuly uvolněné z poškozených buněk (damage-associated molecular patterns)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DPBS	Dulbecco fosfátový pufr (Dulbecco's phosphate buffered saline)
DTT	dithioeritol
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné části (enzyme-linked immunosorbent assay)
EU	Evropská unie
gDNA	genomová kyselina deoxyribonukleová
GF	bezmikrobní (germ-free)
HMGB1	amfoterin (high mobility group box 1)
HRP	křenuv peroxidáza (horseradish peroxidase)
iFABP	receptor vážící mastné kyseliny ve střevě (intestinal fatty acid binding protein)
IgG	imunoglobulin G
IL	ileum
IL-6	interleukin 6
IL-12/23p40	interleukin 12/23p40
LA	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
LAMP	life-associated molecular patterns
LBP	protein vážící lipopolysacharid (lipopolysaccharide binding protein)
LNA	low-noise amplifiers
LPS	lipopolysacharid
LT2	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium kmen LT2
MD-2	myeloidní diferenciační faktor 2 (myeloid differentiation factor 2)

mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová
MUC2	mucin 2
MyD88	myeloid partition factor 88
NEC	nekrotizující enterokolitida
NLR	nucleotide oligomerization domain (Nod)-like receptors
NOD	nucleotide oligomerization domain
PAGE	elektroforéza na polyakrylamigovém gelu (polyacrylamide gel electrophoresis)
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (pathogens-associated molecular patterns)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PRR	receptory pro rozpoznávání struktur (pattern recognition receptors)
RIG-1	retinoic acid-inducible gene-I
RLR	retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors
RNA	kyselina ribonukleová
SAPE	konjugát phycoerytrinu se streptavidinem
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)
STR	short tandem repeat
T_M	teplota tání (melting temperature)
TMB	tetramethylbenzidin
TLR	Toll-like receptor
TRIF	interferon β s tir doménou (Tir-domain interferon- β)
xMAP	extended Multi-Analyte Profiling

ÚVOD

V přirozeném prostředí není možné se mikrobiální kontaminaci vyhnout, ihned po narození se organismy savců setkávají s bakteriemi. Do té doby je plod v bezmikrobním prostředí, po narození se organismus musí rychle přizpůsobit, vytvořit mechanické bariéry a vytvořit imunitní systém, který bude regulovat mikrobiom (Walker et al., 2017). Střevní mikrobiom je proměnlivým systémem bakterií žijících ve vzájemné symbióze s hostitelem (Di Vincenzo et al., 2024). Při dysregulaci dochází ke střevním infekcím za vzniku zánětlivé imunitní odpovědi mířené nejen proti primárně patogenním bakteriím, ale i patobiontům. Důležitou roli v rozvoji imunitní odpovědi hraje Toll-like receptor. Jedná se o vývojově velmi staré bílkovinné receptory, které rozpoznávají PAMPs a DAMPs. Aktivací se spouští kaskáda reakcí vedoucí k zánětlivé imunitní odpovědi. (Medzhitov, 2021)

Tato diplomová práce se zabývá Toll-like receptory na prasečím modelu. Sele bylo zvoleno jako vhodný organismus blízký lidskému, kdy je podobnost i v intrauterinním vývoji. Na základě známého osazení mikroorganismy, bylo možné sledovat rozdíly imunitní modulace a tvorby zánětu ve stanovených skupinách. Pro zhodnocení exprese byli použity metody kvantifikace pomocí real-time PCR. Dále byla testována vhodnost použití metody ELISA pro zjišťování koncentrace claudinu-1 a okcludinu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HOSTITEL A JEHO MIKROBIÁLNÍ KOLONIZÁTOŘI

V roce 1900 vyslovil francouzský pediatr Henri Tissier hypotézu, že vývoj plodu probíhá ve sterilním prostředí (Tissier, 1900). Tento předpoklad byl, až na malé výjimky, všeobecně přijímán po celé století. Začátkem 21. století však španělsí výzkumníci izolovali komenzální bakterie z pupečnickové krve (Jiménez et al., 2005) a stanovili bakterie přítomné v mekóniu (střevní smolka) a vyslovili domněnku, že existuje „prenatální mikrobiom“ (Jiménez et al., 2008). Následující desetiletí bylo obdobím bouřlivého rozvoje molekulárně genetických metod a další vědci s nadšením popisovali prenatální přítomnost bakterií v děloze a plodu. Zároveň se ale objevovaly i kritické hlasy, které tyto nálezy posuzovaly velice opatrně (Walker et al., 2017), jiné byly přímo odmítavé (Davis et al., 2020).

V roce 2023 byla publikována stěžejní práce, potvrzující správnost Tissierovy hypotézy a ve které se zdůrazňuje: přítomnost 16S rRNA genových sekvencí neznamena přítomnost živých bakterií, nálezy prenatálního mikrobiomu jsou pravděpodobně způsobené nedostatky v technikách analýzy a kontaminacemi a získání bezmikrobních zvířat je možné pouze za předpokladu prenatálního vývoje ve sterilních podmínkách (Kennedy et al., 2023).

1.2 PRVOTNÍ MIKROBIOM

Novorozenec narozený přirozeným vaginálním porodem je již v průběhu porodu osídlován vaginální a fekální mikrobiotou matky. Novorozenec získaný císařským řezem je ale osídlován především mikrobiotou z prostředí nemocničního zařízení a kožní mikrobiotou nemocničního personálu (Healy et al., 2022). Vývoj mikrobioty trávicího systému je dále ovlivňován výživou (mateřské mléko × umělá výživa), termínem porodu (plný × předčasný) a možným použitím antibiotik (Akagawa et al., 2019). Při osídlování trávicího systému spotřebovávají aerotolerantní mikroorganismy kyslík a snižují pH prostředí, a tím vytvářejí podmínky vhodné následnou kolonizaci striktními anaeroby jako jsou např. bifidobakterie (Xiao et al., 2021).

Období prvotního osídlování hostitele je tedy možné považovat za „terapeutické okno“, kdy je možné osídlení ovlivňovat a tím i budoucí symbiotické vztahy hostitele a jeho mikrobioty (Davis et al., 2020).

1.3 ÚVOD DO GNOTOBIOLOGIE

V průběhu fylogenetického vývoje se vyšší organismy vyskytovaly vždy jen v přítomnosti jednobuněčných organismů, které je osídlovaly. Soužitím mezi mikroorganismy a jejich hostiteli se vytvářely různé symbiotické vztahy a rostla závislost hostitele na své mikrobiotě (Krautkramer et al., 2021). Mikroorganismy poskytovaly svému hostiteli metabolity, které sám nedokázal syntetizovat, např. vitamíny skupiny B a vitamín K, umožňovaly, díky svému enzymovému vybavení, trávit pro hostitele nestrávitelné složky potravy, stimulovaly rozvoj imunitního systému (Basic and Bleich, 2019) a obsazením gastrointestinálního traktu bránily před snadnou kolonizací/infekcí střevními patogeny a projevy patobiontů (Herzog et al., 2023).

V rozvíjející se mikrobiologii konce 19. století se proto objevila otázka, jestli je život bez mikrobů vůbec možný. Luis Pasteur definoval podmínky tohoto pokusu, ale sám byl přesvědčený o tom, že život bez mikrobů možný není. Krátce po jeho smrti prokázali jeho pokračovatelé, že je možné získat bezmikrobní morče a udržet ho nějakou dobu při životě (Basic and Bleich, 2019). Tím potvrdili možnost „života bez mikrobů“, avšak za specifických podmínek jako je např. podávání vitamínů normálně produkovaných mikroorganismy.

Chovem a studiem mikrobiologicky definovaných zvířat (organismů) se zabývá gnotobiologie (gnótos = známý, definovaný a bios = život) (Basic and Bleich, 2019). Gnotobiotická zvířata jsou tedy mikrobiologicky definovaná zvířata, včetně bezmikrobních. Bezmikrobní zvířata je možné získat několika způsoby – otevřenou hysterectomií (Císařský řez), uzavřenou hysterectomií (přilepeních dna chirurgického izolátoru na břišní stěnu matky a řez je vedený skrz stěnu izolátoru) a hysterectomií (odnětí celé dělohy s plody) (Miniats and Jol, 1978). V případě laboratorních hlodavců je to také možné přirozeným porodem, pokud jsou hlodavci chováni v gnotobiotických podmínkách po generace.

1.4 PRASE JAKO ZVÍŘECÍ MODEL V BIOMEDICÍNĚ

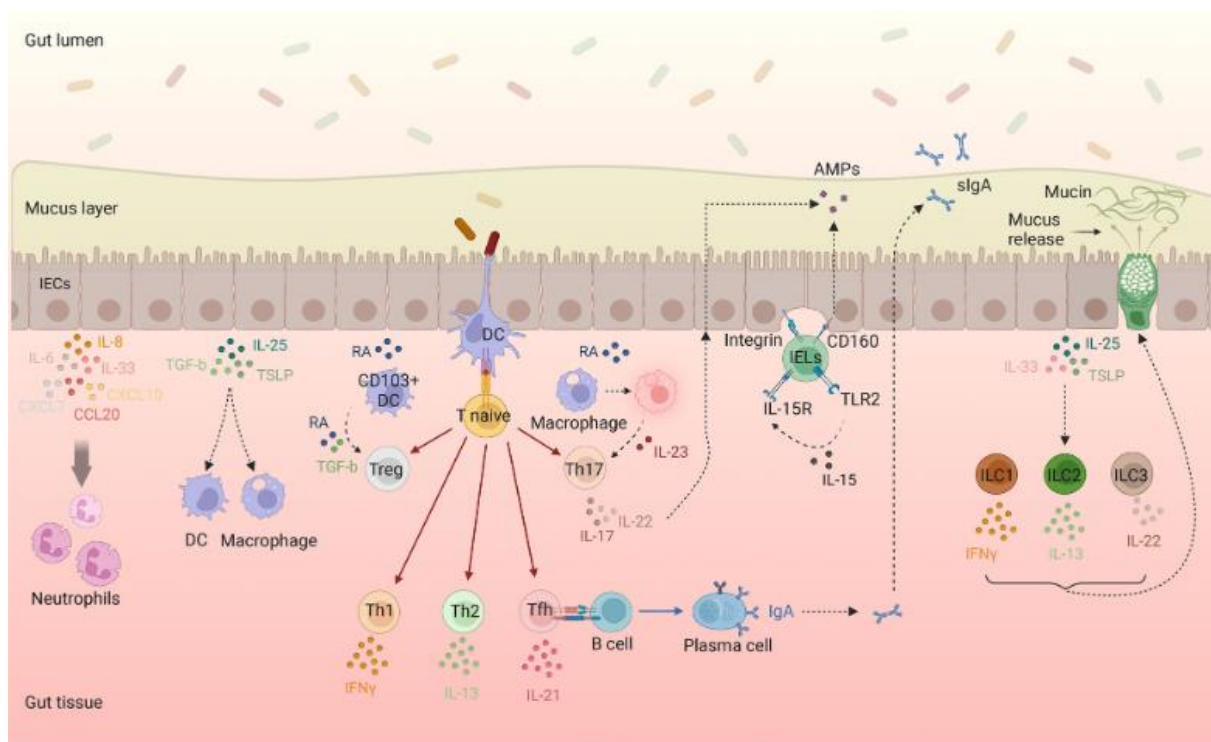
Prase sdílí anatomické, fyziologické a genetické podobnosti s člověkem, a proto je hojně využívaným translačním modelem v různých oblastech biomedicínského výzkumu (Lunney et al., 2021). Podobnost mikrobiomů člověka (Qin et al., 2010) a prasete (Xiao et al., 2016) a imunitního systému ho předurčuje pro studium interakcí mikrobiota-hostitel v případě infekčních nemocí (Meurens et al., 2012), imunitního (Pabst, 2020) a gastrointestinálního systému (Burrin et al., 2020).

Odlišnosti hemochoriální placenty člověka a epiteliochoriální placenty prasete (Roberts et al., 2016) přinášejí zajímavé možnosti v oblasti interakcí mikrobioty a hostitele u prasečího modelu s ohledem na imunokompetentnost novorozence. Lidský novorozenec je při narození vybavený ochrannými mateřskými protilátkami, protože hemochoriální placenta umožňuje transplacentární přenos mateřských protilátek (Butler et al., 2017). U prasete však nedošlo k redukci tkání u matky, a proto je šestivrstevná epiteliochoriální placenta neprostupná pro velké molekuly imunoglobulinů. Pro přežití v konvenčním prostředí však sele potřebuje příjem imunoglobulinů třídy IgG, které získá pitím mateřského kolostra (Salmon et al., 2009). V případě chirurgicky získaných selat však nejsou protilátky potřeba a sele přežívá v prostředí sterilního izolátoru bez potíží.

1.5 STŘEVNÍ BARIÉRA

Ve střevě se nachází nejrozsáhlejší rozhraní mezi vnějším prostředím a tělem hostitele. Střevní bariéra odděluje střevní lumen obsahující velké množství mikroorganismů od sterilních tkání těla hostitele. Tato bariéra chrání před průnikem bakterií, jejich toxinů a nestrávených zbytku potravy do těla hostitele. Rozhraní je tvořeno jednou vrstvou epiteliálních buněk většinou nazývaných enterocyty (v kolonu někdy kolonocyty), která se skládá ze specializovaných buněk - absorpční enterocyty, pohárkové buňky produkující muciny, endokrinní buňky produkující hormony a Panethovy buňky sekretující antimikrobiální peptidy (Yao et al., 2024).

Těsnost a funkčnost střevní bariéry zajišťují proteiny těsných a adherentních spojů a desmozomy spojující přilehlé enterocyty a které zároveň umožňují spojení s *lamina propria*, přičemž v apikální části, tj. nejbliže ke střevnímu lumen, jsou přilehlé buňky spojeny proteiny těsných spojů jako jsou např. claudiny a okludin (Rogers et al., 2023). Narušení střevní bariéry se označuje jako „leaky gut“ (prosakující střevo) (Di Vincenzo et al., 2024). Nad enterocyty směrem do střevního lumen je epiteliální vrstva pokrytá muciny, což jsou vysokomolekulární glykoproteiny (obrázek 1). Mucinová vrstva je první bariéra bránící průniku bakterií a jejich toxinů do těla. Muciny jsou složeny z k enterocytům přilehlé vrstvy a nad ní ležící pohyblivé vrstvy (Yao et al., 2024). Pohyblivá vrstva umožňuje zachycení a odstranění bakterií střevní peristaltikou. Majoritní mucin ve střevě je mucin 2 (MUC2) (Rogers et al., 2023).



Obrázek 1 Střevní bariéra a interakce střevních buněk a buněk imunitního systému (Yao et al., 2024).

1.6 RECEPTORY ROZLIŠUJÍCÍ NEBEZPEČNÉ MOLEKULÁRNÍ STRUKTURY

Pro rozlišení tělu vlastních a cizích molekulárních struktur používá hostitel specifické receptory (Pattern Recognition Receptors; PRR), které se podle homologie jejich proteinových domén rozdělují do 5 tříd: Toll-like receptory (TLR), nucleotide oligomerization domain (Nod)-like receptory (NLR), retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptory (RLRs), C-type lectin receptory (CLRs), a absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptory (ALRs) (Li and Wu, 2021).

V minulosti se v rámci teorie struktury rozlišovaly jen jako vlastní a cizí. Polly Matzingerová však svou „danger teorií“ (Matzinger, 1994) vnesla do tohoto chápání další rozměr a „vlastní“ a „cizí“ se zobecnilo na „nebezpečné“. Receptory rozlišující cizí struktury se obecně označují jako PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Zindel and Kubes, 2020). Příkladem hostitelově tělu cizích struktur je lipopolysacharid (LPS), který je součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií (Gauthier et al., 2022).

Receptory rozlišující vlastní struktury, které jsou však za běžných okolností imunitnímu systému skryté a jejich objevení indikuje tkáňové poškození jsou nazývány DAMP (Damage-

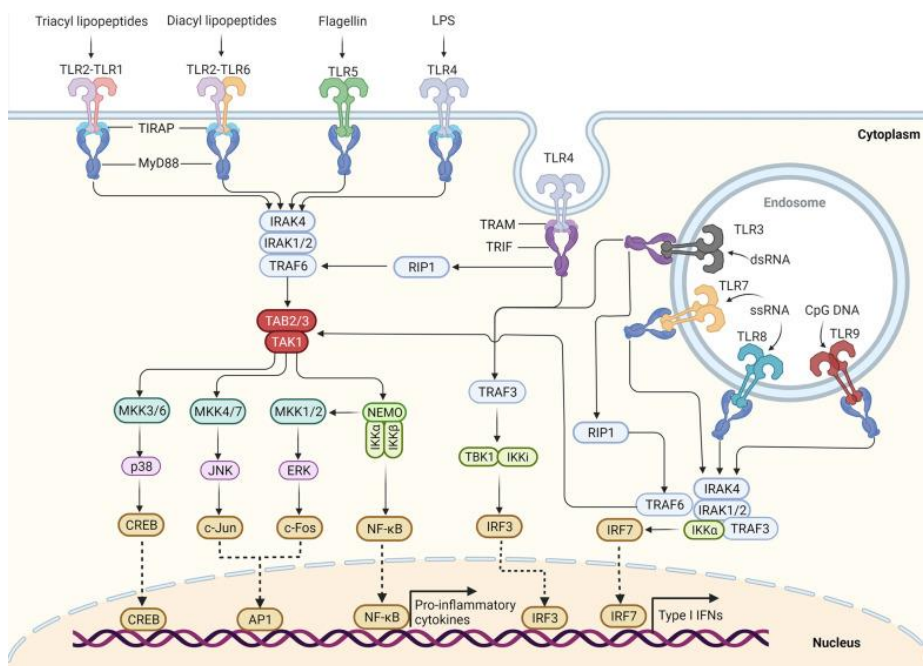
Associated Molecular Patterns) (Zindel and Kubes, 2020). Příkladem těchto cizích struktur může být jaderný protein high mobility group box 1 (HMGB1) (Andersson and Yang, 2022).

Jen pro úplnost – v literatuře jsou zmíněny také struktury související s životním stylem, ve zkratce LAMP (Life-Style Associated Molecular Patterns) (Zindel and Kubes, 2020), jejichž rozlišování však není obecně rozšířeno.

1.7 TOLL-LIKE RECEPTORY

Jako základní senzory pro rozlišování PAMP kooperující s mechanismy přirozené imunity jsou uváděny skupiny PRR - Toll-like receptory (TLR), Nod-like receptory (NLR), RIG-I-like receptory (RLR), AIM-like receptory, C-type lektinové receptory, and nitrobuňčné DNA and RNA senzory (Cao, 2016) (Duan et al., 2022).

TLR rozlišují PAMP jako dimery. Mohou to být homodimery obsahující stejné molekuly, např. TLR4/TLR4 nebo heterodimery vzniklé kombinací různých TLR, např. TLR1/TLR2 (Duan et al., 2022).



Obrázek 2 TLR signální dráhy (Duan et al., 2022).

Výsledkem signalizace TLR4 signální kaskády je, v závislosti na lokalizaci TLR4 (buněčná membrána versus endosom) produkce efektorových molekul (zánětlivé cytokiny versus interferony 1 třídy) (obrázek 2) (Duan et al., 2022; Kawai and Akira, 2011).

S ohledem na náš zájem o bakterie jsou obecně TLR přiřazovány tyto základní bakteriální ligandy: TLR2 – peptidoglykan grampozitivních bakterií (peptidoglykan je však v malé míře přítomý i u grampozitivních bakterií a mykobakterií), TLR4 – lipopolysacharid gramnegativních bakterií, TLR5 – bílkovina bičíku flagelin a TLR9 – CpG motiv (Akira et al., 2006). V kombinaci podjednotek heterodimerů TLR2/TLR1 jsou to triacyl lipopeptidy a TLR2/TLR6 diacyl lipopeptidy (Duan et al., 2022). Jednoznačná a nekritická interpretace podsouvá názor, že TLR2 je typický pro grampozitivní, zatímco TLR4 pro gram-negativní bakterie. Situace se „specifitou“ TLR rozlišující určité bakteriální struktury je však podstatně složitější, protože se jedná o multiligandové receptory, které nejsou svým rozlišováním zaměřeny jen na jeden ligand (Gong et al., 2020). Z tohoto důvodu je tedy na místě potřebná určitá zdrženlivost, protože např. curli gramnegativní bakterie *Salmonella Typhimurium* jsou rozlišovány právě TLR2 (Tükel et al., 2010). A aby byla situace ještě komplikovanější a na interpretaci náročnější, multiligandové TLR rozlišují kromě struktur PAMP, také struktury DAMP (Gong et al., 2020). Názorným příkladem je HMGB1, u kterého je popsáno okolo 15 receptorů mezi které patří i TLR2, TLR4 a TLR9, tedy „bakteriální“ TLR (Paudel et al., 2019).

1.8 TOLL-LIKE RECEPTOR 4

TLR4 je obecně vnímán jako receptor rozlišující LPS, který je součástí vnějšího listu buněčné stěny gramnegativních bakterií a který se uvolňuje při buněčném dělení, uvolnění vezikul vnější membrány či buněčné smrti (Gorman and Golovanov, 2022). Situace je však mnohem složitější a TLR4 je multiligandový receptor dalších struktur, mezi nimi také, např. nitrobuněčný alarmin HMGB1 (Gong et al., 2020; Paudel et al., 2019). Přehnaná reakce na zánětlivou reakci vyvolávající podnět, kdy dochází k vyplavení extrémních hladin zánětlivých cytokinů, tzn. „cytokinová bouře“ (cytokine storm) (Karki and Kanneganti, 2021) může vést k poškození orgánů a smrti hostitele/pacienta (Cron et al., 2023). Možná modulace signalizace TLR, např. s polyfenoly, terpenoidy, steroidy, antibiotiky, anorganickými sloučeninami či jinými způsoby, je proto významná pro možnost předcházení či snížení poškození orgánů a následné smrti (Zheng et al., 2024).

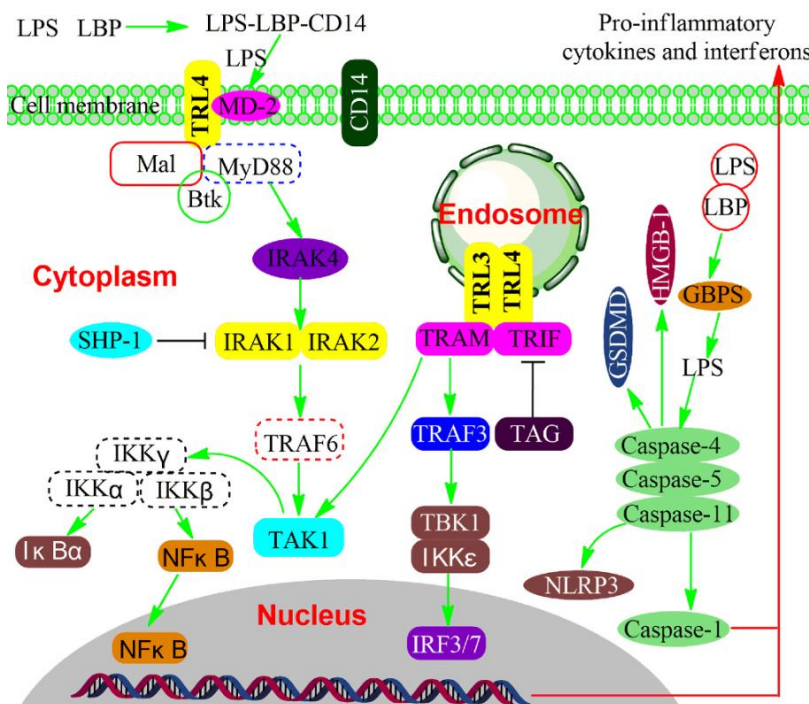
TLR4 rozlišuje své ligandy jako homodimer, který je v komplexu s proteinem MD-2 (Gauthier et al., 2022). V případě výskytu v krvi se na LPS váže protein LBP (LPS-binding protein), který LPS akumuluje. Tento komplex se dále naváže na TLR4 koreceptor - molekulu CD14, která

LPS-LBP přiblíží k TLR4/MD-2 receptorovému komplexu, umožní jejich vzájemnou vazbu, a signalizaci TLR4 signální dráhou (Kawai and Akira, 2011).

TLR4 se může vyskytovat jak v membránově vázané, tak v „rozpuštěné“ (solubilní) formě po jeho proteolytickém odštěpení z buněčné membrány. V tomto případě se uvádí jeho působení jako „decoy“ receptoru (v překladu návnada nebo vějička). Odštěpený TLR4 se sice naváže na ligand, ale není součástí TLR4 signální dráhy, čímž nedojde k následné signalizaci končící produkcí zánětlivých cytokinů (Jung et al., 2009). Jedná se o mechanismus zpětné vazby, která umožňuje regulaci produkce cytokinů v jejich fyziologickém rozmezí (Karki and Kanneganti, 2021; Medzhitov, 2021).

1.9 TLR4 SIGNÁLNÍ DRÁHA

Po rozeznání LPS dochází k signalizaci, která ve svém výsledku vede k tvorbě a uvolnění efektorových molekul – zánětlivých cytokinů (Karki and Kanneganti, 2021). V závislosti, jestli se jedná o signalizaci receptorem na povrchu buněčné membrány probíhá signalizace přes adaptorovou molekulu MyD88 (myeloid partition factor 88) a výsledkem je produkce zánětlivých cytokinů. V případě receptoru v endosómu se jedná o TRIF (Tir-domain interferon- β) kde výsledkem je produkce interferonů β . TLR4 je jediným TLR receptorem, který využívá dva adaptorové proteiny (obrázek 3) (Kawai and Akira, 2011; Zheng et al., 2024).



Obrázek 3 TLR4 signalizace při sepsi (Zheng et al., 2024).

1.10 HIGH MOBILITY GROUP BOX 1

Dříve již zmíněný HMGB1 patří, na rozdíl od LPS, mezi DAMP. Je to jaderný protein, který se objeví mimo buňku při výrazné stimulaci imunitních buněk a jeho sekreci nebo při buněčné nekróze (Bianchi et al., 2017). Protože signalizuje nebezpečí pro organismus, bývá řazen do skupiny molekul nazývaných alarminy (Yang et al., 2020). Při nízkých koncentracích je popisovaný jeho příznivý účinek na hojení, při vysokých koncentracím amplifikuje zánětlivý proces a je součástí procesu samopoškození organismu neřízenou přehnanou zánětlivou reakcí (cytokinová bouře) (Karki and Kanneganti, 2021), která může vznikat jak při sepsi způsobené gramnegativními bakteriemi (Andersson and Yang, 2022), tak při tkáňovém poškození (Gong et al., 2020). HMGB1 je typickým zástupcem molekul „sterilního zánětu“, který může vzniknout na základě mechanického poškození tkání a jehož následky jsou podobné sepsi (Gong et al., 2020).

Zajímavá je skutečnost, že HMGB1 může zaujmout také roli LBP a vychytávat LPS v tělních tekutinách, tedy tvořit s nimi komplex, který je prezentován k rozlišení TLR4. Jak již bylo uvedeno, je známo okolo 15 receptorů pro HMGB mezi které patří také TLR2, TLR4 a TLR9 (Paudel et al., 2019).

1.11 SALMONELLA TYPHIMURIUM LT2

Salmonely patří do skupiny gramnegativních bakterií tvořené pouze dvěma druhy – *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica*. *S. bongori* je střevní patogen studenokrevních živočichů a není pro člověka a hospodářská zvířata příliš významná. *S. enterica* je tvořena 6 poddruhy. Pro člověka a teplokrevné živočichy je nejvýznamnější *S. enterica* subsp. *enterica*, která je tvořena zhruba 2 600 sérovary (Han et al., 2024). Některé sérovary jsou druhově specializované, např. *S. Typhi* a *S. Paratyphi* a způsobující tyfoidní onemocnění u člověka. Podobné onemocnění u prasete vyvolává *S. Choleraesuis*. *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) je „kosmopolitní“ sérovar, který postihuje distální část tenkého střeva (ileum) a tlusté střevo a působí „salmonelózu“, tedy enterokolitidu (Gal-Mor et al., 2014; Kim and Isaacson, 2017).

Je zajímavé, že díky výrazně odlišnému mikrobiomu myši (Xiao et al., 2015) a člověka (Qin et al., 2010) způsobuje *S. Typhimurium* u myši onemocnění podobné lidskému tyfu. Při předcházející selektivní dekontaminaci streptomycinem se však onemocnění vyvolané *S. Typhimurium* mění na enterokolitidu. Stejně tak enterokolitidu vyvolá u bezmikrobních myši

(Walker et al., 2023). U prasete shodně jako u člověka, pravděpodobně v důsledku podobného mikrobiomu (Xiao et al., 2016) *S. Typhimurium* přirozeně vyvolává enterokolitidu (Kim and Isaacson, 2017).

U konvenčních jednotýdenních selat *S. Typhimurium* LT2 nevyvolá zřetelné klinické příznaky enterokolitidy, případně způsobí pouze mírný průjem (Clarke and Gyles, 1987). Infekce tímto kmenem je však letální pro jednotýdenní bezmikrobní selata (Splichal et al., 2020).

1.12 PRINCIPY POUŽITÝCH METOD

1.12.1 Izolace celkové RNA

Pro získání RNA je třeba lýzovat buňky. To se provádí pomocí mechanické homogenizace a díky ní se získá homogenát obsahující směs DNA, RNA, proteiny, sacharidy, lipidy a nízkomolekulární látky. Pro následné vyšetření je potřeba oddělit RNA od složek, které by v dalších krocích mohli interferovat. Dříve hojně používaná byla metoda fenol-chloroformové extrakce, která však přinášela zdravotní rizika. Dnes se hojně využívá komerčních kytů „solid phase extraction“ na principu adsorbční chromatografie. Základem je zachycení RNA v kolonce, kdy jsou ostatní látky z homogenátu odmyty. Poté je použit eluční roztok, který dokáže vymýt RNA z kolonky do sběrné zkumavky.

1.12.2 Syntéza cDNA

Reverzní transkripce je metoda sloužící k převedení RNA zpět na DNA, která však není shodná s genomovou, jelikož je ochuzena o introny, které se do templátové RNA nedostanou. Výsledný produkt tedy nazýváme komplementární DNA (complementary = cDNA). Tento krok je nutný pro kvantifikaci jednotlivých RNA, jelikož metoda real-time PCR nedokáže RNA replikovat. K syntéze je použita reverzní transkriptáza, která nejen nesyntetizuje cDNA, ale při přítomnosti vzniklého dvouřetězce RNA-DNA, dokáže hybrid odstranit díky své hybrid dependentní RNasa dependentní aktivitě.

1.12.3 Real-time polymerázová řetězová reakce

Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce je technika molekulární biologie používaná k měření množství cílové DNA v reálném čase během průběhu PCR. Tato metoda umožňuje přesně kvantifikovat počet kopií specifické DNA v počátečním vzorku. Princip real-

time PCR spočívá v monitorování amplifikace DNA pomocí fluorescenčního signálu, který je generován během každého cyklu.

Výhody real-time PCR zahrnují vysokou citlivost, rychlost a možnost kvantifikace amplifikované DNA v reálném čase, což umožňuje přesnější a efektivnější analýzu genové exprese, genových kopií a detekci patogenů.

LNA sondy jsou hybridizační sondy založené na stejném principu jako TaqMan, s tím rozdílem, že LNA sondy využívají pro navázání 8-9 nukleotidů, na rozdíl od 25-35 nukleotidových TaqMan sond. Začleněním modifikovaných nukleotidů do sekvence, kdy se díky jedné bázi s methylenovým můstkem mezi 2'O a 4'C zvýší T_M až o 8 °C, zvyšujeme stabilitu a specifitu a tím se zvyšuje poměr mezi signálem a šumem (Splichalova et al., 2014).

1.12.4 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunochemická metoda, která umožňuje detekovat a kvantifikovat antigeny nebo protilátky v biologickém vzorku. Princip metody spočívá v sérii biospecifických interakcí a následné enzymatické reakci, která vede k poskytnutí signálu, nejčastěji barevné změně. Na povrch mikrotitrační destičky se naváží specifické protilátky proti testované látce. Tyto protilátky zachytí odpovídající proteiny z testovaného vzorku (buněčný lysát). Na komplex antigen-protilátka se naváže další specifická protilátka, tzv. detekční protilátka, která je značená enzymem. Tato detekční protilátka rozpozná specificky analyt a naváže se na něj. V posledním kroku enzym štěpí substrát za vzniku barevného produktu. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné množství zachyceného analytu v testovaném vzorku. Intenzita zabarvení se změří pomocí spektrofotometru a na základě získaných hodnot se vyhodnotí koncentrace analytu v testovaném vzorku.

1.12.5 Extended Multi-Analyte Profiling technologie

Extended Multi-Analyte Profiling (xMAP) je technologie vyvinutá společností Luminex Corporation. Jedná se o platformu pro multiplexní testování, což znamená, že umožňuje současně testovat vzorek na přítomnost více analytů (jako jsou proteiny, nukleové kyseliny nebo jiné molekuly) v jedné reakci. Technologie xMAP využívá paramagnetické mikroskopické fluorochromy značené (kódované) kuličky. Každá magnetická kulička je

pokryta dvěma typy fluorescentních barviv, které vytvářejí jedinečný identifikační kód. Díky tomu lze na základě fluorescence rozlišit stovky různých typů magnetických kuliček v jediném vzorku.

1.13 PRÁCE SE ZVÍŘATY A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

1.13.1 Princip 3R

Pokusy se zvířaty mohou provádět jen osoby, které k tomu mají osvědčení, které uděluje Ministerstvo zemědělství České republiky na 7 let po absolvování kurzu a složení závěrečné zkoušky. Pro schválení konkrétních pokusů se zvířaty je třeba vypracovat projekt pokusů, který schvaluje odborná komise příslušné instituce a postupuje ke správnému řízení rezortní komisí. Práci se zvířaty je možné započít až po schválení projektů pokusů a jeho nabytí právní moci.

Při pokusech se zvířatech je třeba vycházet z principu 3R (reduction, refinement, replacement) (Padrell et al., 2021).

Reducement – počet zvířat použitých v pokusu by měl být co nejmenší. Zde je třeba brát ohled také na statistické vyhodnocení – např. Kolmogorov-Smirnovův test normality rozdělení, které umožní zvolit odpovídající test.

Refinement – se zvířaty by mělo být manipulováno co nejohleduplněji, aby nedocházelo k jejich zbytečné zátěži a utrpení.

Replacement – pokusy se zvířaty by měly, pokud je to možné nahrazovány jinými metodami, např. prací s buněčnými kulturami.

Pokusy se zvířaty mohou být prováděny pouze ve schválených uživatelských zařízeních, které mají platné příslušné oprávnění vydané Ministerstvem zemědělství České republiky.

1.13.2 Vyhodnocení pokusů

V závislosti na charakteru pokusů a počtu skupin je třeba volit odpovídající statistické metody. Základním kritériem pro určení vhodnosti metody je vyhodnocení normality rozložení hodnot. Snaha o použití co nejmenšího počtu zvířat je však v rozporu se statistickým vyhodnocením, kdy při větším počtu případů bychom se, jednoduše řečeno, dostali snáze ke statistické průkaznosti rozdílů mezi skupinami. Limitující tedy může být např. vyhodnocení normality rozložení hodnot, kdy pro Kolmogorov-Smirnovův test je minimálně požadovaný počet případů (zvířat) 5.

2 CÍLE PRÁCE

- Seznámit se a osvojit si postupy získání a odchovu gnotobiotických selat.
- Získání, skladování, příprava a zpracování vzorků.
- Osvojit si při zpracování vzorků izolaci celkové RNA, přepis do cDNA, ELISA, xMAP technologii (Luminex)
- Posoudit možnosti stanovení claudinu-1 a okludinu metodou ELISA
- Presentovat v diplomové práci výsledky na kterých se diplomantka podílela a je spoluautorkou na publikacích (viz přílohy)
- Možný příspěvek do metodického zázemí pracovního kolektivu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY

- Jednokanálové pipety Finepipette Digital (Thermo Labsystems, Helsinky, Finsko)
- Poloautomatické pipety Bio Control (Thermo Scientific, Helsinky, Finsko)
- Pipetus Aku (Hirschmann, Eberstadt, Německo)
- Vortex (Labnet, Edison, NJ, USA)
- Stolní minicentrifuga (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA)
- Centrifuga Hettich 32R 1614 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Homogenizátor Tissue lyzer LT (Qiagen, Hilden, Německo)
- Nanodrop (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA).
- Termocykler T100 (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Termocykler iQ5 (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Termostat MIR – 162 (Sanyo, Osaka, Japonsko)
- Spektrofotometr pro měření mikrotitračních destiček Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- 2 mm zirkoniové kuličky (BioSpec, Bartlesville, OK, USA)
- 2 mm křemičité střepey (Biospec, Bartlesville, OK, USA)
- 4 mm křemičité střepey (Biospec, Bartlesville, OK, USA)
- Ocelové kuličky o průměru 3,5 mm (Qiagen, Hilden, Německo)
- Polypropylenové destičky (Brand, Wertheim, Německo)
- Automatizovaná promývačka Hydro flex (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Třepačka Orbit 300 (Labnet, Edison, NJ, USA)
- Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- PCR zkumavka 0.2 ml, Biosphere (Sarstedt, Nümbrecht, Německo)
- PCR zkumavka 0.5 ml, Biosphere (Sarstedt, Nümbrecht, Německo)
- Špičky s filtrem Neptune (Biotix, San Diego, CA, USA)
- Černé destičky (NUNC, Roskilde, Dánsko)

Pro práci s RNA a DNA byl použit materiál (špičky, eppendorfky) s deklarovanou sterilitou, DNA free, bez enzymů DNase, RNase a ATP, neobsahující PCR inhibitory.

3.2 REAGENCIE A KITY

- RNAlater (Sigma, St. Luis, MO, USA)
- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo)
- QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Německo)
- Voda pro PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- FastStart TaqMan Universal Probe Master (Roche Applied Science, Penzberg, Německo)
- Primery (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česko)
- LNA sondy (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- NP-40 (Thermo Scientific, Helsinki, Finsko)
- Cytobuster (Merck, Burlington, MA, USA)
- Pig Claudin - 1 (CLDN-1) ELISA kit (Abbexa, Cambrige, Anglie)
- Pig Okludin (OCLN) ELISA kit (Abbexa, Cambrige, Anglie)
- Pig HMGB1 ELISA kit (Abbexa, Cambrige, Anglie)
- Dulbeco (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

3.2.1 Další pomůcky, přístroje a software

Pro vyhodnocení výsledků z PCR byl použit program iQ5 Optical System Software, verze 1.0 (Bio Rad). Literární reference byli tvořeny pomocí Paperpile (Google, Menlo Park, CA, USA), obrázky mnou vytvořené byli generovány za pomoci programu Biorender (Toronto, Kanada), normalizace genového přepisu a výpočet relativní exprese mRNA byly zpracovány software Genex v. 6 (MultiD Analyses AB, Gothengurg, Švédsko), statistické vyhodnocení a část grafů byly provedeny GraphPad Prism softwarem verzí 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍCH SUSPENZÍ

Bakteriální kultury byly ze sbírky Mikrobiologického ústavu v Novém Hrádku.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB-12 (BB12) a *Bifidobacterium boum*, kmeny RP36 a RP37 jsme resuspendovali v 0,05 M fosfátovém pufru, pH 6,5 obsahující 500 mg/l cysteinu (PBC), naočkovali na Wilkins-Chalgren agar (Oxoid, Basingstoke, UK) doplněný o sójový pepton (5 g/l; Oxoid), mupirocin (100 mg/l) a kyselina octová (1 ml/l) v anaerobních nádobách se sáčky AnaeroGen (Oxoid) a inkubovali při 37 °C po dobu 48 hodin. jednotlivé kolonie jsme přemístili do lahvíček obsahujících 10 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid) doplněného se sójovým peptonem (5 g/l, Oxoid) a anaerobně kultivovali při 37 °C přes noc. Bakterie jsme centrifugovali při 4000 g po dobu 10 minut při teplotě místnosti a buněčná peleta byla dvakrát promyta 0,05 M fosfátovým puftrem, pH 6,5 obsahujícím 500 mg/l cysteinu (PBC).

Lactobacillus amylovorus jsme kultivovali v 10 ml MRS bujónu (Oxoid). Buňky jsme získali centrifugací při 4000 g po dobu 10 minut. Peleta byla dvakrát promyta 0,05 M fosfátovým puftrem.

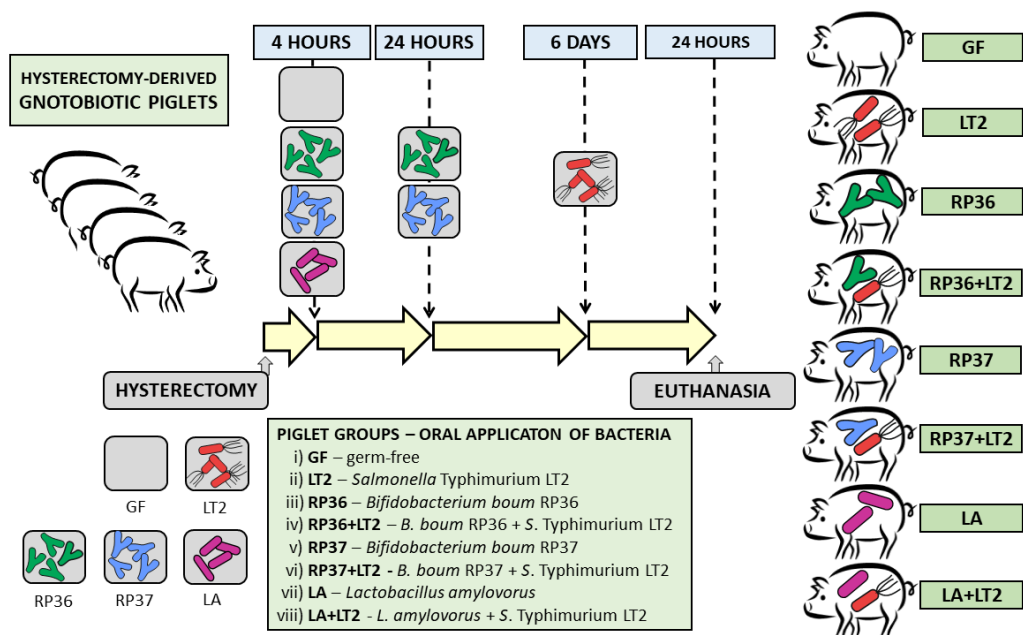
Salmonella Typhimurium LT2 jsme kultivovali na masopeptonovém živném agaru (Oxoid, Basingstoke, Anglie). Po vyočkování kolonií se z nich připraví suspenze v PBS. Výsledné koncentrace bakterií jsme zjišťovali spektrofotometricky při 600 nm pomocí kalibrační křivky.

3.4 OSAZOVÁNÍ SELAT BAKTERIEMI

Podstatnou část práce tvoří publikované výsledky, a proto jsou u schémat a grafů uváděny odkazy na práce ve kterých byly výsledky publikovány. Oba články jsou jako přílohy 2 a 3 součástí diplomové práce.

3.4.1 Donošená selata – schéma experimentu

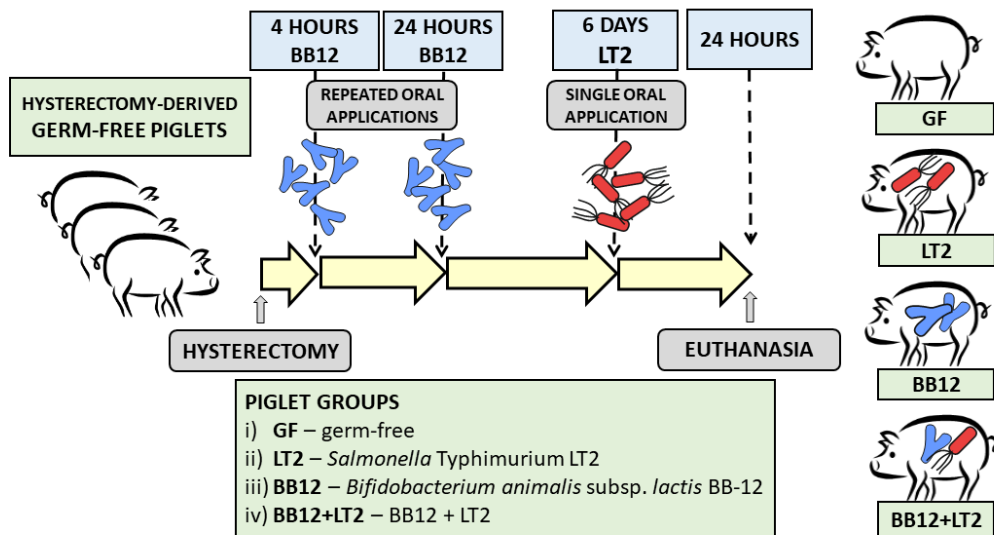
Splichalova, A., Kindlova, Z., Killer, J., Neuzil Bunesova, V., Vlkova, E., Valaskova, B., Pechar, R., Polakova, K., Splichal, I., 2023. Commensal Bacteria Impact on Intestinal Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets. *Pathogens* 12, 1293. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111293z>



Obrázek 4 Schéma osazování donošených selát (Splichalova et al., 2023).

3.4.2 Nedonošená selata – schéma experimentu

Splichal, I., Donovan, S.M., Kindlova, Z., Stranak, Z., Neuzil Bunesova, V., Sinkora, M., Polakova, K., Valaskova, B., Splichalova, A., 2023. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms24032329>



Obrázek 5 Schéma osazování nedonošených selát (Splichal et al., 2023).

3.5 ODBĚRY VZORKŮ

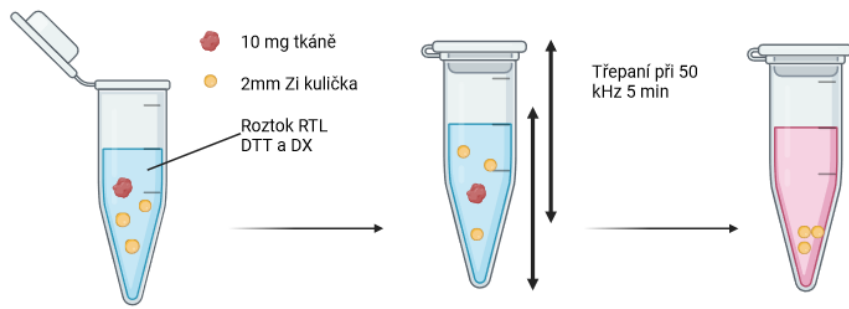
Střevní výplachy jsme provedli Dulbecco PBS, centrifugovali je při $2500 \times g$ po dobu 30 minut při $8 \text{ }^\circ\text{C}$ a supernatanty filtrovali přes $0,2 \text{ m}$ nitrocelulózový filtr (Sartorius, Göttingen, Německo). Citrátovou krev jsme centrifugovali při $1200 \times g$ po dobu 10 minut při $8 \text{ }^\circ\text{C}$. před zamražením a uchováním při $-45 \text{ }^\circ\text{C}$ jsme ke střevním výplachům přidali směs inhibitorů proteáz (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo).

3.6 IZOLACE RNA

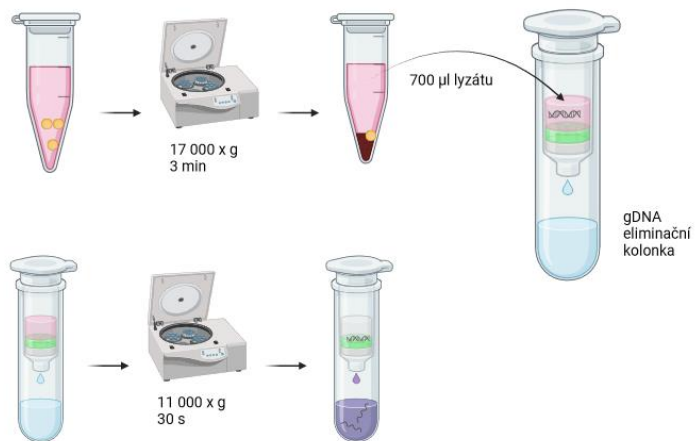
Při pitvách je odebrána tkáň ilea (tenké střevo – kyčelník) a kolonu (tlusté střevo – příčný tračník) do zkumavek s roztokem RNeasy lator pro pozdější izolaci. Vzorky jsou uchovávány při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vlastní izolace se provádí kitem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) homogenizací 10 mg tkáně, získaného příčným řezem střevem. Vzorek tkáně je umístěn do zkumavky s roztokem $600 \text{ }\mu\text{L}$ RLT pufru s přídávkem $48 \text{ }\mu\text{L}$ DTT (dithiotreitolu) a $3 \text{ }\mu\text{L}$ reagensie DX (Qiagen). K homogenizaci slouží 2 mm zirkoniové kuličky (BioSpec, Bartlesville, OK, USA), které na homogenizátoru Tissue lyzer LT (Qiagen) tkáň rozbijí při třepání o 50 Hz po dobu 5 min . Lyzát je centrifugován 3 minuty při $17\,000 \times g$ (obrázek 6).

Supernatant je převeden na spin gDNA kolonku, která výrazně eliminuje možný obsah kontaminující genomové DNA. Po centrifugaci po 30 s při $11\,000 \times g$ je do sběrné zkumavky přidán $600 \text{ }\mu\text{L}$ 70% etanolu a obsah se mírně promíchá. $700 \text{ }\mu\text{L}$ tohoto roztoku je přeneseno na RNeasy kolonku. Centrifugací 15 s při $11\,000 \times g$ jsou odstraněny zbylé složky lyzované tkáně kromě ethanolem denaturovaných, které se zachytí na koloně (obrázek 7). V dalším kroku je provedeno promytí nejprve $700 \text{ }\mu\text{L}$ RW1 roztoku, zcentrifugováno při $11\,000 \times g$ po dobu 15 s , a poté $2\times$ promyto pomocí $500 \text{ }\mu\text{L}$ RPE roztoku. Při druhé centrifugaci se roztok odsraní při delší centrifugaci po dobu 2 min . Pro zvýšení čistoty výsledné RNA je vyměněna eluční zkumavka pod kolonkou. Následuje další centrifugace, tentokrát při $14\,000 \times g$ po dobu 1 min (obrázek 8). Kolonka nyní již se celkovou RNA zachycenou na SPE membráně je umístěna do nové RNA-free zkumavky a na kolonku je aplikováno $30 \text{ }\mu\text{L}$ RNase-free vody. Eluce RNA probíhá pomocí centrifugace při $11\,000 \times g$ po dobu 1 min (obrázek 9).

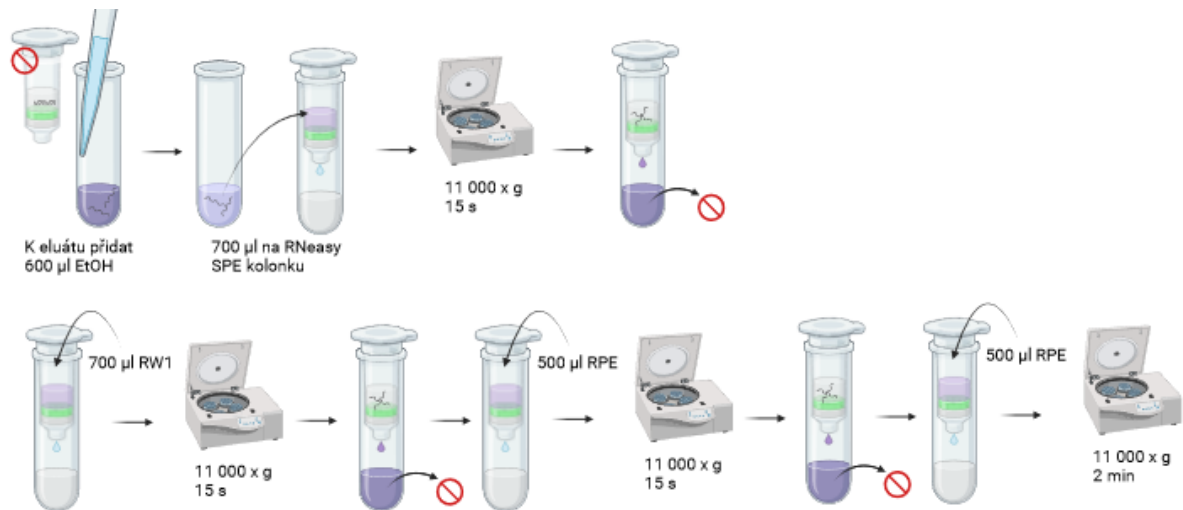
Výsledný izolát je převeden do menší zkumavky a jsou odebrány $4 \text{ }\mu\text{L}$ pro měření a zbytek uložen na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do syntézy cDNA.



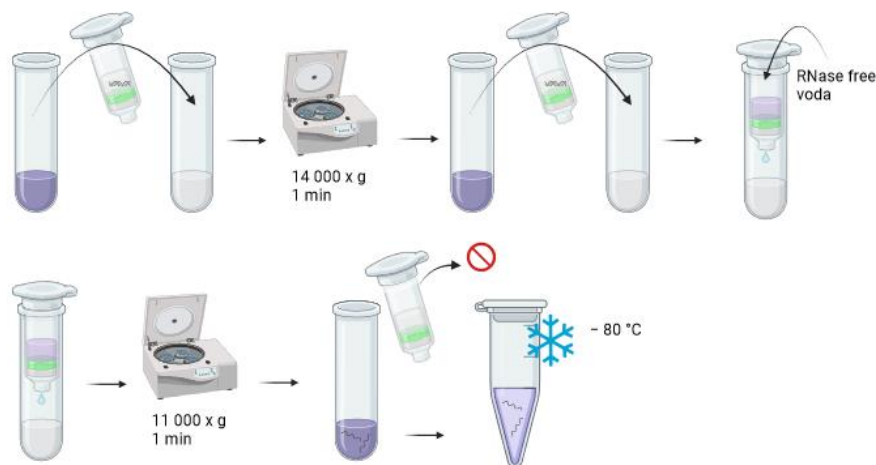
Obrázek 6 Homogenizace vzorku pro izolaci RNA



Obrázek 7 Eliminace genomové DNA v SPE kolonce



Obrázek 8 Promývací kroky při Izolaci RNA



Obrázek 9 Eluce RNA z SPE kolonky

3.6.1 Měření koncentrace celkové RNA

Koncentrace je měřena přístrojem Nanodrop (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). Na mikrokyvetu jsou naneseny 2 μ L izolované celkové RNA.

Měření probíhá při vlnové délce 260 nm pro RNA, 280 nm pro proteiny a 230 nm pro korekci na přítomnost solí. Poměrem mezi RNA a proteiny získáme bezrozměrné číslo, které nad 1,8 značí izolát bez výrazné proteinové kontaminace. Poměrem mezi RNA a solí získáme informaci o rozdělovací účinnosti kolony.

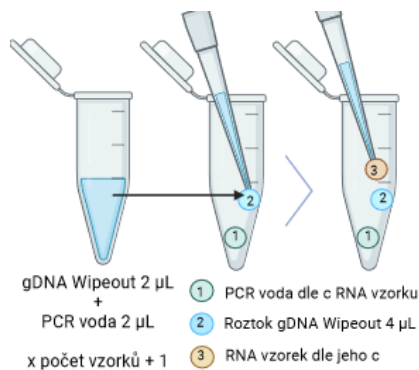
Koncentrace vyizolované RNA je určena výpočtem z absorbance dle vzorce. Kdy konstanta 0,04 je faktor pro jednovláknovou RNA (40 ng-cm/ml pro měření RNA ve vodě).

$$c_{RNA} = A_{260} \cdot 0,04$$

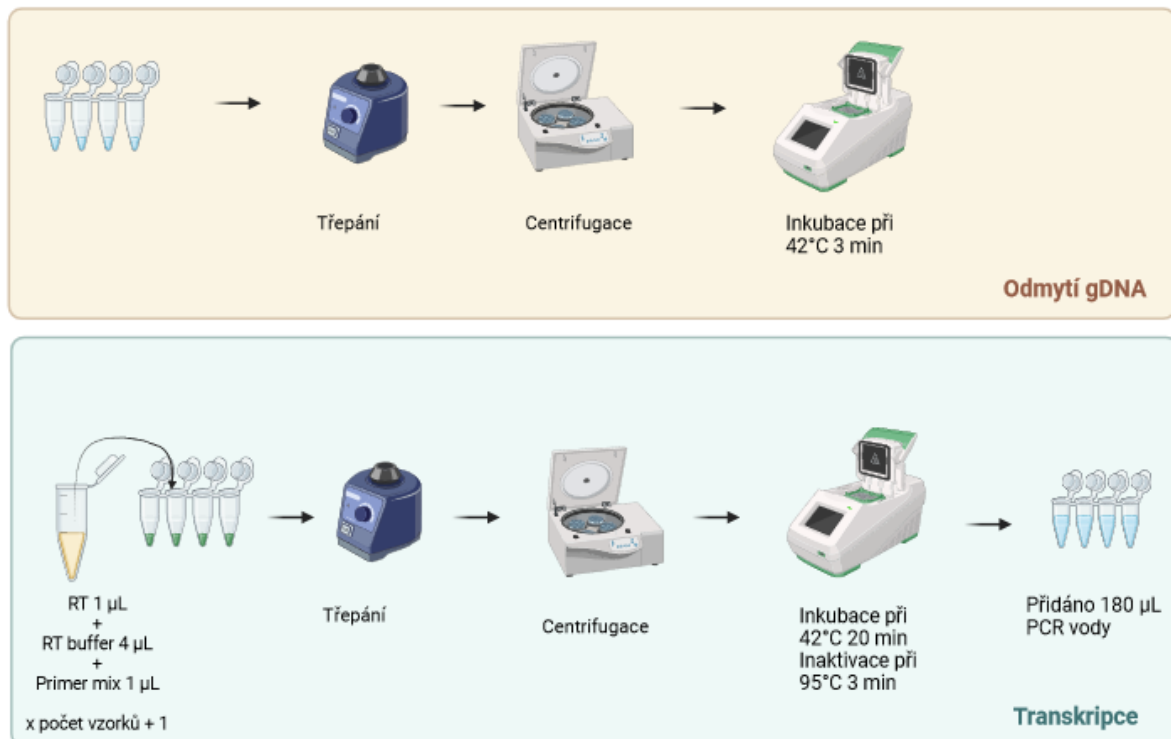
3.7 SYNTÉZA cDNA

Objem izolované celkové RNA ve vodě je vypočten dle naměřené koncentrace v Nanodropu (Thermo Fisher Scientific), kdy vzorek bude obsahovat 500 ng celkové RNA. Pro syntézu cDNA se používá QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Objem vyizolované RNA obsahující 500 ng se doplní do standardního objemu 10 μ l vodou pro PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a syntéza cDNA se provede ve dvou krocích.

1. Pro další odstranění možné kontaminace izolované RNA genomovou DNA se přidá k 10 μl obsahující 500 ng celkové RNA 4 μl gDNA Wipeout pufru. Roztok ve zkumavce se protřepe na vortexu a poté zcentrifuguje. Inkubace probíhá při 42 °C po dobu 3 min.
2. Po přidání 6 μL roztoku obsahujícího reverzní transkriptázu se vzorky protřepou a zcentrifugují. Dále jsou vloženy do termocykléru T100 (BioRad) a inkubují se při 42 °C po dobu 20 min. Poté je reverzní transkriptáza inaktivována 3 minuty při 95 °C.
3. Pro přípravu templátu pro následnou PCR se do každého vzorku přidá 180 μL vody pro PCR templáty jsou uskladněny při -30°C.



Obrázek 10 Příprava roztoků pro odmytí zbytkové gDNA



Obrázek 11 Vlastní reverzní transkripce izolované RNA

3.8 REAL-TIME PCR

Reagencie pro PCR analýzu byly použity v tzv. master mixu, který se skládá z FastStart TaqMan Universal Probe Master (Roche Applied Science, Penzberg, Německo), primerů (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česko), LNA sond (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko) a vody pro PCR (Life Technologies). Celkový objem reakční směsi v jedné jamce je 18 μ l.

Tabulka 1 Reakční směs pro PCR

Reagencie	Objem (μ l)
FastStart Universal Probe Master (2x)	10
PCR voda	7,6
LNA sonda	0,2
Forward primer	0,1
Reverse primer	0,1

Dva μ l PCR templátu byly přidány k 18 μ l FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostics) obsahující 500 nM forward a reverse primeru od každého (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika) a 100 nM LNA sondy (Universal ProbeLibrary; Roche Diagnostics) (tabulka 1). Amplifikace byla provedena v duplikátech.

Připravenou reakční směs protřepeme na vortexu a následně zcentrifugujeme. Tuto směs přeneseme do 96-jamkové destičky pro PCR. K tomuto roztoku je následně přidána cDNA v objemu 2 μ l do každé jamky. Destička je přelepena fólií a je zcentrifugována, protřepána a znovu zcentrifugována. Následně je destička umístěna do termocykléru iQ5 (BioRad, Berkeley, CA, USA) a je nastaven teplotní program.

Tabulka 2 Nastavení cyklu PCR reakce

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Krok 1	95 °C	10 min	1x
Krok 2	95 °C	15 s	45x
	60 °C	60 s	
Krok 3	4 °C	∞	1x

K vyhodnocení byl použit program iQ5 Optical System Software, verze 1.0 (Bio Rad). Primery pro β actin a Cyclophilin A byli použity jako referenční markery replikace RNA v buňkách.

Tabulka 3 Primery a jejich sekvence a odpovídající LNA sondy

Gen	Kód v databázích	Forward primer	Délka LNA sondy
		Reverse primer	
β actin	U07786	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	9
		AAGAGCGCCTCTGGACAC	
Cyclophilin A	NM214353	CCTGAAGCATAACGGGTCCT	48
		AAAGACCACATGTTTGCCATC	
TLR2	NM213761	CTGCTCCTGTGACTTCCTGTC	40
		AGGTAGTTCTCCGGCCAGTC	
TLR4	AB188301	CCATGGCCTTTCTCTCCTG	33
		AGGTAGTTCTCCGGCCAGTC	
TLR9	NM213958	CAATGACATCCATAGCCGAGT	3
		CGTTGCCGCTAAAGTCCA	
MyD 88	AB292176	GCAGCTGGAACAGACCAACT	41
		GTGCCAGGCAGGACATCT	
TRIF	KC969185	ATCTCCCTGGAGGCACTGA	49
		GCTGTCTACACCAGCCACT	
MD-2	AB086377	GCTCTGAAGGGAGAGACTGTG	12
		TTGTCCCGGAGAAAATCGTA	
CD14	AB267810	TCTCACCACCCTGGACCTAT	23
		AACTTGCGCGGACAGAGA	

3.9 ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NA PEVNÉ FÁZI

3.9.1 Stanovení koncentrace celkového proteinu

Vzorky jsou uchovávány při teplotě -20°C . Vzorek je pomalu přiveden na pokojovou teplotu. Homogenizace vzorků se provádí za pomoci ocelových kuliček, křemičitých střepů a zirkoniových kuliček. Centrifuguje se přibližně $1000 \times g$ po dobu 15 minut.

Stanovení koncentrace je prováděno za použití Pierce BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay) Protein Assay Kitu. (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Před samotným vyšetřením je max. 24 hodin předem připraven pracovní roztok. Ten se skládá z 50 dílů BCA reagentu 1 a jednoho dílu reagentu 2. Roztok je stabilní při pokojové teplotě. Do jamek polypropylenové destičky (Brand, Wertheim, Německo) si připravíme koncentrační řadu ze standardu BCA v objemu 25 μl . Vzorky jsou do jamek nanесeny ve stejném objemu jako standard a je napipetován i kontrolní roztok (blank), k ředění a ke kontrolnímu roztoku je použit roztok Dulbecco (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Do každé jamky je pak přidán pracovní roztok v objemu 200 μl . Roztoky jsou poklepaním ze strany destičky promíchány. Jamky jsou překryty fólií a destička je umístěna do termostatu MIR – 162 (Sanyo, Osaka, Japonsko) na 37°C po dobu 30 min. Když se v jamkách se standardy objeví zřetelný barevný gradient, reakce se může ukončit. Ihned poté se změří absorbance na spektrofotometru pro měření mikrotitračních destiček Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm.

3.9.2 ELISA claudin – 1 a okludin

Vyšetření je prováděno pomocí kitů Pig Claudin - 1 (CLDN-1) ELISA kit (Abxexa, Cambridge, Anglie) a Pig Okludin (OCLN) ELISA kit (Abxexa, Cambridge, Anglie). Vzorky jsou naředěny tak, aby očekávaná koncentrace spadala do rozsahu kitu. Vzorek je naředěn poskytnutým ředícím roztokem pro vzorky a důkladně promíchán. Koncentrovaný promývací roztok je zředěn 25krát (1:25) destilovanou vodou. Přípravu standardního roztoku claudinu-1 a okludinu musíme začít centrifugací při $10\,000 \times g$ po dobu 1 minuty, protože by se prášek mohl vysypat z víčka při otevírání. Jakmile je standard rekonstituován, měl by být ihned použit. Standardní roztok o koncentraci 20 ng/ml je získán přidáním 1 ml ředícího roztoku vzorku/standardu do jedné standardní zkušavky. Rekonstituovaný standard je ponechán po dobu 15 minut s jemným mícháním před provedením sériových ředění. Standardní roztoky v koncentrační řadě 10 ng/ml

→ 0,3125 ng/ml jsou rozředěny dvojkovým ředěním, tedy 0,5 ml ředícího roztoku vzorku/standardu do každé zkumavky. Je přidáno 0,5 ml výše uvedeného standardního roztoku 20 ng/ml do první zkumavky a důkladně promícháno. Je převedeno 0,5 ml z první zkumavky do druhé zkumavky a důkladně promícháno. Je převedeno 0,5 ml z druhé zkumavky do třetí zkumavky a důkladně promícháno, a tak dále. Standardní roztok by měl být připraven nejpozději 15 minut před experimentem.

Příprava pracovního roztoku biotinylované protilátky:

Roztok biotinylované protilátky je připraven nejdéle 1 hodinu před experimentem. Celkový objem pracovního roztoku je vypočten: 0,1 ml na každou jamku × počet jamek. (Je ponecháno o 0,1-0,2 ml více než celkový objem). Biotinem konjugovaná protilátka je zředěna s roztokem ředící protilátky v poměru 1:100 a důkladně se promíchá. Po použití je zbytek roztoku biotinem konjugovaná protilátka zlikvidován.

Příprava pracovního roztoku streptavidin – křenové peroxidázy (STR-HRP):

Roztok STR-HRP konjugovaného reagentu je připraven nejdéle 30 minut před experimentem. Celkový objem pracovního roztoku je vypočten: 0,1 ml na každou zkumavku × počet zkumavek. (Je ponecháno 0,1-0,2 ml více než celkový objem). STR-HRP konjugovaný reagent je zředěn s roztokem ředícího STR-HRP v poměru 1:100 a důkladně se promíchá.

Postup vyšetření:

1. Standardní roztoky, vzorky a jamky s kontrolou (blank) jsou pipetovány na pomocnou destičku, kde se ředí dle jejich celkové koncentrace proteinů. Vzorky se měří v dubletu.
2. Do jamek potažených protilátkami proti claudinu a okcludinu je přidáno 100 µl připravených standardních roztoků.
3. Do kontrolní (blank) jamky je přidáno 100 µl roztoku ředícího protilátky vzorku/standardu.
4. Do testovacích jamek je přidáno 100 µl vhodně naředěného vzorku.
5. Destička je zakryta a inkubována v termostatu MIR – 162 (Sanyo, Osaka, Japonsko) při 37 °C po dobu 90 minut.
6. Fólie je odstraněna a tekutina je likvidována. Není prováděno oplachování.

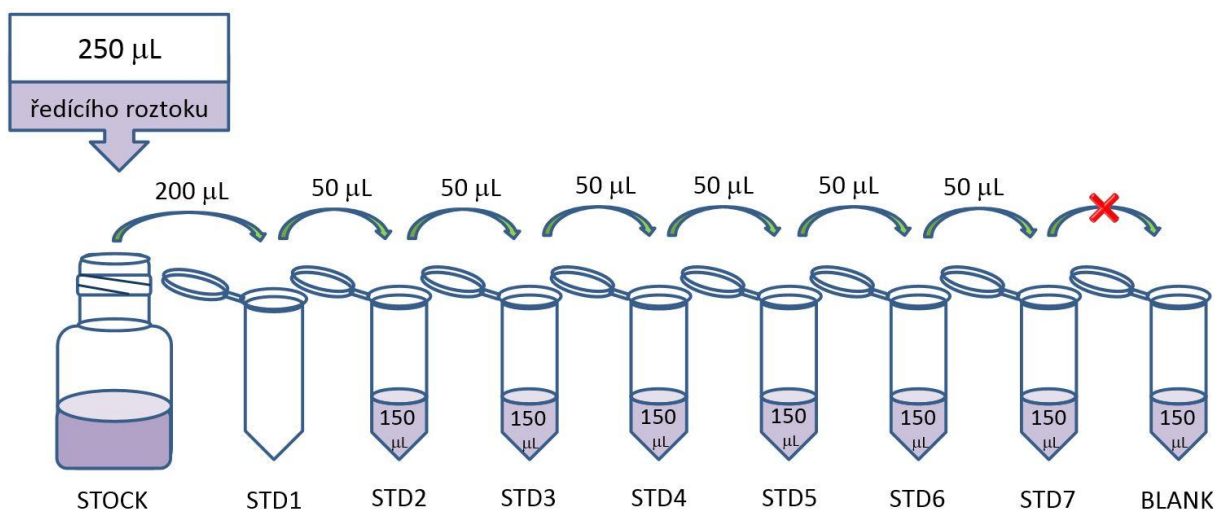
7. Do každé jamky je přidáno 100 µl připraveného pracovního roztoku biotinylované protilátky. Destička je znovu zakryta a inkubována při 37 °C po dobu 60 minut.
8. Fólie je odstraněna a destička je 3krát opláchnuta na automatizované promývače Hydro flex (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
9. Každá jamka je naplněna promývacím roztokem a namáčena po dobu nejméně 1-2 minut Po odstranění promývacího roztoku je destička osušena na savém materiálu
10. Do každé jamky je přidáno 100 µl pracovního roztoku STR-HRP, znovu se přelepí fólií a inkubuje se při 37 °C po dobu 30 minut.
11. Fólie je odstraněna a destička je 5krát promyta promývacím roztokem. Po každém opláchnutí se nechá oplach v jamkách 1-2 minuty. Destička je osušena na savém filtračním papíru nebo buničině.
12. Do každé jamky se přidává 90 µl substrátu TMB. Destička je zakryta a inkubuje se při 37 °C v tmavých podmínkách po dobu 15-20 minut (čas inkubace slouží pouze k referenci, nepřekračuje se 30 minut). Když se v jamkách se standardy objeví zřetelný barevný gradient v jamkách se standardy, reakce se může ukončit.
13. Do každé jamky se přidává 50 µl zastavovacího (stop) roztoku. Měla by nastat změna barvy na žlutou. Destička se lehce ze strany poklepá, aby se zajistilo důkladné promíchání.
14. Absorbance se měří při 450 nm ihned na spektrofotometru pro měření mikrotitračních destiček Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko).

3.10 EXTENDED MULTI-ANALYTE PROFILING TECHNOLOGIE

Vzorky plazmy a séra se před samotným vyšetřením musí zpracovat. Nesrážlivá krev s obsahem 3,8 % citrátu se centrifuguje při 1 000 g po dobu 10 min při 2-8 °C. Odebráním supernatantu získáme plazmu. Sérum se získává vysrážením krve 20–30 min při 20–25 °C. Pokud se ve vzorcích plazmy nebo séra nachází vysoký obsah lipidů, lze daný vzorek zcentrifugovat při 10 000 g po 10 min při 2–8 °C. Alikvoty jsou umístěny do -40 °C.

Pro analýzu byl zvolen kit ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Příprava standardu začíná stočením lyofilizátu při 2 000 g po 10 sec. Standart je resuspendován v 250 µl Universal Assay Buffer ve vialce. Velmi jemně je standart protřepán na vortexu 30 s. Poté je inkubován na ledu 5-10 min.

Kalibrační řada je připravena v poměru 1:4 dle obrázku č 12.



Obrázek 12 Kalibrační řada standardu pro xMAP

Magnetické kuličky se protřepou na vortexu 30 s. Dále se naředí promývacím roztokem DPBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a vloží se na vortex 10 s. Do každé jamky 96-jamkové černé destičky (NUNC, Roskilde, Dánsko) se přidá 25 µl roztoku s magnetickými kuličkami. Dále se přidá roztok DPBS s Tween-20 v objemu 100 µl. Destička je vložena do magnetického separátoru promývačky. Je provedeno promývání, kdy se kuličky separují magnetem, je odebrán supernatant a znovu přidán roztok DPBS v objemu 150 µl opakovaně.

Vzorky se nanášejí do polypropylenové destičky (Brand, Wertheim, Německo) v objemu 80 µl po promíchání a centrifugaci 10 000 g 5 min při 4 °C. Do každé jamky černé destičky se nanese 25 µl Universal Assay Buffer. Do každé jamky se pak z polypropylenové destičky přenesou 25 µl standardu, vzorku nebo Universal Assay Buffer pro kontrolní (blank) vzorek. Destička je přelepena neprůhlednou fólií a třepána na třepáče Orbit 300 (Labnet, Edison, NJ, USA) 500 rpm 45 min při pokojové teplotě. Poté je umístěna do 4 °C přes noc. Druhý den je destička znovu třepána 500 rpm 45 min při pokojové teplotě, a následně je promyta.

Do každé jamky se přidá 25 µl biotinylované detekční protilátky. Destička je přelepena neprůhlednou fólií a je třepána při 500 rpm 1 h při pokojové teplotě, poté je promyta. Na biotin je v dalším kroku navázán konjugát phycoerytrinu se streptavidinem (SAPE), kdy je přidáno 50 µl streptavidinu do každé jamky, a inkubuje se ve tmě na třepáče při 500 rpm 45 min při pokojové teplotě. Následně se destička promyje a přidá se do ní 120 µl čtecího pufru. Ten se s neprůhlednou fólií třepá při 500 rpm 5-15 min při pokojové teplotě. Následná analýza probíhá na Bio-Plexu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.11 PRÁCE SE ZVÍŘATY A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

3.11.1 Projekty pokusů

Projekt pokusů byl projednán odbornou komisí Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. a postoupen Rezortní komisi AV ČR. Pokusy byly provedeny v rámci schválených projektů pokusů

3.11.2 Vyhodnocení pokusů

V závislosti na charakteru pokusů a počtu skupin je třeba volit odpovídající statistické metody. Základním kritériem pro určení vhodnosti metody je vyhodnocení normality rozložení hodnot. Snaha o použití co nejmenšího počtu zvířat je však v rozporu se statistickým vyhodnocením, kdy při větším počtu případů bychom se, jednoduše řečeno, dostali snáze ke statistické průkaznosti rozdílů mezi skupinami. Limitující tedy může být např. vyhodnocení normality rozložení hodnot, kdy pro Kolmogorov-Smirnovův test je minimálně požadovaný počet případů (zvířat) 5.

4 VÝSLEDKY

4.1 IZOLACE RNA

Vzorky vyizolované RNA byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.2 Izolace RNA v experimentální části.

Tabulky 4-7 obsahují absorbance a poměry z absorbancí měřené na Nanodropu (Thermo Fischer). Výpočty koncentrace izolované RNA a její objem potřebný k pipetování pro reverzní transkripci dle kapitoly 3.3 Reverzní transkripce, jsou počítány pro 500 ng celkové RNA ve vzorku.

Tabulka 4 Data izolace RNA z ilea nedonošených selat

Popis a označení vzorků			Syntéza cDNA		Data z NanoDropu				
			H ₂ O	0,5 µg RNA	Konc.	Poměry		Absorbance	
Sele	Popis	Org.	[µL]	[µL]	[ng/µL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀
944/20	GF	IL	1,3	8,7	57,4	2,15	0,31	1,43	0,67
944/90	GF	IL	5,4	4,6	109,7	2,10	2,01	2,74	1,3
945/2	GF	IL	1,1	8,9	56,3	2,05	1,21	1,41	0,69
943/5	GF	IL	6,3	3,7	136,9	2,05	2,08	3,42	1,67
949/1	GF	IL	6,5	3,5	142,0	2,05	2,02	3,55	1,73
949/7	GF	IL	8,2	1,8	276,2	2,07	2,24	6,9	3,33
950/50	GF	IL	7,9	2,1	238,1	2,09	1,52	5,95	2,85
949/2	BB12	IL	4,6	5,4	91,8	2,09	1,20	2,29	1,1
949/4	BB12	IL	7,0	3,0	164,5	2,07	1,69	4,04	1,95
949/6	BB12	IL	7,7	2,3	217,5	2,08	1,71	5,44	2,61
950/0	BB12	IL	6,9	3,1	160,5	2,07	1,83	4,01	1,93
950/40	BB12	IL	8,0	2,0	244,0	2,07	2,08	6,1	2,94
950/60	BB12	IL	4,9	5,1	97,1	2,07	1,44	2,43	1,18
951/11	BB12	IL	8,0	2,0	245,6	2,09	0,92	6,14	2,93
951/16	BB12	IL	8,1	1,9	263,9	2,09	1,00	6,6	3,15
949/5	BB12+LT2	IL	7,8	2,2	230,5	2,08	1,97	5,7	2,77
949/8	BB12+LT2	IL	8,8	1,2	429,2	2,10	1,94	10,73	5,1
949/9	BB12+LT2	IL	8,4	1,6	320,7	2,09	0,63	8,02	3,83
950/10	BB12+LT2	IL	6,4	3,6	140,0	2,07	2,16	3,5	1,69
950/30	BB12+LT2	IL	8,8	1,2	428,8	2,10	1,64	10,72	5,12
951/12	BB12+LT2	IL	8,8	1,2	408,2	2,10	1,48	10,2	4,85
951/13	BB12+LT2	IL	9,1	0,9	541,6	2,05	1,48	13,54	6,6
888/0	LT 2	IL	9,0	1,0	499,0	2,04	2,06	12,47	6,1
888/1	LT2	IL	9,2	0,8	652,4	2,05	2,23	16,31	7,97
892/1	LT 2	IL	7,5	2,5	198,9	2,09	0,88	4,97	2,38
898/3	LT 2	IL	9,3	0,7	670,2	2,06	1,27	16,76	8,14
946/1	LT2	IL	9,2	0,8	639,0	2,06	2,15	15,97	7,75
947/20	LT2	IL	8,8	1,2	426,5	2,10	1,83	10,66	5,08

Při izolaci vzorků z ilea u nedonošených selat nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami selat. Což značí, že přítomnost bakterií ve vzorku neinterferuje s čistotou získané RNA.

Tabulka 5 Data izolace RNA z kolonu nedonošených selat

Popis a označení vzorků			Syntéza cDNA		Data z NanoDropu				
			H ₂ O	0,5 mg RNA	Konc.	Poměry		Absorbance	
Sele	Popis	Org.	[mL]	[mL]	[ng/mL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀
943/5	GF	COL	7,3	2,7	185,2	2,09	0,63	4,63	2,22
944/20	GF	COL	8,9	1,1	450,3	2,10	1,84	11,26	5,36
944/90	GF	COL	3,8	6,2	80,9	2,50	0,81	2,02	0,99
945/2	GF	COL	8,2	1,8	281,5	2,08	1,72	7,04	3,38
949/1	GF	COL	8,8	1,2	415,3	2,10	1,73	10,38	4,95
949/7	GF	COL	7,5	2,5	203,4	2,06	1,85	5,08	2,47
950/50	GF	COL	8,5	1,5	330,2	2,09	1,95	8,26	3,95
949/2	BB12	COL	8,7	1,3	395,5	2,09	2,10	9,89	4,73
949/4	BB12	COL	8,7	1,3	392,1	2,11	0,88	9,8	4,66
949/6	BB12	COL	8,5	1,5	337,3	2,09	2,02	8,43	4,04
950/0	BB12	COL	8,5	1,5	336,6	2,08	2,19	8,41	4,04
950/40	BB12	COL	8,4	1,6	314,7	2,09	1,40	7,87	3,76
950/60	BB12	COL	7,8	2,2	230,0	2,09	0,94	5,75	2,75
951/11	BB12	COL	7,4	2,6	195,5	2,09	0,79	4,89	2,33
951/16	BB12	COL	8,4	1,6	311,7	2,09	2,08	7,79	3,74
949/5	BB12+LT2	COL	9,1	0,9	573,4	2,06	2,00	14,33	6,97
949/8	BB12+LT2	COL	9,3	0,7	732,6	2,07	1,33	18,32	8,84
949/9	BB12+LT2	COL	9,4	0,6	842,6	2,06	2,17	21,07	10,23
950/10	BB12+LT2	COL	9,4	0,6	826,5	2,08	1,44	20,66	9,94
950/30	BB12+LT2	COL	8,9	1,1	471,1	2,10	1,83	11,78	5,6
951/12	BB12+LT2	COL	9,7	0,3	1449,6	2,09	2,27	36,24	17,33
951/13	BB12+LT2	COL	9,6	0,4	1415,4	2,09	2,27	35,39	16,93
888/0	LT2	COL	8,2	1,8	282,3	2,08	1,61	7,06	3,4
888/1	LT2	COL	8,0	2,0	254,1	2,08	1,61	6,35	3,05
892/1	LT2	COL	6,4	3,6	139,7	2,06	1,78	3,49	1,7
898/3	LT2	COL	8,8	1,2	415,9	2,09	2,04	10,4	4,97
946/1	LT2	COL	9,2	0,8	635,3	2,05	2,08	15,88	7,75
947/20	LT2	COL	9,3	0,7	679,5	2,06	1,30	16,99	8,25

Při izolaci vzorků z kolonu u nedonošených selat nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami selat. Což značí, že přítomnost bakterií ve vzorku neinterferuje s čistotou získané RNA.

Tabulka 6 Data izolace RNA z ilea donošených selat

Popis a označení vzorků			Syntéza cDNA		Data z NanoDropu				
			H ₂ O	0,5 µg RNA	Konc.	Poměry		Absorbance	
Sele	Popis	Org.	[µL]	[µL]	[ng/µL]	A260/A280	A260/A230	A260	A280
943/2	RP 36	IL	9,3	0,7	689,4	2,07	2,22	17,23	8,31
943/3	RP 36	IL	8,1	1,9	261,0	2,10	1,16	6,52	3,1
944/6	RP 36	IL	7,2	2,8	178,1	2,10	1,30	4,45	2,12
944/10	RP 36	IL	8,6	1,4	360,4	2,10	1,72	9,01	4,28
945/4	RP 36	IL	8,3	1,7	301,7	2,11	1,57	7,54	3,58
950/20	RP 36	IL	8,3	1,7	286,6	2,09	1,67	7,16	3,42
950/70	RP 36	IL	8,3	1,7	301,3	2,09	1,92	7,53	3,61
950/90	RP 36	IL	8,1	1,9	262,4	2,10	1,59	6,56	3,12
943/6	RP 37	IL	7,5	2,5	196,8	2,07	1,77	4,89	2,36
943/7	RP 37	IL	8,0	2,0	247,1	2,08	1,76	6,18	2,96
944/30	RP 37	IL	8,4	1,6	309,6	2,09	2,13	7,74	3,71
944/50	RP 37	IL	6,3	3,7	135,0	2,07	2,12	3,38	1,63
944/80	RP 37	IL	6,2	3,8	132,8	2,07	1,95	3,32	1,6
945/0	RP 37	IL	9,1	0,9	564,1	2,11	1,80	14,1	6,7
946/4	RP 36+LT2	IL	8,5	1,5	334,1	2,11	1,29	8,35	3,96
946/8	RP 36+LT2	IL	6,2	3,8	132,2	2,06	2,26	3,3	1,6
946/9	RP 36+LT2	IL	9,1	0,9	566,9	2,1	1,94	14,17	6,73
947/10	RP 36+LT2	IL	8,3	1,7	298,0	2,08	2,28	7,45	3,58
948/30	RP 36+LT2	IL	9,2	0,8	636,9	2,11	1,64	15,77	7,47
948/40	RP 36+LT2	IL	9,3	0,7	674,0	2,14	1,24	16,85	7,87
948/50	RP 36+LT2	IL	8,7	1,3	391,4	2,11	1,52	9,78	4,64
946/0	RP 37+LT2	IL	6,6	3,4	148	2,07	1,05	3,7	1,78
946/2	RP 37+LT2	IL	8,5	1,5	338,3	2,1	2,04	8,46	4,03
946/5	RP 37+LT2	IL	9,2	0,8	648,1	2,06	1,57	16,2	7,85
948/20	RP 37+LT2	IL	8,7	1,3	386,9	2,11	1,31	9,67	4,58
948/60	RP 37+LT2	IL	9,2	0,8	609,3	2,06	1,76	15,23	7,39
960/70	LA+LT2	IL	4,8	5,2	95,9	2,12	1,16	2,4	1,13
961/5	LA+LT2	IL	6,0	4,0	125,3	2,13	0,85	3,13	1,47
960/60	LA+LT2	IL	5,0	5,0	100,1	2,15	0,33	2,5	1,17
960/30	LA	IL	3,9	6,1	82,3	2,11	0,94	2,06	0,98
960/80	LA	IL	7,2	2,8	176,1	2,13	0,64	4,4	2,07
960/50	LA	IL	0,8	9,2	54,1	2,13	0,3	1,35	0,62
962/12	LA	IL	8,2	1,8	282,4	2,12	1,45	7,06	3,33
962/16	LA	IL	8,5	1,5	323,2	2,13	0,63	8,08	3,8
962/14	LA	IL	9,0	1,0	489	1,92	1,68	1,22	0,64

Tabulka 7 Data izolace RNA z kolonu donošených selat

Popis a označení vzorků			Syntéza cDNA		Data z NanoDropu				
			H2O	0,5 mg RNA	Konc.	Poměry		Absorbance	
Sele	Popis	Org.	[mL]	[mL]	[ng/mL]	A260/A280	A260/A230	A260	A280
943/2	RP 36	COL	6,6	3,4	147,2	2,08	0,33	3,68	1,77
943/3	RP 36	COL	4,3	5,7	87,7	2,03	1,90	2,19	1,08
944/6	RP 36	COL	7,9	2,1	238,0	2,07	1,68	5,95	2,87
944/10	RP 36	COL	8,0	2,0	251,9	2,07	1,89	6,3	3,04
945/4	RP 36	COL	3,5	6,5	76,4	2,05	0,32	1,91	0,93
950/20	RP 36	COL	4,0	6,0	83,7	2,10	0,28	2,09	0,99
950/70	RP 36	COL	7,8	2,2	227,5	2,09	1,64	5,67	2,72
950/90	RP 36	COL	4,0	6,0	83,5	2,07	1,45	2,09	1,01
943/6	RP 37	COL	6,4	3,6	137,2	2,07	1,67	3,43	1,65
943/7	RP 37	COL	3,2	6,8	73,6	2,10	0,23	1,84	0,88
944/30	RP 37	COL	5,2	4,8	104,6	2,09	0,32	2,61	1,25
944/50	RP 37	COL	7,5	2,5	200,2	2,08	1,78	5,01	2,41
944/80	RP 37	COL	5,1	4,9	101,3	2,09	0,61	2,53	1,21
945/0	RP 37	COL	6,6	3,4	148,6	2,07	0,96	3,71	1,79
946/4	RP 36+LT2	COL	8,8	1,2	422,7	2,10	2,07	10,57	5,03
946/8	RP 36+LT2	COL	7,2	2,8	181,6	2,09	1,05	4,54	2,1
946/9	RP 36+LT2	COL	8,8	1,2	407,3	2,10	2,25	10,18	4,86
947/10	RP 36+LT2	COL	2,6	7,4	67,8	2,08	0,79	1,69	0,81
948/30	RP 36+LT2	COL	7,8	2,2	232,5	2,09	1,71	5,81	2,78
948/40	RP 36+LT2	COL	8,3	1,7	290,8	2,10	1,22	7,27	3,46
948/50	RP 36+LT2	COL	8,6	1,4	358,4	2,09	2,24	8,96	4,29
946/0	RP 37+LT2	COL	8,4	1,6	315,7	2,10	1,81	7,89	3,76
946/2	RP 37+LT2	COL	8,9	1,1	465,2	2,12	1,52	11,63	5,48
946/5	RP 37+LT2	COL	7,8	2,2	225,3	2,08	1,93	5,63	2,7
948/20	RP 37+LT2	COL	8,3	1,7	299,6	2,10	0,80	7,49	3,57
948/60	RP 37+LT2	COL	8,2	1,8	276,9	2,06	2,30	6,92	3,36
960/70	LA+LT2	COL	6,8	3,2	158,3	2,07	1,93	3,96	1,91
961/5	LA+LT2	COL	5,4	4,6	108,4	2,11	0,96	2,71	1,28
960/60	LA+LT2	COL	7,1	2,9	174	2,1	0,84	4,35	2,07
960/30	LA	COL	4,0	6,0	83,9	2,06	1,68	2,1	1,02
960/80	LA	COL	6,5	3,5	143	2,11	1,05	3,57	1,69
960/50	LA	COL	6,9	3,1	163	2,1	0,55	4,07	1,94
952/12	LA	COL	8,0	2,0	250,4	2,1	2,21	6,26	2,98
962/14	LA	COL	7,2	2,8	176,9	2,12	0,52	4,42	2,09
962/16	LA	COL	7,1	2,9	172,6	2,12	1,12	4,32	2,04

4.2 ELISA CLAUDIN – 1 A OKLUDIN

4.2.1 Celková koncentrace proteinů

Pro analýzu claudinu-1 a okludinu je potřeba nejdříve zjistit celkovou koncentraci proteinů vyizolovaných ze vzorku, aby bylo možné porovnávat expresi claudinu-1 a okludinu mezi skupinami selat s různým bakteriálním osazením. Vzorky tkáně jsou proto homogenizovány pro obě analýzy zároveň, protože je potřeba uvádět výsledky v poměru k celkovému objemu. Díky zjištění celkové koncentrace proteinů metodou BCA lze navíc snížit koncentraci analytu pro metodu ELISA pro claudin-1 a okludinu, tak, aby se vzorky vešli do kalibračního rozmezí kitu.

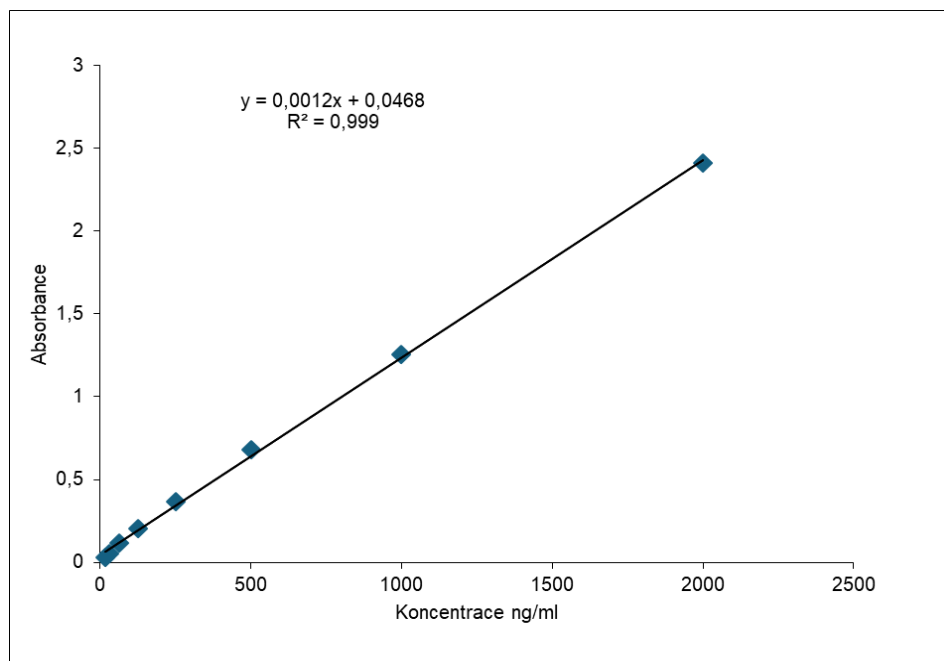
4.2.1.1 Vliv homogenizačních materiálů

Vzorky uskladněné při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nechali při laboratorní teplotě rozmraznout a následně z nich byl odebrán 20 mg kus tkáně k homogenizaci a izolaci proteinů.

Při zavádění ELISA metody bylo potřeba zjistit, který materiál bude k homogenizaci nejlepší. K testování byly použity zirkoniové kuličky o průměru 2 mm (Biospec, Bartlesville, OK, USA), křemičité střepy dvou velikostí, menší s průměrnou velikostí 2 mm a větší o průměrné velikosti 4 mm (Biospec, Bartlesville, OK, USA), a ocelové kuličky o průměru 3,5 mm (Qiagen, Hilden, Německo).

Tabulka 8 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé homogenizační materiály

Konc. ng/ml	A 1	A 2	A avg.	A korig
2000	2,5226	2,4952	2,5089	2,4094
1000	1,3585	1,3503	1,3544	1,2549
500	0,7833	0,7808	0,78205	0,68255
250	0,4697	0,4661	0,4679	0,3684
125	0,3046	0,3003	0,30245	0,20295
62,5	0,2427	0,1943	0,2185	0,119
31,25	0,1527	0,1542	0,15345	0,05395
15,625	0,1381	0,1234	0,13075	0,03125
Blank	0,0981	0,1009	0,0995	0



Graf 1 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro homogenizační materiály

Tabulka 9 Výpočet koncentrace standardu BCA

	A 1	A 2	A avg	A korig	Koncentrace
Zi 2 mm	2,2426	2,5024	2,3725	2,273	1855,167
SiO 2 mm	1,5458	1,58	1,5629	1,4634	1180,5
SiO 4 mm	OVER	OVER	#####	#####	#####
Fe 3,5 mm	2,5991	2,8562	2,72765	2,6282	2151,125

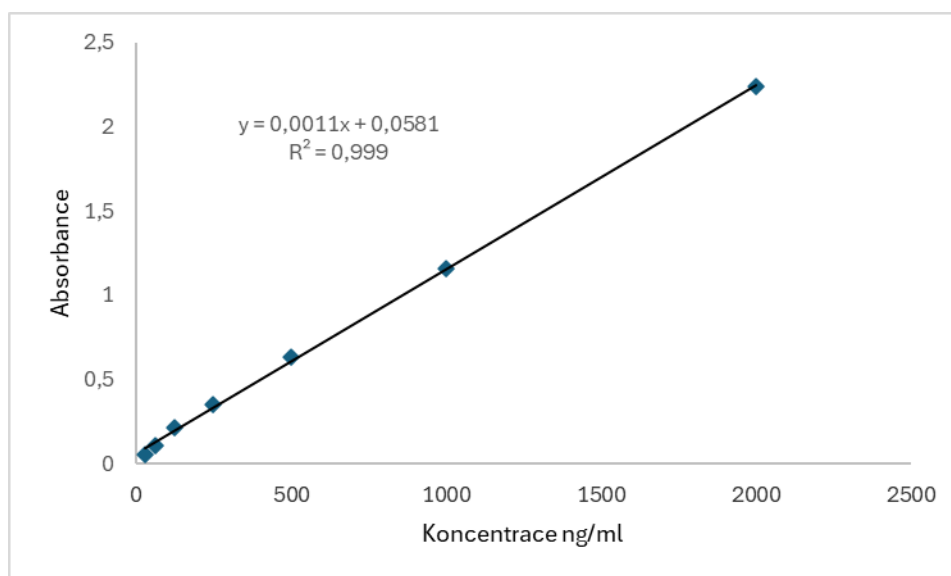
Výsledky koncentrací celkového proteinu nebyly dle typu homogenizačního materiálu statisticky rozdílné. Byly proto zvoleny ocelové kuličky k izolaci na základě pořizovací ceny materiálu a nevýznamných rozdílů koncentrací získaných při izolaci

4.2.1.2 Vliv centrifugační síly

Výsledky vlivu centrifugační síly dokazují, že i při vyšších otáčkách proteiny nesedimentují. Díky vyšší centrifugační síle je lépe odebírán supernatant a nejsou v něm látky, které by mohli způsobovat chyby při čtení celkového počtu proteinů.

Tabulka 10 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé centrifugační síly

Konc. ng/ml	A	A	A avg	A korig
2000	2,6934	1,9606	2,327	2,2373
1000	1,4042	1,1007	1,25245	1,16275
500	0,8065	0,6409	0,7237	0,634
250	0,4724	0,4093	0,44085	0,35115
125	0,3159	0,2875	0,3017	0,212
62,5	0,2113	0,1809	0,1961	0,1064
31,25	0,1535	0,1337	0,1436	0,0539
Blank	0,0896	0,0898	0,0897	0



Graf 2 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro centrifugační síly

Tabulka 11 Hodnoty koncentrace celkového proteinu po rozdílné centrifugační síle

Vzorky	A	A	A avg	A korig	Konc.	Centrifugace
GF	1,8949	1,9184	1,90665	1,81695	1581,045	4000 g
BB12	2,1156	2,1276	2,1216	2,0319	1776,455	
BB12+LT2	2,9569	2,3153	2,6361	2,5464	2244,182	
LT2	2,2488	2,359	2,3039	2,2142	1942,182	
GF	1,8784	1,9102	1,8943	1,8046	1569,818	10 000 g
BB12	1,8736	2,0028	1,9382	1,8485	1609,727	
BB12+LT2	2,62	2,7217	2,67085	2,58115	2275,773	
LT2	2,296	2,3194	2,3077	2,218	1945,636	

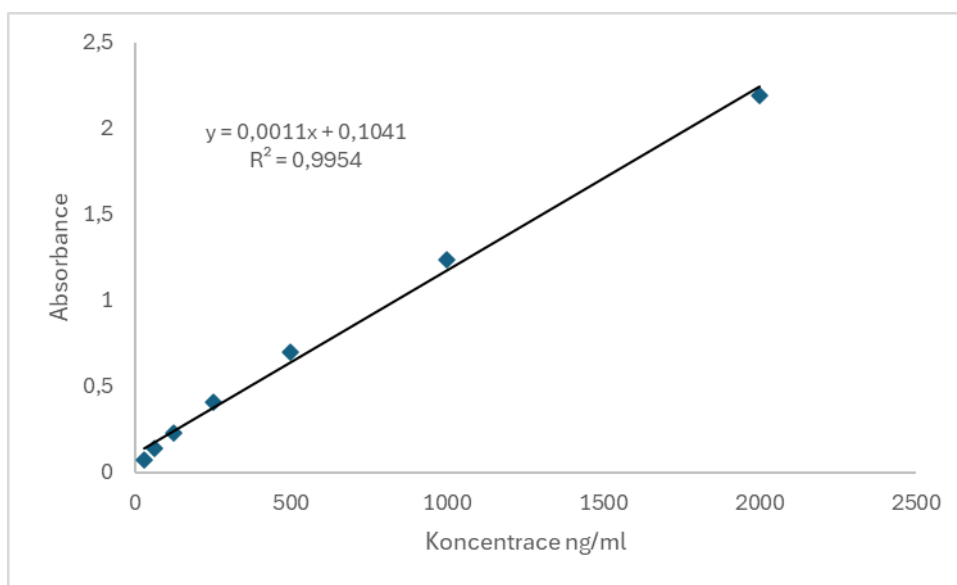
Rozdíly v koncentracích nejsou statisticky významné, a proto lze prohlásit, že vyšší centrifugační síla neodstraňuje protein do sedimentu a je stále přítomen v supernatantu.

4.2.1.3 Vliv lyzačních roztoků

Roztoky používané k homogenizaci vzorku nelze z izolátu jednoduše odstranit, reakce proto probíhá i za jejich přítomnosti, a proto bylo vhodné proměřit, zda neinteragují s reagensy při analýze. Pro lýzu buněk byli uvažovány dva roztoky: NP-40 (Thermo Scientific) a cytobuster(Merck). Oba lyzační roztoky mají při homogenizaci zajistit narušení všech buněčných membrán a tím usnadnit uvolnění proteinů do roztoku.

Tabulka 12 Hodnoty absorbancí standardu BCA pro různé lyzační roztoky

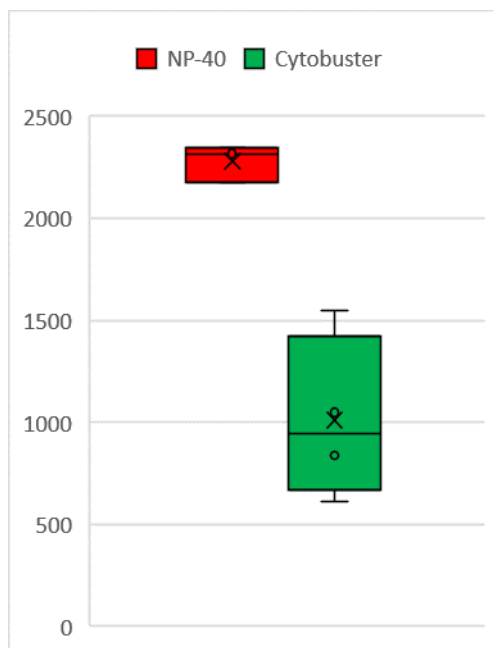
Konc. µg/ml	A	A	A avg.	A korig.
2000	2,3251	2,2519	2,2885	2,1957
1000	1,2716	1,3848	1,3282	1,2354
500	0,8166	0,7685	0,7925	0,6997
250	0,5363	0,4574	0,4968	0,4040
125	0,3532	0,2892	0,3212	0,2284
62,5	0,2703	0,1943	0,2323	0,1395
31	0,1857	0,1407	0,1632	0,0704
Blank	0,0974	0,0882	0,0928	0



Graf 3 Vliv absorbance na koncentraci celkového proteinu pro různé lyzační roztoky

Tabulka 13 Koncentrace celkového proteinu při použití rozdílných lyzačních roztoků

Vzorky		Absorbance		A Průměr	A korig	Konc. µg/ml
NP-40	GF	2,5406	2,764	2,6523	2,6523	2316,64
	BB12	2,6053	2,7641	2,6847	2,6847	2346,09
	BB12+LT2	2,581	2,4122	2,4966	2,4966	2175,09
	LT2	2,954	2,6004	2,7772	2,7772	2430,18
Cytobuster	GF	1,2471	0,9913	1,1192	1,0264	838,55
	BB12	1,3726	1,1405	1,2566	1,2566	1047,77
	BB12+LT2	0,8139	0,7424	0,7782	0,7782	612,86
	LT2	2,3564	1,2566	1,8065	1,8065	1547,73



Graf 4 Rozdíl koncentrací celkového proteinu stejných vzorků za použití různých lyzačních roztoků. Na grafu číslo 4 je vidět výrazný rozdíl mezi NP-40 a cytobusterem, kdy NP-40 výrazně reagoval s reagenциemi při vyšetření a tím falešně zvyšoval koncentraci celkových proteinů.

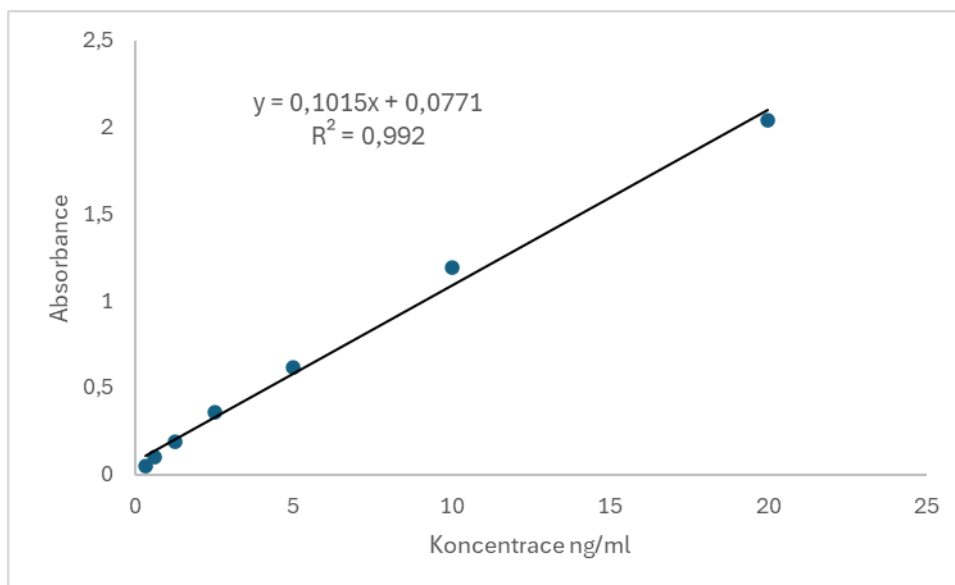
4.2.2 ELISA claudinu-1 a okcludinu

4.2.2.1 Vliv lyzačních roztoků na koncentraci claudinu-1

Po zjištění interference NP-40 při celkovém stanovení bylo přistoupeno k porovnání interference lyzačních roztoků při vlastním stanovení koncentrace claudinu-1 metodou ELISA.

Tabulka 14 Hodnoty absorbancí standardu claudinu-1 pro různé lyzační roztoky

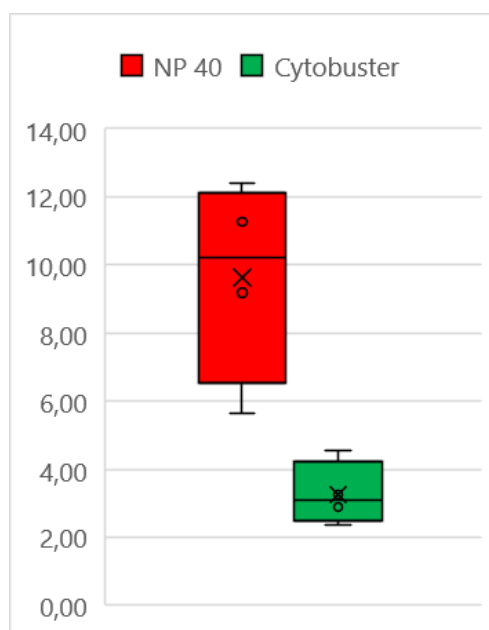
ng/ml	Absorbance		Průměr	A korig.
20	1,9445	1,8954	1,91995	1,8354
10	1,2127	0,9984	1,10555	1,0210
5	0,7072	0,6277	0,66745	0,5829
2,5	0,4075	0,3638	0,38565	0,3011
1,25	0,3612	0,2612	0,3112	0,2266
0,625	0,2346	0,1431	0,18885	0,1043
0,3125	0,17	0,1378	0,1539	0,0693
Blank	0,0826	0,0865	0,08455	0



Graf 5 Vliv absorbance na koncentraci claudinu-1 pro různé lyzační roztoky

Tabulka 15 Koncentrace claudinu-1 při použití různých lyzačních pufrů

	Vzorek	A	Konc. ng/ml
NP 40	GF	0,5919	5,63
	BB12	1,2067	12,38
	BB12+LT2	1,106	11,28
	LT2	0,915	9,18
Cytobuster	GF	0,3768	3,26
	BB12	0,3421	2,88
	BB12+LT2	0,4934	4,54
	LT2	0,2943	2,36



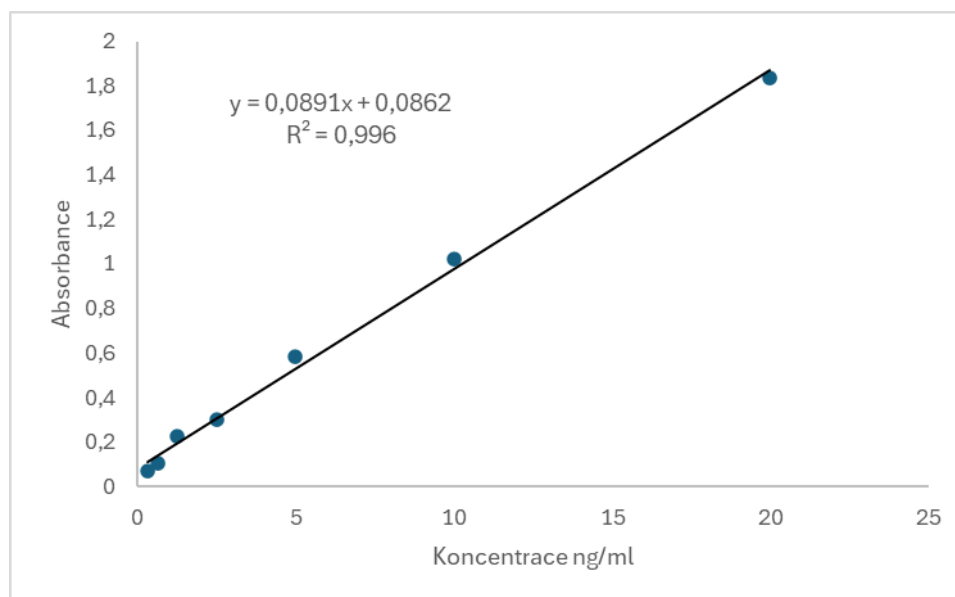
Graf 6 Koncentrace claudinu-1 při použití různých lyzačních pufrů

Vzorky homogenizované lyzačním roztokem NP-40 měli výrazně vyšší hodnoty koncentrace claudinu-1. Jedná se o falešné zvýšení díky interakci lyzačního roztoku s reagensii používaných při analýze (graf 6).

4.2.2.2 Vliv lyzačních roztoků na koncentraci okcludinu

Tabulka 16 Hodnoty absorbancí standardu okcludinu pro různé lyzační roztoky

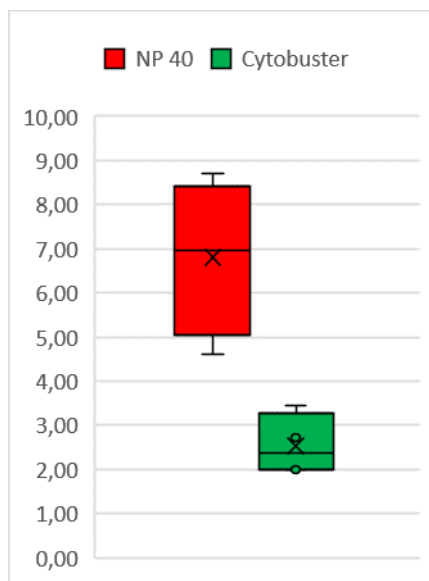
ng/ml	Absorbance		Průměr	A korig.
20	1,9445	1,8954	1,91995	1,8354
10	1,2127	0,9984	1,10555	1,021
5	0,7072	0,6277	0,66745	0,5829
2,5	0,4075	0,3638	0,38565	0,3011
1,25	0,3612	0,2612	0,3112	0,22665
0,625	0,2346	0,1431	0,18885	0,1043
0,3125	0,17	0,1378	0,1539	0,06935
Blank	0,0826	0,0865	0,08455	0



Graf 7 Vliv absorbance na koncentraci okcludinu pro různé lyzační roztoky

Tabulka 17 Koncentrace okcludinu při použití různých lyzačních pufřů

	Vzorek	A	Konc. ng/ml
NP 40	GF	0,7664	7,54
	BB12	0,4986	4,60
	BB12+LT2	0,8725	8,71
	LT2	0,6592	6,37
Cytobuster	GF	0,328	2,73
	BB12	0,2612	1,99
	BB12+LT2	0,393	3,44
	LT2	0,2613	1,99



Graf 8 Koncentrace okludinu při použití různých lyzačních pufrů

Vzorky homogenizované lyzačním roztokem NP-40 měli výrazně vyšší hodnoty koncentrace okludinu. Jedná se o falešné zvýšení díky interakci lyzačního roztoku s reagensy používaných při analýze (graf 8).

	A	A korig.	%
NP-40	0,1	0,0548	221,2389
Cytobuster	0,0853	0,0401	188,7168
DPBS	0,0454	0,0002	100,4425
Abbexa roztok	0,0452	0	100

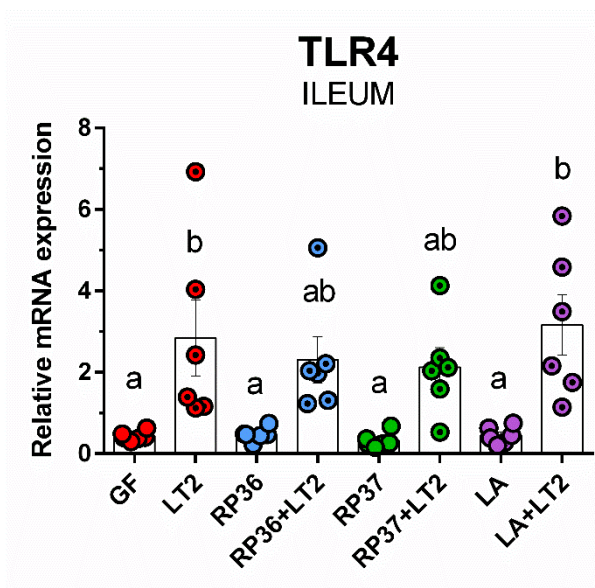
Tabulka 18 Slepé vzorky ředících a lyzačních roztoků.

Roztok Cytobuster vykazoval interakci s kitem když se proměřily pouze čisté roztoky bez proteinových interakcí. Za srovnávací roztok byl zvolen ředící roztok dodávaný výrobcem kitu. Pufr Dulbecco PBS dosáhl podobných výsledků jako ředící roztok od firmy Abbexa, a na tomto základě ho lze používat k ředění vzorků. Interakce obou lyzačních roztoků však znamená, že bez zařazení předčišťovacích kroků, které by zamezily reakci mezi lyzačními roztoky a navázanými protilátkami na stěnách jamek. Z tohoto důvodu je stanovení koncentrace metodou ELISA pro tento typ vzorků nevhodný. Jako verifikační metoda se nedá použít, a bude muset být nahrazena Wester blotovací technikou, kde se vzorek zbaví elektroforézou lyzačních roztoků a protilátky nebudou interagovat za poskytování falešně pozitivních výsledků.

4.3 TLR4 SIGNÁLNÍ DRÁHA V ILEU A KOLONU U GNOTOBIOTICKÝCH SELAT

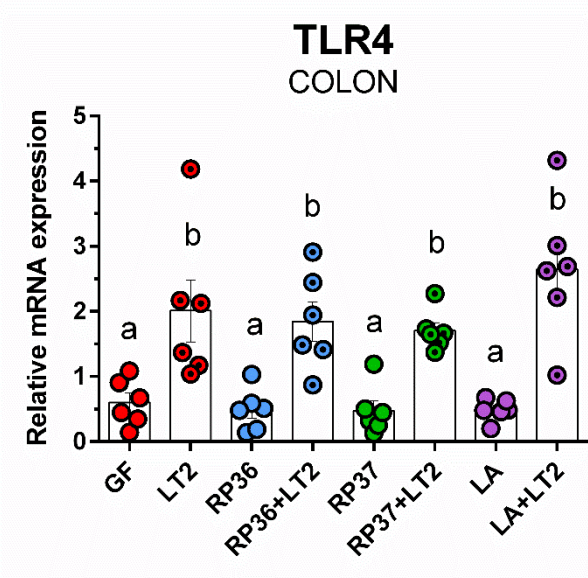
4.3.1 Exprese TLR4 mRNA

Infekce se *Salmonella* Typhimurium LT2 (dále jen LT2) statisticky významně (dále jen významně, výrazně, apod.) zvýšila expresi TLR4 mRNA v ileu gnotobiotických selat. Osídlení bezmikrobních (dále jen GF) selat *Bifidobacterium boum* kmeny RP36 nebo RP37 nebo *Lactobacillus amylovorus* (dále jen RP36, RP37 a LA) neovlivnilo expresi TLR4 mRNA v ileu srovnání s GF selaty (graf 9). Předchozí osídlení žádnou z komenzálních bakterií nezabránilo výraznému zvýšení exprese TLR4 mRNA po infekci s LT2 a bylo tak srovnatelné se selaty infikovanými LT2 bez předchozího osídlení. Předchozí osídlení bifidobakteriemi však mírně snížilo expresi TLR4 mRNA tak, že rozdíl mezi kontrolní GF skupinou a RP36+LT2 a RP37+LT2 nebyl (statisticky) významný při $P < 0,05$. Různá písmena značí statisticky významné rozdíly mezi skupinami selat.



Graf 9 Relativní exprese TLR4 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

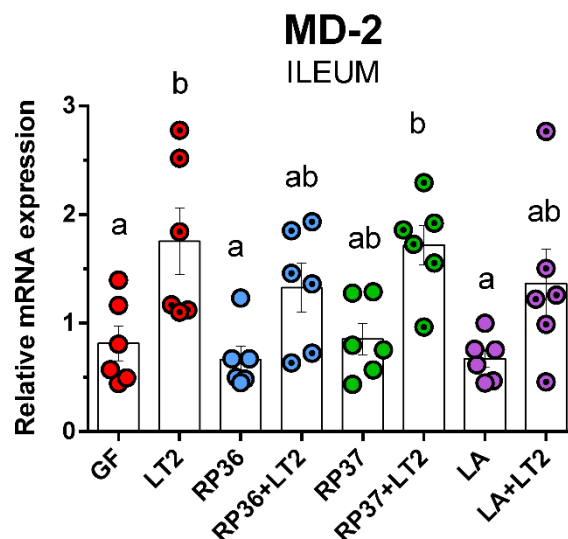
U neinfikovaných selat osídlených komenzálními bakteriemi RP36, RP37 nebo LA nedošlo ke změně v expresi TLR4 mRNA v kolonu ve srovnání se skupinou kontrolních GF selat (graf 10). V infekce došlo k významné stimulaci exprese TLR4 mRNA u všech skupin selat infikovaných LT2 (LT2, LT2+RP36, LT2+RP37 a LT2 a LA).



Graf 10 Relativní exprese TLR4 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

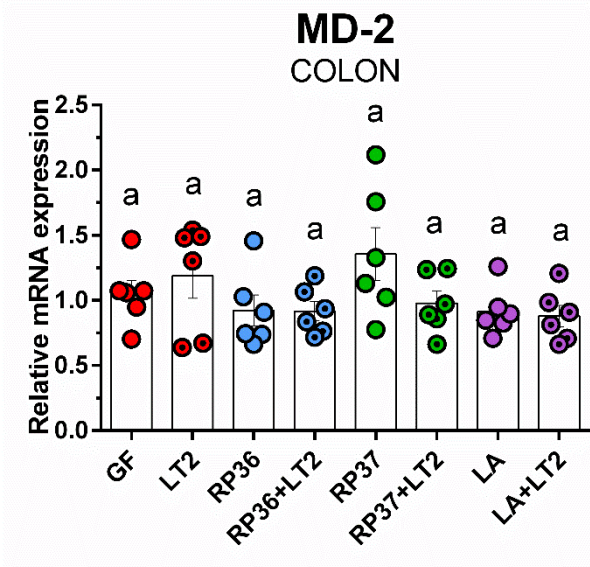
4.3.2 Exprese MD-2 mRNA

Infekce LT2 významně zvýšila expresi MD-2 mRNA v ileu (GF versus LT2) (graf 11). V případech předchozího osídlení selat RP36 a LT2 došlo k neprůkaznému zvýšení, na rozdíl od předchozího osídlení RP37.



Graf 11 Relativní exprese MD-2 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

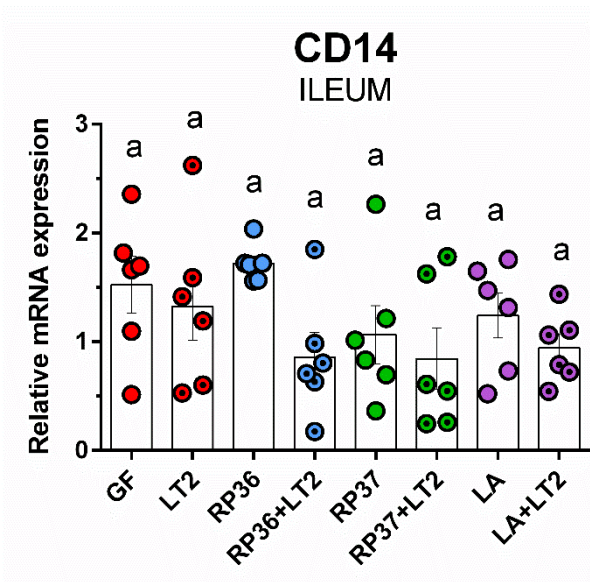
V kolonu ani komenzální bakterie, ani infekce LT2 výrazně nezvýšily expresi MD-2 (graf 12).



Graf 12 Relativní exprese MD-2 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

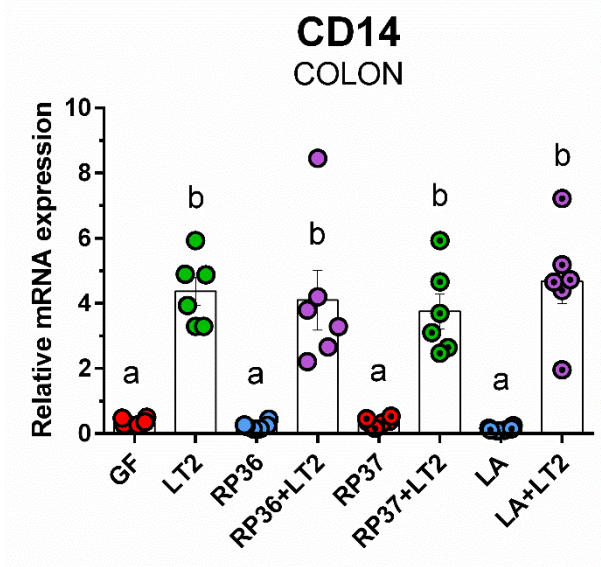
4.3.3 Exprese CD14 mRNA

V ileu nedošlo ke zvýšení exprese CD14 mRNA v případě žádného osídlení nebo infekce LT2 ve srovnání s GF skupinou (graf 13).



Graf 13 Relativní exprese CD14 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

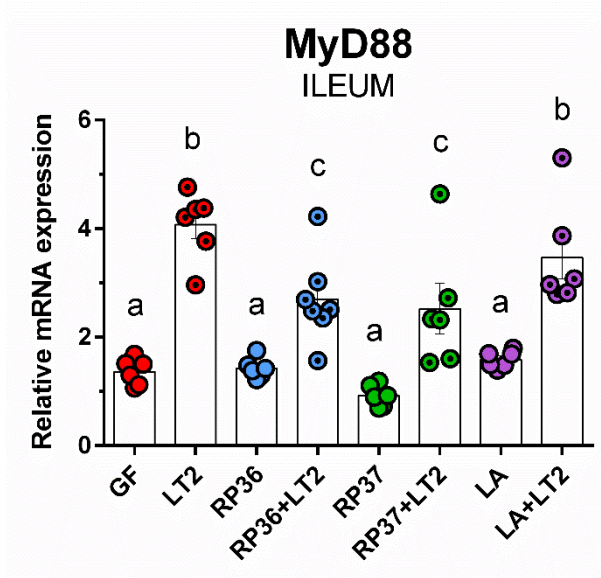
Na rozdíl o ilea došlo v kolonu k výrazné stimulaci exprese CD14 mRNA ve všech případech infekce s LT2 (graf 14).



Graf 14 Relativní exprese CD14 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

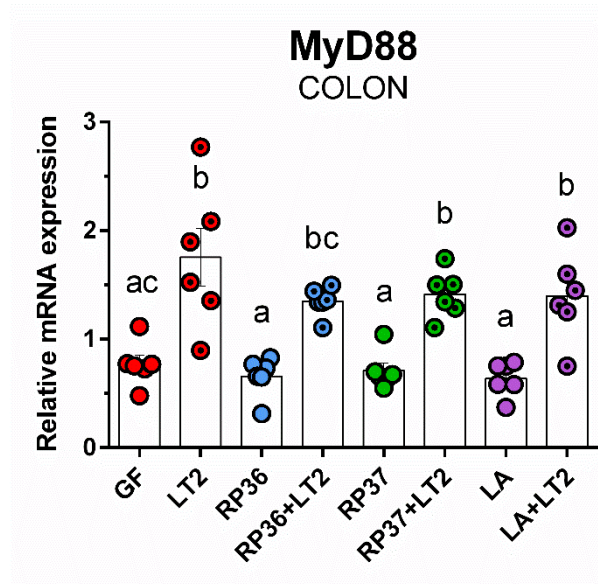
4.3.4 Exprese MyD88 mRNA

V případě adaptorového proteinu MyD88 došlo k výrazné stimulaci exprese MyD88 mRNA v ileu při infekci LT2 (graf 15). V případech předchozího osídlení RP36 nebo RP37 však byla tato stimulace nižší než u skupin LT2 a LT2+LA.



Graf 15 Relativní exprese MyD88 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

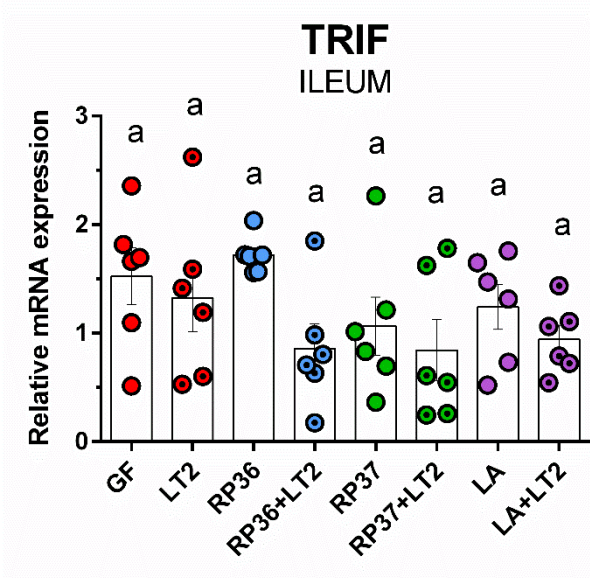
U kolonu bylo zvýšení exprese MyD88 mRNA výrazně zvýšeno u skupin LT2, RP37+LT2 a LA+LT2 (graf 16). Ve srovnání se selaty předem osídlenými komenzálními bakteriemi došlo k výraznému zvýšení u všech skupin infikovaných LT2.



Graf 16 Relativní exprese MyD88 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Spichalova et al., 2023).

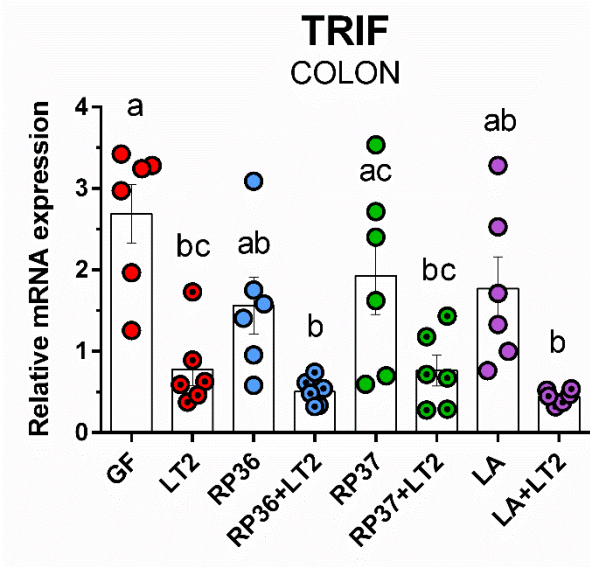
4.3.5 Exprese TRIF mRNA

V případě TRIF mRNA v ileu nebyly pozorovány v ileu žádné rozdíly mezi GF, komenzálními bakteriemi osídlenými nebo LT2 infikovanými selaty (graf 17).



Graf 17 Relativní exprese TRIF mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

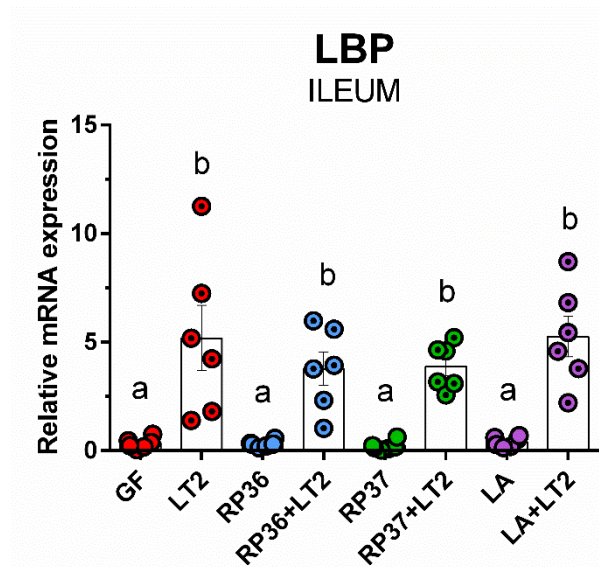
V kolonu došlo ve srovnání s GF selaty k významnému snížení exprese u všech LT2 infikovaných skupin selat (graf 18). Předchozí osídlení komezálními bakteriemi před infekcí tento pokles snížilo, takže rozdíl mezi těmito skupinami a kontrolní GF skupinou selat nebyl na rozdíl od LT2 infikovaných selat významný.



Graf 18 Relativní exprese TRIF mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

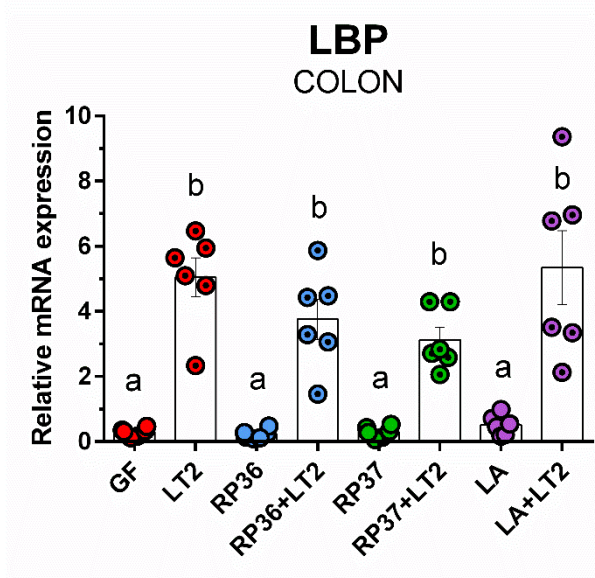
4.3.6 Exprese LBP mRNA

Expese LBP mRNA v ileu zůstala po osídlení komenzálními bakteriemi na úrovni GF skupiny, tedy nebyla stimulována (graf 19). Na rozdíl od toho infekce výrazně zvýšila expresi u všech skupin selat infikovaných LT2.



Graf 19 Relativní exprese LBP mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Spichalova et al., 2023).

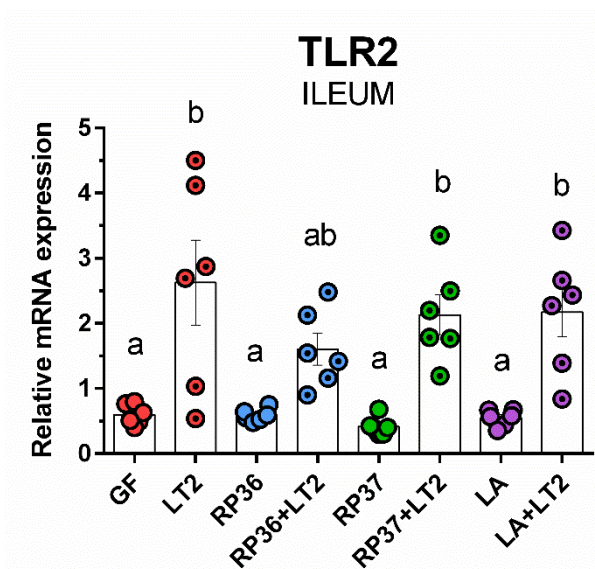
Stejně jako v ileu, expese LBP mRNA v kolonu byla srovnatelná pro všechny skupiny neinfikovaných selat a infekce LT2 tuto expresi výrazně zvýšila (graf 20).



Graf 20 Relativní exprese LBP mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

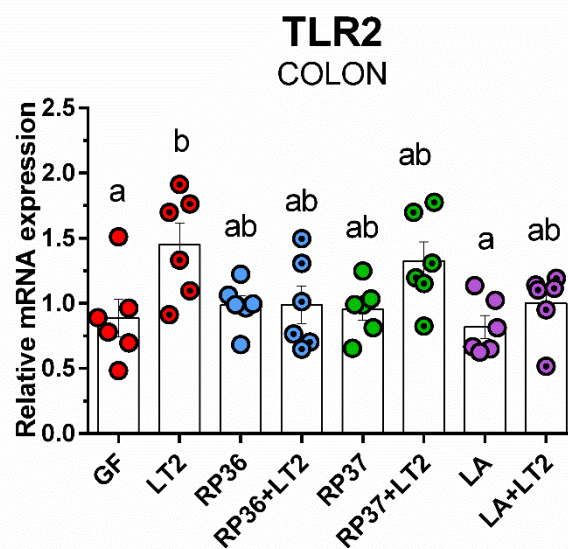
4.3.7 Expres TLR2-2 mRNA

Expres TLR2 mRNA v ileu byla srovnatelná u všech neinfikovaných skupin selat (graf 21). Infekce LT2 zvýšila tuto expresi, která byla, až na výjimku selat předem osídlených RP36 (RP36+LT2), statisticky významná.



Graf 21 Relativní exprese TLR2 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

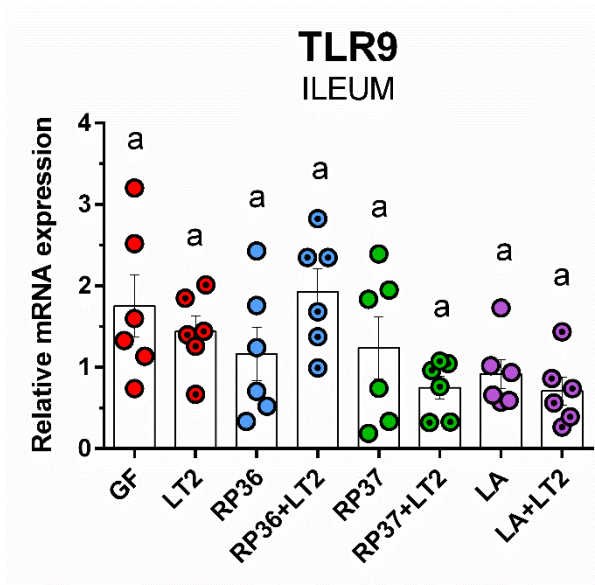
Infekce LT2 bez předchozího osídlení komenzální bakterií výrazně zvýšila expresi TLR2 mRNA (GF versus LT2) v kolonu (graf 22). Expres ale nebyla tak výrazná jako v ileu mezi osídlením bifidobakteriemi samotnými ve vztahu k GF a zároveň LT2 nebyly výrazné rozdíly. Stejně tak nebyly výrazné rozdíly mezi skupinami osídlenými komenzálními bakteriemi samotnými a následně infikovanými LT2.



Graf 22 Relativní exprese TLR2 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

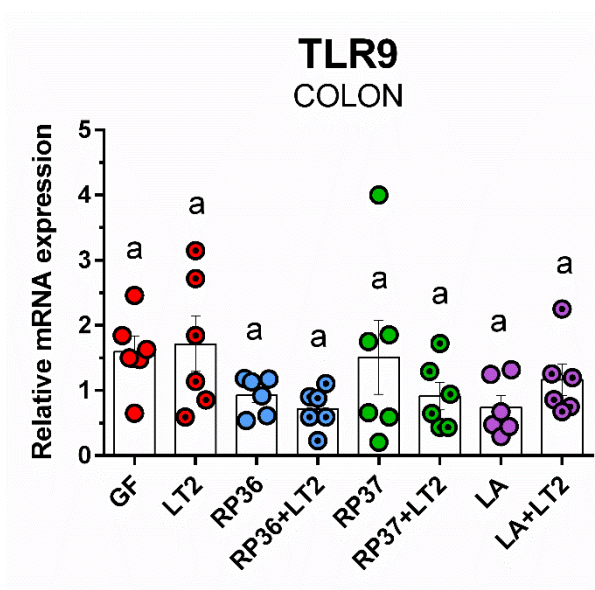
4.3.8 Expres TLR9 mRNA

Změny exprese TLR9 mRNA v ileu byly u všech skupin srovnatelné (graf 23).



Graf 23 Relativní exprese TLR9 mRNA v ileu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

Stejně jako v ileu byly i v kolonu všechny exprese TLR9 mRNA srovnatelné (graf 24).

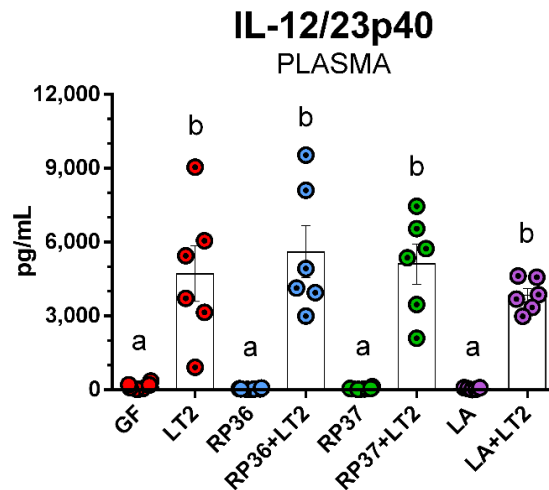


Graf 24 Relativní exprese TLR9 mRNA v kolonu donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

4.3.9 Zánětlivé cytokiny IL-12/23p40 a IL-6 v krevní plazmě

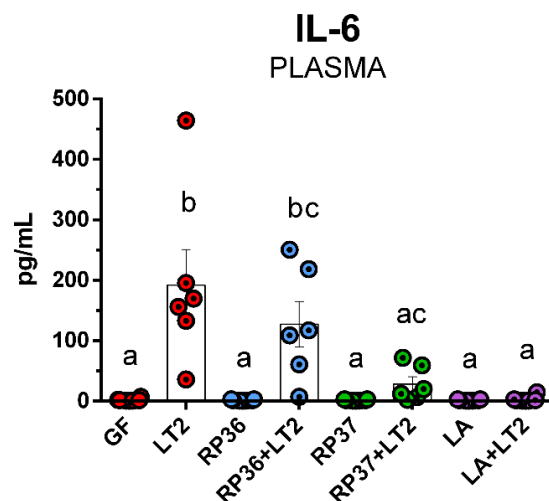
4.3.9.1 Hladiny IL-12/23p40 v krevní plazmě

Hladiny IL-12/23p40 v krevní plazmě GF a ostatních skupin neinfikovaných selat byly nízké a vzájemně srovnatelná (graf 25). Ve všech případech infekce LT2 bez ohledu na předchozí osídlení komenzálními bakteriemi došlo k výraznému zvýšení hladin IL-12/23p40, které byly mezi sebou vzájemně srovnatelné.



Graf 25 Hladiny IL-12/23p40 v krevní plazmě donošených gnotobiotických selat (Splichalova et al., 2023).

Hladiny IL-6 v krevní plazmě byly nízké a srovnatelné pro všechny skupiny neinfikovaných selat (graf 26). V případě infekce samotnou LT2 došlo k výraznému zvýšení IL-6. Předchozí osídlení RP37 a LA však zabránilo významnému zvýšení IL-6 po infekci LT2.

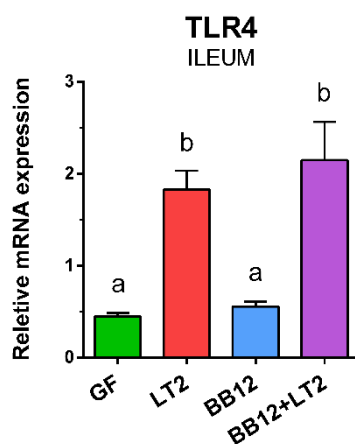


Graf 26 Hladiny IL-6 v krevní plazmě donošených gnotobiotických selat. (Splichalova et al., 2023).

4.4 TLR4 SIGNÁLNÍ DRÁHA V ILEU A KOLONU U NEDONOŠENÝCH GNTOBOTICKÝCH SELAT

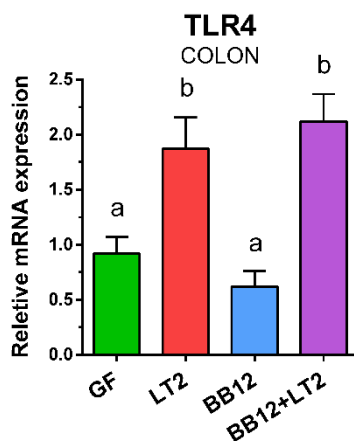
4.4.1 Exprese TLR4 mRNA

BB12 nezvýšilo expresi TLR4 mRNA v ileu ve srovnání s GF kontrola selat (graf 27). Ke statisticky významnému zvýšení však došlo u obou skupin infikovaných *S. Typhimurium* (LT2 a BB12 + LT2). Přítomnost BB12 (BB12 + LT2) neovlivnila expresi TLR4 ve srovnání se samotnou infekcí *S. Typhimurium* (LT2).



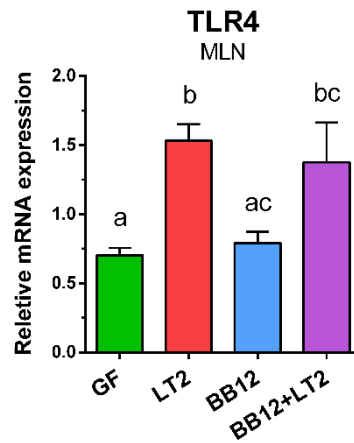
Graf 27 Relativní exprese TLR4 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

Salmonela významně zvýšila expresi TLR4 mRNA v kolonu u obou infikovaných skupinách (LT2 a BB12 + LT2). Předchozí osídlení selat BB12 u skupiny BB12+LT2 toto zvýšení neovlivnilo (graf 28).



Graf 28 Relativní exprese TLR4 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

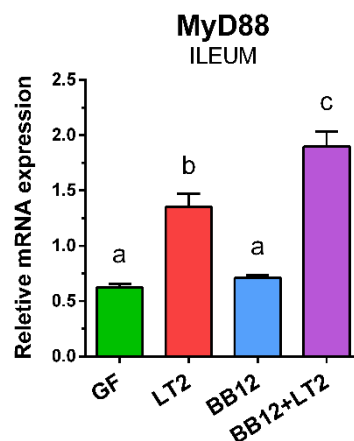
Salmonela významně zvýšila expresi TLR4 mRNA v mezenterálních lymfatických uzlinách 9(MLN) ve skupinách infikovaných LT2 (LT2 a LT2+BB12) GF (graf 29).



Graf 29 Relativní exprese TLR4 mRNA v mezenterálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

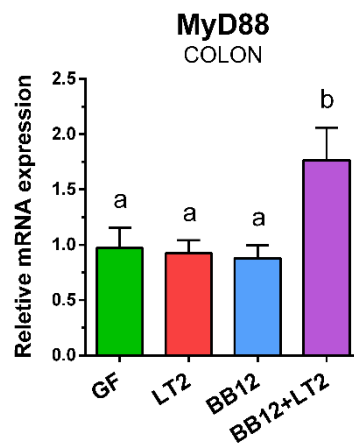
4.4.2 Exprese MyD88

Osídlení s BB12 nezvýšilo expresi mRNA MyD88 v ileu ve srovnání s bezmikrobními selaty. Předchozí osídlení s BB12 před infekcí s LT2 však významně zvýšilo expresi mRNA MyD88 ve srovnání se všemi ostatními skupinami (graf 30).



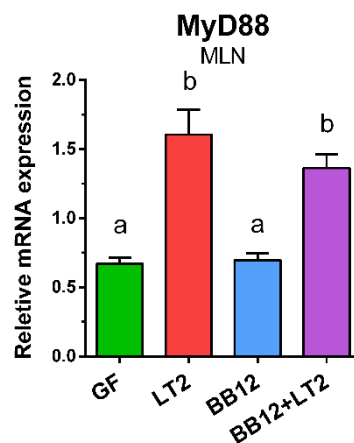
Graf 30 Relativní exprese MyD88 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

MyD88 mRNA byla významně zvýšena v kolonu pouze ve skupině BB12 + LT2 (graf 31).



Graf 31 Relativní exprese MyD88 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

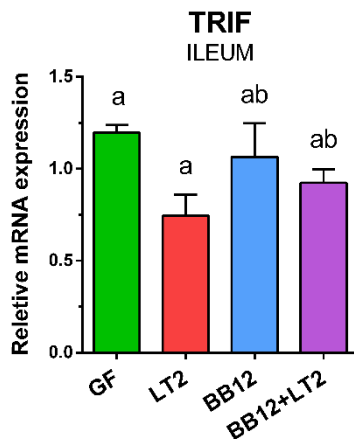
Expres MyD88 v MLN byla, stejně jako v ileu, výrazně stimulována přítomností LT2 u obou skupin infikovaných selat (graf 32).



Graf 32 Relativní exprese MyD88 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

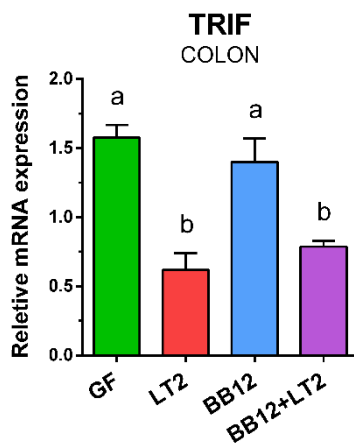
4.4.3 Expres TRIF

Přítomnost salmonely snížila expresi TRIF mRNA v ileu ve srovnání s ostatními skupinami, ale toto snížení nebylo statisticky významné (graf 33).



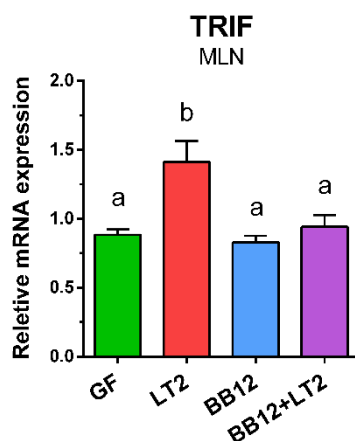
Graf 33 Relativní exprese TRIF mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

TRIF mRNA byla významně snížena v kolonu obou skupin infikovaných salmonelou ve srovnání s oběma neinfikovanými skupinami (graf 34).



Graf 34 Relativní exprese TRIF mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

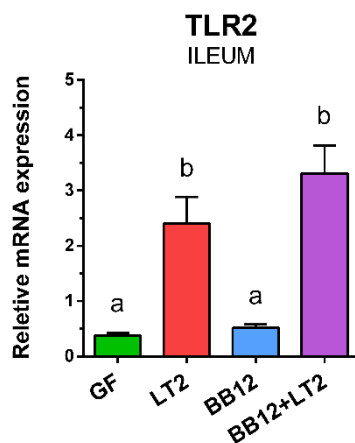
U skupiny selat LT2 byla výrazně zvýšena exprese TRIF mRNA v MLN ve srovnání s ostatními skupinami (graf 35).



Graf 35 Relativní exprese TRIF mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

4.4.4 Exprese TLR2 mRNA

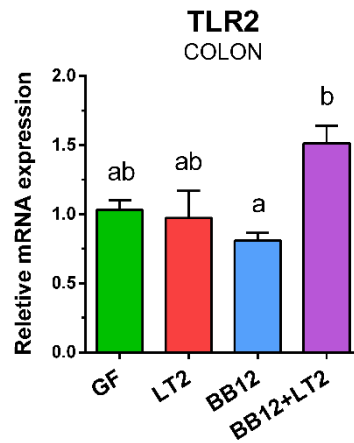
BB12 nezvýšilo expresi TLR2 mRNA v ileu ve srovnání s GF kontrola selat (graf 36). Naproti tomu obě skupiny infikované *S. Typhimurium* (LT2 a BB12 + LT2) měly významně vyšší expresi. Přítomnost BB12 (BB12 + LT2) jen nevýznamně ovlivnilo expresi TLR2 mRNA ve srovnání se samotnou infekcí *S. Typhimurium* (LT2).



Graf 36 Relativní exprese TLR2 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

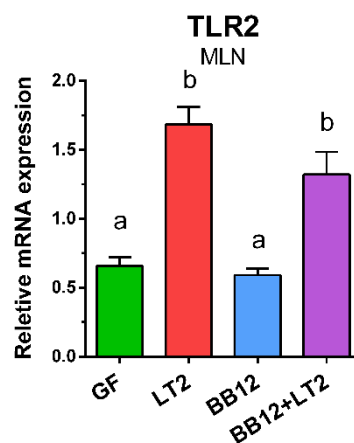
BB12 snížilo expresi TLR2 mRNA v kolonu, ale tato snížení bylo ve srovnání se skupinami GF a LT2 statisticky nevýznamné (graf 37). Při předchozím osídlení s BB12 (BB12 + LT2) ve

srovnání způsobilo významné zvýšení, ale pouze ve srovnání se skupinou BB12. Tato zvýšení ale nebylo statisticky významné ve srovnání se skupinami GF a LT2.



Graf 37 Relativní exprese TLR2 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

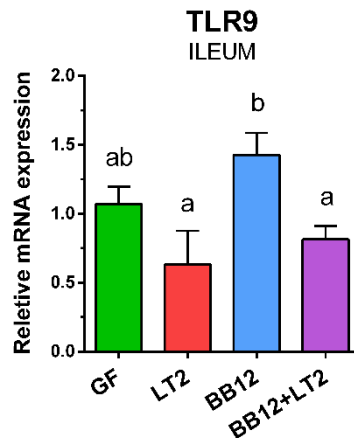
Expresa TLR2 mRNA v MLN se výrazně zvýšila po infekci LT2 a přecházející osídlení s BB12 toto zvýšení neovlivnilo (graf 38).



Graf 38 Relativní exprese TLR2 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

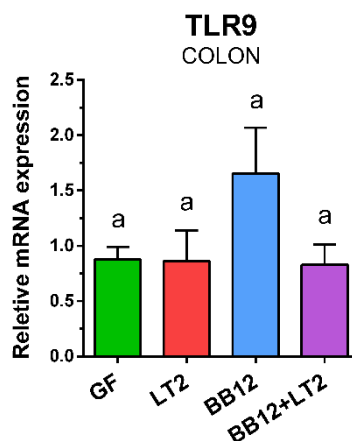
4.4.5 Exprese TLR9 mRNA

U exprese TLR9 mRNA v ileu byl opačný trend než u TLR4 a TLR2 (graf 39). Exprese mRNA TLR9 byla srovnatelná ve skupinách GF a BB12, ale byla snížena infekcí salmonelou. Předchozí kolonizace s BB12 (BB12 + LT2) nezměnila trend vyvolaný infekcí LT2.



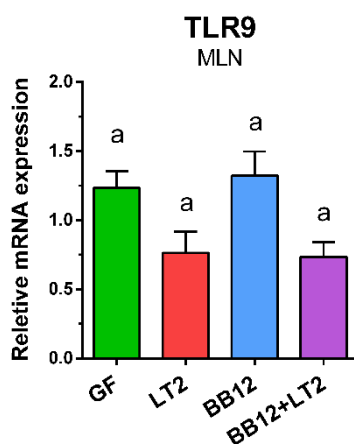
Graf 39 Relativní exprese TLR9 mRNA v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

Exprese TLR9 mRNA v kolonu nevykazovala statisticky významné rozdíly mezi skupinami (graf 40).



Graf 40 Relativní exprese TLR9 mRNA v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

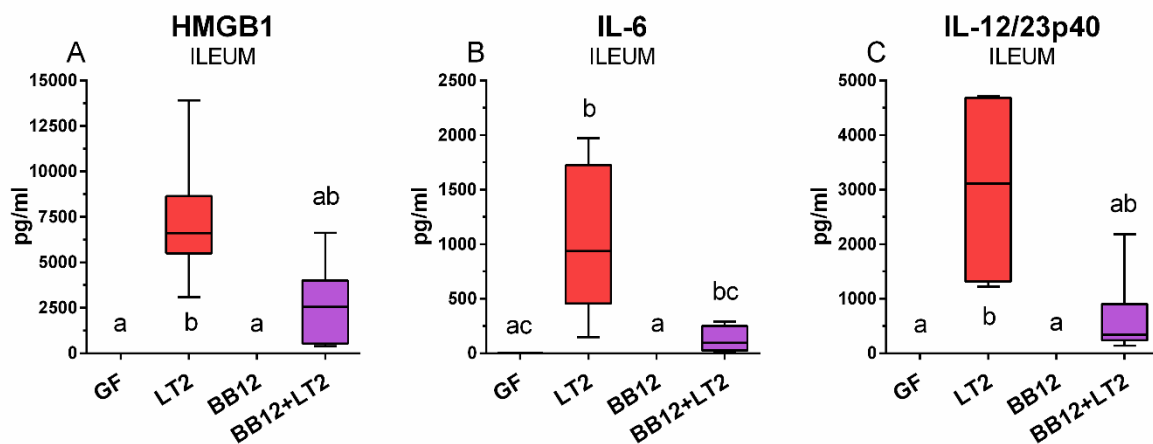
Expres TLR9 mRNA v MLN byla snížena u obou infikovaných skupin, ale toto snížení nebylo statisticky významné (graf 41).



Graf 41 Relativní exprese TLR9 mRNA v mezenteriálních lymfatických uzlinách nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

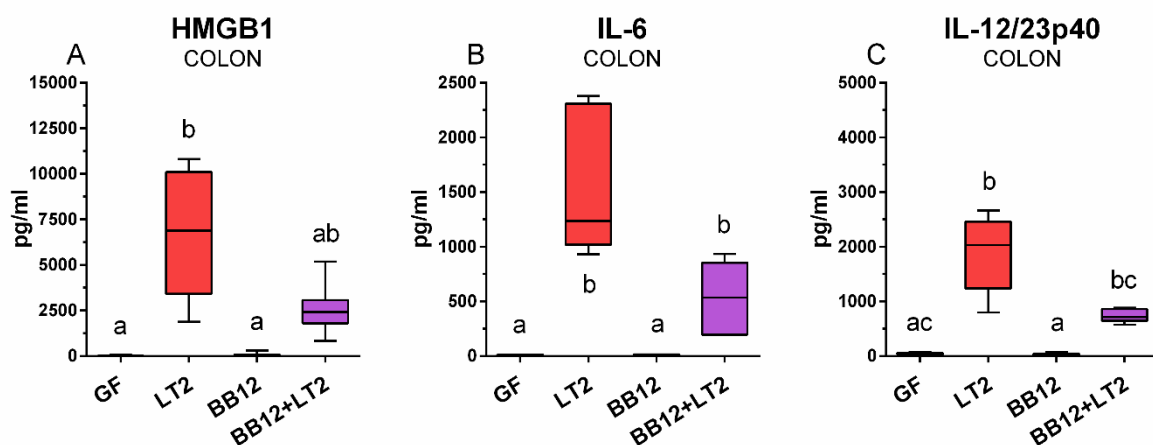
4.4.6 HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v ileu, kolonu a krevní plazmě

Hodnoty HMGB1 v ileu byly při infekci LT2 významně zvýšeny (graf 42A). Při předchozím osídlení selat BB12 došlo ke zvýšení, ale to nebylo statisticky významné ve srovnání s neinfikovanými skupinami (GF a BB12). Infekce LT2 výrazně zvýšila hodnoty IL-6 v ileu (graf 42B). Předchozí osídlení BB12 toto zvýšení zmírnilo, takže bylo ve srovnání jak s kontrolní, tak s LT2 skupinou neprůkazné. U neinfikovaných selata (GF, BB12) byly hladiny IL-12/23p40 nedetekovatelné, nebo velmi nízké (graf 42C). Po infekci LT2 došlo k výraznému zvýšení hodnot. V případě předchozího osídlení BB12 došlo také ke zvýšení hodnot, ale ani ve vztahu k neinfikovaným selatům nebo selatům infikovaným pouze LT2 nebyly tyto rozdíly statisticky významné.



Graf 42 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v ileu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

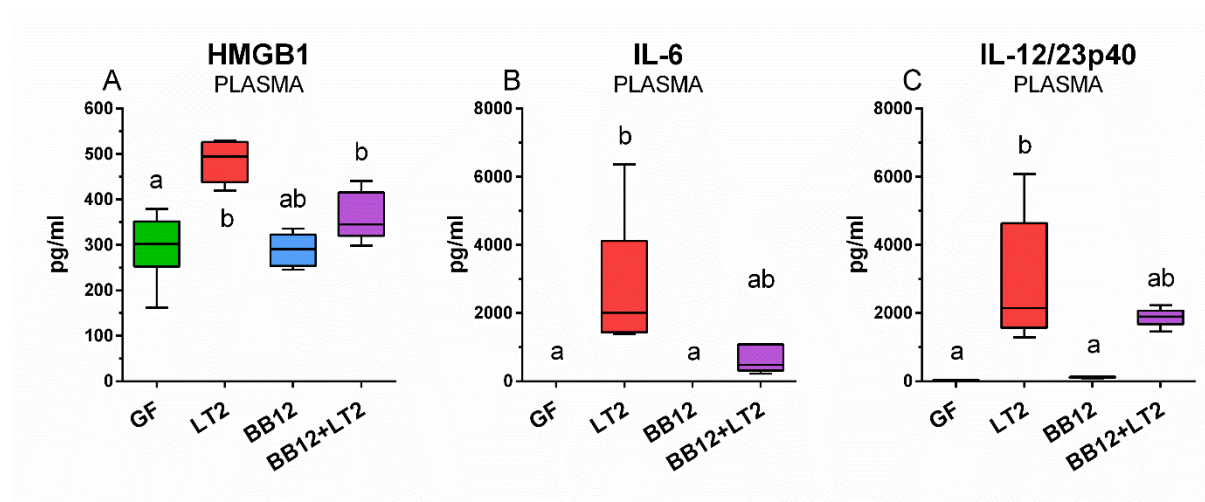
Infekce *S. Typhimurium* významně zvýšila hodnoty HMGB1 v kolonu ve srovnání s neinfikovanými skupinami selat (graf 43A). V případě předchozího osídlení BB12 před infekcí LT2 nedošlo, stejně jako v případě ilea, k výraznému zvýšení. V kolonu infekce výrazně zvýšila hladiny IL-6 u obou skupin infikovaných LT2 a předchozí osídlení BB12 významnost zvýšení neovlivnilo (graf 43B). Infekcí LT2 došlo v kolonu ke zvýšení IL-12/23p40 hladin, které byl výrazné pouze v případě LT2 infekce samotné (graf 43C). Při předchozím osídlení BB12 došlo jen k neprůkaznému zvýšení ve srovnání s kontrolními GF selaty.



Graf 43 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v kolonu nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

Hladiny HMGB1 v krevní plazmě byly dobře detekovatelné u všech skupin selata (graf 44A). Při infekci LT2 došlo k jejich výraznému zvýšení a ani předchozí kolonizace selat s BB12

tomuto průkaznému zvýšení nezabránila. V krevní plazmě infikovaných selat u skupiny LT2 došlo k výraznému zvýšení hladin IL-6. Předchozí osídlení BB12 tyto hodnoty snížilo, ale rozdíl jak ve vztahu k neinfikovaným selatům (GF, BB12), tak ke skupině LT2 byly nevýznamné (graf 44B). Obdobně jako v ileu a kolonu, infekce LT2 výrazně zvýšila hladiny IL12/23 v krevní plazmě (graf 44C). V případě předchozího osídlení bylo toto zvýšení neprůkazné.



Graf 44 Hodnoty HMGB1, IL-6 a IL-12/23p40 v krevní plazmě nedonošených gnotobiotických selat (Splichal et al., 2023).

5 DISKUZE

5.1 MIKROORGANIZMY, INFEKCE A ANTIBIOTIKA

Žijeme ve světě obklopeni mikroorganismy, se kterými jsme v určitém vztahu – symbióze. Tím není myšleno jen vzájemně výhodné soužití, ale symbióza, která nabývá různých podob od vzájemně výhodného mutualismu až po parazitizmus (Swain Ewald and Ewald, 2018). Příkladem parazitizmu (myšleno vztahu) jsou střevní infekce. Nepromyšleným nadměrným používáním antibiotik jsme dospěli do stavu, kdy si mikroorganismy vytvořili multirezistenci na antibiotika, která tak často ztratila svou původní účinnost (Bearson, 2022). Aby došlo k omezení používání antibiotik, platí od r. 2006 v zemích EU zákaz přidávání antibiotik do krmných směsí pro hospodářská zvířata a optimisticky bylo nahlíženo na používání oxidu zinečnatého v krmných směsích pro hospodářská zvířata, který měl antibiotika přinejmenším částečně nahradit. V lednu 2022 došlo k dalšímu zpřísnění zákazu používání antibiotik u hospodářských zvířat a v červnu 2022 Evropská komise používání oxidu zinečnatého zakázala a nařídila stáhnout z trhu výrobky, které ho obsahují (Nunan, 2022). Celou dobu od zjištění negativního vlivu nadměrného používání antibiotik se hledají způsoby, které by namísto antibiotik podpořily dobrý zdravotní stav lidí a zvířat. Hledají se tedy jejich náhražky s antimikrobiálními účinky, např. antimikrobiální peptidy (Zhang et al., 2022), nanomateriály (Munir et al., 2020), metabolity (Bhowmick et al., 2020), a rostlinné extrakty (Amoussa et al., 2023). Jednou z možných cest je modulace mikrobioty, např. použitím probiotik (Davis et al., 2020), definovaných mikrobiálních konsorcií (Darnaud et al., 2021) nebo transplantací mikrobioty (Porcari et al., 2023).

5.2 TRANSLAČNÍ ZVÍŘECÍ MODELY

V experimentální práci je snaha čím dále více nahrazovat zvířecí modely *in vitro* systémy, ať už jsou to 2D nebo 3D (organoidy) tkáňové kultury, explantáty a další systémy (Puschhof et al., 2021). Některé experimenty však vyžadují komplexní reakci organismu, které nám, i přes jejich stále zdokonalování, systémy *in vitro* neposkytují. Protože jsou však možnosti provádění experimentů na lidech velmi omezené (Davis, 2023), má práce s pokusnými zvířaty má stále své opodstatnění. Většinou se jedná o translační zvířecí modely, tj. modely, které simulují určité stavy u člověka a poznatky jsou na člověka přenositelné (Peplow, 2024). Nejbližším zvířecím modelem člověka by byly nehumánní primáti. V tomto případě se ale výrazně přidružují etické problémy, a proto se od využití např. šimpanze jako translačního modelu upouští (Gruen, 2016).

Kromě toho, i „ekonomická složka“ by takovéto pokusy výrazně omezovala. Mohou však nastat situace, např. pandemie SARS-cov-2, kdy se stává šimpanz důležitým zvířecím experimentálním modelem (De Meyer and Meuleman, 2024).

Nejrozšířenějšími zvířecími modely jsou laboratorní hlodavci (Domínguez-Oliva et al., 2023), jejichž využití má mnoho předností, např. malé rozměry a tedy i nároky na chov, dostupnost mnoha linií myši (a jejich cenová přijatelnost), včetně genetickými manipulacemi připravených KO linií. Další výhodou je i široké spektrum komerčně dostupných reagentů jako jsou např. specifické protilátky, ELISA kity, arraye využívající nukleové kyseliny, a další. Protipólem hlodavců je použití velkých hospodářská zvířata (Spencer et al., 2022). V těchto případech se nemusí jednat jen o translační modely ale i o experimenty srovnávající různé podmínky ovlivňující užitek hospodářských zvířat a jejich zdravotní stav. Je zřejmé, že v porovnání s laboratorními hlodavci jsou podstatně vyšší náklady při práci s velkými hospodářskými zvířaty, počínaje ustájením a konče výživou a manipulací se zvířaty. Nezanedbatelnou je multiparita (např. myš) versus uniparita (např. skot), tj. zatímco u myši získáme několik mláďat z jednoho vrhu, vytvořit statisticky hodnotitelné skupiny u skotu, kdy je ve vrhu většinou jen jedno tele, je podstatně obtížnější.

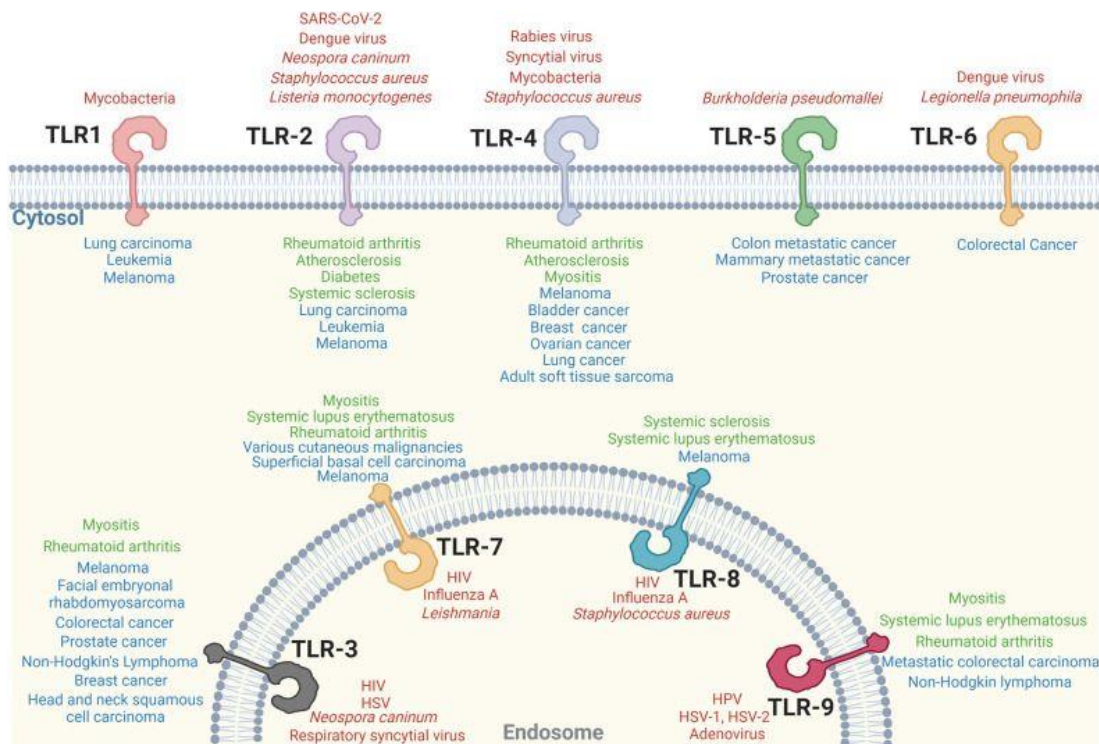
S rozvojem molekulárně genetických metod a „multiomics“ přístupů (Chetty and Blekhan, 2024) se v posledním desetiletí obrátila pozornost na význam mikrobiomu pro zdraví člověka (Krautkramer et al., 2021). Ačkoli je většina experimentů prováděna na myších, je třeba nezapomínat na skutečnost, že střevní mikrobiomy člověka (Qin et al., 2010) a myši (Xiao et al., 2015) jsou velice odlišné. To je pravděpodobně důvod, proč některá infekční agens vyvolávají u člověka a myši různá onemocnění, např. *S. Typhimurium* vyvolá u člověka enterokolitidu, ale u myši onemocnění podobné lidskému břišnímu tyfu (Walker et al., 2023). A naopak, různá infekční agens vyvolávají srovnatelné onemocnění. Např. střevní A/E léze vyvolávají enteropatogenní a enterohemoragické *Escherichia coli* u člověka, ale *Citrobacter rhodentium* u myši (Smallets and Kendall, 2021).

Prase je člověku vývojově podstatně bližší, a jak již bylo uvedeno jeho výrazné podobnosti (anatomie, fyziologie, genetika, mikrobiom) (Lunney et al., 2021; Xiao et al., 2016), ale i odlišnosti (placenta a z toho plynoucí složení kolostra a potřeby novorozence) (Roberts et al., 2016; Salmon et al., 2009) je možné účelně využít pro studium gastroenterologických a infekčních onemocnění člověka (Burrin et al., 2020; Rutai et al., 2022). Pozornost upřenou

k praseti jako žádanému biomedicínskému modelu podporuje také dlouholetá snaha využít prase jako donora orgánů pro člověka a z důvodu usnadnění tohoto procesu vzniká ve světě mnoho transgenních linií prasat (Sykes and Sachs, 2022).

5.3 TLR VE ZDRAVÍ A NEMOCI

TLR jsou zapojeny do regulačních procesů organismu a podílí se na mnoha fyziologických a patologických procesech. Jejich participace je velice častá při onkologických onemocněních (Duan et al., 2022), ale i dalších.



Obrázek 13 TLR a onemocnění (Duan et al., 2022)

Pro pracovní skupinu Imunitních regulací (Laboratoř gnotobiologie MBÚ AV ČR, v.v.i.) je TLR4 zajímavý jako významný receptor pro LPS gramnegativních bakterií, kde prokázali vztah mezi komplexností LPS řetězce Δrfa mutantů *S. Typhimurium* LT2, indukci zánětlivých cytokinů a virulencí mutantů pro gnotobiotická selata (Splichal et al., 2020; Splichalova et al., 2019b).

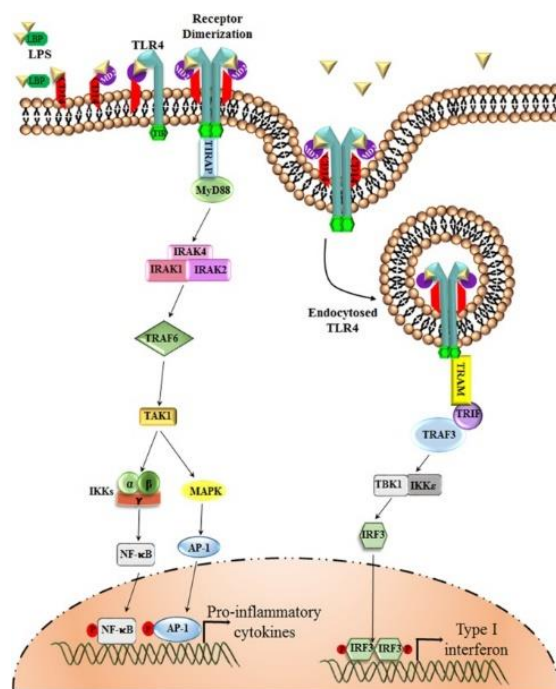
TLR4 hraje také významnou úlohu při vzniku nekrotizující enterokolitidy (NEC). NEC je popisována jako „devastující“ onemocnění, které postihuje především předčasně narozené děti (Scheese et al., 2023). Jedná se o multifaktoriální onemocnění, jehož příčiny vzniku však nejsou plně objasněny. Předpokládá se, že významnou roli význam při vzniku NEC hrají nezralost

střeva a neadekvátní mikrobiota kolonizující trávicí trakt nedonošeného dítěte. Vlivem dysbiotického mikrobiomu dochází k výrazné aktivaci TLR4 a neregulované produkci zánětlivých cytokinů (Karki and Kanneganti, 2021; Scheese et al., 2023). Je pro nás zajímavé, že jak při infekci *S. Typhimurium*, tak při NEC jsou shodně místy hlavního poškození terminální ileum a kolon (Feldens et al., 2018; Gal-Mor et al., 2014).

5.4 RELATIVNÍ EXPRESE mRNA PRO TLR4 A MOLEKULY MAJÍCÍ K TLR4 BEZPROSTŘEDNÍ VZTAH

V předložené práci jsme sledovali genové přepisy TLR4, MD-2, CD14, LBP a adaptorové molekuly MyD88 a TRIF. Pro doplňující informace také z hlediska bakteriálních ligandů zajímavé TLR2 a TLR9. Jsme si dobře vědomi, že změny exprese na úrovni mRNA ještě neznamenají změny exprese odpovídajícího proteinu. Exprimovaný TLR protein může sloužit buď jako funkční receptor pro amplifikaci reakce nebo naopak jako solubilní, tedy odštěpený receptor, může zpětnovazebně reakci tlumit (Jung et al., 2009). Na regulaci efektu imunitní odpovědi se mohou také účastnit další složky podílející se na kaskádě signalizace TLR4 receptoru, např. solubilní koreceptor CD14, který je považovaný za významný biomarker novorozenecké sepse (Boscarino et al., 2023). Podstatné pro nás však bylo zjištění, jestli mohou vybrané bakterie ovlivnit předpokládanou expresi receptoru na úrovni mRNA, bez ohledu na to, co se dále s receptorem děje.

Pro připomenutí, TLR4 signalizace může, podle adaptorových protein MyD88 a TRIF a lokalizace TLR4, probíhat MyD88- a TRIF-dependentními drahami s výslednými efektorovými molekulami zánětlivými cytokiny (MyD88) nebo interferony 1 třídy (TRIF) (Firmal et al., 2020). To byl také důvod, proč jsme se zaměřili na aktivaci genového přepisu těchto adaptorových proteinů.



Obrázek 14 MyD88-závislá a TRIF-závislá signalizace TLR4

Práce je rozdělena na 2 části podle toho, jestli jsme prováděli pokusy s donošenými nebo nedonošenými selaty. V obou případech byly výsledky publikované ve vědeckých impaktovaných časopisech a byly použity jen ty výsledky na jejich získání, zpracování a vyhodnocení jsem se bezprostředně podílela.

5.4.1 Donošená gnotobiotická selata

Výsledky jsme publikovali v článku:

Splichalova, A., Kindlova, Z., Killer, J., Neuzil Bunesova, V., Vlkova, E., Valaskova, B., Pechar, R., Polakova, K., Splichal, I., 2023. Commensal Bacteria Impact on Intestinal Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets. *Pathogens* 12, 1293. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111293>

5.4.2 Nedonošená gnotobiotická selata

Výsledky jsme publikovali v článku:

Splichal, I., Donovan, S.M., Kindlova, Z., Stranak, Z., Neuzil Bunesova, V., Sinkora, M., Polakova, K., Valaskova, B., Splichalova, A., 2023. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms24032329>

Dále byly prezentovány výsledky, jejichž získání jsem věnovala hodně času, byť se nakonec metodický přístup ukázal jako problematický (ELISA pro claudin-1 a okcludin ve střevních

homogenátech). Kvantitativnímu stanovení obou proteinů se v budoucnu budeme věnovat a první metodické pokusy pro zavedení Western blotu byly udělány. Z důvodu počátečních výsledku však nejsou v práci uvedeny.

Pro srovnání statistické významnosti mezi skupinami jsme zvolili písmenný systém (a, b, c, ab, apod.), protože se domníváme, že je více ilustrativní, tj. dokáže detailněji popisovat vztahy mezi jednotlivými skupinami, než systém využívající asterisky (*, ** a ***). Důvodem bylo také to, že při nízkém počtu případů (zvířat) ve skupině rozlišování na $P < 0,05$, $P < 0,01$ a $P < 0,001$ je méně uplatnitelné.

5.5 DONOŠENÁ SELATA

Selata byla bezprostředně po hysterektomii osazena prasečími komenzálními bakteriemi – mucinolytickým *Bifidobacterium boum*, kmen RP36 (RP36), nemucinolytickým *B. boum*, kmen RP37 (RP37) nebo *Lactobacillus amylovorus* (LA). Skupiny selat RP36 a RP37 byly 24 hodin po hysterektomii znovu osídleny stejnými kmeny *B. boum* (Splichalova et al., 2020). Dvojí osídlení se provádělo z důvodu, že jsou bifidobakterie striktně anaerobní bakterie a v běžných podmínkách pro jejich kolonizaci připravují vhodné podmínky, jako jsou např. aerotolerantní laktobacily (Xiao et al., 2021). Z tohoto důvodu bylo u *L. amylovorus* provedeno pouze jednou a to 4 hod po hysterektomii. Cílem osídlení selat bylo zjistit, zda bakterie nebudou translokovat a snaha o zvýšení kolonizační rezistence (Leshem et al., 2020). To by ztížilo kolonizaci trávicího traktu *Salmonella* Typhimurium jako to bylo popsáno u probiotické *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) (Splichal et al., 2019a). Jako kontrolní skupinu jsme použili bezmikrobní selata (GF), které vykazují nízkou lokální a systémovou produkci zánětlivých cytokinů (Splichalova et al., 2018). Selata infikovaná pouze *S. Typhimurium* LT2 (LT2) tvořily skupinu s předpokládanými projevy enterokolitidy jako jsou zvýšená teplota, nechutenství, malátnost a průjem. Jako efektorové molekuly TLR4 signalizace jsme vybrali dva zánětlivé cytokinové biomarkery sepse IL12/23p40 a IL-6 (Barichello et al., 2022). IL-12/23p40 je sdílená subjednotka interleukinů 12 a 23 a je významným regulátorem imunitní odpovědi při salmonelových infekcích (Huang, 2021). Zároveň IL-12 v séru novorozenců dětí je marker pozitivně korelující se závažností NEC (Yin et al., 2020). IL-6 je úzce spojen s produkcí proteinů akutní fáze a inhibice jeho hladin se ukázala být terapeutickou možností při snižování následků NEC (Yarci et al., 2021).

Žádné s neinfikovaných selat (GF, RP36, RP37 a LA) nevykazovalo známky enterokolitidy. Infikovaná selata měla zvýšenou teplotu, avšak předchozí osídlení komenzálními bakteriemi (RP36+LT2, RP37+LT2 a LA+LT2) tyto projevy mírně snížilo. Domnívali jsme se proto, že by se předchozí osídlení komenzály mohlo projevit i na snížení TLR4 mRNA exprese ve střevě. To se ale neprojevilo ani v ileu, ani v kolonu. Předchozí osídlení selat RP37 a LA před infekcí LT2 bylo účinné a došlo k významnému snížení systémových hodnot IL6. V případě IL-12/23p40 však předosídlení neovlivnilo výrazné zvýšení systémových hladin u infikovaných selat. Nepozorovali jsme tedy, obecně uvedeno, výrazný inhibiční vliv na aktivaci TLR4 signální dráhy a produkci cytokinů jako tomu bylo při předosídlení gnotobiotických selat *E. coli* Nissle 1917 (Splichal et al., 2019a). Je však třeba vzít v potaz, že *E. coli* je stejně jako *S. Typhimurium* gramnegativní bakterie, jejíž LPS je významným ligandem pro TLR4, jehož signalizaci je možné inhibovat různými agonisty (Tam et al., 2023). Navíc má *E. coli* Nissle 1917 „hrubý“ (rough) chemotyp LPS (Grozdanov et al., 2002), čímž je pozměněna jeho signalizace (Splichal et al., 2020). Tento typ LPS dělá bakterii citlivou vůči komplementu a omezuje tak její translokaci (Potruch et al., 2022). Obecně je uvolněný LPS pro organismus hostitele toxický a způsobuje endotoxinový šok (Cavaillon et al., 2020). Zde se nabízí otázka použití působení hrubého LPS jako možného agonisty při TLR4 signalizaci (Zubova et al., 2021).

5.6 NEDONOŠENÁ SELATA

U dětí narozených císařským řezem nedochází k přirozenému osídlení jako u vaginálního porodu, ale jsou osidlovány především bakteriemi z nemocničního prostředí (Healy et al., 2022). Podání probiotických preparátů nebo jiné ovlivnění vyvíjející se mikrobioty proto může snížit relativní množství potenciálně patogenních (patobiotických) bakterií a zvýšit podíl prospěšné mikrobioty (Yang et al., 2024). U předčasně narozených dětí jsou však nedostatečně vyvinuté orgánové systémy, např. plíce, střevo a imunitní systém. Nedostatečně vyvinutý imunitní systém může na různé podněty reagovat dysregulovanou imunitní odpovědí - cytokinové bouří, které může poškodit orgány novorozence (Karki and Kanneganti, 2021; Sampah and Hackam, 2020). Jsou známy případy, kdy při použití probiotických preparátů u nedonošených dětí, způsobila probiotika sepsi (Kulkarni et al., 2022). Při vypracovávání postupů modulace mikrobioty u nedonošených dětí by proto bylo vhodné ověřovat bezpečnost těchto postupů na vhodných zvířecích modelech.

Novorozená selata získají, na rozdíl od člověka, ochranné protilátky až po narození po příjmu kolostra, které je zpočátku bohaté především na IgG (Bigler et al., 2022) a jehož působení je „systémové“. Příjem neporušených (nenatrávených) protilátek je zároveň zajištěn propustností střevní bariéry v období bezprostředně po narození (Salmon et al., 2009). Model nedonošeného konvenčního selete pro studium NEC je v současnosti používán na několika pracovištích, např. skupiny prof. Sangilda (Univerzita v Kodani) (Burrin et al., 2020) a prof. Hackama (Univerzita Johna Hopkinse v Baltimore) (Kovler et al., 2021). Pracovníci MBÚ AV ČR jako první (a zatím jediní) na světě odchovali nedonošená bezmikrobní selata (Splichalova et al., 2018) a použili v experimentech s probiotickými bakteriemi *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (Splichalova et al., 2019a) a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Splichal et al., 2023). Ani v případě bezmikrobních nebo monoosídlených selat se jim však nepodařilo vyvolat NEC. Nepřímo tak potvrdili, že se v případě absence mikrobiálního faktoru nevyvine NEC. Dá se tedy předpokládat, že ani při použití probiotických, tedy zdraví prospěšných bakterií nedojde k vyvolání NEC.

Abychom prohloubili imunokompromitaci hysterektomií získaných bezmikrobních selat, provedli jsme hysterektomii téměř o týden dříve, než je termín očekávaného spontánního porodu. V tomto období, ve srovnání s bezmikrobními selaty získanými v termínu očekávaného porodu, vykazují selata nezralost ve struktuře střeva, změny v lokalizaci proteinů těsných spojů claudinu-1 a okcludinu, a vyšší spontánní produkci některých zánětlivých cytokinů (Splichalova et al., 2018). Model nedonošeného gnotobiotického selete je citlivější k možným patobiotickým projevům bakterií, včetně probiotických. Jako modelové probiotikum jsme si vzali dlouhodobě používané probiotikum *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Jensen et al., 2021). Selata jsme rozdělili do 4 skupin – bezmikrobní (GF), selata infikovaná *S. Typhimurium* LT2 (LT2), selata osídlená *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12) a selata osídlená BB12 a infikovaná LT2 (BB12+LT2). Kromě efektorových molekul IL-6 a IL-12/23p40 jsme použili také stanovení HMGB1. HMGB1 je považován v případě jeho výrazného uvolnění za amplifikační faktor zánětu, který je kritický při sepsích způsobených gramnegativními bakteriemi a patří do skupiny biomarkerů sepse (Andersson and Yang, 2022; Barichello et al., 2022). Stanovovali jsme jak lokální hladiny bezprostředního kontaktu hostitel-mikrobiota v ileu a kolonu, tak systémové v krevní plazmě (Splichal et al., 2023).

BB12 netranslokovalo do orgánů a potvrdilo tak svou bezpečnost i u modelu imunokompromitovaného selete (Splichalova et al., 2021). Infekce GF selat LT2 vyvolalo

výrazné zvýšení exprese mRNA pro TLR4 a TLR2 v ileu, kolonu a mezenteriálních lymfatických uzlinách. Je zajímavé, že v případě TLR9 docházelo naopak ke snížení v přítomnosti bakterií, kdy bychom s ohledem na CpG motiv očekávali opak. Této skutečnosti a jejímu možnému vysvětlení by bylo dobré v budoucnu věnovat pozornost. Stejně tak tomu bylo pro sledované ileum a kolon u donošených selat (Splichalova et al., 2023). V ileu a lymfatických je v souladu se změnami i průběh exprese MyD88, avšak v kolonu TRIF.

Vzhledem k průběhu exprese TLR4 mRNA, ale také TLR2 mRNA, při infekcích gram negativní bakterií *S. Typhimurium* LT2 se domníváme, že MyD88 signální dráha sehrává významnější úlohu při signalizaci a produkci efektorových molekul.

5.7 TLR4 SIGNALIZACE A DALŠÍ

Ve výsledcích, které byly prezentovány, ne vždy dokázaly komenzální a probiotické bakterie dostatečným způsobem potlačit nekontrolovanou produkci zánětlivých cytokinů či HMGB1. Podstatně úspěšnější byly v tomto případě dřívější experimenty klolektivu z MBÚ AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku s probiotickou *Escherichia coli* Nissle 1917, která dokázala ve většině případů eliminovat zvýšenou tvorbu cytokinů (Splichal et al., 2019a). Příčinou může být obsazení TLR4 LPS této probiotické bakterie a jeho chemotyp, který nevyvolává zánětlivou reakci. Gramnegativních probiotických bakterií je velice málo a právě z důvodu jejich interakce s TLR4 by byly velice zajímavé, jedná se především o velice zajímavé *E. coli* (Biyashev et al., 2022).

Při hodnocení rozhraní mezi bakteriemi bohatým střevním lumen a sterilním prostředím těla hostitele nás zajímá funkčnost střevní bariéry. Měření i-FABP (intestinal fatty acid binding protein) nepřineslo očekávané informace (výsledky neprezentovány). Dlouhodobě sledování aktivace genového přepisu proteinů těsných spojů claudinu-1 a okludinu opakovaně potvrzuje, že *S. Typhimurium* LT2 u gnotobiotických selat aktivuje genový přepis u claudinu-1 a naopak u okludinu jej potlačuje (Splichal et al., 2019b; Splichalova et al., 2021). Kvantifikace obou proteinů v tkáňových homogenátech ilea a kolonu metodou ELISA se zdála být snadnou a efektivní metodou kvantifikace. Bohužel, nepodařilo se nám odstranit vysoké pozadí způsobené lyzačním pufrem, aby bylo možné proteiny v lyzátech kvantifikovat. Začali jsme se tedy zabývat Western blotem pro stanovení obou proteinů, ale vypracování metod je v počáteční fázi, a proto nebylo do diplomové práce zahrnuto.

6 ZÁVĚR

Začátkem 21. století došlo vlivem rozvoje molekulárně genetických metod a „omics“ přístupů k získání nových poznatků vztahů hostitele a jeho mikrobioty a k renezanci zájmu o gnotobiotické zvířecí modely. Zdá se, že v posledním desetiletí se zájem přesouvá z probiotik, často daných jednotlivými bakteriemi (nebo kvasinkami) k více složitým probiotickým preparátům založeným stále ještě hlavně na bifidobakteriích a laktobacilech, ale i k posunu k více složitým definovaným mikrobiálním konsorciím. Tato konsorcia by měla více zabezpečovat/pokrývat potřeby hostitele, a proto se domníváme, že jim patří budoucnost.

V současnosti se zabýváme transplantací mikrobioty získané od dětí ve stáří 2-5 měsíců, které nebyly ošetřeny antibiotiky. Při našem studiu budeme i nadále pracovat s modelem gnotobiotického selete. TLR4, jeho genový přepis, exprese proteinu a přítomnost v tělních tekutinách bude i nadále středem našeho zájmu se snahou připravit stabilní mikrobiotu, která by byla schopná zabránit neúměrné produkci cytokinů při různých zánětlivých procesech včetně infekcí a následné sepsi s jejím devastujícím účinku na organismus hostitele.

7 POUŽITA LITERATURA

- Akagawa, S., Tsuji, S., Onuma, C., Akagawa, Y., Yamaguchi, T., Yamagishi, M., Yamanouchi, S., Kimata, T., Sekiya, S.-I., Ohashi, A., Hashiyada, M., Akane, A., Kaneko, K., 2019. Effect of Delivery Mode and Nutrition on Gut Microbiota in Neonates. *Ann. Nutr. Metab.* 74, 132–139. <https://doi.org/10.1159/000496427>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Amoussa, A.M.O., Lagnika, L., Jullian, V., Chassagne, F., 2023. Anti-*Salmonella* activity of plant species in the Benin republic: *Artemisia afra* and *Detarium senegalense* with promising in vitro and in vivo activities. *Biomed. Pharmacother.* 158, 114119. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114119>
- Andersson, U., Yang, H., 2022. HMGB1 is a critical molecule in the pathogenesis of Gram-negative sepsis. *J Intensive Med* 2, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.jointm.2022.02.001>
- Barichello, T., Generoso, J.S., Singer, M., Dal-Pizzol, F., 2022. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit. Care* 26, 14. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03862-5>
- Basic, M., Bleich, A., 2019. Gnotobiotics: Past, present and future. *Lab. Anim.* 53, 232–243. <https://doi.org/10.1177/0023677219836715>
- Bearson, S.M.D., 2022. *Salmonella* in Swine: Prevalence, Multidrug Resistance, and Vaccination Strategies. *Annu Rev Anim Biosci* 10, 373–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-013120-043304>
- Bhowmick, S., Mazumdar, A., Moulick, A., Adam, V., 2020. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnol. Adv.* 43, 107571. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107571>
- Bianchi, M.E., Crippa, M.P., Manfredi, A.A., Mezzapelle, R., Rovere Querini, P., Venereau, E., 2017. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol. Rev.* 280, 74–82. <https://doi.org/10.1111/imr.12601>
- Bigler, N.A., Bruckmaier, R.M., Gross, J.J., 2022. Implications of placentation type on species-specific colostrum properties in mammals. *J. Anim. Sci.* 100, skac287. <https://doi.org/10.1093/jas/skac287>
- Biyashev, B., Biyashev, K., Bulegenova, M., Kirkimbaeva, Z., Zhylkaidar, A., 2022. Determination of prophylactic and therapeutic effectiveness of probiotic strain *Escherichia coli* 39-SN. *J. Med. Life* 15, 20–25. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0118>

- Boscarino, G., Migliorino, R., Carbone, G., Davino, G., Dell'Orto, V.G., Perrone, S., Principi, N., Esposito, S., 2023. Biomarkers of Neonatal Sepsis: Where We Are and Where We Are Going. *Antibiotics (Basel)* 12, 1233. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081233>
- Burrin, D., Sangild, P.T., Stoll, B., Thymann, T., Buddington, R., Marini, J., Olutoye, O., Shulman, R.J., 2020. Translational Advances in Pediatric Nutrition and Gastroenterology: New Insights from Pig Models. *Annu Rev Anim Biosci* 8, 321–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115142>
- Butler, J.E., Wertz, N., Sinkora, M., 2017. Antibody Repertoire Development in Swine. *Annu Rev Anim Biosci* 5, 255–279. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022818>
- Cao, X., 2016. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 35–50. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.8>
- Cavaillon, J.-M., Singer, M., Skirecki, T., 2020. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol. Med.* 12, e10128. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810128>
- Chetty, A., Blekhman, R., 2024. Multi-omic approaches for host-microbiome data integration. *Gut Microbes* 16, 2297860. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2297860>
- Clarke, R.C., Gyles, C.L., 1987. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella typhimurium* in ligated intestinal segments of calves, pigs, and rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 48, 504–510.
- Cron, R.Q., Goyal, G., Chatham, W.W., 2023. Cytokine Storm Syndrome. *Annu. Rev. Med.* 74, 321–337. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-112837>
- Darnaud, M., De Vadder, F., Bogeat, P., Boucinha, L., Bulteau, A.-L., Bunescu, A., Couturier, C., Delgado, A., Dugua, H., Elie, C., Mathieu, A., Novotná, T., Ouattara, D.A., Planel, S., Saliou, A., Šrůtková, D., Yansouni, J., Stecher, B., Schwarzer, M., Leulier, F., Tamellini, A., 2021. A standardized gnotobiotic mouse model harboring a minimal 15-member mouse gut microbiota recapitulates SOPF/SPF phenotypes. *Nat. Commun.* 12, 6686. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26963-9>
- Davis, E.C., Dinsmoor, A.M., Wang, M., Donovan, S.M., 2020. Microbiome Composition in Pediatric Populations from Birth to Adolescence: Impact of Diet and Prebiotic and Probiotic Interventions. *Dig. Dis. Sci.* 65, 706–722. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06092-x>
- Davis, S., 2023. Declaration of Helsinki: Can it still serve as a North star for ethics in regulatory trials? *Perspect. Clin. Res.* 14, 1–2. https://doi.org/10.4103/picr.picr_247_22
- De Meyer, A., Meuleman, P., 2024. Preclinical animal models to evaluate therapeutic antiviral antibodies. *Antiviral Res.* 225, 105843. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105843>
- Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L.R., Scaldaferrri, F., 2024. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* 19, 275–293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>

- Domínguez-Oliva, A., Hernández-Ávalos, I., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., Mota-Rojas, D., 2023. The Importance of Animal Models in Biomedical Research: Current Insights and Applications. *Animals (Basel)* 13, 1223. <https://doi.org/10.3390/ani13071223>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., Wang, R.-F., 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front. Immunol.* 13, 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Feldens, L., Souza, J.C.K. de, Fraga, J.C., 2018. There is an association between disease location and gestational age at birth in newborns submitted to surgery due to necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.* 94, 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.06.010>
- Firmal, P., Shah, V.K., Chattopadhyay, S., 2020. Insight Into TLR4-Mediated Immunomodulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Front. Immunol.* 11, 807. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00807>
- Gal-Mor, O., Boyle, E.C., Grassl, G.A., 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* 5, 391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>
- Gauthier, A.E., Rotjan, R.D., Kagan, J.C., 2022. Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature. *Open Biol.* 12, 220146. <https://doi.org/10.1098/rsob.220146>
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., Zhou, R., 2020. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 95–112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>
- Gorman, A., Golovanov, A.P., 2022. Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 180, 289–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
- Grozdanov, L., Zähringer, U., Blum-Oehler, G., Brade, L., Henne, A., Knirel, Y.A., Schombel, U., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., Rietschel, E.T., Dobrindt, U., 2002. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 184, 5912–5925. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5912-5925.2002>
- Gruen, L., 2016. The End of Chimpanzee Research. *Hastings Cent. Rep.* 46. <https://doi.org/10.1002/hast.604>
- Han, J., Aljahdali, N., Zhao, S., Tang, H., Harbottle, H., Hoffmann, M., Frye, J.G., Foley, S.L., 2024. Infection biology of *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus* eesp00012023. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2023>
- Healy, D.B., Ryan, C.A., Ross, R.P., Stanton, C., Dempsey, E.M., 2022. Clinical implications of preterm infant gut microbiome development. *Nat Microbiol* 7, 22–33. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01025-4>

- Herzog, M.K.-M., Cazzaniga, M., Peters, A., Shayya, N., Beldi, L., Hapfelmeier, S., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Frankel, G., Gahan, C.G.M., Hardt, W.-D., 2023. Mouse models for bacterial enteropathogen infections: insights into the role of colonization resistance. *Gut Microbes* 15, 2172667. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2172667>
- Huang, F.-C., 2021. The Interleukins Orchestrate Mucosal Immune Responses to *Salmonella* Infection in the Intestine. *Cells* 10, 3492. <https://doi.org/10.3390/cells10123492>
- Jensen, K., Al-Nakeeb, K., Koza, A., Zeidan, A.A., 2021. Updated Genome Sequence for the Probiotic Bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *Microbiol Resour Announc* 10, e0007821. <https://doi.org/10.1128/MRA.00078-21>
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M., 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51, 270–274. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
- Jung, K., Lee, J.-E., Kim, H.-Z., Kim, H.M., Park, B.S., Hwang, S.-I., Lee, J.-O., Kim, S.C., Koh, G.Y., 2009. Toll-like receptor 4 decoy, TOY, attenuates gram-negative bacterial sepsis. *PLoS One* 4, e7403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007403>
- Karki, R., Kanneganti, T.-D., 2021. The “cytokine storm”: molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Trends Immunol.* 42, 681–705. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.06.001>
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Kennedy, K.M., de Goffau, M.C., Perez-Muñoz, M.E., Arrieta, M.-C., Bäckhed, F., Bork, P., Braun, T., Bushman, F.D., Dore, J., de Vos, W.M., Earl, A.M., Eisen, J.A., Elovitz, M.A., Ganal-Vonarburg, S.C., Gänzle, M.G., Garrett, W.S., Hall, L.J., Hornef, M.W., Huttenhower, C., Konnikova, L., Lebeer, S., Macpherson, A.J., Massey, R.C., McHardy, A.C., Koren, O., Lawley, T.D., Ley, R.E., O’Mahony, L., O’Toole, P.W., Pamer, E.G., Parkhill, J., Raes, J., Rattei, T., Salonen, A., Segal, E., Segata, N., Shanahan, F., Sloboda, D.M., Smith, G.C.S., Sokol, H., Spector, T.D., Surette, M.G., Tannock, G.W., Walker, A.W., Yassour, M., Walter, J., 2023. Questioning the fetal microbiome illustrates pitfalls of low-biomass microbial studies. *Nature* 613, 639–649. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05546-8>
- Kim, H.B., Isaacson, R.E., 2017. *Salmonella* in Swine: Microbiota Interactions. *Annu Rev Anim Biosci* 5, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022834>
- Kovler, M.L., Gonzalez Salazar, A.J., Fulton, W.B., Lu, P., Yamaguchi, Y., Zhou, Q., Sampah, M., Ishiyama, A., Prindle, T., Jr, Wang, S., Jia, H., Wipf, P., Sodhi, C.P., Hackam, D.J., 2021. Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of

- necrotizing enterocolitis. *Sci. Transl. Med.* 13, eabg3459. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg3459>
- Krautkramer, K.A., Fan, J., Bäckhed, F., 2021. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 77–94. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0438-4>
- Kulkarni, T., Majarikar, S., Deshmukh, M., Ananthan, A., Balasubramanian, H., Keil, A., Patole, S., 2022. Probiotic sepsis in preterm neonates-a systematic review. *Eur. J. Pediatr.* 181, 2249–2262. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04452-5>
- Leshem, A., Liwinski, T., Elinav, E., 2020. Immune-Microbiota Interplay and Colonization Resistance in Infection. *Mol. Cell* 78, 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.001>
- Li, D., Wu, M., 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6, 291. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Lunney, J.K., Van Goor, A., Walker, K.E., Hailstock, T., Franklin, J., Dai, C., 2021. Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd5758. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5758>
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>
- Medzhitov, R., 2021. The spectrum of inflammatory responses. *Science* 374, 1070–1075. <https://doi.org/10.1126/science.abi5200>
- Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., Gerds, V., 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 20, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>
- Miniats, O.P., Jol, D., 1978. Gnotobiotic pigs-derivation and rearing. *Can. J. Comp. Med.* 42, 428–437.
- Munir, M.U., Ahmed, A., Usman, M., Salman, S., 2020. Recent Advances in Nanotechnology-Aided Materials in Combating Microbial Resistance and Functioning as Antibiotics Substitutes. *Int. J. Nanomedicine* 15, 7329–7358. <https://doi.org/10.2147/IJN.S265934>
- Nunan, C., 2022. Ending routine farm antibiotic use in Europe. Achieving Responsible Farm Antibiotic Use through Improving Animal Health and Welfare in Pig and Poultry Production.
- Pabst, R., 2020. The pig as a model for immunology research. *Cell Tissue Res.* 380, 287–304. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03206-9>
- Padrell, M., Llorente, M., Amici, F., 2021. Invasive Research on Non-Human Primates-Time to Turn the Page. *Animals (Basel)* 11, 2999. <https://doi.org/10.3390/ani11102999>
- Paudel, Y.N., Angelopoulou, E., Piperi, C., Balasubramanian, V.R.M.T., Othman, I., Shaikh, M.F., 2019. Enlightening the role of high mobility group box 1 (HMGB1) in

- inflammation: Updates on receptor signalling. *Eur. J. Pharmacol.* 858, 172487. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172487>
- Peplow, P.V., 2024. Animal models in medical translation: the grand challenge of developing new treatments for human diseases. *Front Med Technol* 6, 1367521. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2024.1367521>
- Porcari, S., Benech, N., Valles-Colomer, M., Segata, N., Gasbarrini, A., Cammarota, G., Sokol, H., Ianiro, G., 2023. Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic. *Cell Host Microbe* 31, 712–733. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.020>
- Potruch, A., Schwartz, A., Ilan, Y., 2022. The role of bacterial translocation in sepsis: a new target for therapy. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 15, 17562848221094214. <https://doi.org/10.1177/17562848221094214>
- Puschhof, J., Pleguezuelos-Manzano, C., Clevers, H., 2021. Organoids and organs-on-chips: Insights into human gut-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 29, 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.002>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Roberts, R.M., Green, J.A., Schulz, L.C., 2016. The evolution of the placenta. *Reproduction* 152, R179-89. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0325>
- Rogers, A.P., Mileto, S.J., Lyras, D., 2023. Impact of enteric bacterial infections at and beyond the epithelial barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 260–274. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00794-x>
- Rutai, A., Zsikai, B., Tallósy, S.P., Ércses, D., Bizánc, L., Juhász, L., Poles, M.Z., Sóki, J., Baaity, Z., Fejes, R., Varga, G., Földesi, I., Burián, K., Szabó, A., Boros, M., Kaszaki, J., 2022. A Porcine Sepsis Model With Numerical Scoring for Early Prediction of Severity. *Front. Med.* 9, 867796. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.867796>
- Salmon, H., Berri, M., Gerds, V., Meurens, F., 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.007>
- Sampah, M.E.S., Hackam, D.J., 2020. Dysregulated Mucosal Immunity and Associated Pathogenesis in Preterm Neonates. *Front. Immunol.* 11, 899. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00899>

- Scheese, D.J., Sodhi, C.P., Hackam, D.J., 2023. New insights into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis and the dawn of potential therapeutics. *Semin. Pediatr. Surg.* 32, 151309. <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2023.151309>
- Smallets, S., Kendall, M.M., 2021. Post-transcriptional regulation in attaching and effacing pathogens: integration of environmental cues and the impact on gene expression and host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 63, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.08.003>
- Spencer, T.E., Wells, K.D., Lee, K., Telugu, B.P., Hansen, P.J., Bartol, F.F., Blomberg, L., Schook, L.B., Dawson, H., Lunney, J.K., Driver, J.P., Davis, T.A., Donovan, S.M., Dilger, R.N., Saif, L.J., Moeser, A., McGill, J.L., Smith, G., Ireland, J.J., 2022. Future of biomedical, agricultural, and biological systems research using domesticated animals. *Biol. Reprod.* 106, 629–638. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac019>
- Splichal, I., Donovan, S.M., Jenistova, V., Splichalova, I., Salmonova, H., Vlkova, E., Neuzil Bunesova, V., Sinkora, M., Killer, J., Skrivanova, E., Splichalova, A., 2019a. High Mobility Group Box 1 and TLR4 Signaling Pathway in Gnotobiotic Piglets Colonized/Infected with *L. amylovorus*, *L. mucosae*, *E. coli* Nissle 1917 and *S. Typhimurium*. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6294. <https://doi.org/10.3390/ijms20246294>
- Splichal, I., Donovan, S.M., Kindlova, Z., Stranak, Z., Neuzil Bunesova, V., Sinkora, M., Polakova, K., Valaskova, B., Splichalova, A., 2023. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms24032329>
- Splichal, I., Donovan, S.M., Splichalova, Z., Neuzil Bunesova, V., Vlkova, E., Jenistova, V., Killer, J., Svejstil, R., Skrivanova, E., Splichalova, A., 2019b. Colonization of Germ-Free Piglets with Commensal *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus mucosae*, and Probiotic *E. coli* Nissle 1917 and Their Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms* 7, 0273. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080273>
- Splichal, I., Rychlik, I., Splichalova, I., Karasova, D., Splichalova, A., 2020. Toll-Like Receptor 4 Signaling in the Ileum and Colon of Gnotobiotic Piglets Infected with *Salmonella* Typhimurium or Its Isogenic Δ rfa Mutants. *Toxins* 12, 545. <https://doi.org/10.3390/toxins12090545>
- Splichalova, A., Donovan, S.M., Tlaskalova-Hogenova, H., Stranak, Z., Splichalova, Z., Splichal, I., 2021. Monoassociation of Preterm Germ-Free Piglets with *Bifidobacterium animalis* Subsp. *lactis* BB-12 and Its Impact on Infection with *Salmonella* Typhimurium. *Biomedicines* 9, 183. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020183>
- Splichalova, A., Jenistova, V., Splichalova, Z., Splichal, I., 2019a. Colonization of preterm gnotobiotic piglets with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and its interference with *Salmonella* Typhimurium. *Clin. Exp. Immunol.* 195, 381–394. <https://doi.org/10.1111/cei.13236>
- Splichalova, A., Kindlova, Z., Killer, J., Neuzil Bunesova, V., Vlkova, E., Valaskova, B., Pechar, R., Polakova, K., Splichal, I., 2023. Commensal Bacteria Impact on Intestinal

- Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets. *Pathogens* 12, 1293. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111293>
- Splichalova, A., Pechar, R., Killer, J., Splichalova, Z., Bunesova, V.N., Vlkova, E., Salmonova, H.S., Splichal, I., 2020. Colonization of Germ-Free Piglets with Mucinolytic and Non-Mucinolytic *Bifidobacterium boum* Strains Isolated from the Intestine of Wild Boar and Their Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms* 8, 2002. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122002>
- Splichalova, A., Slavikova, V., Splichalova, Z., Splichal, I., 2018. Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets. *Front. Immunol.* 9, 220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00220>
- Splichalova, A., Splichal, I., Sonnenborn, U., Rada, V., 2014. A modified MacConkey agar for selective enumeration of necrotogenic *E. coli* O55 and probiotic *E. coli* Nissle 1917. *J. Microbiol. Methods* 104, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.017>
- Splichalova, A., Splichalova, Z., Karasova, D., Rychlik, I., Trevisi, P., Sinkora, M., Splichal, I., 2019b. Impact of the Lipopolysaccharide Chemotype of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium on Virulence in Gnotobiotic Piglets. *Toxins* 11, 534. <https://doi.org/10.3390/toxins11090534>
- Swain Ewald, H.A., Ewald, P.W., 2018. Natural Selection, The Microbiome, and Public Health. *Yale J. Biol. Med.* 91, 445–455.
- Sykes, M., Sachs, D.H., 2022. Progress in xenotransplantation: overcoming immune barriers. *Nat. Rev. Nephrol.* 18, 745–761. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00624-6>
- Tam, J.S.Y., Collier, J.K., Prestidge, C.A., Bowen, J.M., 2023. Investigation of TLR4 Antagonists for Prevention of Intestinal Inflammation. *Inflammation* 46, 103–114. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01714-0>
- Tissier, H., 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Méd.--Paris.
- Tükel, C., Nishimori, J.H., Wilson, R.P., Winter, M.G., Keestra, A.M., van Putten, J.P.M., Bäumlér, A.J., 2010. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell. Microbiol.* 12, 1495–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01485.x>
- Walker, G.T., Gerner, R.R., Nuccio, S.-P., Raffatellu, M., 2023. Murine Models of *Salmonella* Infection. *Curr Protoc* 3, e824. <https://doi.org/10.1002/cpz1.824>
- Walker, R.W., Clemente, J.C., Peter, I., Loos, R.J.F., 2017. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr. Obes.* 12 Suppl 1, 3–17. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12217>
- Xiao, L., Estellé, J., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Xia, Z., Feng, Q., Liang, S., Pedersen, A.Ø., Kjeldsen, N.J., Liu, C., Maguin, E., Doré, J., Pons, N., Le Chatelier, E., Prifti, E., Li, J., Jia, H., Liu, X., Xu, X., Ehrlich, S.D., Madsen, L., Kristiansen, K., Rogel-

- Gaillard, C., Wang, J., 2016. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat Microbiol* 1, 16161. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.161>
- Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S.B., Xia, Z., Qiu, X., Li, X., Long, H., Zhang, J., Zhang, D., Liu, C., Fang, Z., Chou, J., Glanville, J., Hao, Q., Kotowska, D., Colding, C., Licht, T.R., Wu, D., Yu, J., Sung, J.J.Y., Liang, Q., Li, J., Jia, H., Lan, Z., Tremaroli, V., Dworzynski, P., Nielsen, H.B., Bäckhed, F., Doré, J., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., Lin, J.C., Arumugam, M., Wang, J., Madsen, L., Kristiansen, K., 2015. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat. Biotechnol.* 33, 1103–1108. <https://doi.org/10.1038/nbt.3353>
- Xiao, Y., Zhai, Q., Zhang, H., Chen, W., Hill, C., 2021. Gut Colonization Mechanisms of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*: An Argument for Personalized Designs. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 12, 213–233. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-061120-014739>
- Yang, H., Wang, H., Andersson, U., 2020. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front. Immunol.* 11, 484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00484>
- Yang, S., He, J., Shi, J., Xie, L., Liu, Y., Xiong, Y., Liu, H., 2024. Characteristics of intestinal microbiota in preterm infants and the effects of probiotic supplementation on the microbiota. *Front. Microbiol.* 15, 1339422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1339422>
- Yao, Y., Shang, W., Bao, L., Peng, Z., Wu, C., 2024. Epithelial-immune cell crosstalk for intestinal barrier homeostasis. *Eur. J. Immunol.* e2350631. <https://doi.org/10.1002/eji.202350631>
- Yarci, E., Tayman, C., Ozturk Yarci, D., Cakir, U., Gonel, A., Taskin Turkmenoglu, T., 2021. Inhibition of Interleukin-6 signaling: A novel therapeutic approach to necrotizing enterocolitis. *Int. Immunopharmacol.* 101, 108358. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108358>
- Yin, Y., Wu, X., Zou, H., Li, S., Qin, Z., Zhang, T., Cao, J., 2020. Expressions of Fib, IL-12 in Serum of Neonatal Necrotizing Enterocolitis and Their Correlation with Clinicopathological Features. *Iran. J. Public Health* 49, 1439–1446. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i8.3874>
- Zhang, R., Xu, L., Dong, C., 2022. Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. *Protein Pept. Lett.* 29, 641–650. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220613102145>
- Zheng, Y., Gao, Y., Zhu, W., Bai, X.-G., Qi, J., 2024. Advances in molecular agents targeting toll-like receptor 4 signaling pathways for potential treatment of sepsis. *Eur. J. Med. Chem.* 268, 116300. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116300>
- Zindl, J., Kubes, P., 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* 15, 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>

Zubova, S.V., Grachev, S.V., Prokhorenko, I.R., 2021. Effect of lipopolysaccharide structure on functional response of whole blood cells. *Immunobiology* 226, 152030. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152030>

8 PŘÍLOHY

8.1 PŘÍLOHA 1

Znaky nedonošených selat



Obrázek 15 Znaky nedonošených selat (Splichalova et al., 2018).

A: Selata mají zavřené oči, amniotická membrána je na některých částech těla pevně přichycena.

B: Nedovyvinutý tvar paznehtů, které jsou měkké a zahnuté.

8.2 PŘÍLOHA 2

Článek 1

Splichalova, A., Kindlova, Z., Killer, J., Neuzil Bunesova, V., Vlkova, E., Valaskova, B., Pechar, R., Polakova, K., Splichal, I., 2023. Commensal Bacteria Impact on Intestinal Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets. *Pathogens* 12, 1293. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111293>

8.3 PŘÍLOHA 3

Článek 2

Splichal, I., Donovan, S.M., Kindlova, Z., Stranak, Z., Neuzil Bunesova, V., Sinkora, M., Polakova, K., Valaskova, B., Splichalova, A., 2023. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms24032329>

Article

Commensal Bacteria Impact on Intestinal Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets

Alla Splichalova ¹, Zdislava Kindlova ¹, Jiri Killer ^{2,3}, Vera Neuzil Bunesova ², Eva Vlkova ²,
Barbora Valaskova ¹, Radko Pechar ^{2,4}, Katerina Polakova ¹ and Igor Splichal ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Gnotobiology, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 549 22 Novy Hradek, Czech Republic; splichalova@gnotobio.cz (A.S.); kindlova@gnotobio.cz (Z.K.); valaskova@gnotobio.cz (B.V.); polakova@gnotobio.cz (K.P.)
- ² Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, 165 00 Prague, Czech Republic; killer@iapg.cas.cz (J.K.); bunesova@af.czu.cz (V.N.B.); vlkova@af.czu.cz (E.V.); pecharr@af.czu.cz (R.P.)
- ³ Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic
- ⁴ Department of Research, Food Research Institute Prague, 102 00 Prague, Czech Republic
- * Correspondence: splichal@gnotobio.cz; Tel.: +420-491-418-539; Fax: +420-491-478-264

Abstract: Gnotobiotic (GN) animals with simple and defined microbiota can help to elucidate host-pathogen interferences. Hysterectomy-derived germ-free (GF) minipigs were associated at 4 and 24 h post-hysterectomy with porcine commensal mucinolytic *Bifidobacterium boum* RP36 (RP36) strain or non-mucinolytic strain RP37 (RP37) or at 4 h post-hysterectomy with *Lactobacillus amylovorus* (LA). One-week-old GN minipigs were infected with *Salmonella* Typhimurium LT2 strain (LT2). We monitored histological changes in the ileum, mRNA expression of Toll-like receptors (TLRs) 2, 4, and 9 and their related molecules lipopolysaccharide-binding protein (LBP), coreceptors MD-2 and CD14, adaptor proteins MyD88 and TRIF, and receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the ileum and colon. LT2 significantly induced expression of TLR2, TLR4, MyD88, LBP, MD-2, and CD14 in the ileum and TLR4, MyD88, TRIF, LBP, and CD14 in the colon. The LT2 infection also significantly increased plasmatic levels of inflammatory markers interleukin (IL)-6 and IL-12/23p40. The previous colonization with RP37 alleviated damage of the ileum caused by the *Salmonella* infection, and RP37 and LA downregulated plasmatic levels of IL-6. A defined oligo-microbiota composed of bacterial species with selected properties should probably be more effective in downregulating inflammatory response than single bacteria.

Keywords: *Bifidobacterium*; cytokines; gnotobiotic minipig; *Lactobacillus*; lipopolysaccharide; *Salmonella* Typhimurium; Toll-like receptor



Citation: Splichalova, A.; Kindlova, Z.; Killer, J.; Neuzil Bunesova, V.; Vlkova, E.; Valaskova, B.; Pechar, R.; Polakova, K.; Splichal, I. Commensal Bacteria Impact on Intestinal Toll-like Receptor Signaling in *Salmonella*-Challenged Gnotobiotic Piglets. *Pathogens* **2023**, *12*, 1293. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111293>

Academic Editors: Ming Z. Fan and Lawrence S. Young

Received: 11 September 2023

Revised: 12 October 2023

Accepted: 26 October 2023

Published: 29 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

1.1. *Pathogen- and Damage-Associated Molecular Patterns*

Inflammation is a protective reaction to keep homeostasis and organ integrity [1]. The inflammatory process is triggered by recognizing molecular patterns via pattern recognition receptors (PRRs) [2]. These molecular patterns are divided into pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) [3,4]. PAMPs are foreign (extrinsic) molecular structures typical for microorganisms [3], but DAMPs are host (intrinsic) body structures [5,6]. DAMPs are generally hidden from immune recognition but become available after their release by tissue damage or by secretion [4,6].

Toll-like receptors (TLRs) are one group of PRRs that sense PAMPs and DAMPs. They recognize PAMPs as hetero- or homodimers, e.g., bacterial PAMPs—TLR2/TLR1 (triacyl lipopeptide), TLR2/6 (diacyl lipopeptide), TLR4/TLR4 (lipopolysaccharide), TLR5/TLR5 (flagellin), and TLR9/TLR9 (CpG motif) [7,8]. However, the repertoire of each TLR is not limited to one PAMP but usually covers a broader panel of PAMPs [8,9]. Moreover,

TLRs also recognize DAMPs, e.g., uric acid, the myosin heavy chain, SAP130 and S100 proteins, ATP, nucleic acids including mitochondrial DNA, and intracellular nuclear DNA-binding protein high mobility group box 1 (HMGB1) [10]. HMGB1 extracellular presence is sensed with a receptor for advanced glycation end (RAGE), TLR2, TLR4, TLR9, and other receptors [11]. This TLR overlapping [12] explains the similarity in consequences of sepsis and sterile inflammation [13] that are triggered by the recognition of PAMPs or DAMPs, respectively [4,9,14].

Lipopolysaccharide (LPS) is a Gram-negative bacteria cell wall component released from bacterial cells after their death and destruction [15,16]. It is a central molecule of Gram-negative bacteria-caused sepsis [17], triggering the unregulated release of inflammatory mediators called the “cytokine storm” that provokes multiorgan failure, often resulting in the host’s death [18]. TLR4 is an essential TLR for LPS [7]. The released LPS is initially trapped and cumulated by lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and presented to the CD14 molecule [15,16]. CD14 transports LPS to the TLR4/MD-2 complex, which recognizes it and triggers the downstream cascade and production of inflammatory cytokines [1]. Cytokines participate at their physiological levels in homeostasis [19], but their exaggerated levels harm the organism [1].

1.2. Colonization of the Newborn Intestinal Tract and *Salmonella Typhimurium*

Newborn infants are settled with primary microbiota dependent on their delivery [20]. *Lactobacillus* spp. predominate in the vaginal microbiome. Thus, lactobacilli belong among the first colonizers of the newborn intestine in vaginally-born infants [21]. They co-form conditions, e.g., consume oxygen and reduce pH, that are suitable for settlement of their followers, e.g., obligatory anaerobic *Bifidobacterium* spp. that are the principal inhabitants of an infant’s intestine [20,22]. The stable colonization, the creation of a balanced microbiota, and its persistence in the intestine are prerequisites for the beneficial effects of commensal bacteria on host health [23]. Both bifidobacteria and lactobacilli are the main components of multi-strain probiotic preparations [23–25]. On the contrary, dysbiosis contributes to decreased host colonization resistance and facilitates diarrheagenic diseases [26,27].

Around 40% of all diarrheal disease-associated deaths are attributed to *Salmonella* [28]. The genus *Salmonellae* consists of around 2500 serovars that are human and animal orally acquired pathogens [29,30]. *Salmonella enterica* (*S. enterica*) serovars can cause, in dependence on a host and *Salmonella* serovar, four major syndromes: enteric fever (typhoid), enterocolitis/diarrhea, bacteremia, and chronic asymptomatic carriage [31]. The serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) causes self-limiting enterocolitis in formerly healthy immunocompetent individuals [32]. However, in risk subjects, e.g., children < 1 year of age and HIV-infected persons, the infection can cause life-threatening disease with more severe progress [33,34].

1.3. Pig Translational Model

The pig shows close similarities to humans in genetics, physiology, anatomy, and microbiome [35–37]. This predetermines pigs as animal models in many areas of biomedical research, including gastroenterology [38,39], immunology [40,41], and infectious diseases [42]. Moreover, the pig has epitheliochorial placentation [43] that prevents the prenatal transfer of protective immunoglobulins from the mother to the fetus, unlike in humans [44]. A newborn piglet obtains protective immunoglobulins and immunocytes through colostrum intake after birth [45]. The fact that mammalian fetuses develop in sterile conditions of the uterus [46–48] allows deriving sterile (germ-free; GF) animals [49,50] for the study of microbiota-host interactions in microbiologically-controlled (gnotobiotic; GN) conditions [47,51]. Surgically derived GF piglets show less colonization resistance than conventional (CV) ones [52,53]. This results in the higher sensitivity of the GF animals to enteric infections [54]. Therefore, GF piglets are used for in vivo studies of host and microbiota relationships, including the importance of bacterial virulence factors [52,53].

This work aimed to describe how pig commensal bacteria—mucinolytic *Bifidobacterium boum* RP36, non-mucinolytic *Bifidobacterium boum* RP37, and *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698^T interfere with *Salmonella* Typhimurium LT2 in GN piglets. The modulatory properties of the bacteria were evaluated using TLR2, TLR4, TLR9, and RAGE mRNA expression, leading to the release of inflammatory cytokines IL-6 and IL-12/23p40.

2. Materials and Methods

2.1. Gnotobiotic Minipigs

Germ-free (GF) minipigs (Animal Research Institute, Kostelec nad Orlici, Czechia) were derived through hysterectomy on the 112th day of gestation, a full term for these pigs. The piglets were reared in fiberglass isolators with a heated floor and fed through a nipple with cow's milk-based formula 6–7 times per day, and their microbiological state was tested as described elsewhere [55].

2.2. Bacterial Cultures

Pig commensal mucinolytic *B. boum* strain RP36 (*B. boum* RP36 or RP36), non-mucinolytic *B. boum* strain RP37 (*B. boum* RP37 or RP37) [56,57], *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698^T (LA) [58], and *Salmonella* Typhimurium LT2 (*S. Typhimurium* or LT2) [59,60] were used in the present experiments. *B. boum* strains, *L. amylovorus*, and *S. Typhimurium* were cultivated as previously described [57,61].

2.3. Experimental Design

Forty-eight GN minipigs from three independent hysterectomies were divided into eight groups containing six minipigs per group (Figure 1): (i) GF during the whole experiment (GF); (ii) challenged with 6 log *S. Typhimurium* LT2 CFU (LT2); (iii) repeatedly associated with 8 log *B. boum* RP36 CFU (RP36); (iv) RP36 challenged with 6 log LT2 CFU (RP36+LT2); (v) repeatedly associated with 8 log *B. boum* RP37 CFU (RP37); (vi) RP37 challenged with 6 log LT2 CFU (RP37+LT2); (vii) associated with 8 log *L. amylovorus* CFU (LA); and (viii) LA challenged with 6 log LT2 CFU (LA+LT2). Bacterial suspensions were applied per os in 5 mL of milk diet; GF piglets obtained the milk only. The groups LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2 were challenged with LT2 for 24 h. The isoflurane-anesthetized GN minipigs were exsanguinated via cardiac puncture, and required tissue samples were collected.

2.4. Clinical Signs

The minipigs were examined for signs of enterocolitis (fever, anorexia, sleepiness, and diarrhea) at each feeding by staff.

2.5. Histological Evaluation

The terminal ileum was fixed in Carnoy's fluid for 30 min, dehydrated, and embedded in paraffin. Hematoxylin-eosin stained 5 µm cross-sections were examined under an Olympus BX 40 microscope with an Olympus Camedia C-2000 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). Ten measurements for each parameter were taken per minipig to appraise ileal villus length and crypt depth. Histological scoring was evaluated as previously described [61]: (i) submucosal edema (0–2); (ii) infiltration of polymorphonuclear neutrophils into the lamina propria (0–2); (iii) villus atrophy (0–3); (iv) exudate in lumen (0–2); (v) vessel dilatation (0–2); (vi) inflammatory cellularity in lymphatic vessel lumen (0–2); (vii) hyperemia (0–2); (viii) peritonitis (0–1), and (ix) erosion of the epithelial layer (0–3). The total score could reach 0–19 points [62].

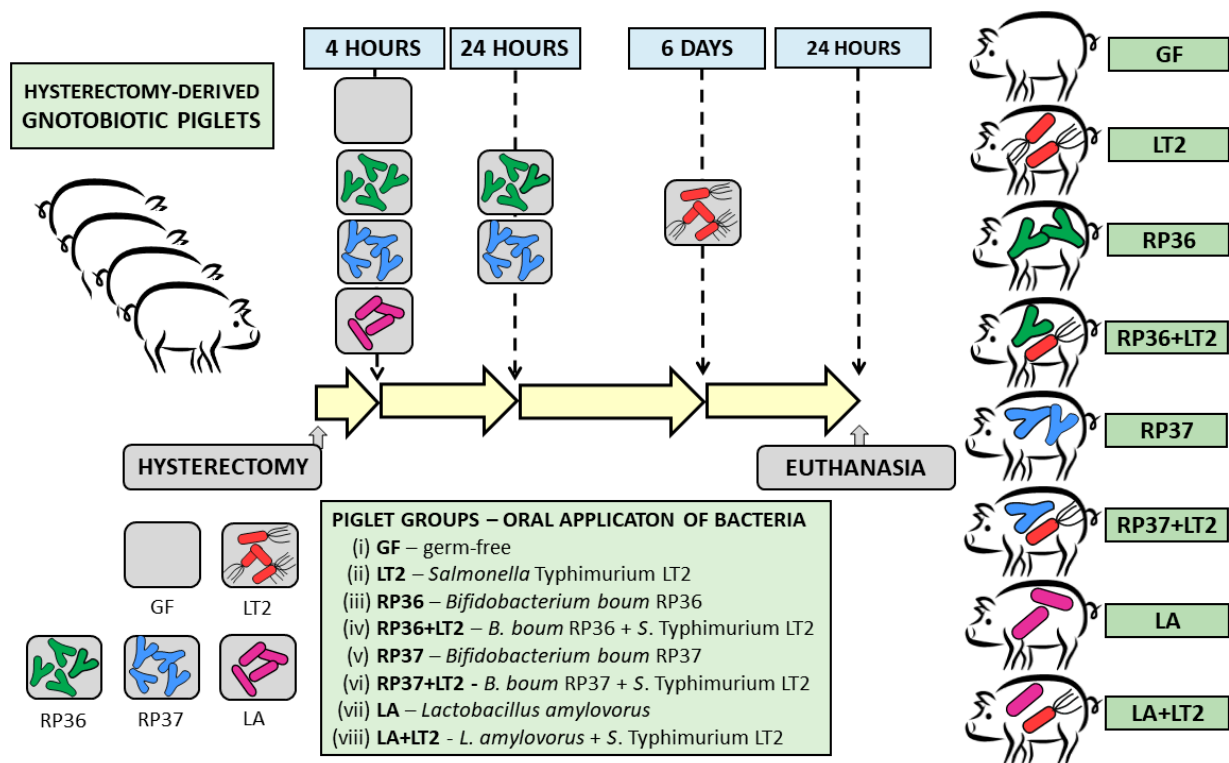


Figure 1. Schema of the experiment. The GN minipigs (n = 48) were divided into eight groups with six piglets per group: (i) GF; (ii) infected with LT2 (LT2); (iii) associated with RP36 (RP36); (iv) RP36 challenged with LT2 (RP36+LT2); (v) associated with RP37 (RP37); (vi) RP37 challenged with LT2 (RP37+LT2); (vii) associated with LA (LA); (viii) LA challenged with LT2 (LA+LT2).

2.6. Blood Plasma

Blood plasma was obtained via centrifugation from cooled citrated blood [57]. Protease inhibitors (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were added to plasma samples and then stored at -45°C until following the processing.

2.7. Total RNA Extraction and cDNA Synthesis

Cross-sections of the terminal ileum and transverse colon were cut and stored in RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at -20°C until further homogenization with 2 mm zirconia beads (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) in TissueLyser LT beadbeater (Qiagen, Hilden, Germany) and extraction with an RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen). cDNA synthesis was performed from 500 ng of total RNA with a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), [55]. Eighty μL of PCR quality water (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was added to the synthesized cDNA. These cDNA templates were stored at -25°C until Real-Time PCR.

2.8. Real-Time PCR

Two μL of the cDNA template was used to perform lock nucleic acid (LNA) probe (Universal ProbeLibrary; Roche Diagnostics)-based Real-Time PCR with β -actin and cyclophilin A as reference genes. The PCR amplification was performed on an iQ cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and relative TLR4, MD-2, CD14, LBP, MyD88, TRIF, TLR2, TLR9, and RAGE mRNA expressions (fold changes) were counted using GenEx 6 software (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden) [55].

2.9. IL-6 and IL-12/23p40 in Blood Plasma

A Porcine ProcartaPlex kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) based on paramagnetic beads Luminex xMAP technology (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) was used

to measure IL-12/23p40 and IL-6 in plasma on a Bio-Plex Multi Array System with Bio-Plex Manager 4.01 software (Bio-Rad, Hercules, TX, USA) and evaluated as previously described [61].

2.10. Statistical Analysis

Values of all groups were checked for normality of their distribution and outliers. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post-hoc test was used for the statistical comparisons at $p < 0.05$ and evaluated with GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A letter system was used to depict the significance of group differences in graphs.

3. Results

3.1. Clinical Signs of Infection

All non-infected minipigs thrived for the whole experiment or until the challenge with *S. Typhimurium*. In contrast, clinical signs of enteric infection, such as fever, anorexia, sleepiness, and diarrhea, were observed in all infected minipigs (LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2) beginning 2–4 h after infection. Previous association with RP37 mildly delayed the manifestation of the infection. This was not observed in the previous association with RP36 and LA.

3.2. Histological Assessment of the Terminal Ileum

The evaluation of hematoxylin-eosin stained ileum of non-infected GF, RP36, RP37, and LA minipigs was performed only because villi of the infected LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2 minipigs were damaged and did not allow evaluation (Figure 2). No statistical differences ($p < 0.05$) in the villus height, crypt depth, and ratio of villus height/crypt depth were found among groups of non-infected GN minipigs (Table 1).

Table 1. Villus height, crypt depth, and ratio of villus height/crypt depth in the terminal ileum of the GN minipigs. These characteristics in the terminal ileum in the non-infected minipigs (GF, RP36, RP37, and LA) were evaluated using ANOVA with Tukey's post-hoc test and presented as mean \pm SD. The values from six minipigs per group were compared ($p < 0.05$).

	GF	RP36	RL37	LA
Villus height (μm)	704.9 \pm 76.2	614.2 \pm 71.4	614.8 \pm 40.1	635.9 \pm 56.5
Crypt depth (μm)	74.7 \pm 3.8	77.2 \pm 7.8	78.7 \pm 4.3	77.2 \pm 6.1
Height/Depth (ratio)	9.1 \pm 2.1	8.2 \pm 1.6	6.9 \pm 0.8	8.0 \pm 1.3

The ileum of the non-infected minipigs (GF, RP36, RP37, and LA) contained villi with vacuolated enterocytes that were located along the whole length of the villus from the top of crypts to the villus tips (Figure 2A–D). Because no obvious inflammatory signs or damage were observed in these minipigs, they are not included in the histological assessment depicted as the histological score graph (Figure 2I). In contrast, the ileum in the *Salmonella*-infected minipigs (LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2; Figure 2E–H) showed signs of acute inflammation and are summarized on the histological score graph (Figure 2I). The total histological score of the *Salmonella*-infected minipigs ranged between six and nine, with the lowest value in the RP37+LT2 and the highest in the LA+LT2 minipigs.

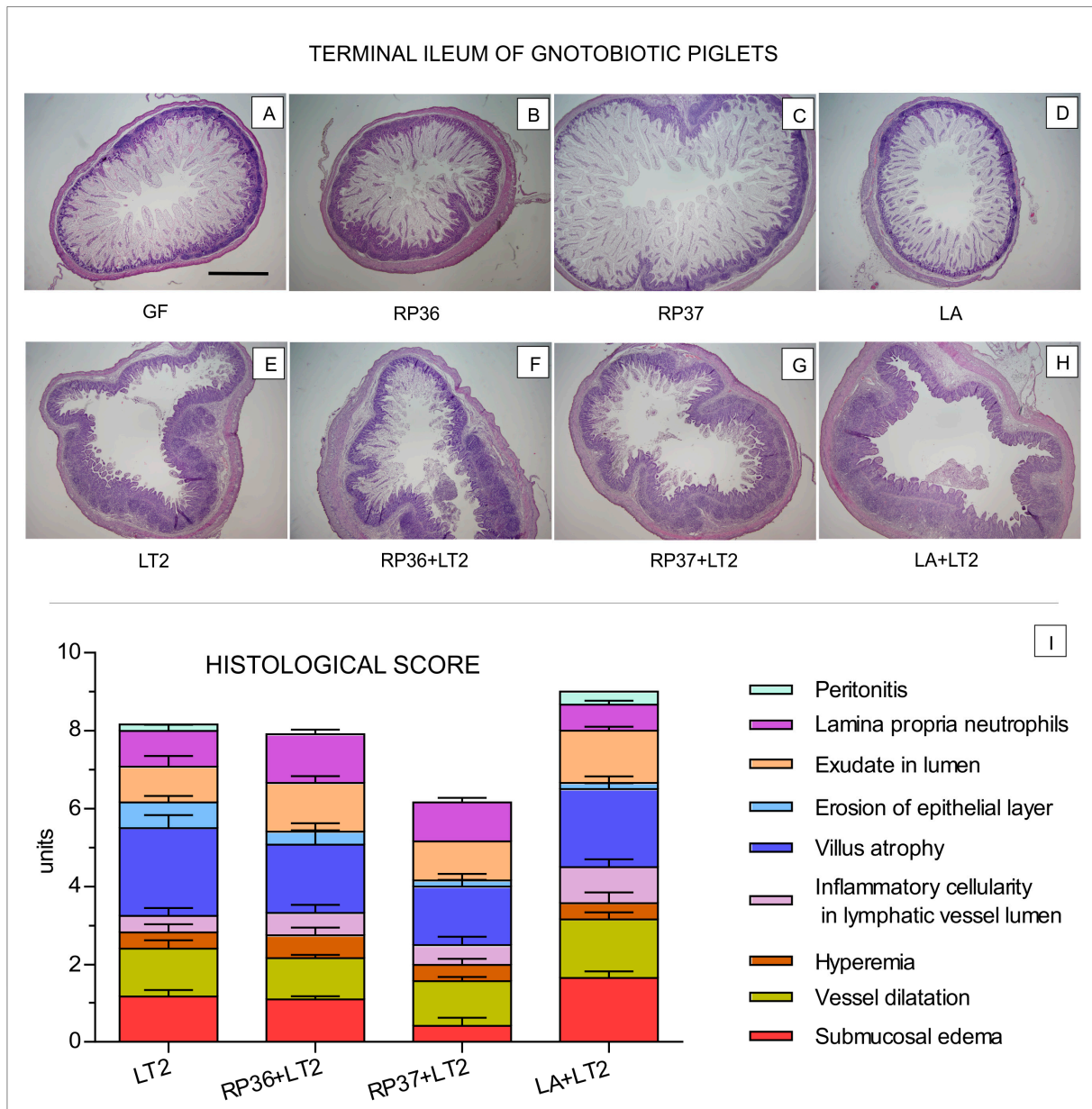


Figure 2. Representative hematoxylin-eosin stained terminal ileum cross sections in the GN minipigs and a histological score. The GN minipigs were divided into eight groups with six minipigs per group: (i) GF ((A), GF); (ii) associated with RP36 ((B), RP36); (iii) associated with RP37 ((C), RP37); (iv) associated with LA ((D), LA); (v) infected with LT2 ((E), LT2); RP36 challenged with LT2 ((F), RP36+LT2); RP37 challenged with LT2 ((G), RP37+LT2); and LA challenged with LT2 ((H), LA+LT2). The depicted bar on the cross-section (A) represents 1 mm. Histological score of six minipigs of four *Salmonella*-challenged minipig groups (LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2) are shown (I).

3.3. Toll-like Receptors, Their Related Molecules, and RAGE mRNA Expression in the Ileum

TLR4 mRNA expression was induced in the LT2-infected minipig groups (LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2) compared to *Salmonella*-free (GF, RP36, RP37, and LA) groups (Figure 3A), but this increase was significant in the LT2 and LA+LT2 groups only. The preliminary one-week association with *B. boum* strains RP36 or RP37 prevented significant induction of TLR4 mRNA in the ileum of the RP36+LT2 and RP37+LT2 minipig groups. In contrast to both *B. boum* strains, *L. amylovorus* (LA+LT2) did not show this effect. The infection

with LT2 significantly upregulated MD-2 mRNA expression (Figure 2B). The previous associations with RP36 (RP36+LT2) and LA (LA+LT2) downregulated MD-2 expression, but this downregulation was insignificant. The infection with *Salmonella* downregulated the mRNA expression of TLR4 coreceptor CD14 (Figure 3C). However, this downregulation was not statistically significant. LBP mRNA expression was induced in all cases of the *Salmonella*-infected minipigs (Figure 3D). Neither *B. boum* nor *L. amyovororus* ameliorated this induction. TLR2 mRNA expression was induced in the *Salmonella* infection, but previous association with mucinolytic *B. boum* RP36 prevented statistically significant induction of TLR2 mRNA (Figure 3E). In contrast, no influence of commensal bacteria on mRNA expression was shown in TLR9 (Figure 3F). The infection with *Salmonella* statistically significantly induced adaptor protein MyD88 mRNA, but this induction was significantly lower for previous association with either RP36 or RP37 *B. boum* strains (Figure 3G). Non-infected minipigs versus their infected counterparts (GF vs. LT2, RP36 vs. RP36+LT2, RP37 vs. RP37+LT2, and LA vs. LA+LT2) showed increased expression of TRIF mRNA (Figure 3H) and RAGE mRNA (Figure 3I) after infection with *Salmonella*. However, neither in the case of TRIF nor RAGE was this lowering statistically significant.

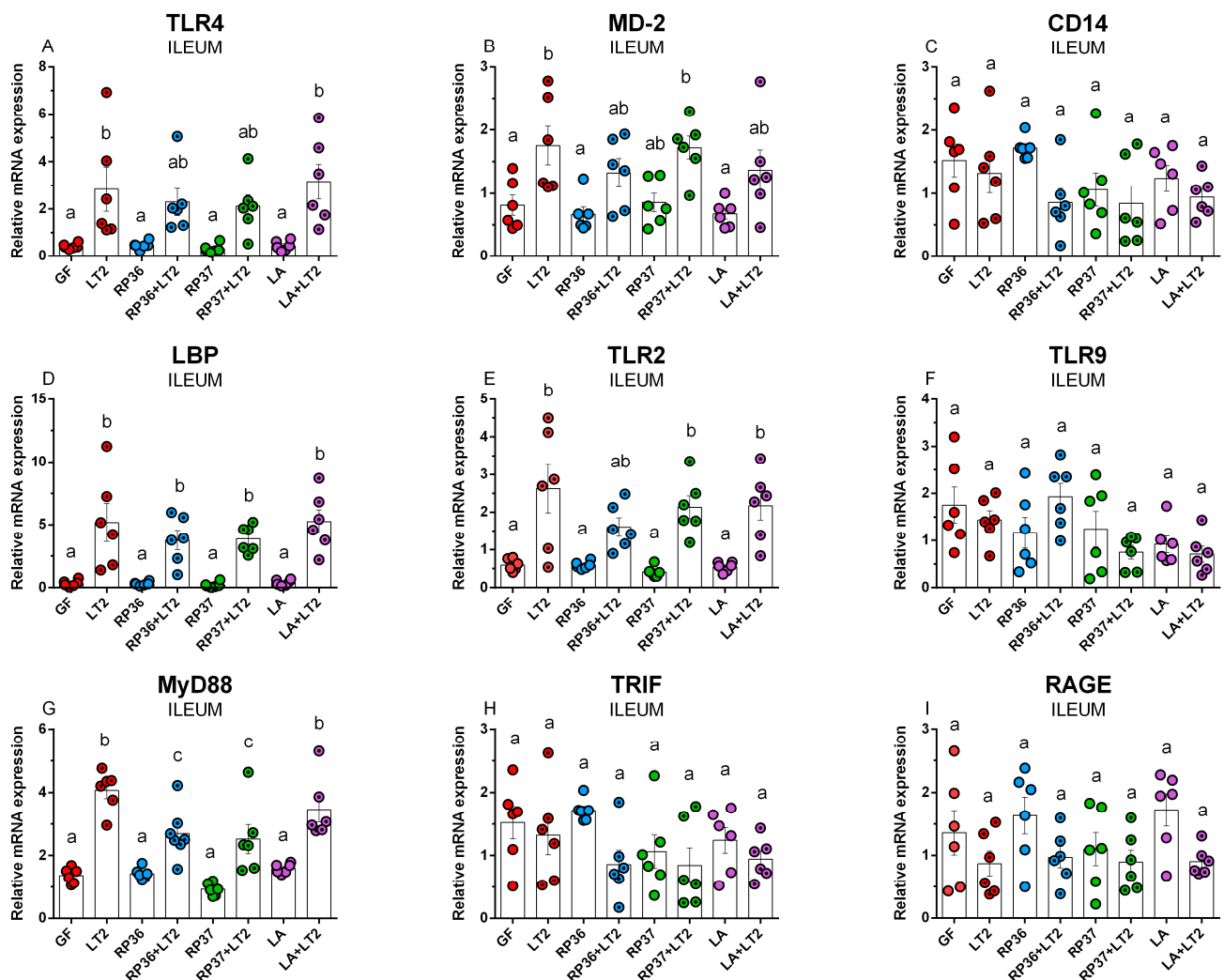


Figure 3. Expression of TLR4 (A), MD-2 (B), CD14 (C), LBP (D), TLR2 (E), TLR9 (F), MyD88 (G), TRIF (H), and RAGE (I) in the ileum of the GN minipigs: (i) GF, (ii) infected with LT2 (LT2), (iii) associated with RP36 (RP36), (iv) associated with RP36 and challenged with LT2 (RP36+LT2),

(v) associated with RP37 (RP37), (vi) associated with RP37 and challenged with LT2 (RP37+LT2), (vii) associated with LA (LA), and (viii) associated with LA and challenged with LT2 (LA+LT2). The values are presented as individual dots indicating mean \pm SEM. Statistical differences were evaluated using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, and $p < 0.05$ is denoted with different letters above the columns. Six samples in each group were analyzed.

3.4. Toll-like Receptors, Their Related Molecules, and RAGE mRNA Expression in the Colon

The infection with *Salmonella* upregulated statistically significantly TLR4 mRNA expression in all *Salmonella*-challenged minipigs (LT2, RP36+LT2, RP37+LT2, and LA+LT2) compared to non-challenged ones (GF, RP36, RP37, and LA) (Figure 4A). No statistically significant differences among infected and non-infected minipig groups were found. In contrast, no differences in MD-2 expression were found among all minipig groups (Figure 4B). TLR4 coreceptor CD14 mRNA expression faithfully copied TLR4 mRNA expression and showed upregulated expression after infection with *Salmonella* without any influence of previous association with commensal bacteria (Figure 4C). A concordant infection-stimulated upregulation without the influence of previous association was shown also in LBP mRNA expression (Figure 4D). TLR2 mRNA was statistically significantly upregulated in *Salmonella*-infected LT2 minipigs compared to the GF group (Figure 4E). Previous association with RP36, RP37, or LA ameliorated this upregulation, and these infected groups did not statistically differ from either the GF or LT2 groups. The association with both *B. boum* strains resulted in nonsignificant differences among them, the GF, and the LT2 groups. Association with only LA did not influence the TLR2 mRNA expression comparable to the GF one. Neither association nor infection significantly influenced the expression of TLR9 mRNA, which was comparable in all groups (Figure 4F). The infection with *Salmonella* upregulated MyD88 mRNA expression. However, significant differences were found among the infected LT2, RP37+LT2, and LA+LT2 groups and non-infected RP36, RP37, and LA only groups (Figure 4G). TRIF mRNA showed a downregulated trend after infection with *Salmonella*, and significant downregulation was shown in all *Salmonella*-infected minipig groups compared to the GF group (Figure 4H). RAGE mRNA expression did not show significant regulation influenced by association with commensal bacteria or infection with *Salmonella* (Figure 4I).

3.5. IL-6 and IL-12/23p40 Levels in Plasma

The GF minipigs colonized with pig commensal bacteria (RP36, RP37, and LA) showed comparable levels of IL-6 (Figure 5A). The infection with *S. Typhimurium* significantly increased plasmatic IL-6 levels. The previous association with RP37 (RP37+LT2) and LA (LA+LT2) significantly downregulated IL-6 levels compared to the LT2 group. In the case of IL12/23p40 (Figure 5B), the infection with *S. Typhimurium* also, as in the case of IL-6, significantly increased plasmatic IL-12/23p40 levels. The previous association with pig commensal bacteria (RP36, RP37, and LA) did not influence this increase.

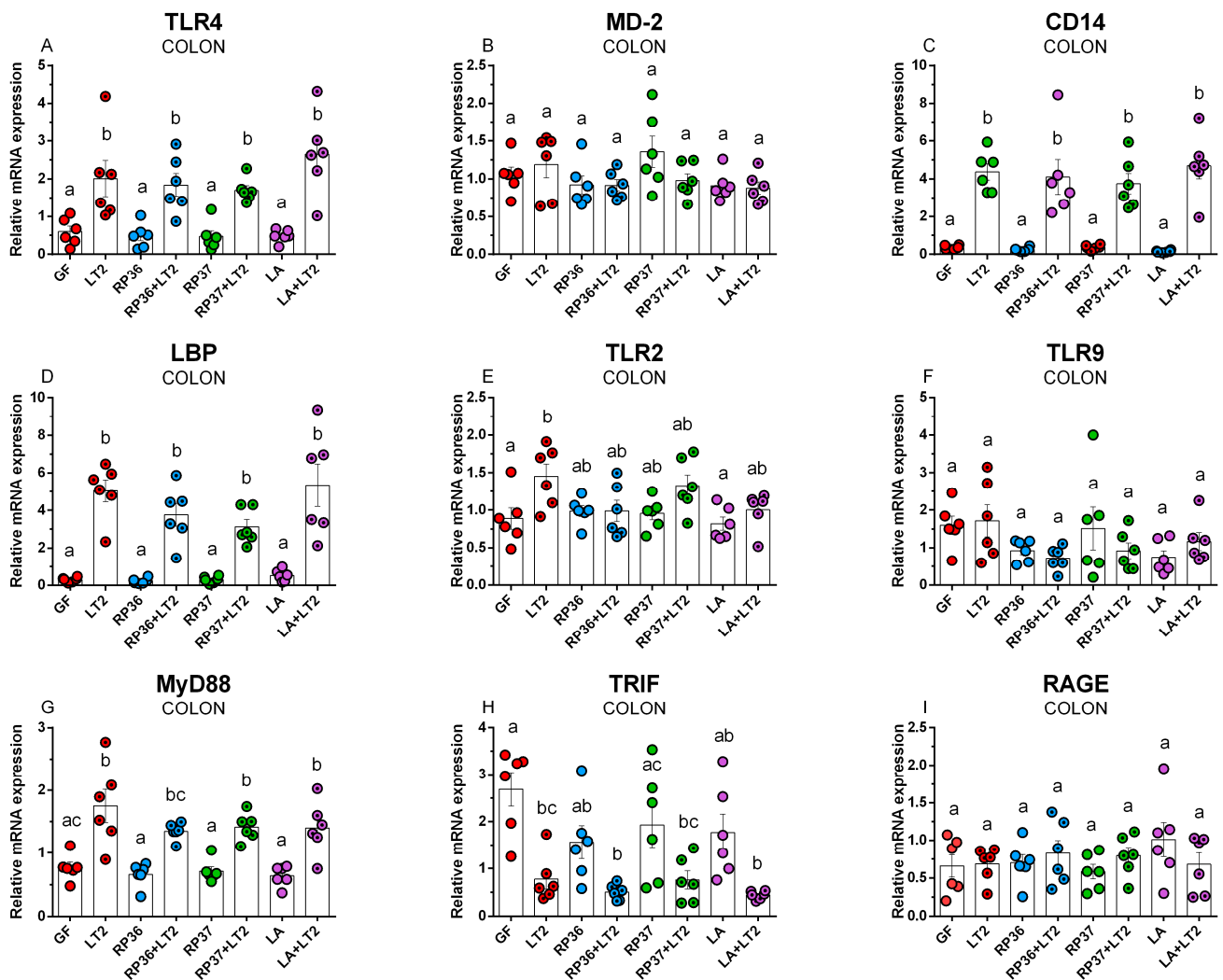


Figure 4. Expression of TLR4 (A), MD-2 (B), CD14 (C), LBP (D), TLR2 (E), TLR9 (F), MyD88 (G), TRIF (H), and RAGE (I) in the colon of the GN minipigs: (i) GF, (ii) infected with LT2 (LT2), (iii) associated with RP36 (RP36), (iv) associated with RP36 and challenged with LT2 (RP36+LT2), (v) associated with RP37 (RP37), (vi) associated with RP37 and challenged with LT2 (RP37+LT2), (vii) associated with LA (LA), and (viii) associated with LA and challenged with LT2 (LA+LT2). The values are presented as individual dots indicating mean \pm SEM. Statistical differences were evaluated using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, and $p < 0.05$ is denoted with different letters above the columns. Six samples in each group were analyzed.

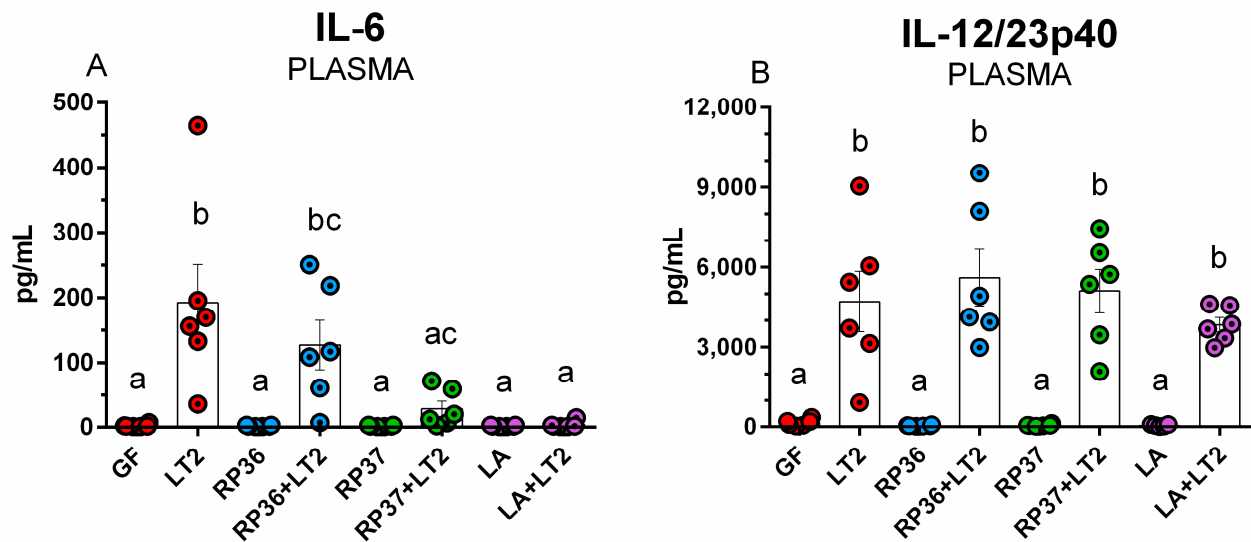


Figure 5. Plasmatic levels of IL-6 (A) and IL-12/23p40 (B) in the GN minipigs: (i) GF, (ii) infected with LT2 (LT2), (iii) associated with RP36 (RP36), (iv) associated with RP36 and challenged with LT2 (RP36+LT2), (v) associated with RP37 (RP37), (vi) associated with RP37 and challenged with LT2 (RP37+LT2), (vii) associated with LA (LA), and (viii) associated with LA and challenged with LT2 (LA+LT2). The values are presented as individual dots indicating mean \pm SEM. Statistical differences were evaluated using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, and $p < 0.05$ is denoted with different letters above the columns. Six samples in each group were analyzed.

4. Discussion

Both lactobacilli and bifidobacteria are the most common components of single- or multi-strain probiotic preparations [23–25]. TLR2 is recognized as a pivotal TLR for peptidoglycan, lipopeptides, and lipoproteins of Gram-positive bacteria, mycoplasma lipopeptides, or fungal zymosan and β -glucan. The primary TLR4 ligand of Gram-negative bacteria is lipopolysaccharide (LPS) [7]. However, the possible strict recognition of Gram-positive and Gram-negative bacteria by TLR2 and TLR4, respectively, is more complicated, as we discuss later.

S. Typhimurium-caused enterocolitis is most severe in the terminal ileum and proximal colon, and neutrophil recruitment to the intestinal epithelium is the hallmark of this enteric disease [31,63]. Hematoxylin-eosin staining of terminal ileum cross sections showed that the absence of bacteria in the GF minipigs or association with pig commensal bacteria in the RP36, RP37, and LA groups did not influence intestinal histology, and villi contained vacuolated enterocytes that were typical for newborn piglets [64,65]. The association with microbiota stimulated the disappearance of vacuoles [66]. The terminal ileum is the main site of *Salmonella* detrimental attack and translocation [67,68]. Thus, we targeted our attention to the histological structure of the ileum.

The infection with *Salmonella* roughly disrupted intestinal architecture; the villi containing vacuolated enterocytes were shortened, and most vacuoles disappeared. A degree of damage was assessed with the histological scoring established for preterm [62] and term GN minipigs [61]. The previous association with these pig commensal bacteria did not prevent the damage of the mucosa and is comparable with the association of GN minipigs with our formerly isolated pig commensal *Lactobacillus mucosae* P5 and *L. amylovorus* P1 [61]. Any intestinal barrier damage facilitates translocation [67]. The mono-association with all these pig-derived bifidobacteria and lactobacilli showed no or lower protective effect against intestinal damage than association with probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) [69], which showed a substantial protective effect [61].

We attempted to regulate TLR4/MD-2 signaling and the consequent production of inflammatory cytokines (here represented by IL-6 and IL-12/23p40) in GN minipigs using

pig commensal bacteria *B. boum* strains RP36 and RP37 [57] and LA [70]. Our attention was focused on indigenous *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. as essential species of primary microbiota [20,21].

The expressions of TLR4, MD-2, and LBP mRNA in the ileum of the GN minipigs were significantly induced in the presence of *S. Typhimurium*, but in these cases, the pig commensal bacteria were not changed compared to the GF control. In contrast, CD14 mRNA expression in the ileum was not related to the *Salmonella* presence. A possible explanation is that CD14 is not specific for the discrimination of LPS, but also recognizes other structures in relation to TLR2 [71,72]. These findings agree with our previous results in preterm minipigs colonized with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG [62,73] and *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 [74,75]. A similar situation was found in the ileum of GN minipigs colonized with pig commensal lactobacilli *L. amylovorus* P1 and *L. mucosae* P5 but not with probiotic *E. coli* Nissle 1917 [76]. This probiotic EcN was effective in preventing infant and toddler acute diarrhea [77,78] and acute diarrhea in *S. Typhimurium*-infected GN minipigs [79]. One reason for the high effectivity of EcN could be its rough chemotype LPS (R-LPS) [80]. GN minipigs colonized with R-LPS *S. Typhimurium* F98 or *S. Typhimurium* SF1591 were resistant to subsequent infection with virulent *S. Infantis* 1326/28 [81,82] or *S. Typhimurium* LT2 [83], respectively. *S. Typhimurium* LT2 is avirulent for one-week-old CV piglets [53], which are protected by complex microbiota mediating their colonization resistance [26,27]. In contrast, *S. Typhimurium* LT2 is lethal for their GF counterparts with low colonization resistance [52]. Prepared Δrfa LT2 mutants with R-LPS were less competent in triggering the TLR4-signaling and inducing inflammatory cytokines so that they did not exceed their beneficial regulatory range in the protective inflammatory reaction. In contrast, wild-type LT2 induced excessive levels of inflammatory cytokines that were detrimental to GN minipigs [52,84].

TLRs are multiligand receptors [5,7]. Thus, various ligands can influence their up-regulation such as, e.g., HMGB1, which is the ligand of all observed TLRs (2, 4, and 9) in our experiments. HMGB1 can be released in tissue damage and can reflect the severity of sepsis [85], e.g., the destruction of ileal villi in *Salmonella*-infected minipigs [61,74], and released HMGB1 can emphasize an inflammatory reaction through its cytokine activity [86]. Moreover, an HMGB1-LPS complex can present LPS for TLR4/MD-2 recognition [87] and amplify an inflammatory reaction.

TLR2 recognizes Gram-positive bacterial structures in the heterodimers TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 [7]. TLR2 was not induced with pig commensal RP36, RP37, and LA compared to the GF minipigs, but its mRNA expression in the ileum was upregulated by *Salmonella* concordantly with TLR4. TLR2 can also participate in the recognition of Gram-negative structures. The TLR2/TLR1 heterodimer recognizes curli amyloid fibrils of Gram-negative *S. Typhimurium* biofilm [71]. This should explain the similar expression of TLR2 and TLR4 in the presence of *Salmonella*. In contrast to TLR2 and TLR4, TLR9 mRNA expression was not modulated in the presence of pig commensal bacteria or *S. Typhimurium* compared to the GF counterparts. Similarly to our results, TL2 and TLR4 mRNA expression in the ileum was upregulated in CV pigs 24 h after infection with *S. Typhimurium*, but TLR9 mRNA expression was not influenced [88].

Various TLRs use MyD88 or TRIF adaptor proteins. TLR2 and TLR9 use MyD88 adaptor protein for downstream signaling, but TLR4 can use both adaptor proteins in MyD88-dependent and TRIF-dependent pathways according to the type of ligand and localization of the TLR4 on the cellular membrane or in the endosome [88]. MyD88 mRNA expression showed a similar trend to TLR2 and TLR4 mRNA expression with upregulation in the presence of *Salmonella*, but TRIF mRNA did not show any apparent trend. Thus, we suppose the primary TLR4 signaling was through the MyD88-dependent pathway. The presence of bacteria did not influence RAGE mRNA expression. However, RAGE is a multiligand receptor capable of binding to a broad range of structurally diverse ligands expressed on various cell types and participating in various physiological functions and

pathological processes. Moreover, cleaved RAGE can occur in two forms of soluble RAGE and can act as a decoy receptor and regulate downstream signaling [89].

The colon is the site of the densest bacterial population of the GIT [90,91], and *Salmonella* occurrence is abundant [57,68]. The *Salmonella* CFU density was found one order higher in the colon compared to the ileum in CV piglets at 2 days post-infection [92]. A similar colon/ileum CFU ratio was found in *Salmonella*-infected GN minipigs [61]. The *Salmonella* infection upregulated LBP, CD14, TLR4, and LBP in the colon. Both MyD88 and TRIF adaptor protein mRNA expression showed an apparent trend related to the infection. MyD88 was upregulated as it was in the ileum, but the TRIF mRNA expression was downregulated by the infection with *Salmonella*. This was also observed in the colon of the GN minipigs challenged/colonized with Δrfa *S. Typhimurium* strain LT2 mutants, where TRIF mRNA expression increased with truncation of LPS [52]. We believe that the MyD88-dependent signaling pathway is the crucial pathway in the case of the ileum and in the case of the colon, but the downregulation of the TRIF-dependent pathway by *Salmonella* infection and its relation to the LPS chain needs future studies.

Experiments in vitro do not fully cover the complexity of microbiota-host interactions, but they bring valuable findings that can help elucidate microbiota-host and microbiota-microbiota interferences, including the role of TLRs in inflammatory signaling. Porcine epithelial cell line IPEC-J2 infected with *S. Typhimurium* showed upregulated TLR2 mRNA expression 1.5 and 6 h post-infection. However, no TLR4 and TLR9 mRNA expression changes were found within the observed 6 h period [88]. *L. amylovorus* DSM 16698^T, which we used in our in vivo experiment, suppressed TLR4 signaling in human Caco-2/TC7 cells and pig jejunal explants, as well as the overproduction of inflammatory cytokines IL-8 and IL-1 β , by inhibiting ETEC-induced TLR4 and MyD88 mRNA expression. This anti-inflammatory effect was achieved by modulating the negative regulators Tollip and IRAK-M. Anti-TLR2 antibodies proved the role of TLR2 in suppressing TLR4 signaling [93].

More than 200 biomarkers of sepsis are described, such as C-reactive protein (CRP), procalcitonin, calprotectin, and some inflammatory cytokines, e.g., tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, and IL-12 [94,95]. Plasmatic cytokine levels help to discriminate between physiological (homeostasis) and pathological (inflammation) processes [19]. We selected two inflammatory markers—IL-6 and IL-12/23p40 to assess the activation of innate immune response and possible cytokine storm [95]. IL-6, IL-12, and IL-23 belong to the ‘level 1’ cytokines that stimulate the production of other cytokines through various cells [96].

IL-6 is a pleiotropic cytokine that participates in hematopoiesis and governs acute phase response [97]. Its detection is a helpful marker of neonatal sepsis [98]. In the intestine, enterocytes produce IL-6 with anti-inflammatory and cell-protective properties that strengthen the intestinal barrier and can alleviate its disruption by *Salmonella* infection [99]. GN minipigs challenged with necrotoxicogenic *E. coli* O55 (EcO55) without significant signs of enteric infection showed low or undetectable levels of systemic IL-6, but minipigs with significantly expressed clinical signs of enteric infection showed high levels of IL-6 24 h post-infection [100]. In our experiments, none of the used pig commensal bacteria increased levels of IL-6 in plasma. The infection with LT2 significantly increased plasmatic IL-6 levels. The previous association with mucinolytic *B. boum* RP36 did not influence this increase. In contrast, the previous association with non-mucinolytic *B. boum* RP37 and *L. amylovorus* prevented IL-6 increase. Differences in the diminishing of plasmatic IL-6 induced by *B. boum* strains agree with previous findings in TNF- α and IL-10 decreasing, but in these cases, only non-significantly [57].

The inner lumen of the ileum (intestine in general) is covered with a mucin layer that prevents the tight contact of enterocytes with bacteria and their translocation. Moreover, the upper movable mucin layer helps to clear away bacteria from the intestine via peristalsis [101]. The disruption of the protective mucin layer by mucinolytic RP36 [57] could support *Salmonella* translocation, which could result in the upregulation of IL-6. The highest downregulating effect was shown for *L. amylovorus* DSM16698^T. This *Lactobacillus*

showed a suppressive effect on inflammatory cytokines in Caco-2/TC7 cell line and piglet explants infected with ETEC K88, as mentioned about TLR4 regulation [93].

IL-12 and IL-23 are critical cytokines for human immunity against *Salmonella* [102]. They are primarily produced by antigen-presenting cells (APCs) and regulate colonization resistance and intestinal inflammation [103]. IL-12 and IL-23 are heterodimeric pro-inflammatory cytokines composed of p40 and p35 or p40 and p19 units, respectively [104]. GN minipigs infected with EcO55 that suffered from infection had significantly increased intestinal IL-12/23p40 levels, which correlated with plasmatic levels of IL-12/23p40. The IL-12/23p40 levels were directly related to clinical signs of enteric infection and sepsis [100]. In the present work, we used IL-12/23p40 as a biomarker of enteric infection and sepsis and a marker of the possible effectivity of commensal pig bacteria (RP36, RP37, and LA) to modulate the TLR4/MD-2 signaling pathway. None of them prevented an increase in IL-12/23p40 levels after infection with *S. Typhimurium*.

5. Conclusions

Gnotobiotic animals allow the study of interferences between hosts and simple and defined microbiota. Obtained results can reflect the particular activity of individual bacteria but also can mirror artificial conditions that naturally do not occur. Concordantly, both variants can bring interesting information. More complex microbiota, e.g., multi-strain probiotic preparations, can reflect more complex actions compared to single-strain species [104,105]. Within the last decade, synthetic, defined multi-strain microbiota have been developed with more complex synergy and additive effects, as shown in experiments with gnotobiotic mice [105,106]. In relation to this trend, we plan to use defined multi-species microbiota composed of pig commensal bacteria with selected properties [107] to study more complex host-microbiota interferences under defined conditions.

Author Contributions: Conceptualization, I.S., E.V. and A.S.; methodology, I.S., R.P., J.K., Z.K., V.N.B., E.V., B.V., K.P. and A.S.; validation, I.S. and A.S.; formal analysis, I.S., R.P., J.K., V.N.B., E.V., B.V., K.P. and A.S.; investigation, I.S., R.P., J.K., Z.K., E.V., B.V., K.P. and A.S.; resources, I.S. and E.V.; data curation, I.S., E.V. and A.S.; writing—original draft preparation, I.S. and A.S.; writing—review and editing, I.S., J.K., E.V., B.V. and A.S.; supervision, I.S. and A.S.; project administration, I.S. and E.V.; funding acquisition, I.S. and E.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by grant 21-15621S from the Czech Science Foundation and Institutional Research concept RVO 61388971 from the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: All procedures with the animals were approved by the Animal Care and Use Committee of the Czech Academy of Sciences (protocol 57/2021, 18 August 2021).

Data Availability Statement: The corresponding author will share the data on request.

Acknowledgments: We thank Jana Machova, Hana Sychrovská, and Jarmila Jarkovská for their technical and animal care assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Medzhitov, R. The Spectrum of Inflammatory Responses. *Science* **2021**, *374*, 1070–1075. [[CrossRef](#)]
2. Janeway, C.A., Jr. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1989**, *54 Pt 1*, 1–13. [[CrossRef](#)]
3. Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 805–820. [[CrossRef](#)]
4. Chen, G.Y.; Nuñez, G. Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 826–837. [[CrossRef](#)]
5. Gong, T.; Liu, L.; Jiang, W.; Zhou, R. DAMP-Sensing Receptors in Sterile Inflammation and Inflammatory Diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 95–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kono, H.; Rock, K.L. How Dying Cells Alert the Immune System to Danger. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 279–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kawai, T.; Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **2011**, *34*, 637–650. [[CrossRef](#)]

8. Kawai, T.; Akira, S. The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–384. [[CrossRef](#)]
9. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [[CrossRef](#)]
10. Kono, H.; Onda, A.; Yanagida, T. Molecular Determinants of Sterile Inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *26*, 147–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Paudel, Y.N.; Angelopoulou, E.; Piperi, C.; Balasubramaniam, V.R.M.T.; Othman, I.; Shaikh, M.F. Enlightening the Role of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) in Inflammation: Updates on Receptor Signalling. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *858*, 172487. [[CrossRef](#)]
12. Newton, K.; Dixit, V.M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a006049. [[CrossRef](#)]
13. Cavaillon, J.-M.; Giamarellos-Bourboulis, E.J. Immunosuppression Is Inappropriately Qualifying the Immune Status of Septic and SIRS Patients. *Shock* **2019**, *52*, 307–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rock, K.L.; Latz, E.; Ontiveros, F.; Kono, H. The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 321–342. [[CrossRef](#)]
15. Caroff, M.; Karibian, D.; Cavaillon, J.M.; Haeflner-Cavaillon, N. Structural and Functional Analyses of Bacterial Lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 915–926. [[CrossRef](#)]
16. Kagan, J.C. Lipopolysaccharide Detection across the Kingdoms of Life. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 696–704. [[CrossRef](#)]
17. Dong, Y.; Glaser, R.; Speer, C.P. Late-Onset Sepsis Caused by Gram-Negative Bacteria in Very Low Birth Weight Infants: A Systematic Review. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2019**, *17*, 177–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Karki, R.; Kanneganti, T.-D. The “Cytokine Storm”: Molecular Mechanisms and Therapeutic Prospects. *Trends Immunol.* **2021**, *42*, 681–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Meizlish, M.L.; Franklin, R.A.; Zhou, X.; Medzhitov, R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **2021**, *39*, 557–581. [[CrossRef](#)]
20. Tamburini, S.; Shen, N.; Wu, H.C.; Clemente, J.C. The Microbiome in Early Life: Implications for Health Outcomes. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 713–722. [[CrossRef](#)]
21. Healy, D.B.; Ryan, C.A.; Ross, R.P.; Stanton, C.; Dempsey, E.M. Clinical Implications of Preterm Infant Gut Microbiome Development. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 22–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Milani, C.; Duranti, S.; Bottacini, F.; Casey, E.; Turroni, F.; Mahony, J.; Belzer, C.; Delgado Palacio, S.; Arbolea Montes, S.; Mancabelli, L.; et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*, e00036-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Xiao, Y.; Zhai, Q.; Zhang, H.; Chen, W.; Hill, C. Gut Colonization Mechanisms of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*: An Argument for Personalized Designs. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2021**, *12*, 213–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kwoji, I.D.; Aiyegoro, O.A.; Okpeku, M.; Adeleke, M.A. Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities. *Biology* **2021**, *10*, 322. [[CrossRef](#)]
25. Yunes, R.A.; Poluektova, E.U.; Vasileva, E.V.; Odorskaya, M.V.; Marsova, M.V.; Kovalev, G.I.; Danilenko, V.N. A Multi-Strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 973–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ducarmon, Q.R.; Zwitterink, R.D.; Hornung, B.V.H.; van Schaik, W.; Young, V.B.; Kuijper, E.J. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2019**, *83*, e00007-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Herzog, M.K.-M.; Cazzaniga, M.; Peters, A.; Shayya, N.; Beldi, L.; Hapfelmeier, S.; Heimesaat, M.M.; Bereswill, S.; Frankel, G.; Gahan, C.G.M.; et al. Mouse Models for Bacterial Enteropathogen Infections: Insights into the Role of Colonization Resistance. *Gut Microbes* **2023**, *15*, 2172667. [[CrossRef](#)]
28. Besser, J.M. *Salmonella* Epidemiology: A Whirlwind of Change. *Food Microbiol.* **2018**, *71*, 55–59. [[CrossRef](#)]
29. Hurley, D.; McCusker, M.P.; Fanning, S.; Martins, M. *Salmonella*-Host Interactions—Modulation of the Host Innate Immune System. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 481. [[CrossRef](#)]
30. Heredia, N.; García, S. Animals as Sources of Food-Borne Pathogens: A Review. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 250–255. [[CrossRef](#)]
31. Coburn, B.; Grassl, G.A.; Finlay, B.B. *Salmonella*, the Host and Disease: A Brief Review. *Immunol. Cell Biol.* **2007**, *85*, 112–118. [[CrossRef](#)]
32. Ménard, S.; Lacroix-Lamadé, S.; Ehrhardt, K.; Yan, J.; Grassl, G.A.; Wiedemann, A. Cross-Talk Between the Intestinal Epithelium and *Salmonella* Typhimurium. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 906238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gordon, M.A. *Salmonella* Infections in Immunocompromised Adults. *J. Infect.* **2008**, *56*, 413–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wen, S.C.; Best, E.; Nourse, C. Non-Typhoidal *Salmonella* Infections in Children: Review of Literature and Recommendations for Management. *J. Paediatr. Child Health* **2017**, *53*, 936–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Xiao, L.; Estellé, J.; Küllerich, P.; Ramayo-Caldas, Y.; Xia, Z.; Feng, Q.; Liang, S.; Pedersen, A.Ø.; Kjeldsen, N.J.; Liu, C.; et al. A Reference Gene Catalogue of the Pig Gut Microbiome. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16161. [[CrossRef](#)]
37. Lunney, J.K.; Van Goor, A.; Walker, K.E.; Hailstock, T.; Franklin, J.; Dai, C. Importance of the Pig as a Human Biomedical Model. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabd5758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Burrin, D.; Sangild, P.T.; Stoll, B.; Thymann, T.; Buddington, R.; Marini, J.; Olutoye, O.; Shulman, R.J. Translational Advances in Pediatric Nutrition and Gastroenterology: New Insights from Pig Models. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2020**, *8*, 321–354. [[CrossRef](#)]

39. Zhang, Q.; Widmer, G.; Tzipori, S. A Pig Model of the Human Gastrointestinal Tract. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 193–200. [[CrossRef](#)]
40. Pabst, R. The Pig as a Model for Immunology Research. *Cell Tissue Res.* **2020**, *380*, 287–304. [[CrossRef](#)]
41. Rothkötter, H.J.; Sowa, E.; Pabst, R. The Pig as a Model of Developmental Immunology. *Hum. Exp. Toxicol.* **2002**, *21*, 533–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Meurens, F.; Summerfield, A.; Nauwynck, H.; Saif, L.; Gerdts, V. The Pig: A Model for Human Infectious Diseases. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 50–57. [[CrossRef](#)]
43. Roberts, R.M.; Green, J.A.; Schulz, L.C. The Evolution of the Placenta. *Reproduction* **2016**, *152*, R179–R189. [[CrossRef](#)]
44. Bigler, N.A.; Bruckmaier, R.M.; Gross, J.J. Implications of Placentation Type on Species-Specific Colostrum Properties in Mammals. *J. Anim. Sci.* **2022**, *100*, skac287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Salmon, H.; Berri, M.; Gerdts, V.; Meurens, F. Humoral and Cellular Factors of Maternal Immunity in Swine. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33*, 384–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fricke, W.F.; Ravel, J. Microbiome or No Microbiome: Are We Looking at the Prenatal Environment through the Right Lens? *Microbiome* **2021**, *9*, 9. [[CrossRef](#)]
47. Kennedy, K.M.; de Goffau, M.C.; Perez-Muñoz, M.E.; Arrieta, M.-C.; Bäckhed, F.; Bork, P.; Braun, T.; Bushman, F.D.; Dore, J.; de Vos, W.M.; et al. Questioning the Fetal Microbiome Illustrates Pitfalls of Low-Biomass Microbial Studies. *Nature* **2023**, *613*, 639–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Perez-Muñoz, M.E.; Arrieta, M.-C.; Ramer-Tait, A.E.; Walter, J. A Critical Assessment of the “Sterile Womb” and “in Utero Colonization” Hypotheses: Implications for Research on the Pioneer Infant Microbiome. *Microbiome* **2017**, *5*, 48. [[CrossRef](#)]
49. Miniats, O.P.; Jol, D. Gnotobiotic Pigs-Derivation and Rearing. *Can. J. Comp. Med.* **1978**, *42*, 428–437. [[PubMed](#)]
50. Taylor, D.M. The Use of Laminar Flow for Obtaining Germ-Free Mice. *Lab. Anim.* **1975**, *9*, 337–343. [[CrossRef](#)]
51. Ruff, W.E.; Greiling, T.M.; Kriegel, M.A. Host-Microbiota Interactions in Immune-Mediated Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 521–538. [[CrossRef](#)]
52. Splichal, I.; Rychlik, I.; Splichalova, I.; Karasova, D.; Splichalova, A. Toll-like Receptor 4 Signaling in the Ileum and Colon of Gnotobiotic Piglets Infected with *Salmonella* Typhimurium or Its Isogenic Δ rfa Mutants. *Toxins* **2020**, *12*, 545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Clarke, R.C.; Gyles, C.L. Virulence of Wild and Mutant Strains of *Salmonella* Typhimurium in Ligated Intestinal Segments of Calves, Pigs, and Rabbits. *Am. J. Vet. Res.* **1987**, *48*, 504–510. [[PubMed](#)]
54. Thaïss, C.A.; Zmora, N.; Levy, M.; Elinav, E. The Microbiome and Innate Immunity. *Nature* **2016**, *535*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Splichalova, A.; Slavikova, V.; Splichalova, Z.; Splichal, I. Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pechar, R.; Killer, J.; Mekadim, C.; Geigerová, M.; Rada, V. Classification of Culturable Bifidobacterial Population from Colonic Samples of Wild Pigs (*Sus Scrofa*) Based on Three Molecular Genetic Methods. *Curr. Microbiol.* **2017**, *74*, 1324–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Splichalova, A.; Pechar, R.; Killer, J.; Splichalova, Z.; Bunesova, V.N.; Vlkova, E.; Salmonova, H.S.; Splichal, I. Colonization of Germ-Free Piglets with Mucinolytic and Non-Mucinolytic *Bifidobacterium boum* Strains Isolated from the Intestine of Wild Boar and Their Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms* **2020**, *8*, 2002. [[CrossRef](#)]
58. Konstantinov, S.R.; Poznanski, E.; Fuentes, S.; Akkermans, A.D.L.; Smidt, H.; de Vos, W.M. *Lactobacillus sobrius* Sp. Nov., Abundant in the Intestine of Weaning Piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 29–32. [[CrossRef](#)]
59. Trebichavsky, I.; Dlabac, V.; Rehakova, Z.; Zahradnickova, M.; Splichal, I. Cellular Changes and Cytokine Expression in the Ileum of Gnotobiotic Piglets Resulting from Peroral *Salmonella* Typhimurium Challenge. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 5244–5249. [[CrossRef](#)]
60. McClelland, M.; Sanderson, K.E.; Spieth, J.; Clifton, S.W.; Latreille, P.; Courtney, L.; Porwollik, S.; Ali, J.; Dante, M.; Du, F.; et al. Complete Genome Sequence of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium LT2. *Nature* **2001**, *413*, 852–856. [[CrossRef](#)]
61. Splichal, I.; Donovan, S.M.; Splichalova, Z.; Neuzil Bunesova, V.; Vlkova, E.; Jenistova, V.; Killer, J.; Svejstl, R.; Skrivanova, E.; Splichalova, A. Colonization of Germ-Free Piglets with Commensal *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus mucosae*, and Probiotic *E. Coli* Nissle 1917 and Their Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms* **2019**, *7*, 273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Splichalova, A.; Jenistova, V.; Splichalova, Z.; Splichal, I. Colonization of Preterm Gnotobiotic Piglets with Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Its Interference with *Salmonella* Typhimurium. *Clin. Exp. Immunol.* **2019**, *195*, 381–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gal-Mor, O. Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonellae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00088-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Skrzypek, T.; Valverde Piedra, J.L.; Skrzypek, H.; Kazimierzczak, W.; Biernat, M.; Zabielski, R. Gradual Disappearance of Vacuolated Enterocytes in the Small Intestine of Neonatal Piglets. *J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *58* (Suppl. S3), 87–95.
65. Zabielski, R.; Godlewski, M.M.; Guilloteau, P. Control of Development of Gastrointestinal System in Neonates. *J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *59* (Suppl. S1), 35–54.
66. Shirkey, T.W.; Siggers, R.H.; Goldade, B.G.; Marshall, J.K.; Drew, M.D.; Laarveld, B.; Van Kessel, A.G. Effects of Commensal Bacteria on Intestinal Morphology and Expression of Proinflammatory Cytokines in the Gnotobiotic Pig. *Exp. Biol. Med.* **2006**, *231*, 1333–1345. [[CrossRef](#)]
67. Zhang, K.; Griffiths, G.; Repnik, U.; Hornef, M. Seeing Is Understanding: *Salmonella*'s Way to Penetrate the Intestinal Epithelium. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 97–106. [[CrossRef](#)]
68. Keestra-Gounder, A.M.; Tsois, R.M.; Bäumlér, A.J. Now You See Me, Now You Don't: The Interaction of *Salmonella* with Innate Immune Receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 206–216. [[CrossRef](#)]

69. Trebichavsky, I.; Splichal, I.; Rada, V.; Splichalova, A. Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 459–464. [[CrossRef](#)]
70. Jakava-Viljanen, M.; Murros, A.; Palva, A.; Björkroth, K.J. *Lactobacillus sobrius* Konstantinov et al. 2006 Is a Later Synonym of *Lactobacillus amylovorus* Nakamura 1981. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 910–913. [[CrossRef](#)]
71. Tükel, C.; Nishimori, J.H.; Wilson, R.P.; Winter, M.G.; Keestra, A.M.; van Putten, J.P.M.; Bäuml, A.J. Toll-like Receptors 1 and 2 Cooperatively Mediate Immune Responses to Curli, a Common Amyloid from Enterobacterial Biofilms. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 1495–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Rapsinski, G.J.; Wynosky-Dolfi, M.A.; Oppong, G.O.; Tursi, S.A.; Wilson, R.P.; Brodsky, I.E.; Tükel, Ç. Toll-like Receptor 2 and NLRP3 Cooperate to Recognize a Functional Bacterial Amyloid, Curli. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 693–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Capurso, L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *J. Clin. Gastroenterol.* **2019**, *53* (Suppl. S1), S1–S41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Splichal, I.; Donovan, S.M.; Kindlova, Z.; Stranak, Z.; Neuzil Bunesova, V.; Sinkora, M.; Polakova, K.; Valaskova, B.; Splichalova, A. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* Subsp. Lactis BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Jensen, K.; Al-Nakeeb, K.; Koza, A.; Zeidan, A.A. Updated Genome Sequence for the Probiotic Bacterium *Bifidobacterium animalis* Subsp. Lactis BB-12. *Microbiol. Resour. Announc.* **2021**, *10*, e0007821. [[CrossRef](#)]
76. Splichal, I.; Donovan, S.M.; Jenistova, V.; Splichalova, I.; Salmonova, H.; Vlkova, E.; Neuzil Bunesova, V.; Sinkora, M.; Killer, J.; Skrivanova, E.; et al. High Mobility Group Box 1 and TLR4 Signaling Pathway in Gnotobiotic Piglets Colonized/Infected with *L. Amylovorus*, *L. Mucosae*, *E. Coli* Nissle 1917 and *S. Typhimurium*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6294. [[CrossRef](#)]
77. Henker, J.; Laass, M.; Blokhin, B.M.; Bolbot, Y.K.; Maydannik, V.G.; Elze, M.; Wolff, C.; Schulze, J. The Probiotic Escherichia Coli Strain Nissle 1917 (EcN) Stops Acute Diarrhoea in Infants and Toddlers. *Eur. J. Pediatr.* **2007**, *166*, 311–318. [[CrossRef](#)]
78. Henker, J.; Laass, M.W.; Blokhin, B.M.; Maydannik, V.G.; Bolbot, Y.K.; Elze, M.; Wolff, C.; Schreiner, A.; Schulze, J. Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 versus Placebo for Treating Diarrhea of Greater than 4 Days Duration in Infants and Toddlers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27*, 494–499. [[CrossRef](#)]
79. Splichalova, A.; Trebichavsky, I.; Rada, V.; Vlkova, E.; Sonnenborn, U.; Splichal, I. Interference of *Bifidobacterium choerinum* or Escherichia Coli Nissle 1917 with *Salmonella* Typhimurium in Gnotobiotic Piglets Correlates with Cytokine Patterns in Blood and Intestine. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *163*, 242–249. [[CrossRef](#)]
80. Grozdanov, L.; Zähringer, U.; Blum-Oehler, G.; Brade, L.; Henne, A.; Knirel, Y.A.; Schombel, U.; Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Gottschalk, G.; et al. A Single Nucleotide Exchange in the Wzy Gene Is Responsible for the Semirough O6 Lipopolysaccharide Phenotype and Serum Sensitivity of Escherichia Coli Strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5912–5925. [[CrossRef](#)]
81. Foster, N.; Lovell, M.A.; Marston, K.L.; Hulme, S.D.; Frost, A.J.; Bland, P.; Barrow, P.A. Rapid Protection of Gnotobiotic Pigs against Experimental Salmonellosis Following Induction of Polymorphonuclear Leukocytes by Avirulent *Salmonella* Enterica. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 2182–2191. [[CrossRef](#)]
82. Foster, N.; Hulme, S.; Lovell, M.; Reed, K.; Barrow, P. Stimulation of Gp91 Phagocytic Oxidase and Reactive Oxygen Species in Neutrophils by an Avirulent *Salmonella* Enterica Serovar Infantis Strain Protects Gnotobiotic Piglets from Lethal Challenge with Serovar Typhimurium Strain F98 without Inducing Intestinal Pathology. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4539–4547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Splichal, I.; Trebichavsky, I.; Splichalova, A.; Barrow, P.A. Protection of Gnotobiotic Pigs against *Salmonella* Enterica Serotype Typhimurium by Rough Mutant of the Same Serotype Is Accompanied by the Change of Local and Systemic Cytokine Response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2005**, *103*, 155–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Splichalova, A.; Splichalova, Z.; Karasova, D.; Rychlik, I.; Trevisi, P.; Sinkora, M.; Splichal, I. Impact of the Lipopolysaccharide Chemotype of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium on Virulence in Gnotobiotic Piglets. *Toxins* **2019**, *11*, 534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Splichalova, A.; Splichal, I.; Chmelarova, P.; Trebichavsky, I. Alarmin HMGB1 Is Released in the Small Intestine of Gnotobiotic Piglets Infected with Enteric Pathogens and Its Level in Plasma Reflects Severity of Sepsis. *J. Clin. Immunol.* **2011**, *31*, 488–497. [[CrossRef](#)]
86. Yang, H.; Wang, H.; Andersson, U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 484. [[CrossRef](#)]
87. Andersson, U.; Yang, H. HMGB1 Is a Critical Molecule in the Pathogenesis of Gram-Negative Sepsis. *J. Intensive Med.* **2022**, *2*, 156–166. [[CrossRef](#)]
88. Burkey, T.E.; Skjolaas, K.A.; Dritz, S.S.; Minton, J.E. Expression of Toll-like Receptors, Interleukin 8, Macrophage Migration Inhibitory Factor, and Osteopontin in Tissues from Pigs Challenged with *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium or Serovar Choleraesuis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2007**, *115*, 309–319. [[CrossRef](#)]
89. Dong, H.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Deng, H. Pathophysiology of RAGE in Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 931473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. O'Hara, A.M.; Shanahan, F. The Gut Flora as a Forgotten Organ. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 688–693. [[CrossRef](#)]
91. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **2016**, *164*, 337–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Bescucci, D.M.; Moote, P.E.; Ortega Polo, R.; Uwiera, R.R.E.; Inglis, G.D. *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Temporally Modulates the Enteric Microbiota and Host Responses To Overcome Colonization Resistance in Swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01569-20. [[CrossRef](#)]
93. Finamore, A.; Roselli, M.; Imbinto, A.; Seeboth, J.; Oswald, I.P.; Mengheri, E. *Lactobacillus amylovorus* Inhibits the TLR4 Inflammatory Signaling Triggered by Enterotoxigenic *Escherichia Coli* via Modulation of the Negative Regulators and Involvement of TLR2 in Intestinal Caco-2 Cells and Pig Explants. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Pierrakos, C.; Velissaris, D.; Bisdorff, M.; Marshall, J.C.; Vincent, J.-L. Biomarkers of Sepsis: Time for a Reappraisal. *Crit. Care* **2020**, *24*, 287. [[CrossRef](#)]
95. Cavaillon, J.-M.; Singer, M.; Skirecki, T. Sepsis Therapies: Learning from 30 Years of Failure of Translational Research to Propose New Leads. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e10128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 343–353. [[CrossRef](#)]
97. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a016295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Song, J.; Park, D.W.; Moon, S.; Cho, H.-J.; Park, J.H.; Seok, H.; Choi, W.S. Diagnostic and Prognostic Value of Interleukin-6, Pentraxin 3, and Procalcitonin Levels among Sepsis and Septic Shock Patients: A Prospective Controlled Study According to the Sepsis-3 Definitions. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 968. [[CrossRef](#)]
99. Huang, F.-C. The Interleukins Orchestrate Mucosal Immune Responses to *Salmonella* Infection in the Intestine. *Cells* **2021**, *10*, 3492. [[CrossRef](#)]
100. Splichalova, A.; Splichal, I. Local and Systemic Occurrences of HMGB1 in Gnotobiotic Piglets Infected with *E. Coli* O55 Are Related to Bacterial Translocation and Inflammatory Cytokines. *Cytokine* **2012**, *60*, 597–600. [[CrossRef](#)]
101. Linden, S.K.; Sutton, P.; Karlsson, N.G.; Korolik, V.; McGuckin, M.A. Mucins in the Mucosal Barrier to Infection. *Mucosal Immunol.* **2008**, *1*, 183–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. MacLennan, C.; Fieschi, C.; Lammas, D.A.; Picard, C.; Dorman, S.E.; Sanal, O.; MacLennan, J.M.; Holland, S.M.; Ottenhoff, T.H.M.; Casanova, J.-L.; et al. Interleukin (IL)-12 and IL-23 Are Key Cytokines for Immunity against *Salmonella* in Humans. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1755–1757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Awoniyi, M.; Miller, S.I.; Wilson, C.B.; Hajjar, A.M.; Smith, K.D. Homeostatic Regulation of *Salmonella*-Induced Mucosal Inflammation and Injury by IL-23. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Vignali, D.A.A.; Kuchroo, V.K. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 722–728. [[CrossRef](#)]
105. Stecher, B. Establishing Causality in *Salmonella*-Microbiota-Host Interaction: The Use of Gnotobiotic Mouse Models and Synthetic Microbial Communities. *Int. J. Med. Microbiol.* **2021**, *311*, 151484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Brugiroux, S.; Berry, D.; Ring, D.; Barnich, N.; Daims, H.; Stecher, B. Specific Localization and Quantification of the Oligo-Mouse-Microbiota (OMM12) by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Curr. Protoc.* **2022**, *2*, e548. [[CrossRef](#)]
107. Horvathova, K.; Modrackova, N.; Splichal, I.; Splichalova, A.; Amin, A.; Ingribelli, E.; Killer, J.; Dorskocil, I.; Pechar, R.; Kodesova, T.; et al. Defined Pig Microbiota with a Potential Protective Effect against Infection with *Salmonella* Typhimurium. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1007. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants

Igor Splichal ¹, Sharon M. Donovan ², Zdislava Kindlova ¹, Zbynek Stranak ³, Vera Neuzil Bunesova ⁴, Marek Sinkora ¹, Katerina Polakova ¹, Barbora Valaskova ¹ and Alla Splichalova ^{1,*}

¹ Laboratory of Gnotobiology, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 549 22 Novy Hradek, Czech Republic

² Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA

³ Department of Neonatology, Institute for the Care of Mother and Child, 147 00 Prague, Czech Republic

⁴ Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Czech University of Life Sciences in Prague, 160 00 Prague, Czech Republic

* Correspondence: splichalova@gnotobio.cz; Tel.: +420-491-418-539

Abstract: Gnotobiotic (GN) animals with defined microbiota allow us to study host–microbiota and microbiota–microbiota interferences. Preterm germ-free (GF) piglets were mono-associated with probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12) to ameliorate/prevent the consequences of infection with the *Salmonella* Typhimurium strain LT2 (LT2). Goblet cell density; expression of Toll-like receptors (TLRs) 2, 4, and 9; high mobility group box 1 (HMGB1); interleukin (IL)-6; and IL-12/23p40 were analyzed to evaluate the possible modulatory effect of BB12. BB12 prevented an LT2-induced decrease of goblet cell density in the colon. TLRs signaling modified by LT2 was not influenced by the previous association with BB12. The expression of HMGB1, IL-6, and IL12/23p40 in the jejunum, ileum, and colon and their levels in plasma were all decreased by BB12, but these changes were not statistically significant. In the colon, differences in HMGB1 distribution between the GF and LT2 piglet groups were observed. In conclusion, the mono-association of GF piglets with BB12 prior to LT2 infection partially ameliorated the inflammatory response to LT2 infection.

Keywords: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12; *Salmonella* Typhimurium; high mobility group box 1; Toll-like receptors; tight junction proteins; mucin; intestinal barrier; inflammatory cytokines; immunodeficient host



Citation: Splichal, I.; Donovan, S.M.; Kindlova, Z.; Stranak, Z.; Neuzil Bunesova, V.; Sinkora, M.; Polakova, K.; Valaskova, B.; Splichalova, A. Release of HMGB1 and Toll-like Receptors 2, 4, and 9 Signaling Are Modulated by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Salmonella* Typhimurium in a Gnotobiotic Piglet Model of Preterm Infants. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms24032329>

Academic Editors: Alfredo Micheli, Xuewu Zhang and Leilei Yu

Received: 17 December 2022

Revised: 16 January 2023

Accepted: 19 January 2023

Published: 24 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Preterm birth (PTB) is a birth that occurs before 37 weeks of gestation, and its incidence affects about 11% of pregnancies [1]. Various reasons can trigger PTB, and the inflammatory process is one of them [2]. In addition, preterm infants have a low birth weight and underdeveloped organ systems, making them more susceptible to many life-threatening comorbidities [2]. These factors and their possible concurrence result in special requirements for preterm infants that need supportive care in the neonatal intensive care unit (NICU) [3]. However, despite this particular regimen, the preterm infant suffers from increased morbidity that is inversely proportional to the length of gestation [4].

The initial colonization of vaginally born infants occurs immediately during childbirth by the mother’s vaginal and fecal microbiota. This settlement starts with pioneer settlers that create suitable conditions for their followers [5]. However, colonization occurs more rapidly than was believed [6], because strictly anaerobic bifidobacteria are present in the feces of some infants on the first day after birth [7]. The establishment of balanced microbiota (eubiosis) in newborns is negatively influenced by antibiotic treatment of the

mother or newborn and formula feeding [8]. Cesarean-delivered infants are not exposed to the mother's vaginal and fecal microbiota and are, instead, colonized with microbes from the surgery room and NICU surroundings, which can have competitive advantages for their antibiotic resistance [9] and can cause nosocomial infections. Furthermore, this microbiota with low diversity allows the overgrowth of pathobionts that are usually suppressed in their growth [10]. Thus, the early establishment of a balanced microbiota is crucial and beneficial for the host's development and health [11]. For this reason, it is necessary to pay great attention to the initial colonization that will impact short- and long-term health [12].

Microbes express pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are [13] recognized by pattern-recognition receptors (PRRs) to trigger an immune defense response. One of the beneficial effects of the gastrointestinal (GI) microbiota on neonatal hosts is the stimulation of immune system development [14]. In contrast to PAMPs, damage-associated molecular patterns (DAMPs) are molecules produced by the host after stimulation or cellular damage [15] that are usually hidden from immune recognition. Both PAMPs and DAMPs represent danger signals, are sensed by PRRs, and induce inflammatory reactions to maintain homeostasis [16]. Toll-like receptors (TLRs) are PRRs that recognize both PAMPs and DAMPs [15,17]. TLRs sense various bacterial motifs, such as lipoproteins, lipoteichoic acid, peptidoglycan (TLR2), lipopolysaccharide (LPS; TLR4), and CpG (TLR9) [13]. TLR2, TLR4, and TLR9 also sense the DAMPs, high mobility group 1 (HMGB1) [18].

Probiotics are live microorganisms that beneficially affect the host's health. The treatment of preterm infants with probiotics positively influenced the GI microbial ecosystem and showed preventive effects against the development of necrotizing enterocolitis (NEC) [19] and sepsis [20]. Primary colonization of the preterm infant GI with probiotics supported further colonization with probiotic bacteria [21]. Bifidobacteria belong to the first colonizers and principal inhabitants of the infant's intestine [7]. Together with lactobacilli, they form the main components of probiotic preparations [22]. Probiotic persistence among indigenous microbiota is usually transient and depends on GI microbiota composition [23]. Thus, the newborn GI tract with no fully established balanced microbiota and low colonization resistance [24] suggests an opportunity for longer-time colonization with probiotics and defined microbiota [23]. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12) is a widely used bifidobacterial probiotic strain with excellent gastric acid and bile tolerance and strong mucus-adherence properties [25]. BB12 showed its ability to reduce *Salmonella* growth in the GIT of mice and alleviate the consequences of the infection [26].

Gnotobiotic (GN) animals are microbiologically defined animals consisting of germ-free (GF) animals and animals associated with simple defined microbiota [27]. The GF animals with absent microbiota show lower colonization resistance and higher sensitivity to enteric infections [28]. They are suitable animal models for studies of host–bacteria and bacteria–bacteria interferences. Our study aimed to evaluate the possibility of modulating TLRs signaling by administration of a widely used probiotic bacteria to alleviate the consequences of enteric infections. HMGB1, a marker of the severity of enteric infection and sepsis, and a potent inflammatory inducer, was used as the main indicator molecule to evaluate the inflammatory process. Thus, we studied the direct interactions between *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12) and *Salmonella* Typhimurium LT2 (LT2) in a GN piglet model of preterm infants [29]. The preterm GF piglets were associated with *B. animalis* BB-12 (BB12) for one week prior to being infected with enteric pathogen *S. Typhimurium* LT2 (BB12 + LT2) or infected with *S. Typhimurium* LT2 alone (LT2).

2. Results

2.1. Clinical Signs of Enterocolitis

The non-infected piglets (GF and BB12 groups) did not show any signs of enterocolitis. In contrast, the *Salmonella*-infected piglets (LT2) were sleepy and had anorexia with non-bloody diarrhea and fever. The piglets associated with BB12 and one-week later infected with LT2 (BB12 + LT2) showed milder diarrhea than the piglets infected with LT2 only.

2.2. Goblet Cells in the Ileum

The GF (Figure 1A) and BB12 (Figure 1C) piglets showed long villi with many vacuolated enterocytes and mucin-producing, blue-stained goblet cells among enterocytes. Piglets infected with *S. Typhimurium* (Figure 1B) had shortened and damaged villi with desquamated epithelial cells in the lumen. Colonization with BB12 did not fully protect ileal villus morphology against injury induced by *S. Typhimurium* infection (Figure 1D). The number of goblet cells was reduced in the LT2 group, but this decrease was not statistically significant (Figure 1E).

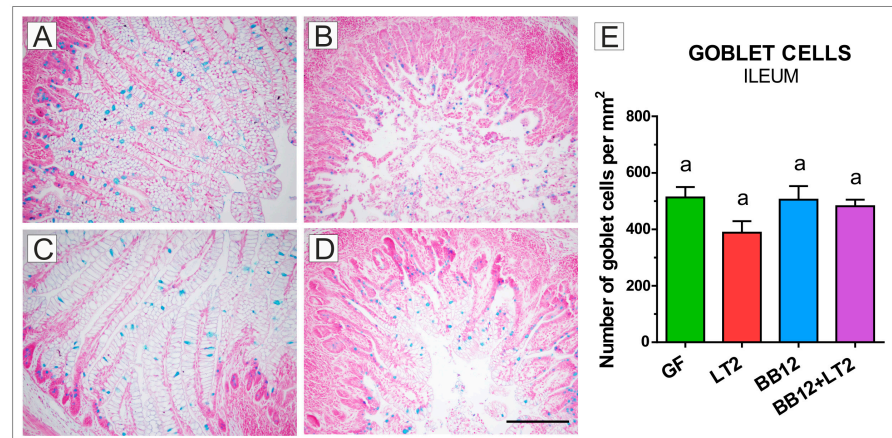


Figure 1. Goblet cells (blue color) in the ileum of gnotobiotic piglets. Number of goblet cells per mm² in the ileum of the one-week-old piglets: germ-free (GF; (A)), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2; (B)), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12; (C)), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2; (D)). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post hoc test. The values are presented as mean + SEM, and $p < 0.05$ among groups are denoted by different letters above the columns (E). A scale bar (D) depicts 200 μ m.

2.3. Goblet Cells in the Colon

S. Typhimurium infection significantly reduced the number of goblet cells in the colon in the LT2 groups (Figure 2B,E) compared to the other groups (Figure 2A,C–E). Prior association with BB12 (BB12 + LT2; Figure 2C) prevented a decrease in the goblet cell counts, as is comparable to the GF (Figure 2A,E), BB12 (Figure 2C,E), and BB12 + LT2 (Figure 2D,E) piglets.

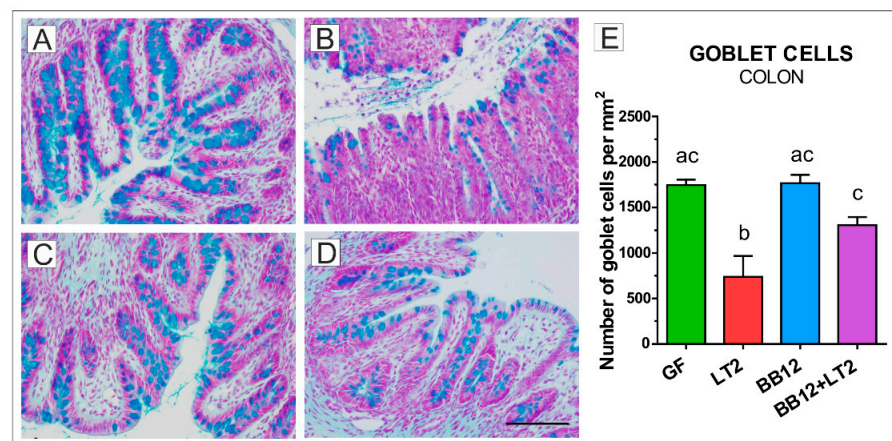


Figure 2. Goblet cells (blue color) in the colon of gnotobiotic piglets. Number of goblet cells per mm² in the colon of the one-week-old gnotobiotic piglets: germ-free (GF; (A)), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2; (B)), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12; (C)), and associated with BB12 and

infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2; (D)). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post hoc test. The values are presented as mean + SEM, and a $p < 0.05$ among groups is denoted by different letters above the columns (E). A scale bar (D) depicts 100 μm .

2.4. TLR2, TLR4, TLR9, MyD88, TRIF, and RAGE mRNA in Ileum

BB12 did not increase the expression of TLR2 mRNA in the ileum compared to the GF piglet control (Figure 3A). In contrast, both groups infected with *S. Typhimurium* (LT2 and BB12 + LT2) had significantly higher expression. The presence of BB12 (BB12 + LT2) did not significantly influence the TLR2 expression compared to *S. Typhimurium* infection alone (LT2). Similar changes of mRNA expression were found in TLR4 (Figure 3B). An opposite trend was found in TLR9 mRNA expression (Figure 3C). TLR9 mRNA expression was comparable in GF and BB12 groups but was downregulated by *Salmonella* infection. The prior association with BB12 (BB12 + LT2) did not ameliorate the LT2-induced downregulation of TLR-9 expression. BB12 did not influence MyD88 mRNA expression, but it was significantly upregulated by *Salmonella* (Figure 3D). The presence of BB12 enhanced this expression, so the expression in BB12 + LT2 group was significantly higher than in the LT2 group. In contrast, *Salmonella* downregulated the expression of TRIF mRNA (Figure 3E). *Salmonella* infection downregulated RAGE mRNA expression compared to GF, but this downregulation was only significant for LT2, and not for BB12 + LT2 (Figure 3F).

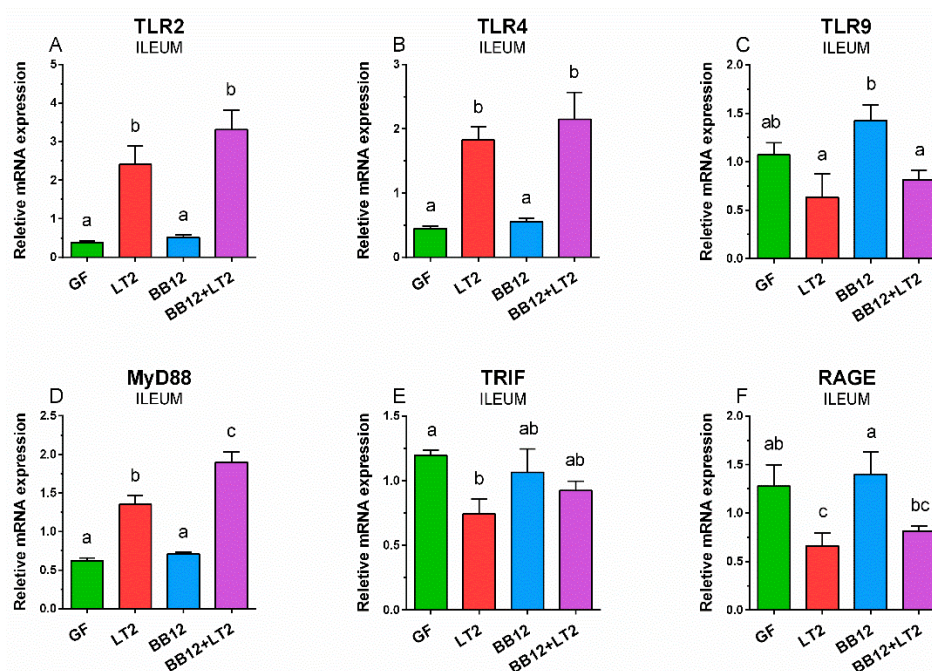


Figure 3. Relative expression (fold-change) of TLR2 (A), TLR4 (B), TLR9 (C), MyD88 (D), TRIF (E), and RAGE (F) mRNA in the ileum of the one-week-old gnotobiotic piglets: germ-free (GF), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post hoc test. The values are presented as mean + SEM, and a $p < 0.05$ among groups is denoted by different letters above the columns.

2.5. TLR2, TLR4, TLR9, MyD88, TRIF, and RAGE mRNA in Colon

BB12 downregulated TLR2 mRNA expression in the colon, but this downregulation in comparison to GF and LT2 groups was statistically non-significant (Figure 4A). However, a previous association with BB12 (BB12 + LT2) caused significant upregulation in comparison to the BB12 group alone. Simultaneously, this upregulation was not statistically significant

in comparison to the GF and LT2 groups. *Salmonella* significantly upregulated TLR4 mRNA expression in both infected groups (LT2 and BB12 + LT2) (Figure 4B). TLR9 mRNA expression was comparable among all groups (Figure 4C). MyD88 mRNA was significantly upregulated in the BB12 + LT2 group only (Figure 4D). TRIF mRNA was significantly downregulated in both *Salmonella*-infected groups compared to both non-infected groups (Figure 4E). RAGE mRNA expression was downregulated in the *Salmonella*-infected groups (LT2 and BB12 + LT2) (Figure 4F).

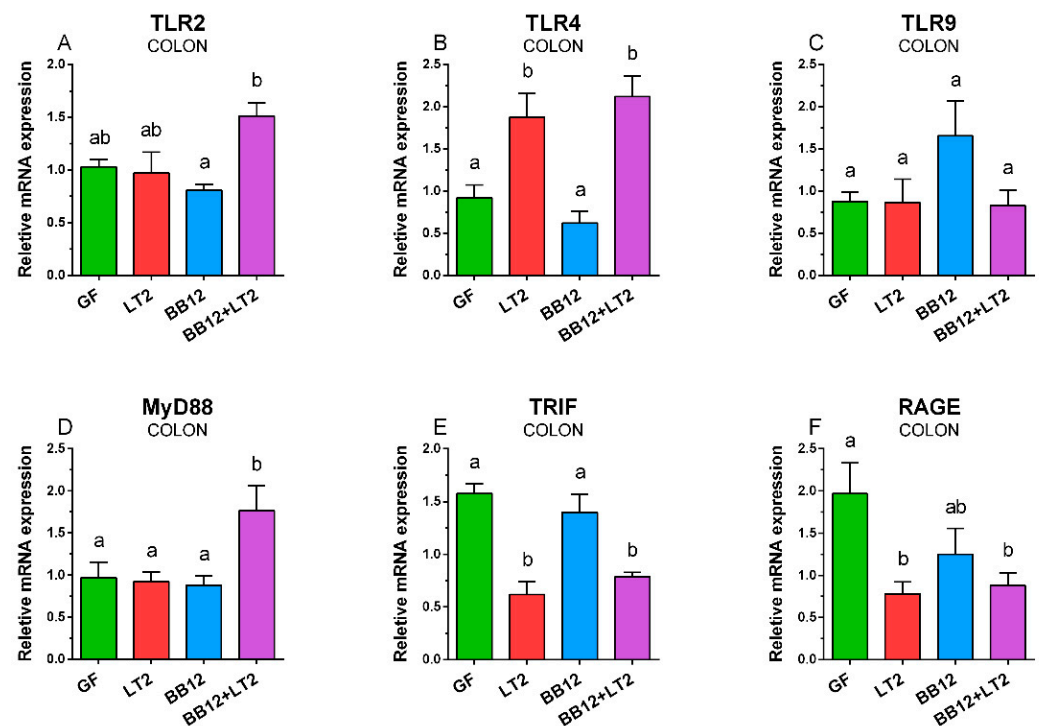


Figure 4. Relative expression (fold-change) of TLR2 (A), TLR4 (B), TLR9 (C), MyD88 (D), TRIF (E), and RAGE (F) mRNA in the colon of the one-week-old gnotobiotic piglets: germ-free (GF), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post hoc test. The values are presented as mean + SEM, and a $p < 0.05$ among groups is denoted by different letters above the columns.

2.6. TLR2, TLR4, TLR9, MyD88, TRIF, and RAGE mRNA in Mesenteric Lymph Nodes

Salmonella significantly upregulated TLR2 mRNA expression in MLN (Figure 5A). The same trend was observed for TLR4 mRNA, but only induction in the LT2-infected groups (LT2 and BB12) was significant against the GF group only (Figure 5B). The opposite trend was found for TLR9, but the suppression by *Salmonella* was not statistically significant (Figure 5C). MyD88 mRNA was significantly induced by *Salmonella* in both infected groups (Figure 5D), but in the case of TRIF mRNA, this significant upregulation was observed in the LT2 group only (Figure 5E). Finally, no effect of LT2 or BB12 on RAGE mRNA expression in MLN was found (Figure 5F).

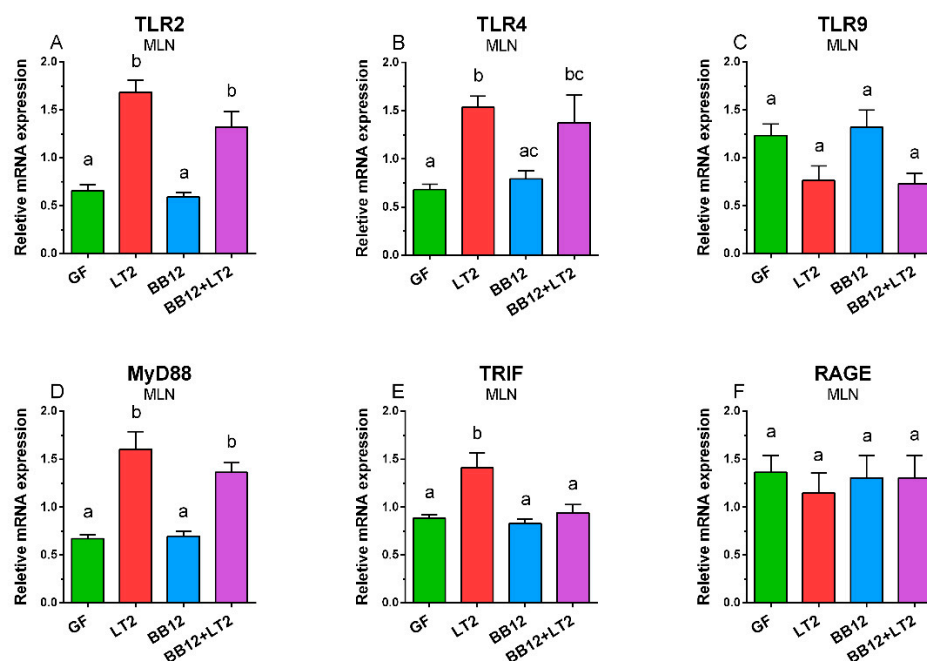


Figure 5. Relative expression (fold-change) of TLR2 (A), TLR4 (B), TLR9 (C), MyD88 (D), TRIF (E), and RAGE (F) mRNA in the mesenteric lymph nodes of the one-week-old piglets: germ-free (GF), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison post hoc test. The values are presented as mean + SEM, and a $p < 0.05$ among groups is denoted by different letters above the columns.

2.7. HMGB1 Expression in the Colon

In the colon of GF piglets (Figure 6A), the nuclear protein HMGB1 was localized in both the nucleus and the cytoplasm, whereas in LT2 piglets (Figure 6B), HMGB1 was localized mainly in the cytoplasm.

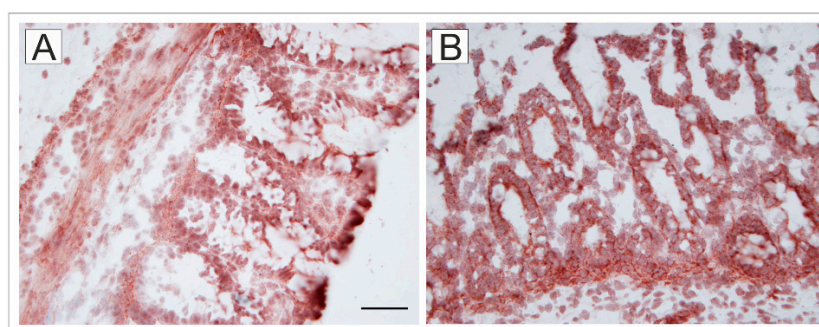


Figure 6. Expression of HMGB1 in the colon. Representative micrographs of the germ-free (GF; (A)) and *S. Typhimurium* LT2-infected piglets for 24 h (LT2; (B)) are depicted. The scale bar (A) corresponds to 50 μm .

2.8. Intestinal Levels of HMGB1, IL-6, and IL-12/23p40

HMGB1 release was significantly induced in the jejunum with *Salmonella* infection (Figure 7A) compared to the GF group. The association with BB12 did not induce HMGB1 release in the jejunum. The previous association of the piglets with BB12 in the (BB12 + LT2) group prevented the significant induction of HMGB1 (Figure 7A). However, differences between LT2 and BB12 + LT2 were non-significant. The IL-6 levels in the *Salmonella*-infected piglets were significantly increased (Figure 7B). IL-12/23p40 was also induced

by the infection (Figure 7C). The previous association of piglets with BB12 significantly suppressed this increase.

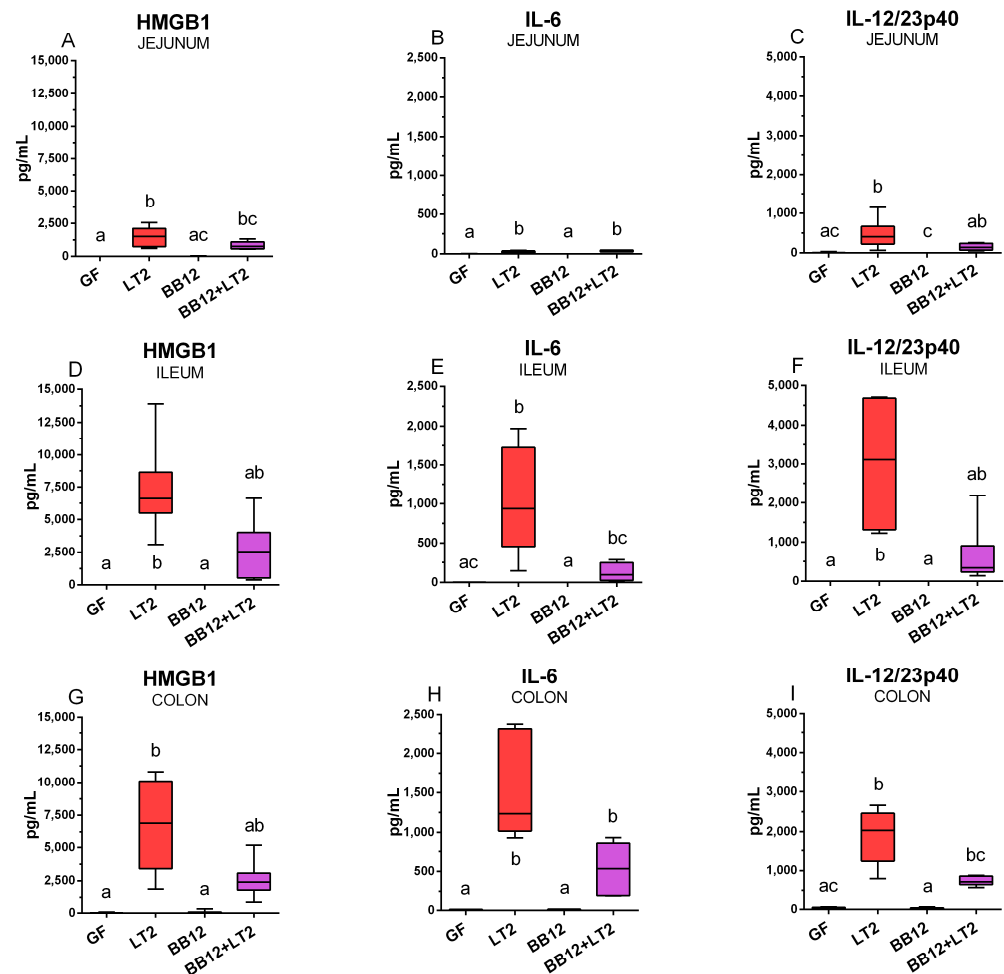


Figure 7. Abundance of HMGB1 (A,D,G), IL-6 (B,E,H), and IL-12/23p40 (C,F,I) proteins in the jejunum (A–C), ileum (D–F), and colon (G–I) of the one-week-old piglets: germ-free (GF), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2). Six samples from each group were analyzed, and statistical differences were calculated by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison post hoc test. The values are presented as boxes and whiskers indicating the lower and upper quartiles, the central line is the median, and the ends of the whiskers depict the minimal and maximal values. A $p < 0.05$ among groups is denoted with different letters around the columns.

In the ileum, HMGB1 levels showed a similar trend as in the jejunum; that is, they were significantly induced in the LT2 group and previously associated with BB12 non-significantly reduced this increase (Figure 7D). The IL-6 levels in the ileum were upregulated by the *Salmonella* infection, but suppression by the previous association with BB12 resulted in a non-significant increase against the control GF group (Figure 7E). At the same time, the suppression was not statistically significant compared to that of the LT2 group. A similar trend of induction/suppression in the ileum was also found in IL-12/23p40 group (Figure 7F).

As was observed in the jejunum and ileum, HMGB1 BB12 suppressed HMGB1 concentrations in the colon (Figure 7G), but the difference was not statistically significant. IL-6 levels were significantly induced by the infection with *Salmonella* (Figure 7H). The previously applied BB12 non-significantly suppressed IL-12/23p40 levels in the colon (Figure 7I).

All biomarkers showed low levels in the jejunum (Figure 7A–C). They were highly increased in the ileum (Figure 7D–F) and colon (Figure 7G–I) of both LT2-infected groups, and these values were comparable in both organs. The same ratio of the y -axis in individual biomarkers was used to clearly depict this trend throughout the intestine.

2.9. HMGB, IL-6, and IL-12/23p40 in Plasma

The levels of plasmatic HMGB1 (Figure 8A), IL-6 (Figure 8B), and IL-12/23p40 (Figure 8C) reflect the situation in the intestine. It means that *Salmonella* induced these levels, and the previous association with BB12 suppressed them, but this suppression was not statistically significant.

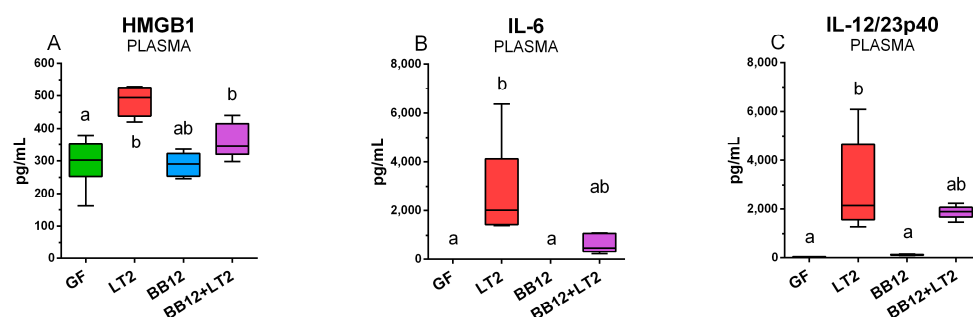


Figure 8. Plasma concentrations of HMGB1 (A), IL-6 (B) and IL-12/23p40 (C) proteins of one-week-old piglets: germ-free (GF), infected with *S. Typhimurium* LT2 for 24 h (LT2), associated with *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 (BB12), and associated with BB12 and infected with LT2 for 24 h (BB12 + LT2). Six samples in each group were analyzed and statistical differences were calculated by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison post hoc test. The values are presented as boxes and whiskers indicating the lower and upper quartiles, the central line is the median, and the ends of the whiskers depict the minimal and maximal values. A $p < 0.05$ among groups is denoted with different letters around the columns.

3. Discussion

3.1. Animal Models of Immunocompromised Host and Probiotics

Most reports refer to probiotics as beneficial and safe for preterm infants [23]. However, it is necessary to consider that preterm neonates have underdeveloped immune systems and compromised intestinal barrier integrity [30]. It simplifies bacterial translocation, and these infants are at increased risk of probiotic-caused sepsis [31]. The experimental work with human volunteers is limited [32], and neither two-dimensional (2D) nor three-dimensional (3D; organoids) cell culture systems [33] sufficiently simulate a complex reaction of the whole organism. Thus, suitable translational animal models play a vital role in human disease research [34–37].

3.2. Gnotobiotic Piglet Translational Model

The similarities in anatomy, physiology, genetics, immunology [38], and microbiome composition [39,40] predestine pigs as animal models of human diseases. Pig translational models are used for studies in nutrition and gastroenterology [41], infectious diseases [42], and sepsis [35]. The potential of the pig as an organ donor for humans deepens the attraction of this animal model [43]. Several research groups studied bacterial translocation and sepsis [44–47], the ontogeny of innate [29,45] and adaptive [48,49] immunity, and NEC [36,50,51] on preterm piglets.

In our experiments, we infected the one-week-old preterm GF piglets with *S. Typhimurium* strain LT2 for 24 h [46]. This *Salmonella* strain was avirulent for one-week-old conventional (CV) piglets [52] but lethal for term GF piglets, which died 36–48 h post-infection [53]. Thus, its virulence is influenced by the presence of a microbiota and, expectedly, also the microbiome composition. Moreover, the virulence of the *S. Typhimurium*

serovars for the GF piglets depends on the form completeness of its LPS. For example, Gram-negative bacteria secrete smooth LPS chemotype (S-LPS), which is more virulent than rough (R-LPS) chemotype mutants [47,53]. Colonization resistance, presence of maternal immunoglobulins and immune cells [54], and stimulation of innate immunity [55] in the CV piglets are probably responsible for their resistance to LT2 infection [9,13,29,34,52,56,57].

3.3. Intestinal Barrier

A single epithelial cell layer creates a specific barrier between the bacteria-rich intestinal lumen and the host's organism. Adjacent enterocytes are joined in their apical part with tight junction proteins, e.g., claudins and occludin, and create a semipermeable interface that protects the host against penetration of harmful dietary antigens and invading pathogens and their toxins [58]. The epithelial layer is covered with mucin composed of a lumen-oriented movable upper layer and an enterocyte-touched fixed lower layer [59]. The disruption of the mucus layer causes intestinal inflammation and facilitates bacterial translocation [60,61]. Mucins are produced and secreted from goblet cells which are specialized enterocytes and colonocytes in the small intestine and colon, respectively [58]. The main intestinal mucin in humans and mice is acid mucin 2 (MUC2) [59]. An impaired MUC2 synthesis predisposed preterm CV piglets to develop necrotizing enterocolitis [62], and a defect in the production of MUC2 dramatically increased the sensitivity of mice to infection with *S. Typhimurium* [63]. The presence of bacteria stimulates the production of mucin and GF animals show thinner mucin layer compare to CV ones [58].

We measured acid mucin-producing goblet cell density in the ileum and colon of the preterm GN piglets. In our previous study with the term piglets [61], we found that the term GN piglets showed a higher number of goblet cells in the ileum. In the current study, preterm GN piglets had a comparable goblet cell density in the ileum and colon. In contrast, comparable numbers of the acid and neutral mucin-containing goblet cells in the distal small intestine, but lower in the colon, were found in the preterm versus term CV piglets [61,64,65]. Mucin degradation allows for easier penetration of harmful bacteria, and the absence of mucin-degrading activities is a safety criterion for probiotic candidates [63,66].

In previous studies, BB12 alone or in combination with LT2 did not weaken the intestinal barrier or increase bacterial translocation [46], as was shown in mucinolytic *B. boum* RP36 [61]. Thus, we believe that BB12 did not provoke an adverse effect in the ileum of the preterm GN piglets. In the colon of the term GN piglets, which has a higher goblet cell density than the ileum, a negative effect of *Salmonella* was shown without an influence of either *B. boum* strain studied [61]. This significant *Salmonella*-induced downregulation of goblet cell density in the colon was also found in preterm piglets; however, this effect was ameliorated by probiotic BB12, supporting a beneficial effect on the host. Differences in goblet cell count in piglets can also be influenced by the formula used, as was found in formula-fed compared to colostrum-fed CV preterm piglets [62]. In our experiment, all GN piglet groups were fed the same way (Splichalova et al., 2018), excluding the possible effect of the diet.

3.4. Receptors and Biomarkers

TLRs 2, 4, and 9 are commonly classified as Gram-positive (TLR2), Gram-negative (TLR4), and pan-bacteria (TLR9) recognizing receptors [67]. However, they are not narrowly specific to one ligand, but recognize multiple molecular structures of both exogenous PAMPs (e.g., LPS, peptidoglycan, and lipoteichoic acid) and endogenous DAMPs (e.g., HMGB1) [15]. Moreover, HMGB1 is the endogenous ligand of all three TLRs [18]. Thus, the transcription and protein expression of these receptors can be influenced by various exogenous and endogenous stimuli, and their modulation depends on miscellaneous influences, including regulatory feedback [28,67,68].

Gram-positive BB12 alone did not upregulate TLR2 expression in the ileum, colon, and mesenteric lymph nodes. However, Gram-negative LT2 upregulated it in the ileum

and mesenteric lymph nodes and combination with BB12 in all three observed organs. This finding is seemingly controversial. However, TLR2 recognizes shared patterns of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, e.g., lipoproteins [69] and some lipopolysaccharides [67]. Moreover, this signaling pathway uses the CD14 molecule, which is mainly known as a co-receptor of the TLR4/MD-2 signaling pathway [69].

TLR4 was significantly upregulated in all organs of piglets infected with *S. Typhimurium*. The previous association with BB12 alleviated the upregulation in the mesenteric lymph nodes, but not in the intestine. The released LPS is bound to the LPS-binding protein, trapped by the CD14 molecule, and transported to TLR4/MD-2 complex [69]. The activation of the TLR4 pathway depends on the LPS structure and completeness of LPS. LT2 isogenic Δrfa mutants with truncated R-LPS were shown to be less effective in the activation of TLR4/MD-2 signaling pathway and induction of local and systemic inflammatory cytokine levels than wild-type LT2 with S-LPS [53]. While released LPS causes life-threatening endotoxin shock [70], non-typhoidal avirulent *Salmonella* serovars with R-LPS can induce an inflammatory reaction that protects GN piglets against the subsequent infection with S-LPS virulent *S. Typhimurium* [71–73].

TLR4 is only one of the TLRs that use both MyD88 and TRIF adaptor molecules in cell surface and endosomal TLR4 signaling, respectively [67]. MyD88-dependent and TRIF-dependent signaling consequent in different spectrums of produced inflammatory cytokines [13]. Similar profiles of TLR4 and MyD88 in the piglet groups in the ileum and mesenteric lymph nodes attest to MyD88 as the main adaptor molecule mediated inflammatory signaling in the *Salmonella* infection [74]. In contrast, this trend did not appear in the colon, and the downregulation of TRIF in *Salmonella* infection was obvious. Similar trends in preterm groups infected with *S. Typhimurium* were observed in the ileum, colon, and mesenteric lymph nodes in term GN piglets, independent of previous association with pig commensal *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus mucosae*, or probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 [75]. In contrast to direct contact with *Salmonella* and other bacteria with host intestinal tissue, *Salmonella* only translocated to mesenteric lymph nodes in GN piglets associated with mucinolytic *B. boum* [53,61].

3.5. Cytokines

Monocytes/macrophages and neutrophil granulocytes are the first-line sentinel cells of the innate immune response that are early prenatally developed [76–78]. Thus, a broad spectrum of inflammatory mechanisms is available for a non-specific immune response immediately after birth. However, their excessive production is known as a “cytokine storm” [79] and can cause multiple organ dysfunction [80]. Possible discrimination between physiological and pathological levels predetermines inflammatory cytokines as members of sepsis biomarkers [81]. Commonly used interleukins (IL)-8, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α were also found to be valuable markers of enteric infections in GN piglets [82], and higher levels in intestinal tissue and plasma were found in *Salmonella*-infected preterm GN piglets [46]. IL-6 and IL-12/23p40 are other cytokines that go together with IL-8, IL-10, and TNF- α as biomarkers of prenatal and postnatal inflammation [83,84] and neonatal sepsis [85–88].

We found that infection with *Salmonella* excessively upregulated ileal, colonic, and plasma IL-6 and IL-12/23/p40 levels within the acute phase of the immune response. Their excessive levels attest to the deleterious effect of the *Salmonella* infection on the immunocompromised preterm GN piglets. The previous colonization of piglets with BB12 prevented a significant increase in IL-6 and IL-12/23p40 intestinal and plasma levels after infection with *Salmonella* compared to control GF piglets. BB12 ameliorated the cytokine storm [79] and the subsequent multiple dysfunction syndrome as its consequences [80].

3.6. HMGB1 Protein Expression in the Ileum and Its Intestinal and Plasmatic Levels

HMGB1 is a DNA-binding nuclear protein crucial for transcription that orchestrates responses to tissue damage and repair [17]. Released HMGB1 is also an inflammatory

mediator with cytokine activity that emphasizes the production of inflammatory cytokines of intestinal inflammation associated with endotoxemia and NEC [89]. Intestinal HMGB1 was described as an inflammatory bowel disease (IBD) marker in children and a marker of the severity of enteric infections in GN piglets [90]. The part of GN piglets infected with necrotoxicogenic *E. coli* O55 that relatively thrived showed low levels of plasmatic and intestinal HMGB1, but the piglets that suffered from the infection showed highly increased levels [91]. Our present finding confirms HMGB1 participation in a cytokine storm [79] with its detrimental effect in the *Salmonella*-infected GN piglets.

HMGB1 levels can be increased by the active secretion of immune cells or its passive release from necrotic cells [17]. Previously, we showed histopathological changes in the intestine in the *Salmonella*-infected preterm piglets [46]. In this work, we presented changes in the localization of HMGB1 in the enterocytes, justifying that increased levels in the *Salmonella*-infected piglets originated from both its stimulated secretion and necrotic release.

3.7. Conclusions

Exaggerated levels of cytokines within a cytokine storm [79] have systemic effects due to the damage of vital organs [92]. A modification of microbiota and renewal of its balance can be a therapeutic way of preventing or modulation of MOD in sepsis-suffered patients and increasing the ratio of patients that thrive [93]. Mono-associated GN piglets are the first step of bacterial interference studies and their consequences for the immunocompromised host. The GN piglets associated with a defined synthetic microbiota will be the logical next step in our future research.

4. Materials and Methods

4.1. Bacteria

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB-12 (BB12) was isolated from a commercial preparation Biopron Respiron (Valosun, Trinec, Czechia) on modified Wilkins–Chalgren agar (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with soya peptone (5 g/L; Oxoid), mupirocin (100 mg/L), and acetic acid (1 mL/L) in anaerobic jars with AnaeroGen sachets (Oxoid) and incubated at 37 °C for 48 h, as we described elsewhere [46]. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2 (*S. Typhimurium* or LT2) [77] was from a collection of microorganisms from the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences (Novy Hradek, Czechia). It was cultivated on meat-peptone agar slopes (blood agar base; Oxoid) at 37 °C overnight. Then 8 log CFU/mL BB12 and LT2 suspensions in PBS were prepared for application to animals.

4.2. Gnotobiotic Piglets

Preterm miniature germ-free (GF) piglets were derived by hysterectomy on day 104 of pregnancy and reared in fiberglass isolators with a partially heated floor; they were fed 6–7 times per day with cow-milk-based formula. Their microbiological state was tested as described elsewhere [29]. Piglets ($n = 24$) were divided into four groups, with six piglets per group (Figure 9), and orally colonized/infected with BB12 (BB12), LT2 (LT2), and their combination (BB12 + LT2), as we showed (Figure 9) and described previously [46]. The bacteria were orally administered in 5 mL of the milk diet, and the control piglets (GF) received 5 mL of milk without bacteria. At the end of the experiment, the piglets were euthanized by exsanguination via cardiac puncture under isoflurane anesthesia.

4.3. Mucin and Goblet Cells in the Ileum and Colon

Acid mucin-producing cell density per area of the tunica mucosa was assessed as described elsewhere [61]. Briefly, Carnoy's fluid-fixed terminal ileum and colon were dehydrated and embedded in paraffin, and 5 µm cross-sections were stained with Alcian Blue and post-stained with Nuclear Fast Red. The specimens were examined under an Olympus BX 40 microscope with an Olympus Camedia C-2000 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

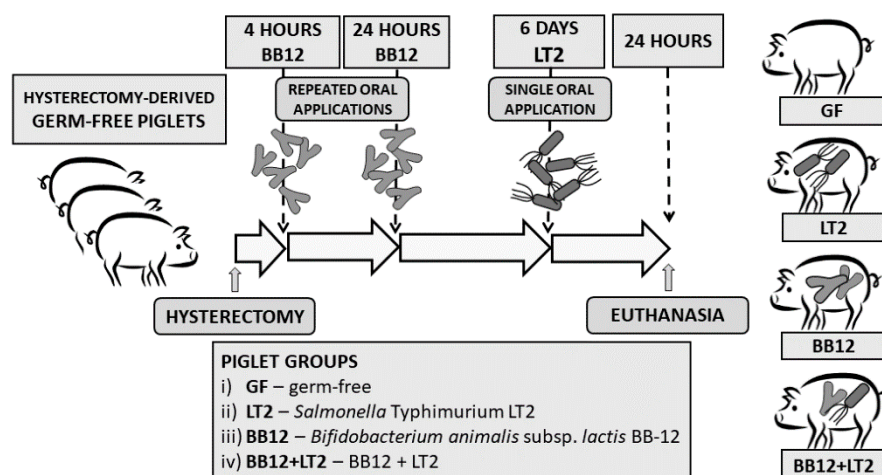


Figure 9. Experiment design. Preterm gnotobiotic piglets ($n = 24$) were assigned into four groups with six piglets per group: (i) germ-free (GF), (ii) infected with *Salmonella* Typhimurium strain LT2 (LT2), (iii) associated with probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12), and (iv) associated with BB12 and infected with LT2 (BB12 + LT2).

4.4. Intestinal Lavage and Blood Plasma

Sections (40 cm) of proximal jejunum and the whole ileum with distal jejunum segments were filled with 2 mL of Dulbecco's PBS (DPBS; TPP, Pasching, Austria), gently kneaded, and rinsed. The colon was cut into small pieces and lavaged in 4 mL of DPBS. The lavages were briefly vortexed and centrifuged at $2500 \times g$ for 30 min at 8°C , and supernatants were filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ filter (Sartorius, Goettingen, Germany). Citrated blood was withdrawn by cardiac puncture and centrifuged at $1200 \times g$ for 10 min at 8°C . A protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was added to the lavage filtrates and plasma, and their aliquots were frozen and stored at -45°C until processing.

4.5. RNA Purification and cDNA Synthesis

The terminal ileum and transverse colon cross-section slices and small pieces of mesenteric lymph nodes were put into RNAlater and stored at -20°C . Later they were moved into the RTL buffer of RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen) and homogenized with 2 mm zirconia beads (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) in TissueLyser LT beadbeater (Qiagen). The total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. A total of 500 ng of total RNA was reverse transcribed by QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). The prepared cDNA was 1/10 diluted by PCR quality water (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and this cDNA template was stored at -25°C till quantitative PCR was performed.

4.6. Real-Time PCR

A total of $2 \mu\text{L}$ of the cDNA template was added into $18 \mu\text{L}$ of the FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostics), with 500 nM each of forward and reverse primers and 100 nM locked nucleic acid (LNA) probe (Universal ProbeLibrary; Roche Diagnostics). The PCR systems for the reference genes β -actin and cyclophilin A, as well as for the genes of interest, TLR2, TLR4, TLR9, MyD88, and TRIF, were listed elsewhere [29]. The PCR amplification was performed in duplicates in 45 cycles (95°C for 15 s and 60°C for 60 s) and run on an iQ cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The evaluation of relative mRNA expression (fold changes) was described elsewhere [46].

4.7. Intestinal and Plasmatic HMGB1 Levels

HMGB1 levels in the intestinal lavages (jejunum, ileum, and colon) and blood plasma were measured by ELISA kit (Abbexa, Cambridge, UK), according to the producer's

instructions. The absorbances were measured at 450 and 620 nm on an RS ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland), and the results were evaluated with Genesis 3 software (Labsystems).

4.8. IL-6 and IL-12/23 p40 in Intestinal Lavage and Blood plasma

Levels of IL-6 and IL-12/23 p40 in the intestinal lavages and plasma were measured by a paramagnetic sphere-based xMAP technology (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) with a Porcine ProcartaPlex kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) on the Bio-Plex Multi Array System (Bio-Rad, Hercules, TX, USA) and evaluated by Bio-Plex Manager 4.01 software (Bio-Rad), as described previously [75].

4.9. Immunochemical Detection of HMGB1 in the Colon

The transverse colon was embedded in Tissue-Tek (Sakura, Tokyo, Japan), immediately frozen in liquid nitrogen vapor-cooled isopentane, and kept at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then $5\text{ }\mu\text{m}$ acetone-fixed cryosections on SuperFrost/Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) were stored at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ until labeling. After the incubation of sections with 5% goat serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at RT, they were labeled by anti-HMGB1 rabbit polyclonal antibodies (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) overnight, at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The sections were incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit F(ab)2 IgG fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2 h at RT. HMGB1 was visualized by AEC substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin (Diapath, Martinengo, Italy). Control sections without primary antibodies were treated in the same way. The sections were examined under an Olympus BX 40 microscope with Olympus Camedia C-2000 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan), as described elsewhere [94].

4.10. Statistical Analysis

Normally distributed values were compared with two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post hoc test. Values that did not meet the normal distribution were evaluated with Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparisons post hoc test. The statistical comparisons were performed at $p < 0.05$ by GraphPad 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and significant differences were depicted in figures by a letter system.

Author Contributions: Conceptualization, A.S., S.M.D., Z.S. and I.S.; methodology, A.S., Z.K., M.S., V.N.B. and I.S.; validation, A.S. and I.S.; formal analysis, A.S., Z.K., M.S., K.P., B.V. and I.S.; investigation, A.S., Z.K., V.N.B. and I.S.; resources, A.S. and M.S.; data curation, I.S. and A.S.; writing—original draft preparation, A.S., Z.S., B.V., K.P., M.S., V.N.B. and I.S.; writing—review and editing, A.S., S.M.D., Z.S. and I.S.; visualization, A.S. and I.S.; supervision, I.S.; project administration, A.S.; funding acquisition, A.S. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by grants 13-14736S and 20-03282S of the Czech Science Foundation and the Institutional Research Concept RVO 61388971 of the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the ethical standards defined by the EU legislation on the use of experimental animals (2010/63/EU) and approved by the Animal Care and Use Committee of the Czech Academy of Sciences (protocol 118/2012).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to Jana Machova, Hana Sychrovská, and Jarmila Jarkovská for their excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Walani, S.R. Global Burden of Preterm Birth. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **2020**, *150*, 31–33. [[CrossRef](#)]
2. Humberg, A.; Fortmann, I.; Siller, B.; Kopp, M.V.; Herting, E.; Göpel, W.; Härtel, C. German Neonatal Network, German Center for Lung Research and Priming Immunity at the beginning of life (PRIMAL) Consortium Preterm Birth and Sustained Inflammation: Consequences for the Neonate. *Semin. Immunopathol.* **2020**, *42*, 451–468. [[CrossRef](#)]
3. Goldstein, R.F.; Malcolm, W.F. Care of the Neonatal Intensive Care Unit Graduate after Discharge. *Pediatr. Clin. North Am.* **2019**, *66*, 489–508. [[CrossRef](#)]
4. Da Fonseca, E.B.; Damião, R.; Moreira, D.A. Preterm Birth Prevention. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2020**, *69*, 40–49. [[CrossRef](#)]
5. Rutayisire, E.; Huang, K.; Liu, Y.; Tao, F. The Mode of Delivery Affects the Diversity and Colonization Pattern of the Gut Microbiota during the First Year of Infants' Life: A Systematic Review. *BMC Gastroenterol.* **2016**, *16*, 86. [[CrossRef](#)]
6. Wang, J.; Dominguez-Bello, M.G. Microbial Colonization Alters Neonatal Gut Metabolome. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 785–786. [[CrossRef](#)]
7. Nagpal, R.; Kurakawa, T.; Tsuji, H.; Takahashi, T.; Kawashima, K.; Nagata, S.; Nomoto, K.; Yamashiro, Y. Evolution of Gut Bifidobacterium Population in Healthy Japanese Infants over the First Three Years of Life: A Quantitative Assessment. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10097. [[CrossRef](#)]
8. Akagawa, S.; Tsuji, S.; Onuma, C.; Akagawa, Y.; Yamaguchi, T.; Yamagishi, M.; Yamanouchi, S.; Kimata, T.; Sekiya, S.-I.; Ohashi, A.; et al. Effect of Delivery Mode and Nutrition on Gut Microbiota in Neonates. *Ann. Nutr. Metab.* **2019**, *74*, 132–139. [[CrossRef](#)]
9. Brooks, B.; Firek, B.A.; Miller, C.S.; Sharon, I.; Thomas, B.C.; Baker, R.; Morowitz, M.J.; Banfield, J.F. Microbes in the Neonatal Intensive Care Unit Resemble Those Found in the Gut of Premature Infants. *Microbiome* **2014**, *2*, 1. [[CrossRef](#)]
10. Mueller, N.T.; Differding, M.K.; Østbye, T.; Hoyo, C.; Benjamin-Neelon, S.E. Association of Birth Mode of Delivery with Infant Faecal Microbiota, Potential Pathobionts, and Short Chain Fatty Acids: A Longitudinal Study over the First Year of Life. *BJOG* **2021**, *128*, 1293–1303. [[CrossRef](#)]
11. Fan, Y.; Pedersen, O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 55–71. [[CrossRef](#)]
12. Donovan, S.M. Evolution of the Gut Microbiome in Infancy within an Ecological Context. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2020**, *23*, 223–227. [[CrossRef](#)]
13. Kawai, T.; Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **2011**, *34*, 637–650. [[CrossRef](#)]
14. Gensollen, T.; Iyer, S.S.; Kasper, D.L.; Blumberg, R.S. How Colonization by Microbiota in Early Life Shapes the Immune System. *Science* **2016**, *352*, 539–544. [[CrossRef](#)]
15. Gong, T.; Liu, L.; Jiang, W.; Zhou, R. DAMP-Sensing Receptors in Sterile Inflammation and Inflammatory Diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 95–112. [[CrossRef](#)]
16. Meizlish, M.L.; Franklin, R.A.; Zhou, X.; Medzhitov, R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **2021**, *39*, 557–581. [[CrossRef](#)]
17. Bianchi, M.E.; Crippa, M.P.; Manfredi, A.A.; Mezzapelle, R.; Rovere Querini, P.; Venereau, E. High-Mobility Group Box 1 Protein Orchestrates Responses to Tissue Damage via Inflammation, Innate and Adaptive Immunity, and Tissue Repair. *Immunol. Rev.* **2017**, *280*, 74–82. [[CrossRef](#)]
18. Paudel, Y.N.; Angelopoulou, E.; Piperi, C.; Balasubramaniam, V.R.M.T.; Othman, I.; Shaikh, M.F. Enlightening the Role of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) in Inflammation: Updates on Receptor Signalling. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *858*, 172487. [[CrossRef](#)]
19. Van Best, N.; Trepels-Kottek, S.; Savelkoul, P.; Orlikowsky, T.; Hornef, M.W.; Penders, J. Influence of Probiotic Supplementation on the Developing Microbiota in Human Preterm Neonates. *Gut Microbes* **2020**, *12*, 1826747. [[CrossRef](#)]
20. Samara, J.; Moossavi, S.; Alshaikh, B.; Ortega, V.A.; Pettersen, V.K.; Ferdous, T.; Hoops, S.L.; Soraisham, A.; Vayalunkal, J.; Dersch-Mills, D.; et al. Supplementation with a Probiotic Mixture Accelerates Gut Microbiome Maturation and Reduces Intestinal Inflammation in Extremely Preterm Infants. *Cell Host Microbe* **2022**, *30*, 696–711.e5. [[CrossRef](#)]
21. Plummer, E.L.; Danielewski, J.A.; Garland, S.M.; Su, J.; Jacobs, S.E.; Murray, G.L. The Effect of Probiotic Supplementation on the Gut Microbiota of Preterm Infants. *J. Med. Microbiol.* **2021**, *70*, 001403. [[CrossRef](#)]
22. Lee, E.-S.; Song, E.-J.; Nam, Y.-D.; Lee, S.-Y. Probiotics in Human Health and Disease: From Nutraceuticals to Pharmabiotics. *J. Microbiol.* **2018**, *56*, 773–782. [[CrossRef](#)]
23. O'Brien, C.E.; Meier, A.K.; Cernioglo, K.; Mitchell, R.D.; Casaburi, G.; Frese, S.A.; Henrick, B.M.; Underwood, M.A.; Smilowitz, J.T. Early Probiotic Supplementation with *B. Infantis* in Breastfed Infants Leads to Persistent Colonization at 1 Year. *Pediatr. Res.* **2022**, *91*, 627–636. [[CrossRef](#)]
24. Ducarmon, Q.R.; Zwittink, R.D.; Hornung, B.V.H.; van Schaik, W.; Young, V.B.; Kuijper, E.J. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2019**, *83*, e00007-19. [[CrossRef](#)]
25. Jungersen, M.; Wind, A.; Johansen, E.; Christensen, J.E.; Stuer-Lauridsen, B.; Eskesen, D. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis BB-12(®). *Microorganisms* **2014**, *2*, 92–110. [[CrossRef](#)]
26. Pang, J.; Wang, S.; Wang, Z.; Wu, Y.; Zhang, X.; Pi, Y.; Han, D.; Zhang, S.; Wang, J. Xylo-Oligosaccharide Alleviates Salmonella Induced Inflammation by Stimulating Bifidobacterium Animalis and Inhibiting Salmonella Colonization. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21977. [[CrossRef](#)]

27. Ruff, W.E.; Greiling, T.M.; Kriegel, M.A. Host-Microbiota Interactions in Immune-Mediated Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 521–538. [[CrossRef](#)]
28. Thaïss, C.A.; Zmora, N.; Levy, M.; Elinav, E. The Microbiome and Innate Immunity. *Nature* **2016**, *535*, 65–74. [[CrossRef](#)]
29. Splichalova, A.; Slavikova, V.; Splichalova, Z.; Splichal, I. Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 220. [[CrossRef](#)]
30. Sampah, M.E.S.; Hackam, D.J. Dysregulated Mucosal Immunity and Associated Pathogeneses in Preterm Neonates. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 899. [[CrossRef](#)]
31. Kulkarni, T.; Majarikar, S.; Deshmukh, M.; Ananthan, A.; Balasubramanian, H.; Keil, A.; Patole, S. Probiotic Sepsis in Preterm Neonates—a Systematic Review. *Eur. J. Pediatr.* **2022**, *181*, 2249–2262. [[CrossRef](#)]
32. Wikler, D. Must Research Benefit Human Subjects If It Is to Be Permissible? *J. Med. Ethics* **2017**, *43*, 114–117. [[CrossRef](#)]
33. Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A.F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32*, 266–277. [[CrossRef](#)]
34. Kovler, M.L.; Sodhi, C.P.; Hackam, D.J. Precision-Based Modeling Approaches for Necrotizing Enterocolitis. *Dis. Model. Mech.* **2020**, *13*, dmm044388. [[CrossRef](#)]
35. Rutai, A.; Zsikai, B.; Tallósy, S.P.; Érces, D.; Bizánc, L.; Juhász, L.; Poles, M.Z.; Sóki, J.; Baaity, Z.; Fejes, R.; et al. A Porcine Sepsis Model with Numerical Scoring for Early Prediction of Severity. *Front. Med.* **2022**, *9*, 867796. [[CrossRef](#)]
36. Sangild, P.T.; Siggers, R.H.; Schmidt, M.; Elnif, J.; Bjornvad, C.R.; Thymann, T.; Grondahl, M.L.; Hansen, A.K.; Jensen, S.K.; Boye, M.; et al. Diet- and Colonization-Dependent Intestinal Dysfunction Predisposes to Necrotizing Enterocolitis in Preterm Pigs. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 1776–1792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nolan, L.S.; Wynn, J.L.; Good, M. Exploring Clinically-Relevant Experimental Models of Neonatal Shock and Necrotizing Enterocolitis. *Shock* **2020**, *53*, 596–604. [[CrossRef](#)]
38. Lunney, J.K.; Van Goor, A.; Walker, K.E.; Hailstock, T.; Franklin, J.; Dai, C. Importance of the Pig as a Human Biomedical Model. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabd5758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)]
40. Xiao, L.; Estellé, J.; Küilerich, P.; Ramayo-Caldas, Y.; Xia, Z.; Feng, Q.; Liang, S.; Pedersen, A.Ø.; Kjeldsen, N.J.; Liu, C.; et al. A Reference Gene Catalogue of the Pig Gut Microbiome. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16161. [[CrossRef](#)]
41. Burrin, D.; Sangild, P.T.; Stoll, B.; Thymann, T.; Buddington, R.; Marini, J.; Olutoye, O.; Shulman, R.J. Translational Advances in Pediatric Nutrition and Gastroenterology: New Insights from Pig Models. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2020**, *8*, 321–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Meurens, F.; Summerfield, A.; Nauwynck, H.; Saif, L.; Gerdtts, V. The Pig: A Model for Human Infectious Diseases. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 50–57. [[CrossRef](#)]
43. Lu, T.; Yang, B.; Wang, R.; Qin, C. Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 3060. [[CrossRef](#)]
44. Bæk, O.; Ren, S.; Brunse, A.; Sangild, P.T.; Nguyen, D.N. Impaired Neonatal Immunity and Infection Resistance Following Fetal Growth Restriction in Preterm Pigs. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nguyen, D.N.; Jiang, P.; Frøkiær, H.; Heegaard, P.M.H.; Thymann, T.; Sangild, P.T. Delayed Development of Systemic Immunity in Preterm Pigs as a Model for Preterm Infants. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Splichalova, A.; Donovan, S.M.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Stranak, Z.; Splichalova, Z.; Splichal, I. Monoassociation of Preterm Germ-Free Piglets with Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis BB-12 and Its Impact on Infection with *Salmonella typhimurium*. *Biomedicines* **2021**, *9*, 183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Splichalova, A.; Splichalova, Z.; Karasova, D.; Rychlik, I.; Trevisi, P.; Sinkora, M.; Splichal, I. Impact of the Lipopolysaccharide Chemotype of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on Virulence in Gnotobiotic Piglets. *Toxins* **2019**, *11*, 534. [[CrossRef](#)]
48. Tlaskalova-Hogenova, H.; Mandel, L.; Trebichavsky, I.; Kovaru, F.; Barot, R.; Sterzl, J. Development of Immune Responses in Early Pig Ontogeny. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1994**, *43*, 135–142. [[CrossRef](#)]
49. Cukrowska, B.; Kozáková, H.; Reháková, Z.; Sinkora, J.; Tlaskalová-Hogenová, H. Specific Antibody and Immunoglobulin Responses after Intestinal Colonization of Germ-Free Piglets with Non-Pathogenic Escherichia Coli O86. *Immunobiology* **2001**, *204*, 425–433. [[CrossRef](#)]
50. Zamora, I.J.; Stoll, B.; Ethun, C.G.; Sheikh, F.; Yu, L.; Burrin, D.G.; Brandt, M.L.; Olutoye, O.O. Low Abdominal NIRS Values and Elevated Plasma Intestinal Fatty Acid-Binding Protein in a Premature Piglet Model of Necrotizing Enterocolitis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Azcarate-Peril, M.A.; Foster, D.M.; Cadenas, M.B.; Stone, M.R.; Jacobi, S.K.; Stauffer, S.H.; Pease, A.; Gookin, J.L. Acute Necrotizing Enterocolitis of Preterm Piglets Is Characterized by Dysbiosis of Ileal Mucosa-Associated Bacteria. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 234–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Clarke, R.C.; Gyles, C.L. Virulence of Wild and Mutant Strains of *Salmonella typhimurium* in Ligated Intestinal Segments of Calves, Pigs, and Rabbits. *Am. J. Vet. Res.* **1987**, *48*, 504–510. [[PubMed](#)]
53. Splichal, I.; Rychlik, I.; Splichalova, I.; Karasova, D.; Splichalova, A. Toll-Like Receptor 4 Signaling in the Ileum and Colon of Gnotobiotic Piglets Infected with *Salmonella typhimurium* or Its Isogenic Δ rfa Mutants. *Toxins* **2020**, *12*, 545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Salmon, H.; Berri, M.; Gerdts, V.; Meurens, F. Humoral and Cellular Factors of Maternal Immunity in Swine. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33*, 384–393. [[CrossRef](#)]
55. Mair, K.H.; Sedlak, C.; Käser, T.; Pasternak, A.; Levast, B.; Gerner, W.; Saalmüller, A.; Summerfield, A.; Gerdts, V.; Wilson, H.L.; et al. The Porcine Innate Immune System: An Update. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *45*, 321–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Masi, A.C.; Stewart, C.J. The Role of the Preterm Intestinal Microbiome in Sepsis and Necrotising Enterocolitis. *Early Hum. Dev.* **2019**, *138*, 104854. [[CrossRef](#)]
57. Hong, C.R.; Han, S.M.; Jaksic, T. Surgical Considerations for Neonates with Necrotizing Enterocolitis. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2018**, *23*, 420–425. [[CrossRef](#)]
58. Allaire, J.M.; Crowley, S.M.; Law, H.T.; Chang, S.-Y.; Ko, H.-J.; Vallance, B.A. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 677–696. [[CrossRef](#)]
59. Linden, S.K.; Sutton, P.; Karlsson, N.G.; Korolik, V.; McGuckin, M.A. Mucins in the Mucosal Barrier to Infection. *Mucosal Immunol.* **2008**, *1*, 183–197. [[CrossRef](#)]
60. Johansson, M.E.V.; Phillipson, M.; Petersson, J.; Velcich, A.; Holm, L.; Hansson, G.C. The Inner of the Two Muc2 Mucin-Dependent Mucus Layers in Colon Is Devoid of Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15064–15069. [[CrossRef](#)]
61. Splichalova, A.; Pechar, R.; Killer, J.; Splichalova, Z.; Bunesova, V.N.; Vlkova, E.; Salmonova, H.S.; Splichal, I. Colonization of Germ-Free Piglets with Mucinolytic and Non-Mucinolytic Bifidobacterium Boum Strains Isolated from the Intestine of Wild Boar and Their Interference with *Salmonella typhimurium*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 2002. [[CrossRef](#)]
62. Puiman, P.J.; Jensen, M.; Stoll, B.; Renes, I.B.; de Bruijn, A.C.J.M.; Dorst, K.; Schierbeek, H.; Schmidt, M.; Boehm, G.; Burrin, D.G.; et al. Intestinal Threonine Utilization for Protein and Mucin Synthesis Is Decreased in Formula-Fed Preterm Pigs. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 1306–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zarepour, M.; Bhullar, K.; Montero, M.; Ma, C.; Huang, T.; Velcich, A.; Xia, L.; Vallance, B.A. The Mucin Muc2 Limits Pathogen Burdens and Epithelial Barrier Dysfunction during *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3672–3683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ren, S.; Hui, Y.; Obelitz-Ryom, K.; Brandt, A.B.; Kot, W.; Nielsen, D.S.; Thymann, T.; Sangild, P.T.; Nguyen, D.N. Neonatal Gut and Immune Maturation Is Determined More by Postnatal Age than by Postconceptional Age in Moderately Preterm Pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2018**, *315*, G855–G867. [[CrossRef](#)]
65. Wrzosek, L.; Miquel, S.; Noordine, M.-L.; Bouet, S.; Joncquel Chevalier-Curt, M.; Robert, V.; Philippe, C.; Bridonneau, C.; Cherbuy, C.; Robbe-Masselot, C.; et al. Bacteroides Thetaiotaomicron and Faecalibacterium Prausnitzii Influence the Production of Mucus Glycans and the Development of Goblet Cells in the Colonic Epithelium of a Gnotobiotic Model Rodent. *BMC Biol.* **2013**, *11*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Abe, F.; Muto, M.; Yaeshima, T.; Iwatsuki, K.; Aihara, H.; Ohashi, Y.; Fujisawa, T. Safety Evaluation of Probiotic Bifidobacteria by Analysis of Mucin Degradation Activity and Translocation Ability. *Anaerobe* **2010**, *16*, 131–136. [[CrossRef](#)]
67. Takeda, K.; Akira, S. Toll-like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Seumen, C.H.T.; Tomasiunaite, U.; Legler, D.F.; Hauck, C.R. Elimination of Negative Feedback in TLR Signalling Allows Rapid and Hypersensitive Detection of Microbial Contaminants. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 24414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Takeda, K.; Akira, S. Toll-like Receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *109*, 14.12.1–14.12.10. [[CrossRef](#)]
70. Galanos, C.; Freudenberg, M.A. Mechanisms of Endotoxin Shock and Endotoxin Hypersensitivity. *Immunobiology* **1993**, *187*, 346–356. [[CrossRef](#)]
71. Splichal, I.; Trebichavský, I.; Splíchalová, A.; Barrow, P.A. Protection of Gnotobiotic Pigs against *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium by Rough Mutant of the Same Serotype Is Accompanied by the Change of Local and Systemic Cytokine Response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2005**, *103*, 155–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Foster, N.; Lovell, M.A.; Marston, K.L.; Hulme, S.D.; Frost, A.J.; Bland, P.; Barrow, P.A. Rapid Protection of Gnotobiotic Pigs against Experimental Salmonellosis Following Induction of Polymorphonuclear Leukocytes by Avirulent *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 2182–2191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Foster, N.; Richards, L.; Higgins, J.; Kanellos, T.; Barrow, P. Oral Vaccination with a Rough Attenuated Mutant of *S. Infantis* Increases Post-Wean Weight Gain and Prevents Clinical Signs of Salmonellosis in *S. Typhimurium* Challenged Pigs. *Res. Vet. Sci.* **2016**, *104*, 152–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Talbot, S.; Töttemeyer, S.; Yamamoto, M.; Akira, S.; Hughes, K.; Gray, D.; Barr, T.; Mastroeni, P.; Maskell, D.J.; Bryant, C.E. Toll-like Receptor 4 Signalling through MyD88 Is Essential to Control *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection, but Not for the Initiation of Bacterial Clearance. *Immunology* **2009**, *128*, 472–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Splichal, I.; Donovan, S.M.; Jenistova, V.; Splichalova, I.; Salmonova, H.; Vlkova, E.; Neuzil Bunesova, V.; Sinkora, M.; Killer, J.; Skrivanova, E.; et al. High Mobility Group Box 1 and TLR4 Signaling Pathway in Gnotobiotic Piglets Colonized/Infected with *L. amylovorus*, *L. mucosae*, *E. coli* Nissle 1917 and *S. typhimurium*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6294. [[CrossRef](#)]
76. Commins, S.P.; Borish, L.; Steinke, J.W. Immunologic Messenger Molecules: Cytokines, Interferons, and Chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S53–S72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Trebichavský, I.; Tlaskalová, H.; Cukrowska, B.; Splíchal, I.; Sinkora, J.; Oeháková, Z.; Sinkora, M.; Pospíšil, R.; Kováøù, F.; Charley, B.; et al. Early Ontogeny of Immune Cells and Their Functions in the Fetal Pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *54*, 75–81. [[CrossRef](#)]

78. Reháková, Z.; Trebichavský, I.; Sinkora, J.; Splíchál, I.; Sinkora, M. Early Ontogeny of Monocytes and Macrophages in the Pig. *Physiol. Res.* **1998**, *47*, 357–363.
79. Karki, R.; Kanneganti, T.-D. The “Cytokine Storm”: Molecular Mechanisms and Therapeutic Prospects. *Trends Immunol.* **2021**, *42*, 681–705. [[CrossRef](#)]
80. Mehta, S.; Gill, S.E. Improving Clinical Outcomes in Sepsis and Multiple Organ Dysfunction through Precision Medicine. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *11*, 21–28. [[CrossRef](#)]
81. Barichello, T.; Generoso, J.S.; Singer, M.; Dal-Pizzol, F. Biomarkers for Sepsis: More than Just Fever and Leukocytosis—a Narrative Review. *Crit. Care* **2022**, *26*, 14. [[CrossRef](#)]
82. Splíchál, I.; Splíchálová, A. Experimental Enteric Bacterial Infections in Pigs. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 504–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Revello, R.; Alcaide, M.J.; Dudzik, D.; Abehsera, D.; Bartha, J.L. Differential Amniotic Fluid Cytokine Profile in Women with Chorioamnionitis with and without Funisitis. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* **2016**, *29*, 2161–2165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Weissenbacher, T.; Laubender, R.P.; Witkin, S.S.; Gingelmaier, A.; Schiessl, B.; Kainer, F.; Friese, K.; Jeschke, U.; Dian, D.; Karl, K. Diagnostic Biomarkers of Pro-Inflammatory Immune-Mediated Preterm Birth. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2013**, *287*, 673–685. [[CrossRef](#)]
85. Gude, S.S.; Peddi, N.C.; Vuppapapati, S.; Venu Gopal, S.; Marasandra Ramesh, H.; Gude, S.S. Biomarkers of Neonatal Sepsis: From Being Mere Numbers to Becoming Guiding Diagnostics. *Cureus* **2022**, *14*, e23215. [[CrossRef](#)]
86. Hunter, C.A.; Jones, S.A. IL-6 as a Keystone Cytokine in Health and Disease. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 448–457. [[CrossRef](#)]
87. Castellheim, A.; Thorgersen, E.B.; Hellerud, B.C.; Pharo, A.; Johansen, H.T.; Brosstad, F.; Gaustad, P.; Brun, H.; Fosse, E.; Tønnessen, T.I.; et al. New Biomarkers in an Acute Model of Live Escherichia Coli-Induced Sepsis in Pigs. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *68*, 75–84. [[CrossRef](#)]
88. Nakano, N.; Nishiyama, C.; Kanada, S.; Niwa, Y.; Shimokawa, N.; Ushio, H.; Nishiyama, M.; Okumura, K.; Ogawa, H. Involvement of Mast Cells in IL-12/23 P40 Production Is Essential for Survival from Polymicrobial Infections. *Blood* **2007**, *109*, 4846–4855. [[CrossRef](#)]
89. Zamora, R.; Grishin, A.; Wong, C.; Boyle, P.; Wang, J.; Hackam, D.; Upperman, J.S.; Tracey, K.J.; Ford, H.R. High-Mobility Group Box 1 Protein Is an Inflammatory Mediator in Necrotizing Enterocolitis: Protective Effect of the Macrophage Deactivator Semapimod. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *289*, G643–G652. [[CrossRef](#)]
90. Splíchálová, A.; Splíchál, I.; Chmelarova, P.; Trebichavsky, I. Alarmin HMGB1 Is Released in the Small Intestine of Gnotobiotic Piglets Infected with Enteric Pathogens and Its Level in Plasma Reflects Severity of Sepsis. *J. Clin. Immunol.* **2011**, *31*, 488–497. [[CrossRef](#)]
91. Splíchálová, A.; Splíchál, I. Local and Systemic Occurrences of HMGB1 in Gnotobiotic Piglets Infected with *E. coli* O55 Are Related to Bacterial Translocation and Inflammatory Cytokines. *Cytokine* **2012**, *60*, 597–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Fajgenbaum, D.C.; June, C.H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2255–2273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wei, Y.; Yang, J.; Wang, J.; Yang, Y.; Huang, J.; Gong, H.; Cui, H.; Chen, D. Successful Treatment with Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Multiple Organ Dysfunction Syndrome and Diarrhea Following Severe Sepsis. *Crit. Care* **2016**, *20*, 332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Splíchál, I.; Splíchálová, A. High Mobility Group Box 1 in Pig Amniotic Membrane Experimentally Infected with *E. coli* O55. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.