

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietologie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Izolace a klasifikace kultivovatelných bakterií z tkáně
kolorektálního karcinomu a zánětlivých intestinálních
onemocnění**

Diplomová práce

Nikola Pilařová

Studijní obor: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Killer, Ph. D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Izolace a klasifikace kultivovatelných bakterií z tkáně kolorektálního karcinomu a zánětlivých intestinálních onemocnění" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jiřímu Killerovi, Ph. D. za trpělivost, podnětné poznámky, pomoc a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat celé mé rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě během studia a psaní diplomové práce podporovali v mnoha směrech.

Izolace a klasifikace kultivovatelných bakterií z tkáně kolorektálního karcinomu a zánětlivých intestinálních onemocnění

Souhrn

V posledních letech se stále více zdůrazňuje důležitost mikrobiomu v lidském zdraví a nemoci. Mikrobiom představuje komplexní ekosystém mikroorganismů, včetně bakterií, virů, hub a dalších mikroorganismů, které obývají lidské tělo. Tyto organismy hrají klíčovou roli v udržování rovnováhy v těle a jejich nerovnováha (tzv. dysbióza) může vést k řadě zdravotních problémů. Nicméně každý jedinec je genetickým unikátem a negativní roli mohou hrát různé taxonomické jednotky intestinálních bakterií. Česká republika bohužel patří mezi země s nejvyšší prevalencí kolorektálního karcinomu na světě. Vysoká prevalence u nás byla zjištěna také v případě tzv. idiopatických střevních zánětů.

Cílem práce bylo ze tkání pacientů s kolorektálním karcinomem a IBDs izolovat a klasifikovat prostřednictvím genové 16S rRNA komparativní analýzy co nejširší spektrum bakterií s použitím modifikovaných izolačních a růstových médií a jednoduše porovnat toto spektrum s izoláty zdravých jedinců.

V Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze – Krči bylo operativně odebráno z 8 pacientů (2 s kolorektálním karcinomem, 2 s Crohnovou chorobou, 2 s ulcerózní kolitidou a 2 zdraví jedinci) 22 vzorků intestinální tkáně. Celkově se povedlo izolovat 269 bakteriálních kmenů.

Při porovnávání jednotlivých pacientů s CRC a s IBDs se zdravými jedinci bylo izolováno a klasifikováno také několik shodných bakterií. U CRC např. *Escherichia fergusonii*, *Streptococcus mitis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Shigella flexneri* a *Collinsella aerofaciens*. U CD je to např. *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides Thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Collinsella aerofaciens* a *Clostridium innocuum*. U UC např. *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Collinsella aerofaciens*, *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*, *Phocaeicola dorei*, *Clostridium saccharogumia* a *Collinsella aerofaciens*.

Hypotézu, která konstatuje, že by se intestinální mikrobiota zdravých jedinců měla od jedinců s CRC nebo s IBDs lišit, nemůžeme svým způsobem potvrdit ani vyvrátit. Záleží na individualitě každého jedince a pro určení statisticky relevantního výsledku nebylo poskytnuto větší množství vzorků. Každopádně i v tomto případě jsou dosažené výsledky velice vzácné.

Získané izoláty budou využity pro další experimenty zaměřené především na imunologické parametry, na možné cytotoxické působení (in vitro studie na buněčných liniích Caco 2- buňky aj.) apod. Výskyt izolovaných bakteriálních druhů v kolorektální tkáni by mohl také přinést nové cesty v diagnostice léčbě kolorektálního karcinomu a IBDs a zároveň přispět k lepšímu pochopení vztahu mezi mikrobiomem a lidským zdravím.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, intestinální mikrobiota, idiopatická střevní onemocnění, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida

Isolation and classification of culturable bacteria from colorectal cancer tissue and inflammatory intestinal diseases

Summary

In recent years, the importance of the microbiome in human health and disease has been increasingly emphasized. The microbiome is a complex ecosystem of microorganisms, including bacteria, viruses, fungi and other microorganisms that inhabit the human body. These organisms play a key role in maintaining balance in the body, and an imbalance (called dysbiosis) can lead to a number of health problems. However, each individual is genetically unique and different taxonomic units of intestinal bacteria can play a negative role. Unfortunately, the Czech Republic is one of the countries with the highest prevalence of colorectal cancer in the world. A high prevalence has also been found in the case of so-called idiopathic intestinal inflammation.

The aim of this study was to isolate and classify as wide a spectrum of bacteria as possible from tissues of patients with colorectal cancer and IBDs by means of 16S rRNA gene comparative analysis using modified isolation and growth media and to simply compare this spectrum with isolates from healthy individuals.

At the Institute of Clinical and Experimental Medicine in Prague - Krč, 22 intestinal tissue samples were surgically collected from 8 patients (2 with colorectal cancer, 2 with Crohn's disease, 2 with ulcerative colitis and 2 healthy individuals). In total, we were able to isolate 269 bacterial strains.

Several identical bacteria were also isolated and classified when comparing individual patients with CRC and IBDs with healthy individuals. In CRC, for example, *Escherichia fergusonii*, *Streptococcus mitis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Shigella flexneri* and *Collinsella aerofaciens*. For CD, these include *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Collinsella aerofaciens* and *Clostridium innocuum*. In UC, e.g. *Ruminococcus gnavus*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Collinsella aerofaciens*, *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*, *Phocaeicola dorei*, *Clostridium saccharogumia* and *Collinsella aerofaciens*.

We cannot confirm or refute the hypothesis that the intestinal microbiota of healthy individuals should differ from those with CRC or S IBDs. It depends on the individuality of each individual and a larger number of samples were not provided to determine a statistically significant result. In any case, even in this case, the results obtained are very rare.

The obtained isolates will be used for further experiments, mainly focused on immunological parameters, possible cytotoxic effects (in vitro studies on Caco 2-cell lines, etc.), etc. The occurrence of isolated bacterial species in colorectal tissue could also provide new avenues in the diagnosis of colorectal cancer and IBDs, and contribute to a better understanding of the relationship between the microbiome and human health.

Keywords: colorectal cancer, intestinal microbiota, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, ulcerative colitis

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Kolorektální karcinom	10
3.1.1	Faktory iniciace vzniku	11
3.1.2	Screening	11
3.1.3	Epidemiologie ve světě a v ČR	12
3.1.4	Historie vzniku	12
3.2	Idiopatické střevní záněty	14
3.2.1	Klinické projevy IBDs	15
3.2.2	Epidemiologie ve světě a v ČR	15
3.2.3	Historie onemocnění	16
3.3	Fyziologická mikrobiota intestinálního traktu člověka	17
3.3.1	Tvorba mikrobiomu	17
3.3.2	Skladba IM	18
3.3.3	Základní funkce IM	20
3.4	Narušené složení fyziologické intestinální mikrobioty: dysbióza	21
3.5	Nejvýznamnější patogenní mikrobiální taxony spojované s CRC	22
3.6	Nejvýznamnější patogenní mikrobiální taxony spojované s IBDs	29
3.7	Modulace IM při prevenci, supresi a léčbě CRC a IBDs	32
3.7.1	Probiotika	32
3.7.2	Prebiotika a postbiotika	34
3.7.3	Fekální transplantace	35
3.7.4	Změna dietních návyků	36
3.7.4.1	Základní nutriční složky	37
4	Materiál a metodika	41
4.1	Odběr vzorků	41
4.2	Kultivace a inkubace vzorků	42
4.3	Izolace a klasifikace bakteriálních izolátů	43
5	Výsledky	45
5.1	Bakteriální kmeny izolované z pacientů s kolorektálním karcinomem	45
5.2	Bakteriální kmeny izolované z pacientů s Crohnovou chorobou	49
5.3	Bakteriální kmeny izolované z pacientů s Ulcerózní kolitidou	52
5.4	Bakteriální kmeny izolované ze zdravých jedinců	56
6	Diskuze	59
6.1	Izoláty z tkáně CRC	59
6.2	Izoláty z tkání pacientů s CD	61

6.3	Izoláty z tkání pacientů s UC	63
6.4	Izoláty z tkání zdravých jedinců.....	63
7	Závěr	65
8	Literatura.....	67
9	Seznam obrázků	81
10	Seznam tabulek	82
11	Seznam použitých zkratk a symbolů	83

1 Úvod

Badatelé jako např. Robert Koch či Ilja Mečnikov a po nich řada dalších upozornili na skutečnost, že naše okolí včetně našeho těla není sterilní, ba naopak, je obýváno celou škálou různých mikroorganismů. Ovšem až v posledních 50-70 letech byla prostřednictvím četných výzkumů prokázána značná role vyvážené, nenarušené střevní mikrobioty ve zdraví, homeostáze člověka. Narušení skladby fyziologické mikrobioty intestinálního traktu nazývané dysbióza doprovází téměř veškerá víceméně závažná (nejen) střevní onemocnění. Vzhledem k faktu, že intestinální trakt reprezentuje podstatnou část imunitního systému člověka zahrnující až 70 % imunokompetentních buněk, mohou intestinální onemocnění zásadně ovlivnit aktuální i budoucí zdravotní stav a homeostázu. Mezi taková onemocnění náleží infekční (např. průjmová onemocnění s definovaným virovým či mikrobiálním patogenem), nádorová (kolorektální karcinom) a zánětlivá (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida apod.).

Česká republika bohužel patří mezi země s nejvyšší prevalencí kolorektálního karcinomu na světě. Vysoká prevalence u nás byla zjištěna také v případě tzv. idiopatických střevních zánětů. Příčinné faktory, až na dědičnost v případě specifického nádorového onemocnění, nejsou zcela známy. Spekuluje se kromě již výše zmíněné dědičnosti o nezdravém životním stylu (kouření, strava s dominující složkou v podobě masa a uzenin bez patřičného pohybu), přítomnosti organických či anorganických polutantů ve stravě, vodě a ovzduší, narušení fyziologické mikrobioty ústní dutiny či v neposlední řadě dysbiotický stav intestinálního traktu. Příčiny tohoto nežádoucího stavu jsou mnohdy neznámé. Je charakterizován dominancí potenciálně patogenních gramnegativních bakterií rodu *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Klebsiella*, *Fusobacterium* spolu s některými zástupci grampozitivních rodů *Streptococcus* a *Enterococcus*, a zároveň redukcí grampozitivních zástupců fyziologické mikrobioty (*Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* aj.). Nutno podotknout, že studie zahrnující tyto závěry byly zaměřeny na stolici pacientů a metody sekvencování nové generace (NGS-next generation sequencing). Problematická v tomto ohledu je analýza stolice, nikoli tkáň karcinomu a postižené tkáň v případě idiopatických střevních zánětů. Rovněž diskutabilní jsou výsledky klasifikace bakterií prostřednictvím NGS založené na krátkém fragmentu (200–400 párů bází) genu pro 16S rRNA (ribosomální RNA mále podjednotky ribozomů). Ovšem ještě v současné době enormního nárůstu vědomostí díky pokročilým vědním technikám není jasné, zda za indukci kolorektálního karcinomu či idiopatických střevních zánětů stojí víceméně náhlá změna ve složení intestinální mikrobioty, resp. dysbióza způsobená mnoha faktory (vnitřními i vnějšími), či zda vlastní karcinogeneze naopak nezpůsobuje dysbiózu. Nejpravděpodobnější se ovšem zdá „souhra“ obou faktorů.

Je nezbytné v dané oblasti získat dostatečné penzum dalších znalostí umožňující do budoucna navrhnout cílenou léčbu či preventivní opatření a vhodně zvolit předmět i metody výzkumu. Tedy tkáň kolorektálního karcinomu či idiopatických střevních zánětů namísto vzorků stolice a precizní klasifikaci mikrobiálních (především bakteriálních) kmenů izolovaných pomocí vhodně zvolených růstových médií.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Ekologie mikroorganismů ve tkáni kolorektálního karcinomu a pacientů s IBDs se všemi okolnostmi, zahrnujícími detailní mechanismy negativního působení v souvislosti s iniciací a průběhem závažných intestinálních onemocnění, ovlivněním imunitního systému, zbylých zástupců intestinální mikrobioty spolu s detailní klasifikací druhů včetně potenciálního výskytu nových taxonů působících v postižených tkáních, není dostatečně prozkoumán. Vzhledem k náročnosti kultivace za použitých technik v dosavadních studiích předpokládáme izolaci známých a neznámých škodlivých/potenciálně patogenních bakteriálních taxonů ve tkáni pacientů s kolorektálním karcinomem a IBDs na bázi modifikovaných, fortifikovaných, izolačních a kultivačních médií. Klasifikované izoláty by měly být odlišné od izolátů ze tkáni uzdravených pacientů.

Cílem prezentované práce je ze tkáni pacientů s kolorektálním karcinomem a IBDs izolovat a klasifikovat prostřednictvím genové 16S rRNA komparativní analýzy co nejširší spektrum bakterií s použitím modifikovaných izolačních a růstových médií a jednoduše porovnat toto spektrum s izoláty z uzdravených jedinců. Výsledky by měly prohloubit vědomosti v dané oblasti potenciálně vedoucí k návrhu nových strategií modulace intestinální mikrobioty při prevenci, supresi a léčbě těchto velmi závažných intestinálních onemocnění.

3 Literární rešerše

3.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) je zhoubný nádor vycházející z epiteliálních buněk sliznice tlustého střeva a konečníku. Radíme ho mezi tzv. adenokarcinomy žláзовého původu (Lukáš 2005). Patogenita kolorektálního karcinomu vychází z maligní transformace kolorektálních adenomů, kdy adenomy představují benigní žláзовé předchůdce až 80 % maligních karcinomů. Riziko maligního zvratu závisí na velikosti a histologickém složení polypu. U pacientů trpících ulcerózní kolitidou či Crohnovou chorobou může dojít k dysplastické změně ve sliznici tlustého střeva a tím ke vzniku karcinomu (Chlumská 2000). Pravděpodobnost vývoje se zvyšuje s délkou trvání onemocnění. Po 20 letech ulcerózní kolitidy mělo riziko kolorektálního karcinomu 5 % pacientů a po 25 letech 12 % pacientů. Při onemocnění Crohnovou chorobou je maligní zvrát méně častý než u ulcerózní kolitidy. Rakovina se obvykle vyskytuje v postižené části střeva, ale může se objevit i v jizvách po předchozí operaci (Holubec et al. 2004).

Prvotní změnou epitelu sliznice je fáze nazývaná tzv. „field defekt“ – v překladu ložisko atypické sliznice, která je charakterizována proliferací a odlišnou diferenciací epitelu. Rozdíl nádorových onemocnění tlustého střeva a konečníku spočívá nejen v anatomii, ale liší se také klinicky a biologicky (Chlumská 2000).

Podle anatomické lokalizace je kolorektální karcinom rozdělen do několika oblastí (Abramáhová 2004):

- Oblast tračnicku (značí se C 18)
- Rectosigmoideální oblast (C 19)
- Oblast konečníku (C 20)
- Anální oblast (C 21)

Více než 90 % všech zhoubných nádorů tlustého střeva zastupuje hlenotvorný a tabulární adenokarcinom patřící mezi nejčastěji vyskytující se kolorektální karcinom. Další druhy kolorektálních karcinomů jsou ojedinělé, a ne tak moc časté. V závislosti na makroskopické struktuře se může jednat o karcinom z prstencových buněk, adenoskvamozní či neklasifikovatelný karcinom. Z histologického hlediska můžeme posuzovat stupeň diferenciace, to se nazývá „grading“ nádoru a značí se písmenem G a číslicemi 1–4. Čím je číslice nižší, tím je karcinom méně zhoubný. G 1-2 tedy označuje dobře a středně diferencované nádory. Oproti označení G 3, které nám udává špatně diferencované nádory. Nejhorší možná varianta jsou právě karcinomy s označením G 4, které jsou již nediferencované, vysoce maligní a mají nejhorší prognózu. Až v 80 % lymfogenně metastazují (Jech & Hoch 2004).

Existuje několik forem šíření karcinomu. Může se šířit lokálně, homogenně nebo lymfatickou cestou. U lokálního šíření může docházet k prorůstání karcinomu skrze stěnu střevní sliznice do okolních tkání a také přilehlých orgánů. Homogenní forma šíření se vyznačuje zanášením nádorových buněk do organismu, přičemž metastazuje nejčastěji v játrech a plicích. Lymfatickou formou se rozumí usazení nádorových buněk v lymfatických uzlinách anebo cévách, kde hrozí riziko bujení. Samozřejmě existují i další formy šíření nádoru mezi něž patří např. angioinvaze, neuroinvaze, aj. (Jech & Hoch 2004).

Hereditární (dědičné) či exogenní faktory se také mohou podílet na vzniku kolorektálního karcinomu. Za familiární výskyt karcinomů odpovídají především faktory hereditární. Karcinomy nejčastěji vznikají v oblastech vzestupného tračníku a céka. Za karcinomy v sestupném tračníku, sigmoideu a konečniku jsou odpovědné především exogenní faktory (Holubec et al. 2004).

Hereditární faktory

Dle současných poznatků a studií až 25 % gastrointestinálních nádorů vzniká díky vlivu právě hereditární složky. Existují dva typy dědičného kolorektálního karcinomu, polypózní a nepolypózní dědičný kolorektální karcinom (Lukáš & Žák 2007).

Exogenní faktory

Mezi exogenní faktory patří nadbytek tuku ve stravě, nedostatek vlákniny ve stravě, nevhodná tepelná úprava stravy, také nedostatek vápníku, vitamínů A, C, E a selenu a v neposlední řadě nadměrné vylučování žlučových kyselin do stolice. Dalším exogenním faktorem, který ovlivňuje vznik kolorektálního karcinomu, je kouření a konzumace alkoholu. Všechny tyto exogenní faktory negativně ovlivňují vznik kolorektálního karcinomu (Holubec et al. 2004).

3.1.1 Faktory iniciace vzniku

Faktory iniciace vzniku tohoto onemocnění nejsou zcela objasněny. Jako pravděpodobné se zdají být především pokročilý věk, nezdravý životní styl (především tzv. „western diet“ s převahou konzumace červeného masa, uzenin, balených, smažených potravin, cukrovinek a tučných mléčkárenských potravin, slazených a alkoholických nápojů na úkor zeleniny, ovoce a v nich obsažené vlákniny), nedostatek pohybové aktivity a s tím spojená obezita, diabetes mellitus, genotoxické polutanty v potravě i ovzduší a dědičné genetické zatížení (Perillo et al. 2020). Mezi další rizikové faktory patří pozitivní rodinná anamnéza, nejen kolorektálního karcinomu, ale také pozitivní anamnéza karcinomu vaječníků, prsu či děložního čípku. Idiopatické střevní záněty, ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba je rovněž spojena s vyšším výskytem tohoto onemocnění. Udává se, že na základě dědičnosti se projeví přibližně 3 % kolorektálních karcinomů (Büchler 2017). Osoby, které absolvovaly radioterapeutickou léčbu v oblasti břicha nebo dlouhodobou adrogen-deprivační terapii, či muži, kteří absolvovali léčbu radioterapií pro karcinom prostaty, mají také vyšší riziko získání karcinomu kolorekta (Tomášek 2015).

3.1.2 Screening

Velmi významnou roli v prevenci tohoto nádorového onemocnění má screeningový program kolorektálního karcinomu, který byl zahájen v roce 2009 Ministerstvem zdravotnictví České republiky. Cílem je zachytit nádor v ranném stádiu. Navazuje tak na program pro

screening nádoru prsu a děložního hrdla. Tyto screenings jsou doporučením Rady Evropské unie, kdy zároveň dochází ke sběru dat o preventivních vyšetřeních, diagnostických procedurách a konečné stanovené diagnóze. Tyto data jsou zpřístupněné nejen odborné, ale i laické veřejnosti. Screeningové programy mají zlepšit prognózu onemocnění a zahájit včasnou (levnější) a hlavně účinnější léčbu v počátečním stádiu onemocnění. Tento program je určen osobám starším 50 let, kteří mohou preventivně jednou za 10 let podstoupit primární screeningovou kolonoskopii nebo jednou ročně test okultního krvácení do stolice (Dušek et al. 2022).

3.1.3 Epidemiologie ve světě a v ČR

Celosvětově se jedná o jedno z nejčastěji se vyskytujících rakovinných onemocnění s fatálními důsledky, přičemž např. v USA reprezentuje druhé nejčastější rakovinné bujení způsobující smrt. Přestože celkový hlášený výskyt kolorektálního karcinomu v průběhu let klesá, čísla zůstávají vysoká a kolorektální karcinom představuje nejen pro pacienty, ale také i pro zdravotnické systémy a společnost značnou humanistickou a ekonomickou zátěž (Meester et al. 2019).

Dle statistik z roku 2020 bylo celosvětově diagnostikováno 1 931 590 nádorů kolorekta, z toho 519 820 v Evropě. Za rok 2020 toto rakovinotvorné onemocnění zapříčinilo 935 173 úmrtí (Ferlay et al. 2020).

Na území České republiky bylo dle Českého statistického úřadu za rok 2020 zaznamenáno 3 435 úmrtí z cca 8 000 pacientů diagnostikovaných kolorektálních karcinomem (Český statistický úřad 2021). V ženské populaci je incidence a mortalita o něco nižší než u mužů. Od roku 2005 do roku 2015 prevalence vzrostla o 40 %. Incidence kolorektálního karcinomu se stabilizovala a současně dochází k setrvalému snižování mortality. V ČR bylo v poslední dekádě sledováno snížení mortality o 24 %. Podíl nově diagnostikovaných nádorů kolorekta je stále velmi vysoký. Mezi nejčastější věkovou kategorií nemocných patří starší lidé ve věku 60–79 let (Gregor et al. 2018).

3.1.4 Historie vzniku

Jeden z prvních objevitelů, kdo se začal zajímat a zkoumat (nejen) kolorektální karcinom byl doktor Aldred Warthin. Před více než 100 lety měl podezření na poruchu v rodině postižené ženy, která následně zemřela na rakovinu endometria. Z tohoto důvodu se tomuto případu začal věnovat a v roce 1913 publikoval svou první zprávu dokumentující vzorec gynekologické rakoviny (konkrétně rakoviny endometria) a vzorec rakoviny trávicího traktu – zejména žaludku a tlustého střeva (Classics in oncology 1913). V roce 1971, kdy byly aktualizované studie této rodiny badateli Lynch a Krush, se zjistilo, že porucha je v souladu s tzv. Lynchův syndromem (LS) (Lynch & Krush 1971). U pacientů s LS byl pozorován výrazný 70-80% nadbytek proximálního karcinomu tlustého střeva (Lynch et al. 1977). Bylo zjištěno, že kožní projevy tzv. Muir-Torreova syndromu, jako jsou mazové adenomy a mazové karcinomy, jsou taktéž spojeny s poruchou (Fusaro et al. 1996). Kolorektální karcinomy jsou nejčastější rakoviny spojené s LS. Rakovina endometria byla identifikována jako druhá hlavní rakovina

spojená s LS (Yan 2000). Při současných možnostech detekce a léčby se má za to, že nikdo s LS by neměl zemřít na kolorektální karcinom za předpokladu, že pacient se zvýšeným rizikem byl diagnostikován, má erudovaného lékaře a byl odeslán ke gastroenterologovi nebo chirurgovi, který předepisuje časté (roční) screeningové kolonoskopie zahájené ve věku 25 let (Schlussel et al. 2014).

Knudson svými dvěma hypotézami poskytuje základní informace pro pochopení, jak by geny potlačující nádory mohly ovlivnit propuknutí rakoviny u mladé populace (Knudson & Strong 1972; Knudson 1974). Fearon & Vogelstein nám ukázali, že u některých druhů rakoviny je počátečním krokem v karcinogenezi mutování adenomatózního polypózního coli genu (Fearon & Vogelstein 1990). Mutace v adenomatózním polypózním coli genu jsou zodpovědné za syndrom, původně uznaného ve 30. letech 20. století, nesoucí název autozomálně dominantní familiární těžká polypóza. V současnosti je známá jako familiární adenomatózní polypóza (Dukes 1930; Gardner & Woolf 1952; Bodmer et al. 1987).

Rozšířená historie a získávání informací často vedli k charakterizaci dědičných rakovinových syndromů a k jejich lepšímu pochopení. Poprvé bylo možné předpovědět fenotypy z genotypu, který poskytuje cenné informace pro prevenci. Bylo prokázáno, že lokalizace mutací v genu adenomatózní polypóze souvisí s extrakolonickými projevy a také se závažností a věkem propuknutí polypózy (Giardiello et al. 1997). Krátce poté byly potvrzeny extrakolonické karcinomy u LS (Mecklin et al. 1986). Identifikace familiární mutace umožnila presymptomatické genetické testování členů rodiny a otevřela možnost prevence a časného záchytu souvisejících nádorových onemocnění (Schlussel et al. 2014).

V roce 1990 kongres udělil 3 miliardy dolarů projektu „Human Genome Project“, který byl dokončen v roce 2003. Naděje na genomické informace zvýšily možnost nepředvídaných důsledků. Byl zřízen etický, sociální a právní výbor. Technologický pokrok poskytl impuls k novým genetickým objevům. Velké množství dat je nyní dostupné v krátkém čase s malým množstvím DNA. Naše chápání kolorektálního karcinomu stále roste a nyní se odhaduje, že až 10 % populace má známý dědičný syndrom kolorektálního karcinomu. Důležitější je, že existuje 20–30 % případů kolorektálního karcinomu s průkazem familiárního komponentu, ale bez identifikované dědičné genové mutace (Perea et al. 2009). Genetika rozšířila naše chápání somatických dějů tumorigeneze. V poslední době bylo zjištěno, jak může být rakovina způsobena epigenetickou modifikací dědičných i získaných rakovinných genů (Schlussel et al. 2014).

3.2 Idiopatické střevní záněty

Idiopatické střevní záněty (IBDs) jsou zastřešující termín pro skupinu chronických zánětlivých onemocnění neznámé etiologie postihujících gastrointestinální trakt. Chronické IBDs lze rozdělit do dvou hlavních širokých kategorií, ulcerózní kolitidu (UC) a Crohnovu nemoc (CD), klinicky charakterizované recidivující zánětlivé střevní onemocnění s četnými projevy, které často vedou k nepředvídatelnému průběhu onemocnění. Do třetí skupiny řadíme tzv. nespecifické kolitidy, které nelze makroskopicky ani mikroskopicky charakterizovat. Může se taktéž jednat jak o UC, tak i o CD (Lukáš 1998).

UC je zánětlivé chronické onemocnění postihující především sliznici tlustého střeva. Rozsah a závažnost postižení tlustého střeva se liší. Ve své nejomezenější formě může být omezena na distální rektum, zatímco ve své nejběžnější formě je postiženo celé tlusté střevo. U 80 % pacientů se však rozvine onemocnění od rekta po ohyb sleziny a pouze 20 % trpí pankolitidou. Ačkoli etiologie IBDs zůstává nejasná, v poslední době byl učiněn značný pokrok v identifikaci důležitých patofyziologických mechanismů a stále více informací bylo získáváno z nedávných studií epidemiologie, přirozené historie, diagnostiky a léčby (Glassner et al. 2020).

Nespecifické (neklasifikovatelné) kolitidy vykazují mikroskopické i makroskopické nálezy, které jsou typické jak pro Crohnovu chorobu, tak pro ulcerózní kolitidu. Toto označení poprvé použil v roce 1978 A. Price. V současné době se jedná o 10–15 % takových případů, u kterých není možné stanovit jistou diagnózu (Lukáš 1998). Pro neklasifikované kolitidy bývají charakteristické nálezy v tračniku, kde zánět tvoří přeskočené úseky, rektální oblast bývá většinou ušetřena (Lukáš 1998). Onemocnění často mívá těžší průběh, kdy je vyžadován chirurgický zákrok. Při chronickém průběhu onemocnění se větší část kolitid chová jako ulcerózní kolitida a po dlouhodobém sledování a při dostatku klinických i endoskopických informací je možné stanovit diagnózu UC nebo CD. Jen malé množství pacientů nakonec zůstává nezařazeno (Lukáš 1997)

Jak Crohnova choroba, tak ulcerózní kolitida jsou ve většině publikací popsány společně, i když jde o dvě odlišné jednotky onemocnění. Rozdíly mezi oběma chorobami se projevují i v jejich patogenezi (Lukáš 1997). Mikroskopické znaky ulcerózní kolitidy svědčí o počátečních změnách na sliznici tlustého střeva, které se dále projevují jako krevní katarální zánět s tvorbou kryptového abscesu. Naproti tomu u Crohnovy choroby dochází k počátečním změnám lymfoidních folikulů a Peyerových plátů. Otečou, ulcerují a tím vznikají charakteristické aftoidní léze obsahující sarkoidní granulomy (Lukáš 1998). Na vzniku zánětu se podílejí imunopatologické mechanismy kombinované s genetickými a environmentálními faktory (Ambrůzová 2012). Patologická odpověď vede ke ztrátě tolerance k fyziologické flóře střeva. Za poškozením střevní sliznice stojí imunitní reakce IV. typu, kdy tvorba imunitních komplexů je tedy primárně zodpovědná za extraintestinální projevy (Bartůňková & Vernerová 2002). Idiopatický střevní zánět ovlivňuje pacienty v mnoha směrech, jehož nečekaná remise narušuje nemocným schopnost pracovat, plánovat, cestovat, cvičit či vést normální rodinný život (Ďuricová et al. 2018). Navození a udržení remise je proto rozhodující pro zlepšení kvality života těchto pacientů. Léková terapie se vybírá na základě aktivity onemocnění a lokalizace zánětu. Zahrnuje kortikosteroidy, aminosilikáty, antibiotika a imunosupresiva (Lukáš 1997). Průlomem v této problematice jsou samozřejmě bioterapeutika, která obsahují monoklonální protilátky proti prozánětlivým cytokinům, zejména TNF- α (Bortlík et al. 2016).

IBDs jsou považovány za další rizikové faktory pro vznik kolorektálního karcinomu. U 7–14 % lidí s IBDs bylo hlášeno, že se u nich vyvinul kolorektální karcinom po 25 letech tohoto onemocnění. Jedinci s IBDs musí podstoupit více screeningů kolorektálního karcinomu, aby včas odhalili karcinogenezi. Zvýšené riziko kolorektálního karcinomu u IBDs lze přičíst pokračujícímu zánětu a zvýšené permeabilitě v buněčné stěně tlustého střeva. Typickou histologickou (mikroskopickou) lézí ulcerózní kolitidy je absces krypty, při kterém se rozpadá epitel krypty a lumen se plní polymorfonukleárními buňkami. Lamina propria je infiltrována leukocyty. Jak jsou krypty zničeny, normální slizniční architektura se ztrácí a výsledné jizvy se zkracují a mohou zúžit tlusté střevo (Lamichhane et al. 2020).

Styčným bodem v případě obou skupin intestinálních onemocnění je narušená skladba fyziologické mikrobioty (zahrnující bakterie, mikroskopické houby, virové partikule a prvoky: Protozoa), tzv. dysbióza (Dastich et al. 2018).

3.2.1 Klinické projevy IBDs

U pacientů s ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou chorobou dominuje bolest břicha, průjem (i s příměsí krve), únava a ztráta hmotnosti (zejména u Crohnovy choroby). Ačkoli u pacientů s ulcerózní kolitidou dominuje spíše průjem, někteří si mohou stěžovat i na zácpu a rektální spasmy. Také se u nich může objevit horečka, vředy v ústech nebo nevolnost. Lidé trpící Crohnovou chorobou mohou pociťovat taktéž bolest nebo otok kolem konečníku, ať už s výtokem nebo bez něj. U některých pacientů toto onemocnění postihuje i jiné části těla jako otoky kloubů, zanícené oči, kožní bulky nebo vyrážky (Lukáš 1998). Příznaky se liší v závislosti na tom, kde se nemoc v těle nachází a jak závažný je zánět. Časem se onemocnění může zhoršovat či zlepšovat. Mnoho lidí zažije období remise, i když jsou zcela bez příznaků. Cílem léčebné terapie je prodloužit tato období remise a zabránit opakovanému vzplanutí aktivity onemocnění. Při současné lékařské léčbě je průměrná délka života normální (Zbořil 2018).

3.2.2 Epidemiologie ve světě a v ČR

Současná data naznačují, že výskyt IBDs v populaci narůstá. Vyšší výskyt onemocnění je pozorován hlavně ve vyspělých zemích jako je Skandinávie, Spojené království či například západ USA. Na jihu má výskyt IBDs klesající trend (Carbonnel et al. 2009). Obyvatelům měst a vyšším socioekonomickým třídám hrozí zvýšené riziko vzniku IBDs (Lukáš 1998).

Dle Zbořila (2018) prevalence u IBDs, konkrétně u CD, je 18-12 nemocných na 100 obyvatel. U UC se počty o něco liší, kdy se udává prevalence 40-45 pacientů na 100 tisíc obyvatel. V České republice je to o něco nižší číslo, a to pouze 1,7-2 nemocných CD a 3-5 nemocných UC na 100 tisíc obyvatel. První vrchol IBDs byl pozorován u mladší věkové skupiny 20-30 let a druhý vrchol IBDs u pacientů ve věku 50-60 let. Kdyby se hodnoty porovnávaly celosvětově, incidence IBDs by odpovídala 3-10 nových případů onemocnění IBDs na 100 tisíc obyvatel za rok (Zbořil 2018). Vzhledem ke kvalitní dostupné léčbě mortalita není vysoká. Hodnoty mortality se pohybují mezi 0,2-0,4 úmrtí na 100 tisíc obyvatel za rok (Lukáš 1997).

Pacienti s rozsáhlým postižením tenkého střeva před 20. rokem života mají vyšší riziko úmrtí. Jak již bylo zmíněno, rizikovým faktorem je i přítomnost kolorektálního karcinomu (Lukáš 1998). Zajímavé jsou studie imigrace židovské populace, které prokazují důležitost faktorů životního prostředí jako hlavních přispěvatelů k fenotypovým projevům IBDs. 10 Židů, kteří se přistěhovali do Spojených států, měli mnohem vyšší šanci, že se u nich rozvine IBDs než lidé, kteří do Spojených států neemigrovali. K rozvoji onemocnění u imigrantů dochází až po změnách socioekonomických a klimatických podmínek, což naznačuje, že vnější faktory mohou významně ovlivnit nástup onemocnění (Yang et al. 1993).

Častější jsou tzv. familiární faktory. Postižení obou rodičů znamenalo 36% riziko rozvinutí IBDs u potomků. Pokud je postižen pouze jeden rodič, je riziko pro vyvíjející se potomstvo 1,6–7,8 % (Grzybowska-Chlebowczyk et al. 2012). Role genetiky, resp. genetická náchylnost k rozvoji obou onemocnění byla potvrzena ve studii dvojčat. Jednovaječná dvojčata mají téměř identickou genetickou informaci, takže výskyt IBDs u sourozenců podporuje teorii genetického efektu (Lukáš 1998). Histokompatibilní faktory na chromozomu 6 jsou jedním z rizikových faktorů UC. Geny identifikované pro riziko CD jsou IRGM a ATG16L1. Tyto geny jsou důležité pro proces zvaný autofagie (Loddo & Romano 2015). Předmětem výzkumu je také gen IBD1, známý také jako NOD2, který se podílí na tvorbě protizánětlivých cytokinů a antimikrobiálních peptidů (Zbořil 2018). Rizikovým faktorem pro rozvoj IBDs jsou také stravovací návyky. Negativní vliv na vznik onemocnění měla vysoká konzumace rafinovaného cukru a nízká konzumace ovoce a zeleniny. Rizika pro pacienty jsou dlouhá a nepravidelná pracovní doba, stres a špatná hygiena (Lukáš 1997). U CD je nebezpečné zejména kouření, případy UC nebyly prokázány žádné negativní účinky (Thomas et al. 2000). U těchto onemocnění se pojí riziko s infekcemi paramixed virem, *Mycobacterium paratuberculosis* a *Listeria monocytogenes* (Carbonnel et al. 2009). Mezi další rizikové faktory patří kouření, alkohol, drogy, hormonální antikoncepce a špatné duševní zdraví (Lukáš 1998).

3.2.3 Historie onemocnění

Ulcerózní kolitida byla poprvé popsána v roce 1875 dvěma britskými lékaři Wilksem a Moxonem, kteří ji odlišili od průjmových onemocnění způsobených infekčními agens. Zprávy o onemocnění s příznaky podobnými UC pocházejí z doby již před rokem 1875, avšak do tohoto roku ještě nemoc nebyla pojmenována. Crohnova choroba byla poprvé popsána v roce 1932 třemi lékaři – Burrillem Crohnem, Leonem Ginzbergem a Gordonem D. Oppenheimerem. V této době bylo jakékoli onemocnění tenkého střeva považováno za střevní tuberkulózu. Lékaři shromáždili údaje o 14 pacientech vykazujících příznaky křečí v břiše, průjmu, horečky a hubnutí, které nebyly způsobeny tuberkulózou nebo jinými známými nemocemi. Popisují novou jednotku onemocnění, nejprve nazývanou regionální Crohnova choroba a později Crohnova choroba. V letech od objevu zánětlivého onemocnění střev se udělal velký vědecký pokrok, a to zejména v genetice, imunologii a mikrobiologii. Došlo k lepšímu pochopení základních mechanismů podílejících se na IBDs, což vedlo ke stále účinnějšímu vývoji léčebných metod (Ferrante 2007).

3.3 Fyziologická mikrobiota intestinálního traktu člověka

Během posledních 20 let rozsáhlý výzkum lidského mikrobiomu ukázal, že lidské zdraví, i když je silně spjato s naším vlastním genomem, je do značné míry spojeno s mikroby, které žijí v našem těle a na něm (Relman & Falkow 2018). Termín mikrobiota se vztahuje na soubor mikroorganismů přítomných v definovaném prostředí, včetně hub, virů a bakterií. Definovali ji Lederberg a McCray, kteří zdůraznili význam mikroorganismů kolonizujících lidské tělo (Lederberg & McCray 2015). Frič (2010) označuje pojem „střevní mikrobiota“ za ekvivalent dříve používaného pojmu „střevní mikroflóra“, jelikož kořen slova „flóra“ může být zaměňován s rostlinstvím.

Mikrobiom obecně označuje celý biotop, který zahrnuje mikroorganismy, jejich genomy a geny, a okolní podmínky prostředí (Marchesi & Ravel 2015). V lidském těle je gastrointestinální trakt místem nejhustěji osídleným mikroorganismy a je hostitelem asi 40 bilionů mikrobů tvořících více než 1000 druhů, z nichž většina obývá tlusté a tenké střevo (Sendet et al. 2016; Pipek 2019.) Vzhledem k tomu, že představují největší povrchovou plochu pro interakce mezi imunitním systémem hostitele a mikrobiotou tlustého střeva, očekává se, že tyto mikroorganismy budou mít hluboký vliv na lidskou fyziologii a metabolismus (Sears & Garret 2014).

Bylo zjištěno, že vzájemný kontakt mezi střevní mikroflórou a lidským hostitelem je nezbytný pro udržení homeostázy a lidského zdraví. Interakce mezi hostitelem a mikrobiomem je dynamická a řízená velkým množstvím genetických a environmentálních faktorů, jako je věk, geografie, příjem alkoholu nebo drog a strava (Marmol et al. 2017).

3.3.1 Tvorba mikrobiomu

Mikrobiom se začíná tvořit již během nitroděložního vývoje, kdy se plod dostává do styku s bakteriemi přes placentu od matky dítěte. Složení mikrobioty dítěte ovlivňuje též cesta porodu. Při porodu a po narození dochází k masivní kolonizaci (Boženský 2020). Uvádí se, že porod klasickou, tedy vaginální cestou, je pro složení mikrobioty mnohem příznivější. Děti, které se rodí přirozenou cestou mají mnohem rozmanitější intestinální mikrobiotu s převahou laktobacilů a bifidobakterií. Tyto mikroorganismy napomáhají fyziologickému vývoji imunitního systému. Při provedení císařského řezu převažují v mikrobiomu stafylokoky, které se řadí převážně do kožní mikrobioty. Toto nefyziologické osídlení mikroflóry může vést k nepříznivému vývoji imunitního systému. Hrozí zvýšené riziko výskytu atopických onemocnění, alergické rýmy, astmatu, celiakie, nespecifických střevních zánětů, alergické rýmy, dále obezity, poruch chování dítěte nebo nekrotizující enterokolitidy (EFCNI 2018). V České republice se dle údajů císařským řezem narodí přibližně 25 % dětí, přičemž v některých zemích je to až 60 % dětí rodících se císařským řezem (Boženský 2020).

Kojení je dalším velice významným faktorem, který podporuje osídlení střevní mikroflóry prospěšnými mikroorganismy. Děti, jenž matka nemůže kojit, by měly přijímat kojeneckou stravu s probiotiky pro podporu osídlení intestinální mikroflóry správnými mikroorganismy (Gao et al. 2017). Mateřské mléko má vhodné složení, které podporuje

imunitu, chrání dítě před respiračními či střevními infekcemi a taktéž snižuje riziko obezity a diabetu. Pokud matka kojí, měla by dodržovat zdravý životní styl (Kasper 2015).

Aby byl podpořen správný vývoj mikrobiomu, je třeba dodržet několik základních výživových doporučení. Příkrmy by se do stravy dítěte měly začít zařazovat postupně, přibližně od 5. – 7. měsíce věku dítěte. Konzumuje-li dítě již 3 příkrmy denně, je možnost začít do stravy přidávat vodu. Není vhodné podávat kravské mléko, cukr či nepasterizovaný med. Vhodná je suplementace fluoridem a vitamínu K a D. Prvních 1 000 dní, již od početí, je pro tvorbu mikrobioty zásadní, jelikož dochází k vývoji dítěte a jeho dlouhodobého zdraví (EFCNI 2018). K ustálení bakterií ve střevech dochází mezi 1.-3. rokem života. Do této doby se spektrum bakterií střev stále rozšiřuje (Shimizu 2018; Novik & Savich 2020).

3.3.2 Skladba IM

Lidský mikrobiom je definován třemi základními enterotypy (Arumugan et al. 2011):

I – BACTEROIDES, *Parabacteroides* (oba G-: gramnegativní), *Lactobacillus*, Clostridiales: sacharolytická aktivita a fermentace proteinů, pentózo-fosfátová dráha, galaktosidázy, proteázy, hexóزامinidázy

II – PREVOTELLA, *Desulfovibrio*, *Veillonella*, *Escherichia* (všechny G-): mucin degradující, desufurikace mucinů

III – RUMINOCOCCUS, *Akkermansia*, *Clostridium*, *Blautia*, *Lachnospiraceae* – *Roseburia* (všechny G+: grampozitivní): mucin degradující bakterie

Tyto enterotypy nejsou ovlivněny národností hostitele, pohlavím, věkem nebo indexem tělesné hmotnosti (BMI), ale jsou ovlivněny především skladbou stravy. Mezi hlavní vnější faktory řadíme dietu a životní styl (pohyb a prevenci), případně faktory vnitřní, tj. genetické. Dominance *Bacteroides* je typická pro enterotyp I. Enterotyp II byl obohacen především o zástupce rodu *Prevotella* a enterotyp III byl spojen se zástupci rodu *Ruminococcus*. *Prevotella* i *Ruminococcus* se podílejí na rozkladu mucinu (Arumugan et al. 2011).

Enterotypy *Bacteroides* a *Ruminococcus* se vyskytují u jedinců, jejichž strava je bohatá na živočišné bílkoviny a nasycené tuky. Naproti tomu enterotyp *Prevotella* byl spojen se stravou bohatou na sacharidy a jednoduché cukry (Wu et al. 2011).

Adak & Khan (2019) zmiňuje, že každý člověk je kolonizován zhruba 150-170 druhy bakterií. Mezi hlavní kmeny, které sídlí ve střevě, nejčastěji patří *Firmicutes* a *Bacteroides*, které zaujmají asi 80-90 % celkového podílu všech bakterií v intestinálním traktu. Až 50 % bakterií reprezentuje právě kmen *Firmicutes* z třídy *Clostridia*. Zástupci z tohoto kmene jsou dvě grampozitivní čeledě (nikoli gramnegativních zahrnující většinu patogenních bakterií), *Lachnospiraceae*: rody jako *Agathobacter*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Roseburia*) a *Ruminococcaceae*: rody *Butyricoccus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* (Salazar et al. 2017; Choi et al. 2018; Ishiguro et al. 2018; Rinninella et al. 2019). Jsou také často označovány jako *Clostridium* clustery XIVa and IV (Marmol et al. 2017).

Další významní zástupci fyziologické bakteriální mikrobioty člověka náleží kmen *Actinobacteria* s významným rodem probiotickým rodem *Bifidobacterium*. Mezi další bakterie

normálního mikrobiomu patří kmeny *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Streptococci* nebo *Enterobacteriaceae* (Marmol et al. 2017). Rinninella et al. (2019) v následujícím obrázku (Obrázek 1) rozděluje složení střevní mikrobioty dle taxonomického řazení, kdy čtverec zvýrazňuje kmeny Firmicutes a Bacteroides, které tvoří až 90 % střevní mikrobioty.



Obrázek 1: Složení střevní mikrobioty v taxonomickém řazení (Rinninella et al. 2019).

Střevní mikrobiom je vysoce adaptivní a reaguje na změny, ke kterým dochází během lidského života. V průběhu lidské evoluce se stále přirozeně mění. (Coman & Vodnar 2020). Adak a Khan (2019) rozdělili mikroby do dvou skupin. Jednu nazval trvalé jádro a druhou flexibilní část. Například *Escherichia coli* je schopna přežít v lidském střevě, protože je geneticky velmi přizpůsobená a dělí se každých 20 minut (Bischoff 2016). Flexibilitu střevních bakterií činí mikrobiom relativně stabilní. Studie prokázaly, že má potenciál obnovit své původní složení po jeho narušení, tzv. dysbióze (Coman & Vodnar 2020).

Bariéru mezi střevními mikroby a střevem tvoří mucinem potažené střevní epiteliální buňky, které jsou prostředkem komunikace mezi mikrobem a hostitelem (Chang & Kao 2019). Mucinová vrstva, střevní hlen, je modulována střevní mikroflórou (Paone & Cani 2020). Nejvýznamnějšími bakteriemi, které degradují mucin jsou *Akkermansia muciniphila* a *Bacteroides spp.* (DeJong et al. 2020). Přestože je mucin jejich potravou, podpoří rychlost obnovy hlenu a posílí jeho bariéru funkci (Cheng & Xie 2021). K tvorbě mucinu přispívá proces fermentace sacharidů (Choi et al. 2018), z nichž mucin degradující bakterie dodávají pohárkovým buňkám produkujícím mucin energetický substrát (Cheng & Xie 2021).

3.3.3 Základní funkce IM

Střevní mikroflóra má mnoho funkcí, které musí být zajištěny. Mezi základní funkce střevní mikroflóry patří ochrana střevního prostředí proti patogenům či potenciálním patogenům skrze mikrobiální bariéru, motilita a prokrvení střevní stěny, stimulace imunitního střevního systému, redukce bakteriální translokace a produkce vitaminů (Lata & Juránková 2011). Střevní mikroflóra je spojena s játry, centrálním nervovým systémem a plicemi, tzv. „osa střeva-játra“, „osa střeva-mozek“ a „osa střeva-plíce“ (Stavropoulou & Bezirzoglou 2020).

Fyziologická intestinální mikrobiota (IM) přispívá ke zdraví a homeostáze člověka. Zlepšuje metabolické a fyziologické pochody těla. Enzymatická aktivita přispívá k trávení složek potravy, jako jsou polysacharidy a oligosacharidy. Napomáhá konverzi na konečné produkty fermentativních procesů v podobě mastných kyselin s krátkým řetězcem. Kyselina octová, propionová a kyselina máselná slouží jako zdroj vitamínu E pro kolonocyty a vykazuje jiná důležitá působení jako např. inhibici citlivých (na nízké pH) potenciálně patogenních gramnegativních bakterií (Heavey & Rowland 2004). IM dále syntetizuje fyziologicky aktivní látky např. vitamíny řady B a vitamín K, přičemž foláty a biotin napomáhají regulovat proliferaci sliznice tlustého střeva. IM dále zlepšuje sorpci některých makro a mikroelementů v intestinálním traktu, stimuluje a moduluje imunitní systém od narození dítěte (viz probiotické vlastnosti např. bifidobakterií), inhibuje patogenní a potenciálně patogenní mikroorganismy v trávicím traktu (mastné kyseliny, competitive exclusion efekt: vytěsnění z ekologické niky, bakteriociny aj.) a udržuje rovnováhu intestinální mikrobioty takzvané eubiózy.

3.4 Narušené složení fyziologické intestinální mikrobioty: dysbióza

Dysbióza intestinálního traktu doprovází četná onemocnění, především však onemocnění kaudálních částí trávicího traktu včetně kolorektálního karcinomu a IBDs. Ačkoli není jasné, jak dysbióza přispívá ke karcinogenezi tlustého střeva, zdá se, že primárním mechanismem je právě chronický zánět. U pacientů s IBDs byla zpozorována větší pravděpodobnost vzniku kolorektálního karcinomu a s ním spjatá dysbióza, a proto byl mikrobiom považován za jednoho z hlavních podezřelých ve vývoji nebo rozvoji rakoviny tlustého střeva. Tato oblast výzkumu je založena na rozdílech v mikrobiálních profilech mezi pacienty s kolorektálním karcinomem a zdravými jedinci. Ve skutečnosti metody sekvenování nové generace založené na 16S rRNA odhalily obohacení prozánětlivých bakterií, jako je *Fusobacterium*, a nižší počet producentů butyrátu, jako je ochranné *Bifidobacterium* (Perrilo et al. 2020).

Dle Gao et al. 2017 se dysbióza vyznačuje prevalencí gramnegativních, škodlivých, potenciálně patogenních bakterií rodu *Escherichia* (především enterohemoragické, enterotoxické a enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*), *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteroides* (především enterotoxigenní kmeny *B. fragilis*), *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Klebsiella* (především *K. pneumoniae*), *Fusobacterium* (především *F. nucleatum*) a grampozitivních bakterií rodů *Streptococcus* (především *S. gallolyticus*), *Clostridium* (především *C. septicum*), *Gemella*, *Enterococcus* a *Peptostreptococcus* (především *P. anaerobius*). S IBDs a kolorektálním karcinomem je spojována aktivita kmenů kvasinky *Candida albicans* (Ramirez-Garcia et al. 2014).

Převaha nežádoucích gramnegativních bakterií způsobuje trvalou zánětlivou reakci v intestinálním traktu iniciující a podporující tumorigenezi (Wang et al. 2020). Látky, kterými bakterie nepříznivě ovlivňují epiteliální buňky nebo imunitní buňky hostitele, mají cyklomodulační či genotoxické účinky. V epiteliálních buňkách tak může docházet k poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA), akumulaci mutací a nekontrolované proliferaci. Bakteriální produkty se mohou podílet na zabránění dělení imunitních buněk, čímž umožňují sobě i nádorovým buňkám uniknout imunitní reakci. Dalším faktorem, kterým se bakterie mohou úspěšněji podílet na procesu tumorigeneze, je tvorba biofilmů, homogenních nebo heterogenních společenstev mikroorganismů tvořících vyšší struktury obklopené extracelulárními polymery, které vytlačují mikroorganismy z biofilmů a chrání je před nepříznivými podmínkami a imunitou. Bakterie, které mohou ulpívat na různém povrchu, jsou tzv. primární kolonizátory a později se mohou přidat bakterie (sekundární kolonizátory), které by se jinak samy adherovat nemohly. Přítomnost biofilmů mění metabolismus v nádorových tkáních, produkci regulátorů buněčné proliferace a může ovlivnit vývoj a progresi nádoru (Zwinsová et al. 2019).

3.5 Nejvýznamnější patogenní mikrobiální taxony spojované s CRC

Rezidentní bakterie jsou schopny ovlivňovat progresi kolorektálního karcinomu různými mechanismy. Střevní mikroflóra může zahrnovat bakterie, které podporují tvorbu a vývoj kolorektálního karcinomu, stejně jako bakterie, které tyto procesy inhibují (Yang & Jobin 2014). Produkty bakterií *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium septicum*, *Gemella sp.* a kmeny kvasinek druhu *Candida albicans* (Saus et al. 2019) jsou genotoxické a cyklus regulující látky, které narušují genetickou informaci a ovlivňují buněčný cyklus (Zwinsová et al. 2019). Na druhé straně bakterie, které brání progresi karcinogeneze (viz Obrázek 2), jsou z řádu *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (*B. longum*) a *Actinobacteria* (Wang et al. 2012). Bakterie v těchto sériích jsou schopny inhibovat proces tumorigeneze syntetizací prospěšných metabolitů, indukci imunopresivních reakcí a detoxikací potenciálních karcinogenů (Yang & Jobin 2014).

Name	(Potential) Role in CRC Oncogenicity	Mechanism of Action
Proteobacteria, especially the <i>Enterobacteriaceae</i> family	Pro-oncogenic	Opportunistic pathogens, promotion of inflammation
<i>Escherichia coli</i>	Pro-oncogenic	DNA damage by colibactin, induction of a pro-inflammatory environment
Enterotoxigenic <i>Bacteroides fragilis</i> (ETBF)	Pro-oncogenic	Colon cell hyperproliferation by β -catenin pathway activation and IL-8 production
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Pro-oncogenic	Promotion of inflammation, impairment of antitumor immunity, activation of β -catenin pathway, DNA damage
<i>Ruminococcaceae</i> family	Anti-oncogenic	SCFA production
<i>Lachnospiraceae</i> family	Anti-oncogenic	SCFA production
<i>Bifidobacteria</i>	Anti-oncogenic	SCFA production, reduction of pro-inflammatory cytokines, epithelial cell renewal
<i>Lactobacilli</i> , including <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , and <i>L. acidophilus</i>	Anti-oncogenic	SCFA production, reduction of pro-inflammatory cytokines, enhancement of antitumor immunity, epithelial cell renewal
Non-enterotoxigenic <i>Bacteroides fragilis</i> (NTBF)	Anti-oncogenic	Boost of antitumor immunity, amelioration of inflammation by PSA production
<i>Faecalibaculum rodentium</i> and <i>Holdemanella bififormis</i>	Anti-oncogenic	SCFA production
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Anti-oncogenic	SCFA production, regulation of intestinal barrier integrity
<i>Enterococcus faecalis</i>	Anti-oncogenic	Improvement of intestinal inflammation

Obrázek 2: Bakterie ovlivňující kolorektální karcinom (Perillo et al. 2020)

Také například čeleď *Lachnospira*, zahrnující bakterie *Eubacterium hallii*, *Roseburia inulinivorans*, *Coprococcus catus* a *Anaerostipes spp.*, zabraňuje progresi kolorektálního karcinomu. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako je butyrát a propionát jsou produkovány těmito bakteriemi a slouží primárně jako zdroj energie pro buňky tlustého střeva. Butyrát společně s propionátem zabraňuje zánětu ve střevní tkáni tím, že moduluje produkci

prozánětlivých cytokinů a diferenciaci regulačních FOXP3+ T buněk. Zvýšení koncentrace protizánětlivého butyrátu snižuje imunitní odpověď na střevní mikroby. V případě snížení množství butyrátu ve střevě dochází k zánětlivé reakci, která vede k narušení mikrobiální komunity (Louis et al. 2014). Kvalitativní a kvantitativní zastoupení různých mikrobiálních typů hrají zásadní roli v konečném dopadu střevních bakterií na hostitele, v čemž také hraje roli typ dietního substrátu (Kohoutová & Bureš 2013).

Škodlivé účinky gastrointestinálních bakterií na hostitele zahrnují, jak již bylo zmíněno výše, produkci toxinu, aktivaci karcinogenu, karcinogenezi a genotoxickou syntézu. Aktivace mnoha enzymatických systémů bakterií tlustého střeva má na hostitele negativní účinky. Příkladem je beta-glukuronidáza, nejdůležitější indukovatelný enzymatický systém střevních bakterií. Funkcí β -glukuronidázy je hydrolyzovat glukuronidové konjugáty a potenciálně karcinogenní metabolity vznikající v játrech, což vede k jejich uvolňování v tlustém střevě. Aktivita tohoto enzymu byla patrná u lidí, jejichž strava byla bohatá na červené maso a živočišné tuky, naopak fermentovatelná vláknina aktivitu tohoto enzymu snižovala. Aktivita beta-glukuronidázy je typicky zvýšená u pacientů s kolorektálním karcinomem (Kim & Jin 2001). Dalšími bakteriálními enzymy jsou nitrátoreduktáza či nitroreduktáza. Nitráty, které jsou požitý, bývají redukovány nitrátoreduktasou bakteriemi tlustého střeva na ještě toxičtější nitrity. Ty jsou spolu s nitrogenními substancemi z velké části karcinogenní a genotoxické. β -glukosidáza a 7 α -dehydroxyžlučové kyseliny (kyselina chenodeoxycholová a cholová) jsou transformovány na sekundární žlučové kyseliny (kyselina deoxycholová a lithocholová). Také se u nich prokazují kancerogenní a genotoxické účinky a dále napomáhají při selekci antiapoptických buněk. Strava s vysokým obsahem tuku zvyšuje koncentraci žlučových kyselin ve stolici, zatímco vláknina z pšeničných otrub ji snižuje (Kohoutová & Bureš 2013). Přímým důkazem účasti střevních bakterií na patogenezi kolorektálního karcinomu je přítomnost mutageních a genotoxických látek bakteriálního původu v lidské stolici (Stanghellini et al. 2010). Studie na zvířatech potvrdily roli gastrointestinálních bakterií při rozvoji rakoviny (např. při absenci protizánětlivého interleukinu-10 se u myši vyvinul zánět a nádory při kolonizaci tlustého střeva, zatímco trávicí trakt nebyl naopak kolonizován bakteriemi myši). Ukazuje se, že pouze polovina evropské a severoamerické populace jsou exkretory metanu, zatímco 90 % africké populace metan produkuje (Kohoutová & Bureš 2013).

Dle Kohoutové & Burešové (2013) je známo, že patogenní *Citrobacter* nebo *Salmonella* v IM chybí nebo je jejich výskyt v tlustém střevě velmi vzácný. Nicméně tyto bakterie byly detekovány jak v nenádorové sliznici pacientů s kolorektálním karcinomem, tak ve sliznici pacientů s kolorektálním adenomem. Účast *Enterobacteriaceae* na vzniku kolorektálního karcinomu pak lze vysvětlit indukcí asymptomatické, ale chronické zánětlivé reakce a produkcí genotoxinů ovlivňujících DNA ve sliznici tlustého střeva (vedoucí k akumulaci charakteristických mutací – adenom-rakovinová sekvence). Podobná situace byla pozorována u *Helicobacter pylori* během karcinogeneze žaludku. Četné studie zkoumaly vliv jednotlivých bakterií na vznik kolorektálního karcinomu. Druhy *Bacteroides* (zejména *B. fragilis*) produkují metaloproteinázy u pacientů s kolorektálním karcinomem. U zkoumané kontrolní skupiny tomu tak nebylo (Sears et al. 2008). Rod *Prevotella* a *Clostridium*, obzvláště negativní leucinas, která přeměňuje primární žlučové kyseliny na sekundární žlučové kyseliny, je také spojována s kolorektálním karcinomem (dále rod *Lactobacillus* a *Streptococcus bovis* a s nimi nadměrná indukce proliferativní abnormální tvorby krypt tlustého střeva, zvýšené proliferativní

markery a zvýšená produkci IL-8 sliznicí tlustého střeva). Infekce *Clostridium septicum* je vzácná, ale je spojena s 81 % základních malignit a 34 % kolorektálních karcinomů (Kohoutová & Bureš 2013). Ve studii, která byla provedena Marchesi et al. (2011) bylo zjištěno pomocí metody detekce 16S rRNA, že *Streptococcus bovis* a *Clostridium septicum* nejsou detekovatelné u pacientů s kolorektálním karcinomem. Lze však předpokládat, že tyto oportunní patogeny jsou přítomny především v adenomové tkáni a podílejí se na vzniku rakoviny a v samotné nádorové tkáni již být nemusí. *Enterococcus faecalis* je také nežádoucí bakterie, protože produkuje volné radikály kyslíku. Studie na myších prokázala souvislost *Helicobacter hepaticus* a *Citrobacter rodentii* se vznikem kolorektálního karcinomu. Vyšší podíl intraepiteliální *E. coli* se očekává také u pacientů s kolorektálním karcinomem (Kohoutová & Bureš 2013).

Kmeny *Escherichia coli*

Z taxonomického hlediska řadíme *Escherichia coli* (*E. coli*) do bakteriální domény Bacteria, mezi bakterie s gramnegativními buněčnými stěnami, kmen Proteus, třída Gammaproteobacteria, řád Enterobacteriaceae, čeleď Enterobacteriaceae, rod *Escherichia* a druh *Escherichia coli* (Sedláček 2007).

Gramnegativní pohyblivé tyčinky se zaoblenými konci mohou mít vláknitý tvar či tvar kokobacilu. Bakterie mají průměrnou délku 2-3 μm a šířku asi 0,6 μm . Pohybuje se bičíky nebo fimbriemi, které se nacházejí na povrchu buňky (Bednář 2009). Některé *E. coli* jsou nepohyblivé a některé mohou tvořit pouzdra (Zahradnický 1987).

Bakterii poprvé izoloval v roce 1885 rakouský lékař a bakteriolog Theodor von Escherichia, odtud pochází její současný název *Escherichia coli* (Votava 2003). Do rodu *Escherichia* patří i další druhy, např. *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia albertii*, ale tyto druhy jsou u člověka vzácné (Schindler 2010).

E. coli je anaerobní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a je běžným kmenem střevní mikroflóry. Bakterie z tohoto taxonu tvoří méně než 1 % zdravého lidského střevního mikrobiomu. Na druhé straně pacienti s mikrobiotou s kolorektálním karcinomem se vyznačují zvýšeným počtem *E. coli* (Yang & Jobin 2014).

Enteropatogenní bakterie *E. coli* produkuje genotoxin kolibaktin kódovaný polyketid syntázou (Garrett 2019). Kolibaktin způsobuje poškození dvoušroubovice DNA (Louis et al. 2014), což může narušit normální fungování opravného mechanismu DNA (Wang et al. 2012). Schopnost *E. coli* přizpůsobit se novým nepříznivým podmínkám jí umožňuje kolonizovat zanícené tkáně, kde jiné bakterie nemusí být schopny přežít kvůli vysokým hladinám reaktivních forem kyslíku a dusíku. *E. coli* je za takových podmínek schopna vyladit své metabolické funkce, např. může využívat dusičnany při anaerobním dýchání (Yang & Jobin 2014).

Enterotoxigenní kmeny *Bacteroides fragilis*

Bakterie ze skupiny *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) jsou pravidelnou a hojnou součástí fyziologické sedimentace člověka. Tato obligatorně anaerobní gramnegativní bakterie se vyskytuje ve střevě, ústech, nosohltanu, horních cestách dýchacích a pochvě. Hojně kolonizují tlusté a tenké střevo (až 10^{11} bakterií na gram). Tlusté střevo obsahuje velké množství různých mikroorganismů, jejichž hlavním znakem je symbióza. Jsou zodpovědné za rozklad potravin, které naše tělo potřebuje pro energii. *B. fragilis* produkuje endotoxiny a enterotoxiny a je úzce spojena s častou intoxikací těmito typy bakteriálních toxinů. Může způsobit průjmové onemocnění (Julák 2006).

Rod *Bacteroides* je nejčastěji izolovaný z klinických vzorků jako etiologický agens endogenních hnisavých infekcí. Patogenita *B. fragilis* souvisí s jeho sacharidovým pouzdrem, proteiny vnější membrány a produkcí specifických enzymů, včetně nedávno známého enterotoxinu zvaného fragilysin. *B. fragilis* produkující fragilysin, označovaný jako enterotoxigenní *Bacteroides fragilis* (ETBF), je spojován s průjmem u lidí a mladých hospodářských zvířat. Byla nalezena významná korelace mezi přítomností ETBF ve vzorcích stolice pacientů nebo toxinového genu ve vzorcích biopsie tlustého střeva a přítomností aktivního zánětlivého onemocnění střev (Ulger 2006). K indukci zánětlivé reakce dochází prostřednictvím regulační reakce T-buněk, která vede k akumulaci pomocných Th17 buněk, které zesilují prozánětlivou reakci (Sobhani et al. 2011). Kromě toho *B. fragilis* spouští beta-kateninovou signalizaci pro regulaci buněčné proliferace (Saus et al. 2019).

Bylo prokázáno, že ošetření lidských epiteliálních buněk tlustého střeva (HT29/C1) toxinem *Bacteroides fragilis* (BFT) vedlo k časově a koncentračně závislé redistribuci aktinových mikrofilamentů (F-aktin) a také ke zvýšení objemu buněk bez poškození. Tyto změny ve F-aktinu a objemu buněk mohou vést ke změně funkce ve střevním epitelu, což přispívá k patogenezi průjmu u infekce ETBF. Další studie ukázala, že cílem fragilysinu byl buněčný povrchový protein E-cadherin, který je hlavní strukturální složkou zonula adherens a je zodpovědný za adhezi mezi buňkami. Fragilysin způsobující štěpení extracelulární domény E-cadherinu vede k úplné degradaci tohoto proteinu. Po BFT ošetření buněk HT29/C1 se také zjistilo, že ztráta E-cadherinu asociovaného s membránou spustila jadernou lokalizaci β -kateninu, který zase po vazbě s transkripčními aktivátory závislými na faktoru T-buněk indukoval c-myc transkripce a translace, což vede k trvalé buněčné proliferaci (Ulger 2006).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) je gramnegativní nepohyblivá zapouzdřená fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie fermentující laktózu, která se nachází v normální flóře úst, kůže a střev (Antonic et al. 2013). Nejčastěji je spojena s pneumonií a je častou příčinou infekcí v močových a dolních žlučových cestách. Také se může vyskytovat v místech operačních ran. Pyogenní jaterní absces (PJA) je způsoben bakteriemi v závislosti na geografických datech. Nejčastěji izolovanými bakteriemi z pyogenních jaterních abscesů je *E. coli* pro západní země a *K. pneumoniae* pro země východní. Existuje řada kazuistik ukazujících pozitivní korelaci mezi PJA způsobenou *K. pneumoniae* a kolorektálního

karcinomu. Případová kontrolovaná studie srovnávající výskyt kolorektálního karcinomu u pacientů s kryptogenní PJA byla provedena na 230 pacientech (Jeong et al. 2012). 81 pacientů bylo kategorizováno jako kryptogenní PJA a 37 pacientů podstoupilo kolonoskopii. 77 % pacientů s kolorektálním karcinomem, laterálně se šířícím nádorem, nebo vředy tlustého střeva, bylo pozitivně testováno na *K. pneumonia* ve vzorcích abscesu. Retrospektivní studie byla provedena na 2 294 pacientech, z nichž 1 194 (52 %) mělo infekci *K. pneumoniae*. Během desetiletého období sledování byl kolorektální karcinom diagnostikován u 54 (2,3 %) pacientů. U pacientů s kolorektálním karcinomem byl výskyt 2,68krát vyšší s PJA *K. pneumonia* než bez něj (Antonic et al. 2013).

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*) je gramnegativní anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru běžně vyskytující se ve tkáních pacientů s kolorektálním karcinomem (Castellin et al. 2012). *F. nucleatum* zasahuje do imunitního systému hostitele především tím, že narušuje cytotoxicitu NK buněk a funkci lymfocytů infiltrujících nádor (Garrett 2019). Zvýšené hladiny *F. nucleatum* jsou spojeny se sníženým počtem CD3⁺ T buněk, což také potvrzuje účinky této bakterie na imunitní systém hostitele (Pope et al. 2017). *F. nucleatum* může vyvolat prozánětlivou reakci přímým přilnutím k epiteliálním buňkám a následně invazí do epiteliálních tkání (Kostic et al. 2012). Stejně jako *B. fragilis* je i *C. nucleatum* schopen aktivovat β -catenin signalizaci (Saus et al. 2019).

***Streptococcus* sp.**

Streptococcus gallolyticus (*S. gallolyticus*) je grampozitivní oportunní patogen, který způsobuje bakteriémií a endokarditidu u lidí (Kumar et al. 2017). Na myších modelech bylo bakteriální sondou prokázáno, že *Streptococcus gallolyticus* zvyšuje proliferaci nádorových buněk závislých na β -kateninu. Podobně jako u *F. nucleatum* bylo nedávno prokázáno, že *S. gallolyticus* ovlivňuje mikroprostředí nádoru. Byl pozorován nábor imunitních buněk infiltrujících nádor po expozici *S. gallolyticus*, čímž se vytvořilo imunosupresivní mikroprostředí, které řídí neoplazii. Prozánětlivé stavy, vyznačující se vysokou expresí NF- κ B a IL-8 messenger RNA v tkáních, jsou však také spojeny s pacienty pozitivními na *S. gallolyticus*. Zatímco *S. gallolyticus* přitahuje stále větší pozornost v oblasti asociace mikrobiom–kolorektální karcinom, při studiu interakce hostitel–mikrob je potřeba rozlišení na úrovni poddruhů. Pouze určité poddruhy *S. gallolyticus* byly schopny stimulovat proliferaci hostitelských buněk (Ternes et al. 2020).

Skupina *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*) se v současnosti skládá ze tří členů: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* a *Streptococcus intermedius*. Streptokokové druhy patřící do této skupiny prodělaly několik taxonomických změn. Dříve byli označováni jako skupina „*Streptococcus milleri*“, ale nikdy to nebyl oficiální taxonomický termín. Ačkoli se původně navrhovalo, že by celá skupina měla být považována za jediný druh,

mnohé publikace dokládají přítomnost tří odlišných druhů, což je v současnosti akceptovaný taxonomický status této skupiny (Asam & Spellerberg 2014).

Streptococcus anginosus jsou mikroaerofilní kataláza-negativní grampozitivní koky (Petti & Stratton 2015) a jsou součástí normální flóry lidského gastrointestinálního traktu. Jejich schopnost způsobit abscesy je velmi jedinečná a odlišuje je od ostatních skupin streptokoků. Zatímco asociace streptokokové bakteriémie skupiny D a endokarditidy s kolorektálním karcinomem je dobře prokázána, infekce *S. anginosus* jsou zřídka spojeny s malignitou tlustého střeva. Avšak případ 62letého muže, který se dostavil do nemocnice s únavou a generalizovanými bolestmi břicha, potvrdil souvislost mezi bakteriemi *S. anginosus* a přítomností kolorektálního karcinomu, která byla v literatuře zdůrazněna pouze v několika kazuistikách. Počítačová tomografie břicha odhalila mnohočetné jaterní abscesy a ztlustění rekta. Bylo zjištěno, že na hemokulturách rostou bakterie *S. anginosus*. Kolonoskopie odhalila rektální masu, která byla později potvrzena jako rektální adenokarcinom (Masood et al. 2016).

Clostridium septicum

Clostridium septicum (*C. septicum*) je grampozitivní sporotvorná obligátní anaerobní bakterie. Pro tuto bakterii je výskyt v gastrointestinálním traktu zcela běžný, avšak v případě kolorektálního zánětu se může přemístit a způsobit bakteriémii a plynovou gangrénu. Tyto komplikace mohou vést až ke smrti, a to pouze během 48 hodin (Dahmus et al. 2018). U 71–85 % pacientů se s plynovou gangrénou způsobenou *C. septicum* přidružuje i základní malignita, nejčastěji v tlustém střevě. Většinou se jedná o pokročilé malignity, které se objevují až po významné invazi tumoru, která vytváří kanál pro bakteriální translokaci přes slizniční ulceraci. Až 57 % těchto kolorektálních zhoubných nádorů s přidruženými *C. septicum* se lokalizuje ve slepém střevě (Larsson et al. 1995). To je významně vyšší počet případů ve srovnání s běžnou populací, kde bylo zjištěno, že méně než 20 % případů má původ ve slepém střevě. Slepé střevo, což je nejkyselější část tlustého střeva s pH 5,7, poskytuje vhodné prostředí pro růst této bakterie (Dahmus et al. 2018).

C. septicum neinicuje karcinogenezi, ale má symbiotický vztah s růstem již vyvíjejících se malignit (Dahmus et al. 2018). Hypoxické a nekrotické prostředí podporuje klíčení spor vedoucí k množení organismu. Jak organismus roste, indukuje prostřednictvím svého alfa-toxinu nekrózu, což vede k ulceraci sliznice, která umožňuje hematogenní šíření. V případě *C. septicum* hematologických malignit se často souběžně vyskytuje i neutropenická enterokolitida (Hammond et al. 2014). Ve srovnání se *C. septicum* vyskytuje častěji u leukémie než u lymfomu. Alfa-toxin, nekrotizující cytolyzin tvořící póry, indukuje buněčnou smrt prostřednictvím mitochondriální dysregulace a destrukce buněčné membrány. Způsobuje také trombocytopenii a hemolýzu, což může přispívat ke krvácení nádorových buněk do systémové cirkulace. Histologická analýza *C. septicum* myonekrózy ukazuje nedostatek leukocytů v postižené tkáni v důsledku schopnosti alfa toxinu selektivně indukovat apoptózu neutrofilů, a tak interferovat s imunitní odpovědí (Kennedy et al. 2005). To je prospěšné pro růst organismu, ale také to může hrát roli v růstu nádorů. V závislosti na mikroprostředí nádoru mohou neutrofilové hrát pro nebo protinádorovou roli. V tomto případě je teoreticky možné, že protinádorovým neutrofilům, jako jsou neutrofilové spojené s nádorem N1, je zabráněno

potlačovat růst nádoru v důsledku apoptózy zprostředkované alfa toxinem. S alfatoxinem vytvářejícím mikroprostředí bez leukocytů nedochází k modulaci imunitního systému hyperproliferujících maligních buněk (Dahmus et al. 2018).

***Gemella* sp.**

Do rodu *Gemella* můžeme zařadit pět známých druhů: *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Gemella bergeri*, *Gemella sanguinis* a *Gemella palaticanis*. Všechny kromě posledního jsou oportunní lidské patogeny, které mohou způsobit závažné infekce. *G. palaticanis* byl identifikován pouze u psů (Purcell et al. 2001).

Gemella morbillorum (*G. morbillorum*) je fakultativně anaerobní grampozitivní kok vyskytující se v párech nebo krátkých řetězcích. Je nepohyblivý, netvoří spory a je komenzálním organismem ústní, gastrointestinální a genitourinární sliznice (Singer et al. 2021). Bylo prokázáno, že *Gemella morbillorum* snižuje hladiny IL-12 u orálních infekcí. Kromě toho má schopnost štěpit IgA1, což bakteriím umožňuje vyhnout se ochranným funkcím adaptivních imunitních odpovědí na povrchu sliznic. *G. morbillorum* primárně infikuje imunokompromitované pacienty a lokalizuje se pak v okolí nádorů (Ternes et al. 2020).

Kmeny kvasinek druhu *Candida albicans*

Candida albicans (*C. albicans*) je grampozitivní oportunní houbový patogen, který je zodpovědný za kandidózu u lidských hostitelů. *C. albicans* roste v několika různých morfologických formách, od jednobuněčných pučících kvasinek až po pravé hyfy s paralelními bočními stěnami (Holland et al. 2014).

Candida albicans, kvasinka z říše Funghi, je pomocí enzymu alkoholdehydrogenázy schopna metabolizovat alkohol a další látky, jako jsou sacharidy, na acetaldehyd, který je karcinogenní. Acetaldehyd je schopen vyvolat vývoj nádoru různými cestami. Tento karcinogen se váže na proteiny a DNA, modifikuje jejich strukturu a funkčnost a snižuje antioxidační aktivitu glutathionu, což zvyšuje hladiny reaktivních forem kyslíku v buňce. Tyto změny mohou způsobit nestabilitu genomu, která je spojena s inhibicí apoptotického aparátu a může vést k rozvoji nádoru (Ramirez-Garcia et al. 2014).

Dle studie Starého et al. (2020), která zkoumala 52 pacientů s nově diagnostikovaným adenomem kolorektálního karcinomu, bylo možné pozorovat silné a významné nadměrné zastoupení kvasinky *Candida albicans* (*C. albicans*) z rektálních výtěrů. Stále nové množství důkazů podporuje názor, že *C. albicans* skutečně způsobuje rakoviny u lidí. Přepokládá se, že přítomnost *C. albicans* ve střevě může vyvolat nebo usnadnit některé části sporadických případů kolorektálního karcinomu. Dle Starého et al. (2020) by toto pozorování mělo být silným podnětem k ověření potenciální užitečnosti snadno kultivovatelné kvasinky *C. albicans* jako screeningového markeru pro pacienty s rizikem kolorektálního karcinomu nebo pro pacienty s časným asymptomatickým stádiem kolorektálního karcinomu.

3.6 Nejvýznamnější patogenní mikrobiální taxony spojované s IBDs

V patogenezi IBDs hraje důležitou roli rovnováha mezi prozánětlivými faktory (např. bakterie, bakteriální a potravinové antigeny v lumen střeva) a protizánětlivými faktory (např. slizniční bariéry a hlen), modifikovaná genetickými faktory a faktory prostředí. Důležitou roli hraje slizniční kompartment mikrobioty, přičemž některé kmeny jsou považovány za patogenní (Lata & Juránková 2011). Do patogenních bakterií, které jsou spojovány se vznikem IBDs, jsou zařazeny např. *Fusobacterium* sp., *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Clostridium difficile* (Rajilic-Stojanovic et al. 2013), *Bacteroides vulgatus*, enteroinvazivní *Escherichia coli* (Lata & Juránková 2011) a *Mycobacterium avium* (Golan et al. 2009).

Vzhledem k tomu, že probiotika mohou samozřejmě řadu těchto faktorů ovlivnit, jeví se jejich podávání v této indikaci jako přínosné. První popis účinnosti *Escherichia coli Nissle* pochází z první poloviny minulého století. Pozitivní výsledky byly prokázány zejména u ulcerózní kolitidy, efekt u Crohnovy choroby je zatím nejasný (Lata & Juránková 2011).

V léčbě ulcerózní kolitidy byly publikovány studie především na již zmíněných kmenech *Escherichia coli*. Tato léčba byla opakovaně prokázána jako stejně účinná v udržení remise ve srovnání se zlatým standardem léčby, mesalazinem (Kruis et al. 2004). Podání VSL#3 mělo podobné účinky. Obsahovalo tři druhy *Lactobacillus* sp., tři druhy *Bifidobacterium* sp. a *Streptococcus thermophilus*. Předběžné studie naznačují, že v této indikaci lze úspěšně použít i *Saccharomyces boulardii*. Překvapivě se zdá, že poměrně velká část pacientů s IBDs v praxi užívá probiotika, často však bez konzultace s lékařem a výběru kmenů, u kterých nebyl prokázán vliv na tuto indikaci (Mullard et al. 2010).

Bacteroides vulgatus

Bacteroides vulgatus (*B. vulgatus*) je jednou z nejčastěji izolovaných anaerobních bakterií u pacientů s UC. Má se za to, že tato bakterie může hrát roli i při vzniku UC. Pokus na bezmikrobních morčatech ukázal, že když jim byla podána bakterie *B. vulgatus*, vyvinula se u nich kolitida. Pokud však byla morčata předem ošetřena metronidazolem před podáním *B. vulgatus*, kolitida se nevyskytla (Campieri & Gionchetii 2001). Předpokládá se, že roli může hrát antigen vnější membrány *B. vulgatus*. Dalším možným mechanismem přispívajícím k patogenezi může být produkce sulfátu degradujícího mucin, který může vést k chronickému zánětu v důsledku narušení bariérové funkce epiteliální vrstvy. U pacientů s UC byly hlášeny zvýšené hladiny těchto sulfátů (Lucke et al. 2006).

Fusobacterium varium

Fusobacterium varium (*F. varium*) je gramnegativní bakterie rodu *Fusobacterium*, která je často přítomna ve střevní tkáni pacientů s UC, a proto se předpokládá, že hraje roli ve vývoji UC (Afra et al. 2013). Japonská studie prokázala přítomnost *F. varium* u pacientů s UC. Imunohistochemické testování exsudátů, povrchového hlenu a krypt tlustého střeva odhalilo,

že ze 112 pacientů s UC bylo 45 (40,2 %) z nich pozitivní na přítomnost *F. varium*, zatímco ze 128 zdravých jedinců byla bakterie nalezena pouze u 20 (15,6 %) (Minami et al. 2009).

F. varium napadá hlen a sliznici. Přežívá v kryptách tlustého střeva. Zde produkuje kyselinu máselnou, která je zdrojem energie pro epitelální buňky. V rostoucím množství však působí jako toxin a může vyvolat apoptózu a ložiska zánětu, což může být jednou z příčin ulcerózní kolitidy (Ohkusa et al. 2003).

Kmen Firmicutes

U pacientů s CD byl hlášen snížený počet gram pozitivní *Firmicutes*, zejména třídy *Clostridium*. *Clostridium* spp. fermentuje karboanhydrázu na butyrát, který je nejen zdrojem energie pro střevní buňky, ale má také protizánětlivé vlastnosti, včetně schopnosti snižovat cytokinové reakce. Proto se má za to, že nedostatek bakterií třídy *Clostridium* může být příčinou CD (Grophna et al. 2006). Stejně výsledky prokazuje i studie Joossens et al. (2010), kdy byla srovnávána střevní mikroflóra pacientů s CD, jejich příbuzných a zdravých jedinců. Mezi kmeny *Firmicutes* došlo u pacientů s CD ke snížení *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister invisus* a blíže nespecifikovaných druhů z klastru *Clostridium* XIVa. Naproti tomu u *Ruminococcus* byly zjištěny zvýšené počty.

Enteroinvazivní *Escherichia coli*

Adherentně invazivní gramnegativní *Escherichia coli* (AIEC) je patogen, který byl nalezen ve střevní sliznici pacientů s CD. Průzkum z roku 2004 zjistil, že AIEC byl nalezen ve 21,7 % vzorků sliznice tenkého střeva ve srovnání s 6,2 % u zdravých jedinců. Ve vzorcích tlustého střeva byla AIEC hlášena u 3,7 % pacientů s CD a 1,9 % zdravých jedinců (Darfeuille-Michaud et al 2004). AIEC kolonizuje střevní sliznici adherováním k buňkám epitelu. Následně byly díky makropinóze schopny proniknout do makrofágů, kde se replikovaly a uvolnily velké množství cytokinů. Neustálým narušováním této střevní bariéry jsou schopny vyvolat přetrvávající střevní zánět (Darfeuille-Michaud 2002). V experimentu Sasaki et al. (2007) byl zkoumán mechanismus, kterým AIEC způsobuje CD. Experimenty *in vitro* zjistily, že kmeny *E. coli* izolované od pacientů s IBD vedly ke zvýšené produkci cytokinu TNF- α v makrofázích. Dále zjistili, že tyto patogeny mohou indukovat silnou expresi cytokinu IL-8, ale překvapivě byla produkce IL-8 snížena, když byly epitelální buňky infikovány *E. coli* odebranými ze zanícené tkáně. AIEC mají také negativní účinky na střevní stěnu, kde mohou snížit transepitelální rezistenci, narušit F-aktin a vytěsnit protein ZO1 a E-cadherin, což má za následek dvojnásobné zvýšení permeability střevní stěny.

Helicobacter pylori

Bakterie *Helicobacter* sp. často kolonizují gastrointestinální trakt. Diskutuje se také o možnosti jejich vlivu na rozvoj IBDs. Bylo prokázáno, že *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

indukuje produkci protizánětlivých cytokinů, včetně IL-8. Nelze také vyloučit, že vyšší koncentrace specifických antigenů *H. pylori* mohou přispívat k rozvoji CD (Oliveira et al. 2006). Ve studii pediatrických pacientů analýza PCR zjistila, že 59 % (17 z 29) dětí s Crohnovou chorobou bylo pozitivních na *H. pylori*, ve srovnání s 9 % (1 z 11) zdravých dětí. Sekvenování genu 16S rRNA u 11 ze 17 dětí s CD odhalilo, že nejreprezentativnější byly druhy: *Helicobacter bilis*, *Helicobacter canis* a *Flexispira rappini*. U zbylých šesti dětí byl *H. pylori* zastoupen nejvýše (Man et al. 2008).

Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis

Jedním z bakteriálních druhů, o nichž se předpokládá, že způsobují Crohnovu chorobu, je *Mycobacterium avium* (*M. avium*) subsp. *paratuberculosis*. Tato grampozitivní bakterie je zodpovědná za Johnovu chorobu, která způsobuje zánětlivé onemocnění střev u různých druhů savců a je podobná Crohnově chorobě. Bylo zjištěno, že *M. avium* adhezuje ke sliznici střevního epitelu a migruje na apikální povrch pohárkových buněk, kde napadá a kolonizuje, což způsobuje poškození tkáně a zánět (Golan et al. 2009).

Immunoterapie, chemoterapie a chirurgické zákroky značně zatěžují fyziologické a metabolické pochody v těle pacientů s kolorektálním karcinomem a IBDs, a mnohdy vedou k narušení a dokonce zhoršení (minimálně přechodně) homeostázy a zdraví (Wu et al. 2016). Z těchto důvodů se badatelé snaží hledat alternativní možnosti prevence a profylaxe těchto závažných lidských onemocněních. Ty nejdiskutovanější a nejslibnější představují metody založené na využití pozitivního působení a vlastností tzv. fyziologické bakteriální mikrobioty, tedy metody modulace IM, které jsou zmíněny v následující kapitole (Perillo et al. 2020).

3.7 Modulace IM při prevenci, supresi a léčbě CRC a IBDs

Existuje mnoho terapeutických přístupů k léčbě zánětlivých střevních onemocnění včetně užívání probiotik, prebiotik, postbiotik či synbiotik až po fekální mikrobiální transplantaci (Perrilo et al. 2020). Synbiotika jsou kombinací prebiotik a probiotik. Studie říkají, že synbiotika by mohla být účinná v léčbě akutní i chronické Crohnovy choroby a v udržování ulcerózní kolitidy ve stádiu remise (Aggeletopoulou et al. 2019).

Střevní mikrobiom a s ním spjatý zánět jsou skutečně klíčovými hráči a hlavními regulátory nástupu a progresu kolorektálního karcinomu. World Cancer Research Foundation (Londýn, Velká Británie) a Americký institut pro výzkum rakoviny (Washington DC, USA) považují stravu za jeden z nejdůležitějších exogenních faktorů v etiologii. Dietním úpravám jakožto doplnění konvenční léčby rakoviny se věnuje stále větší a větší pozornost. Složení stravy také určuje dostupnost živin v rakovinou tvorném prostředí. Manipulace s metabolickým prostředím rakovinných buněk výrazně mění jejich metabolickou aktivitu, což vede k posunům v citlivosti na léky, rychlosti proliferace a metabolických požadavcích. Strava také ovlivňuje složení střevní mikroflóry a tím i vliv střevních mikrobů na výše uvedené mechanismy. Změny nejen ve stravě, ale také v používání potravinářských přídatných látek (používaných k prodloužení trvanlivosti zpracovaných potravin) vedly ke značnému posunu v kvalitě potravin a zvýšenému riziku vzniku kolorektálního karcinomu (Perrilo et al. 2020).

3.7.1 Probiotika

Světová zdravotnická organizace (2001) definuje probiotika jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou v dostatečném množství, mají příznivý vliv na zdraví hostitele“ a v posledních letech se hojně využívají k léčbě různých vnitřních onemocnění.

Probiotika jsou nepatogenní mikroorganismy, které při konzumaci pozitivně ovlivňují zdraví nebo fyziologii hostitele. Probiotické mikroorganismy se používají k výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Obvykle se jedná o kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Hronek et al. 2004).

Probiotika se používají při léčbě (např. antibiotiky) nebo po dietních chybách. Upravují mikroflóru narušenou antimikrobiálními látkami tak, aby nedošlo k vymýcení nebo přemnožení některých kmenů (Hronek et al. 2004).

Obecně pozitivně ovlivňují lidský organismus a působí detoxikačně (Hronek et al. 2006). V experimentální studii na potkanech bylo prokázáno, že požívání probiotik je spojeno se změněnými fyzikálně-chemickými podmínkami střev, vazbou a degradací potenciálních karcinogenů a zesílenými imunitními reakcemi. Bakterie produkují látky, které snižují toxické složky (Wollowski et al. 2001).

Pro prevenci a léčbu kolorektálního karcinomu mají pozitivní účinky. Ovlivňují místní mikrobiotu, buňky střevního epitelu a celkově imunitní systém (Perrilo et al. 2020). Dle Ding et al. (2020) výhody probiotik zahrnují mnoho specifických aspektů:

- Mohou podporovat sekreci hlenu, zvýšit expresi pevně se vážících proteinů a chránit střevní bariéru
- Regulují imunitní buňky a cytokiny a snižují zánět střev

- Regulují reaktivní formy kyslíku a snižují poškození střevních epiteliálních buněk
- Snižují aktivitu patogenních enzymů k inhibici působení patogenů
- Hrají klíčovou roli v regulaci proliferace a apoptózy nádorových buněk
- Obnovují rovnováhu střevní flóry a zvyšují homeostázu hostitele

V současnosti se jako probiotika používá několik druhů bakterií, které jsou komerčně dostupné – viz následující obrázek (Perillo et al. 2020).

Brand Name	Strain	Producer
Dicoflor	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	AGPHARMA
Enterogermina	<i>Bacillus clausii</i>	SANOFI
Enterolactis	<i>Lactobacillus casei</i>	SOFAR
Nutriflor	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> DDS-14 <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NUTRIGEA
Probiactiol Duo	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM <i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37 <i>Bifidobacterium lactis</i> Bi-07 <i>Bifidobacterium lactis</i> Bi-04	METAGENETICS
VSL#3	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	FERRING FARMACEUTICI
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	YAKULT (Tokio)

Obrázek 3: Příklady některých komerčně zastoupených probiotik (Perillo et al. 2020)

Lactobacillus acidophilus, který je obsažený v kysaném mléce pomáhá snižovat počet hnilobných bakterií ve střevech. Předpokládá se, že hnilobné bakterie jsou rizikovým faktorem pro rakovinu tlustého střeva a konečníku (Hronek et al. 2004).

Další schopností bakterií mléčného kvašení je vázat metabolity vzniklé při odbourávání tuků. Střevní bakterie dokážou syntetizovat vitamín K a některé vitamíny skupiny B, zvýšit vstřebávání vápníku a snížit hladinu LDL lipoproteinů. Probiotika mohou být konzumována ve zmíněných mléčných výrobcích obsahujících mléčné kultury nebo ve formě doplňků (Hronek et al. 2004).

Jiné kmeny jsou naopak doporučovány pro prevenci a léčbu gastrointestinálních onemocnění (Hronek et al. 2004). Probiotika pomáhají léčit enteritidu, gastroenteritidu a rotavirový průjem. Působením aerobních bakterií vzniká kyselina máselná, která příznivě působí na sliznici tlustého střeva, snižuje toxické účinky nitrosaminů a peroxidu vodíku (Wollowski et al. 2001).

Využití probiotik v léčbě idiopatických střevních zánětů (Crohnova choroba a ulcerózní kolitidu) je zatím relativně nízké. Patogeneze obou onemocnění úzce souvisí s přítomností

střevních bakterií, bez kterých tyto záněty ve střevě neprobíhají, jak bylo prokázáno v bezmikrobních pokusech na zvířatech. Experimentální práce dále naznačují, že idiopatický střevní zánět je výsledkem abnormální imunitní reakce na fyziologickou střevní flóru geneticky náchylných jedinců. Ovšem praktické zkušenosti rozhodně zaostávají za teoretickými očekáváními (Bortlik 2009; Lukáš 2015).

Nicméně jeden z novodobých výzkumů prokázal, že mastné kyseliny s krátkým řetězcem a jejich soli, zejména butyrát sodný, má pozitivní vliv nejen v prevenci IBDs. Butyrát jako takový byl v posledním desetiletí předmětem mnoha studií, od základního výzkumu přes preklinický výzkum až po úroveň klinických studií. Dysbióza u pacientů s IBDs hraje důležitou roli, protože výskyt bakterie *Roseburia inulinivorans* produkující butyrát je výrazně nižší. Bylo prokázáno, že butyrát indukuje apoptózu nebo zabraňuje proliferaci nádorových buněk *in vitro* ovlivněním genové exprese. Metabolity se tvoří z vlákniny a polysacharidů přijímaných z potravy střevními bakteriemi a mají řadu účinků na tělo. Butyrát reguluje tvorbu zánětlivých cytokinů a může tak pozitivně ovlivnit zánětlivé onemocnění střev. Také může zvýšit hostitelskou produkci antimikrobiálních peptidů k obraně proti patogenním mikroorganismům. Účinky butyrátu mají potenciál být v budoucnu využity k prevenci, léčbě nebo zmírnění příznaků diabetu, kardiovaskulárních onemocnění a některých neurodegenerativních a vrozených onemocnění. Podávání butyrátu pacientům se zánětlivým onemocněním střev snižuje příznaky zánětu a zároveň obnovuje integritu slizničního epitelu. V této souvislosti může být butyrát také ochranný proti rozvoji možného neoplastického střevního onemocnění způsobeného chronickým zánětem (Ryšávka et al. 2018).

3.7.2 Prebiotika a postbiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které stimulují růst prospěšných bakterií ve střevech a mají pozitivní vliv na organismus. Jedná se o složku potravy, která je selektivně využívána jako potrava gastrointestinální mikrobiotou, což má za následek sekundární změny v jejím složení nebo aktivitě (Coutts et al. 2020).

Prebiotika se podávají jako doplňky stravy, ale není těžké zajistit jejich přirozený příjem v potravě (Coutts et al. 2020). Jedná se o komplexní sacharidy nacházející se v obilovinách, v ovoci a v zelenině (Salazar et al. 2017), nejčastěji v různých formách jako např. pektin, celulóza a oligosacharidy (Ondriová et al. 2015). Významné jsou v cibuli, endivii, pórků, chřestu, banánech a topinamburu (Coutts et al. 2020). Mezi nestravitelné oligosacharidy s významnými probiotickými účinky patří např. xylo-oligosacharidy, galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS) (Coman & Vodnar 2020), včetně inulinu (Coutts et al. 2020), sacharózy a laktulózy (Ondriová et al. 2015).

Důležitým faktorem je délka podávání prebiotika (Coman & Vodnar 2020). Oligosacharidy jsou nejpoužívanějšími látkami v prebiotických doplňcích stravy (Coutts et al. 2020). Nejčastěji používané jsou na bázi galaktózy, GOS, a na bázi fruktózy, FOS (Adak & Khan 2019). GOS a FOS byly schváleny EU jako bezpečné prebiotické složky potravin, zatímco Úřad pro kontrolu potravin a léčiv je neuznal. Prebiotika GOS a FOS mají také pozitivní účinky na nervový systém (Adak & Khan 2019).

Brady, Gallaher a Busta (2000) porovnávali předchozí studie na zvířatech, aby zjistili přesné informace o prebiotických a probiotických účincích. Probiotika mají inhibiční účinky na prekancerózní léze současně s užíváním prebiotik, ale i bez nich.

Postbiotika jsou faktory vylučované živými bakteriemi nebo uvolňované po lýze bakterií. Postbiotika zahrnují inaktivované mikrobiální buňky, buněčné frakce a buněčné metabolity (Perrilo et al. 2020). Mechanismy účinku postbiotik jsou rozmanité: postbiotika mohou vyvolat apoptózu buněk kolorektálního karcinomu, zabránit translokaci patogenů a obnovit střevní bariéru, regulovat imunitní aktivitu v boji proti zánětu, inhibovat patogenní bakteriální enzymy, vykazovat antimutagenní a antioxidantní účinky, snižovat střevní pH a střední signální dráhy spojené s karcinogenním postupem. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou postbiotika, které jsou hlavními produkty bakteriálních metabolitů vlákniny. Buňky kolorektálního karcinomu mohou používat mastné kyseliny s krátkým řetězcem v procesu aerobní glykolýzy a vykazují na ně zvýšenou citlivost. Butyrát je nejrozšířenější mastná kyselina s krátkým řetězcem vykazující silné protirakovinné vlastnosti tím, že reguluje některé signální dráhy (Gao et al. 2021).

Prebiotika a postbiotika povzbuzují probiotika k přeměně složek potravy na prospěšné metabolity a vykazují protizánětlivé účinky. V klinických aplikacích je kombinace probiotik, prebiotik a postbiotik očekávána (Gao et al. 2021).

3.7.3 Fekální transplantace

Transplantace fekální mikrobioty (TFM) je charakterizována přenosem mikrobiální ekologie ze zdravého dárce na pacienta. V současné době je TFM zkoumána jako terapeutická strategie k obnovení normobiózy, normálního stavu lidské střevní mikroflóry, v různých patologických kontextech. Vzhledem k tomu, že je kolorektální karcinom charakterizován stavem dysbiózy, TFM je považována za potenciální klinickou aplikaci u pacientů (Perrilo et al. 2020).

Tato terapie suspenzí stolice se datuje do 4. století našeho letopočtu v Číně, kdy čínský učenec Ge Hong podával orální stolicí pacientům trpícím otravou jídlem a těžkým průjmem. Koncem 16. století známý čínský lékař a vědec popsal přípravek v lidských výkalech a pojmenoval jej „Huang Tang“. Léky pak používal k léčbě pacientů s průjmem, horečkou, bolestmi břicha, zvracením a zácpou. Fekální transplantace využívali také veterináři k léčbě průjmů u koní v 17. století (Vejmelka et al. 2014). Cílem léčby je navození normální střevní mikroflóry, která je primárně narušena užíváním antibiotik a podléhá tak následnému přemnožení kmenů *Clostridium difficile*. Doposud nebyl stanoven žádný standardní postup léčby fekálních bakterií. Existují určité rozdíly v manipulaci s fekáliemi, použití rozpouštědel, metodách homogenizace a následné filtraci materiálu. Každé pracoviště má svůj přesně definovaný přístup k transplantaci. (Březina et al. 2016).

TFM ukázala jako vysoce úspěšná pouze při léčbě recidivujících a rezistentních infekcí *Clostridium difficile* (*C. difficile*) na antibiotika, s mírou vyléčení přibližně 90 % (Perrilo et al. 2020).

Na myším modelu kolorektálního karcinomu byla TFM schopna normalizovat střevní mikroflóru prostřednictvím snížení růstu nádoru. TFM přispěla ke snížení úrovně zánětu

snížením hladin IL-1 β , IL-6 a TNF- α a zvýšením protizánětlivých cytokinů, jako je IL-10 a TGF- β prostřednictvím inhibice kanonické aktivity NF- κ B a buněčné proliferace. Transplantace mikrobioty snížila závažnost průjmu a střevní mukozitidy, potlačila hladiny IL-6 a obnovila počet pohárkových buněk, zonula occludens-1, apoptotických a NF- κ B-pozitivních buněk, stejně jako expresi toll-like receptorů a MYD88. Všechny tyto příznivé účinky byly doprovázeny obnovením složení střevní mikroflóry, aniž by došlo k bakteriémii. Je však třeba poznamenat, že dopad TFM na imunitní systém příjemce je komplikovaný a nepředvídatelný a nelze zabránit riziku šíření neznámých patogenů. Kromě toho zbývá zodpovědět mnoho otázek, včetně vlastností, které by měl mít „dobrý dárc“, způsobů podání a dlouhodobých účinků této terapie (Perrilo et al. 2020).

3.7.4 Změna dietních návyků

Vznik kolorektálního karcinomu je v naší populaci ovlivněn především dietárními faktory, které představují obrovský potenciál pro prevenci. Výživa může jak snižovat riziko iniciace nádorového bujení, tak také zvyšovat. Konkrétně se jedná nejen o nutriční složení stravy, ale také o pohybovou aktivitu a tělesnou hmotnost (Fiala & Brázdová 2000). Nadměrný příjem energie a nízký energetický výdej vede k obezitě jako rizikovému faktoru. Navíc se setkáváme s nebezpečnými látkami, které podporují nebo dokonce způsobují tvorbu karcinogenů, nazývané kancerogeny (sloučeniny vznikající při spalování tuků nebo při uzení). Na progresi kolorektálního karcinomu má též vliv konzumace alkoholu či cigaretový kouř. Důležitou rolí je prevence. Určitá strava a v ní obsažené konkrétní živiny mohou snížit účinky škodlivých karcinogenů (Fiala 2004).

Potraviny mohou být kontaminovány různými chemikáliemi nebo mikroorganismy. Chemické látky jsou především zbytky běžně používaných průmyslových hnojiv, pesticidů, herbicidů, veterinárních léčiv a těžkých kovů. Dichlordifenyiltrichlorethan, dříve používané hnojivo, bylo v mnoha zemích zakázáno a nahrazeno méně škodlivými organofosforovými pesticidy. Většina těchto chemikálií se v potravinách nenachází v dostatečném množství, aby byla spojována s rakovinou. V zemích EU bylo zakázáno používání hormonálních anabolitů v chovu zvířat. Vliv geneticky modifikovaných potravin na riziko vzniku rakoviny je nejasný (AICR 2007).

Aditiva se používají ke zlepšení vlastností a ke konzervaci potravin. Jedná se o různá barviva, vonné látky a další konzervační látky. Některé z těchto látek jsou na seznamu karcinogenů skupiny III IARC (Augustsson et al. 1999). Zmrazování, sušení nebo vakuování je vhodné pro uchovávání potravin, protože nejsou potřeba žádné další konzervační látky. Konzervování potravin, přidáváním různých dusitanů a dusičnanů, je nejhorší způsob konzervace potravin. Rizikovým faktorem je manipulace s masem při vysokých teplotách. Při grilování a smažení vzniká mnoho karcinogenů heterocyklických aminů. Riziko rozvoje kolorektálního karcinomu závisí na druhu masa, době, teplotě a způsobu léčby, frekvenci konzumace těchto potravin a koncentraci heterocyklických aminů (Augustsson et al. 1999). Vaření a dušení se jeví jako vhodnější forma úpravy (Fiala 2004).

3.7.4.1 Základní nutriční složky

Mezi základní nutriční složky potravy řadíme lipidy, sacharidy a bílkoviny. Neopomenutelnou součástí jsou také vitaminy a minerální látky. Strava by měla být nutričně vyvážená a pestrá. Rostlinná strava by měla mít největší podíl v našem jídelníčku. Jídelníček by měl být bohatý na různé druhy zeleniny, ovoce a luštěnin. Ovoce a zelenina by měly tvořit minimálně 7 % celkového příjmu. Potravin z jiných rostlinných zdrojů, jako jsou fazole nebo obiloviny, by měly tvořit cca 45–60 % stravy. Méně než 10 % příjmu by mělo tvořit červené maso (Vyzula & Žaloudík 2007). Butyrát s protizánětlivými a antineoplastickými schopnostmi může chránit intestinální epitelální buňky před tumorigenezí (Gao et al. 2021). Místo červeného masa se doporučuje konzumovat drůbež nebo ryby. Co se týče tuku, je vhodné omezit příjem tučných jídel, zejména rostlinného původu. Konzumace alkoholu není obecně nedoporučována. Dospělí by měli přijmout méně než 6 gramů soli denně (Vyzula & Žaloudík 2007).

Nedostatečný příjem vitamínů může ovlivnit riziko vzniku rakoviny. Důležitá funkce vitamínů spočívá především v jejich antioxidačních účincích. Antioxidanty inhibují volné radikály, které poškozují tkáň, a tím snižují odolnost vůči rakovině. S tímto rizikem jsou spojeny nejvíce prospěšné a nepostradatelné vitamíny: A, D, E, K, B5, B6, B12 a C. Doporučuje se suplementace vitamínů konzumací ovoce a zeleniny. Pro závažné nedostatky vitamínů jsou k dispozici vitamínové doplňky (Manoušková 2010).

Mikroživiny mají také ochranné účinky na různé typy nádorů. Selen a zinek byly hodnoceny jako stopové prvky s protinádorovými účinky. Dále by neměl být opomenut vápník, síra, koenzym Q₁₀ a fytochemikálie. Fytochemikálie jsou biologicky aktivní látky obsažené v rostlinné stravě, které se též vyznačují svým antikarcinogenním účinkem (Manoušková 2010).

Sacharidy

Sacharidy vykazují různý absorpční profil ve střevě podle stupně jejich polymerace. Tenké střevo hydrolyzuje a absorbuje jednoduché cukry (glukózu, fruktózu, sacharózu a škrob), zatímco mikrobiální druhy v tlustém střevě odbourávají fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy spolu s inulinem (Mentella et al. 2020).

Ne všechny formy sacharidů byly prokázány jako přímý rizikový faktor pro vznik rakoviny. Například švédská studie Larsona et al. (2006) neprokázala kauzální vztah mezi příjmem potravy s vysokým glykemickým indexem a kolorektálním karcinomem. Jednoduché sacharidy (cukr, med, melasa atd.) obsažené ve slazených nápojích a jiných slazených potravinách však mají vysokou kalorickou hodnotu a mohou stimulovat rakovinu. Jak ukazují mnohé další studie, růst konzumace jednoduchých sacharidů a nepřímo zvyšuje riziko rakoviny tlustého střeva a konečníku.

Ovšem rané studie z konce 70. let poprvé naznačovaly, že sacharidy by mohly být rizikovým faktorem pro CD. Později několik studií zdůraznilo korelaci mezi vysokým příjmem cukru a nízkým příjmem vlákniny s IBDs (zejména s výskytem CD) s odlišným účinkem různých sacharidů. Možným mechanismem, který je základem účinků sacharidů na střevní

mikroflóru, je nerovnováha ve střevní absorpci vedoucí k tomu, že ve střevním lumen jsou dostupné různé profily cukru, což podporuje přemnožení specifických patobiontů. Tato hypotéza je v souladu s pozorováním, že malabsorpce fruktózy a intolerance laktózy jsou spojeny s IBDs a s pozorováními na zvířatech, která ukazují, že vysoký příjem sacharidů podporuje dysbiózu (Mentella et al. 2020).

Příjem rafinovaného cukru by měl tvořit méně než 10 % z celkového energetického příjmu (AICR 2007).

Dietní vláknina, složená z neškrobových polysacharidů, rezistentních oligosacharidů a ligninu, je důležitou ochrannou složkou proti nádorům tlustého střeva a konečníku. Vláknina je odolná vůči hydrolýze trávicími enzymy, prochází střevem nezměněna a ovlivňuje motilitu střev. Rychlejší průchod střevního obsahu zkracuje dobu, po kterou jsou škodlivé složky potravy vystaveny sliznici tlustého střeva. Následně zabraňuje malabsorpci látek. Rozpustná část vlákniny váže nejen vodu, ale také mastné kyseliny, žlučové kyseliny a steroly. Fyziologickým přínosem je snížené vstřebávání těchto látek a snížení hladiny cholesterolu a glukózy v krvi (Fiala & Brazdová 2002). Nízký příjem vlákniny byl také spojen se zvýšeným výskytem IBDs. Vláknina je fermentována v tlustém střevě a pozitivně moduluje střevní homeostázu a snižuje zánět. Pacienti s IBDs vykazují pokles bakteriálních druhů produkujících butyrát a také sníženou expresi butyrátových transportérů (Mentella et al. 2020).

Vláknina je přirozenou součástí rostlinné stravy a je hojně zastoupena v ovoci, zelenině, luštěninách, obilovinách a ořechách. Doporučené denní dávky se v literatuře liší. Kováčová et al. (2003) doporučuje denní dávku 25 gramů. Wilhem et al. (2004) uvádějí průměrný příjem české populace cca 25-29 gramů u mužů a 19-21 gramů u žen, doporučují však 35-50 gramů. Denní dávka ke snížení rizika adenomu je stanovena na 30 gramů. AICR (2007) popisuje významné nežádoucí účinky pouze při dávkách nižších než 10 gramů denně.

Bílkoviny

Nedávné studie spojují vysoký příjem bílkovin se změnami ve výskytu IBDs, což naznačuje, že vysoký příjem bílkovin z různých zdrojů, včetně červeného masa, ryb, vajec, mléka, sýrů, ořechů, může být také faktorem modulujícím výskyt IBDs (Dixon et al. 2015). Prospektivní dvouletý průzkum mezi 67 581 ženami středního věku ukázal, že živočišné bílkoviny z ryb nebo z masa, s výjimkou bílkovin z vajec nebo z mléčných výrobků, korelovaly se zvýšeným rozvojem IBDs. Další prospektivní studie klinického průběhu a relapsu u pacientů s UC ukázala, že vysoký příjem masa byl spojen s významně zvýšeným rizikem relapsu. Jiné studie na velkém počtu pacientů však nedokázaly najít souvislost mezi vysokým příjmem bílkovin a zvýšeným výskytem UC (Mentella et al. 2020). Mechanismy, které jsou základem role proteinů jako faktoru modulujícího nástup IBDs, zůstávají do značné míry neznámé (Dixon et al. 2015). Spekulovalo se, že degradace živočišných proteinů ve střevě může produkovat substráty podporující expanzi patobiontů nebo mastné kyseliny s krátkým řetězcem modulující funkci enterocytů (Jowett et al. 2004). Zejména se zdá, že některé metabolity pocházející z fermentace proteinů, jako je amoniak a celkový sulfid, jsou u pacientů s UC ve srovnání se zdravými subjekty zvýšené (Gilbert et al. 2018). Dle Mentella et al. (2020) jiné

metabolity, pocházející z normální degradace proteinů, mohou být považovány za škodlivé a mohou způsobovat změnu mikroflóry a zánět střev.

- Fenolové sloučeniny, produkty fermentace aromatických aminokyselin bakteriemi *Bacteroidetes spp.* a některými *Firmicutes* (kyselina fenyloctová, fenoly, indoly a p-kresol), mají *in vitro* škodlivý účinek na slizniční bariérovou funkci, která *in vivo* závisí na přítomnosti jiné živiny.
- N-nitrososloučeniny mají karcinogenní potenciál prostřednictvím alkylace DNA.
- Polyaminy (putrescin, spermidin a spermin) mohou ovlivnit expresi konkrétního kotransportéru pro monokarboxyláty, jako je laktát, pyruvát, leucin a mnoho dalších, které přispívají k regulaci centrálních metabolických drah a sekreci inzulinu.
- Metabolismus oxidu dusnatého (NO), pocházejícího z argininu, produkuje prooxidační látky u IBDs.
- Neabsorbované žlučové kyseliny ovlivňují rovnováhu mezi bakteriemi citlivými/tolerantními vůči kyselinám.

Za zmínku stojí, že polyaminy jsou také využívány několika patogeny, jako jsou *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori* ke zvýšení jejich virulence (Louis et al. 2017). Při zvažování proteinové fermentace jsou zvláště důležité účinky na matici produkované slizovou bariérou. Slizniční matrix hraje základní ochrannou roli ve střevě, vyrovnává mikrobiotu a zabraňuje škodlivým bakteriím v kontaktu se střevním epitelem. U pacientů s UC je vrstva hlenu tenčí než u zdravých subjektů a vykazuje změněné složení mucinu, jako je změněná O-glykosylace MUC2, hlavního vylučovaného mucinu. Muciny postižených subjektů mají narušenou glykosylaci, sialylaci a sulfataci, které se ve fázích remise mohou posunout na normální hladiny. Naopak pacienti s CD vykazují zvýšenou expresi MUC2 a sníženou sulfataci a glykosylaci měnící viskoelastické vlastnosti hlenu během akutního zánětu. Dohromady tato pozorování poukazují na změny mucinů IBDs v důsledku zvýšené míry kolonizace patogeny a jejich metabolismu jako silně ovlivňující zhoršení onemocnění (Mentella et al. 2020).

Tuky

Příležitostný vztah mezi dietou s vysokým příjmem tuků a IBDs byl poprvé vysloven hypotézou korelující spotřeby tuku a výskyt CD a UC. Byl pozorován nárůst výskytu CD po zavedení margarínu v Evropě na začátku 20. století. Tato souvislost je nyní považována za určitý rizikový faktor pro rozvoj IBDs. Podrobnější studie zdůrazňují odlišný dopad různých typů tuků na patogenezi onemocnění (Mentella et al. 2020).

Zvláštní pozornost byla věnována odlišné úloze omega-3 a omega-6 polynenasycených esenciálních mastných kyselin (PUFA). Několik studií prokázalo, že omega-3 PUFA mají protizánětlivý účinek, zatímco omega-6 PUFA prozánětlivý. Jejich vyvážený poměr vede k homeostáze (Raphael et al. 2013). Západní diety obvykle zahrnují vysoký poměr omega-6 ku omega-3, což vede k větší pravděpodobnosti rozvoje IBDs (Mentella et al. 2020).

Další tuky, které se podílejí na zvýšení rizika rozvoje IBDs, jsou triglyceridy s dlouhým řetězcem, které podněcují proliferaci střevních lymfocytů a regulují prozánětlivé mediátory.

Triglyceridy se středně dlouhým řetězcem místo toho potlačují produkci interleukinu-8 (IL-8) – mediátoru neutrofilního atraktantu nadměrně exprimovaného ve sliznici pacientů s IBDs, a jsou proto protizánětlivé. Zvýšené riziko v důsledku stravy s vysokým příjmem tuků může být způsobeno jak zvýšenou propustností střeva, tak i změnou střevní mikroflóry. U většiny zdravých subjektů dodržujících stravu s vysokým příjmem tuků po dobu jednoho měsíce se hladiny endotoxinů v plazmě zvýšily, i když se u nich nevyvinul zánět. Mechanismus, který je základem zvýšené permeability, může zahrnovat nedostatečnou expresi okludinů a některých proteinů tvořících epiteliální těsná spojení (Mentella et al. 2020).

Tuk by měl tvořit maximálně 30 % celkového energetického příjmu a u jedinců s vyšším energetickým výdejem 35 % denního energetického příjmu (Dostálová et al. 2004). Tento fakt byl prokázán studií, kdy riziko recidivy kolorektálního karcinomu klesalo s tím, jak klesal podíl celkového energetického příjmu z tuků. Stejně jako u sacharidů jsou nepřímé účinky tuků spojeny se zvýšeným celkovým energetickým příjmem a obezitou, která prokazatelně zvyšuje riziko rakoviny (Manoušková 2010).

4 Materiál a metodika

4.1 Odběr vzorků

V Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze – Krči bylo operativně odebráno z 8 pacientů (2 s kolorektálním karcinomem, 2 s Crohnovou chorobou, 2 s ulcerózní kolitidou a 2 zdraví jedinci) 22 vzorků intestinální tkáně, jak je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1: Označení a charakteristika odebraných vzorků. Ž – Žena, M – Muž

Vzorek / Onemocnění	Věk / Pohlaví	Označení odebraných tkání
1CC / kolorektální karcinom	72 / M	1CC/1: tkáň tumoru 1CC/2: tkáň proximálně (cca 10 cm) od tumoru
2CC / kolorektální karcinom	70 / Ž	2CC/1: tkáň tumoru 2CC/2: tkáň proximálně (cca 10 cm) od tumoru
CR1 / Crohnova choroba	34 / Ž	CR1/1: tkáň výstelky rekta CR1/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo CR1/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo
CR2 / Crohnova choroba	30 / M	CR2/1: tkáň výstelky rekta CR2/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo CR2/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo
UC1 / Ulcerózní kolitida	28 / M	UC1/1: tkáň výstelky rekta UC1/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo UC1/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo
UC2 / Ulcerózní kolitida	19 / Ž	UC2/1: tkáň výstelky rekta UC2/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo UC2/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo
K1 / Kontrola - zdravý jedinec	60 / Ž	K1/1: tkáň výstelky rekta K1/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo K1/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo
K2 / Kontrola - zdravý jedinec	45 / M	K2/1: tkáň výstelky rekta K2/3: tkáň výstelky céka: slepé střevo K2/5: tkáň výstelky ilea: tenké střevo

Vzorky byly asepticky v průběhu operačního zákroku odebrány v množství 40–200 mg a ihned vloženy do hermeticky uzavíratelných Hungateho zkumavek. Ty obsahovaly 1,8 mL sterilního anaerobního modifikovaného TPY bujónu (TPMF), jehož složení je uvedeno v Tabulce 2, a také skleněné střeptiny nutné pro homogenizaci tkání. Anaerobní prostředí bylo ve všech případech kultivačních médií v rámci této práce, pokud není zmíněno jinak, zajištěno vytěsněním aerobní atmosféry prostřednictvím směsi plynů: N₂ 75%, CO₂ 20% a H₂ 5%. U všech použitých médií byla použita sterilace při 106 °C po dobu 50 minut. Vzorky byly v průběhu 4 hodin po odebrání naředěny v laboratoři po krátké ruční homogenizaci desítkovým systémem ve shodném médiu v Hungateho zkumavkách.

4.2 Kultivace a inkubace vzorků

Pro účely izolace co možná nejširšího spektra především anaerobních bakterií z intestinálních tkání byla navržena a použita 3 modifikovaná média (TPMF: modifikované TPY médium, BHMF: modifikované BHI-brain heart infusion médium a WMF-modifikované Wilkins Chalgren médium) obsahující gastrický mucin (porcine gastric mucin II, Oxoid, Anglie) a lidský fekální extrakt. Kromě těchto 3 médií byla ještě použity komerčně dostupná média M.R.S. (používané především pro kultivaci bakterií mléčného kvašení), McConkey (používané především pro kultivaci a izolaci *Escherichia coli* či zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*) a krevní agar (umožňující izolaci hemolytických, ale i jiných bakterií). Tato tři média byla zakoupena od firmy ThermoFisher scientific (dříve Oxoid) (USA). Mucin byl cíleně zahrnut do vybraných médií, neboť jsme předpokládali přítomnost mucinolytických bakterií (štěpící a využívající intestinální mucin, resp. polysacharid s proteinovým jádrem produkovaný intestinálními buňkami – enterocyty) v intestinální tkáni. Lidský fekální roztok potenciálně obsahující nedefinované bakteriální růstové faktory (krátké peptidy aj. látky) byl připraven následovně: 100 g fekálního vzorku odebraného ze 3-letého jedince mužského pohlaví bylo aplikováno do 900 mL destilované vody. Po rozmíchání a krátkém povaření (5 minut) byl odstředěn (6000 otáček / 6 minut), probublán směsí plynů a sterilován za výše zmíněných podmínek. Skladba, resp. zastoupení jednotlivých komponent médií a objem použitého fekálního roztoku, je uvedena v Tabulce 2.

Naředěné intestinální tkáně byly aplikovány na dno sterilních Petriho misek a přelity příslušnými kultivačními médii. Vzorky byly poté vloženy do 3,5L anaerostatů (Anaerobic Jar, Oxoid, Anglie) se současným přidáním vyvíječe anaerobní atmosféry (AnaeroGen 3.5L generation system; ThermoFisher scientific, USA). Vzorky byly inkubovány po dobu 72 hodin při 37 °C. Jen některé vzorky byly kultivovány volně na vzduchu za stejných podmínek (37°C / 72 hodin), tzv. aerobní kultivace uvedená ve výsledcích u jednotlivých bakteriálních kmenů.

Tabulka 2: Složení kultivačních médií použitých pro izolaci širokého spektra především anaerobních bakterií z biopsií intestinálních tkání

Komponenta (g/L destilované H ₂ O) / Médium	TPMF	BHMF	WMF	M.R.S.	MacConkey	KA (krevní agar)
Trypton	10		15	10		
Pepton					20	10
Glukóza	10	2	4	20	2	
Laktóza					10	
Kvasničný extract	5		5	6		
Sójový pepton	5			3		
Beef extract	2		2	2	4	
Brain infusion solids		12,5				
Beef heart infusion solids		5				10
Protease pepton		10				
Žlučové soli					5	
NaCl	2	5	5	6	5	5
KH ₂ PO ₄	3					
K ₂ HPO ₄	0,5					
Na ₂ HPO ₄		2,5				
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1			0,5		
Pyruvát sodný			1			
Acetát sodný				5		
Cystein x HCl	0,5			0,3		
L-arginin			1			
Mucin (prasečí gastrický II)	2	2	2			
Tween 80 (mL / L)	1			1		
Fekální roztok (mL/L)	50	50	50			
Defibrilovaná koňská krev (mL/L)						100
Agar bakteriologický	15	15	15	15	15	15

4.3 Izolace a klasifikace bakteriálních izolátů

Separované bakteriální kolonie různých tvarů byly vybrány pro izolaci bakteriálních kmenů z výše uvedených médií. Ty byly prostřednictvím sterilní bakteriologické kličky odebrány do 7 mL příslušných anaerobních médií v Hungateho zkumavkách a kultivovány po dobu 24-48 hodin při 37 °C. Poté byla jednoduše mikroskopicky zhodnocena čistota, resp. kontaminace, bakteriálních izolátů. Morfologicky uniformní izoláty byly následně použity pro izolaci bakteriální chromozomální DNA. Kultury v objemu 1,3 mL byly v umělohmotných sterilních 1,5 mL „epi“ zkumavkách odstředěny (8000 otáček / 5 minut). K bakteriálnímu peletu byl

následně přidán roztok ‚PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent‘ (ThermoFisher Scientific, USA) o objemu 80 µL. Po důkladném promíchání na vortexu byly vzorky vloženy do vroucí lázně na 10 minut. Po zchlazení byly odstředěny (13500 otáček / 3 minuty). Supernatant obsahující bakteriální DNA vhodnou pro PCR (polymerázová řetězová reakce) byl použit pro změření koncentrace DNA na NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, USA). Bakteriální DNA byla poté naředěna PCR ultra deionizovanou vodou na koncentraci 10–100 ng / µL.

Bakteriální DNA v uvedeném koncentračním rozmezí byla použita v PCR reakci jako templát pro amplifikaci téměř celého genu pro 16S rRNA (ribosomální RNA malé podjednotky ribozomu). Tento gen, resp. 16S rDNA, je nejhojněji používaným klasifikačním markerem v taxonomii bakterií, resp. prokaryot. PCR směs pro amplifikaci se skládala z templátové DNA, PCR PPP Master Mixu od firmy Top-Bio, Česko ((75 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween 20; 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo)), PCR vody a primerů o koncentraci 5 µM. Pro účely práce byly zvoleny tyto dvojice primerů: fP1 (5′ → 3′: CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) - rP2 (5′ → 3′: CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT) (Forster et al. 1996) a 27FP (5′ → 3′: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) – 1492RP (5′ → 3′: GGYTACCTTGTTACGACTT) (Galkiewicz & Kellogg, 2008). Pro amplifikaci téměř celého 16S rRNA genu o délce cca 1520 nukleotidů byl zvolen tento PCR program: 95 °C po dobu 6 minut, 36 cyklů (95 °C po dobu 50 vteřin, 52 °C po dobu 75 vteřin a 72 °C po dobu 100 vteřin) a 72 °C po dobu 8 minut.

Přítomnost amplikonů byla zkontrolována pomocí 1,5 % agarózového (Agaróza, SERVA, Německo) gelu s přídavkem (5µL/100 ml v koncentraci 10 mg/ml) ethidium bromidu pro účely vizualizace pod UV lampou. Elektroforéza probíhala v 0,5x naředěném TBE pufru (PanReac AppliChem, Německo) po dobu 30 minut při 130 V.

Amplikony byly následně přečištěny pomocí komerčního kitu Monarch PCR & DNA CleanUp Kit (New England BioLabs, Velká Británie) a použity po změření na NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, USA) v koncentraci ≥ 200 ng a za přítomnosti vedoucího / reverzního primeru (2,5 µL o koncentraci 10 µM) pro účely stanovení DNA sekvencí firmou Seqme (Česko).

Zkontrolované sekvence pomocí aplikace Chromas Lite 2.6.6. (Technelysium, Australia) byly dále v programu BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) poskládány do, pokud možno, téměř kompletních sekvencí genu pro 16S rRNA.

Tyto sekvence byly finálně vloženy do databáze EzBioCloud (Yoon et al. 2017; <https://www.ezbiocloud.net/>) s cílem získat homologii, resp. sekvenční shodu genu (v %) s nejbližším příbuzným taxonem. V případě získání homologie ≥ 98,65 % můžeme klasifikovat izoláty jako databází určené taxonomické jednotky (druhy, poddruhy), při nižších hodnotách této komparativní analýzy je nutno uvažovat o nových taxonomických jednotkách (druzích, rodech, čeledích apod.) (Kim et al. 2014).

5 Výsledky

Níže v podkapitolách podle odebraných typů vzorků, resp. podle itestinálního onemocnění, jsou zaznamenány výsledky klasifikace 269 bakteriálních izolátů.

5.1 Bakteriální kmeny izolované z pacientů s kolorektálním karcinomem

V Tabulce 3 jsou uvedeny klasifikace bakteriálních izolátů ze dvou pacientů s kolorektálním karcinomem. Tabulka zahrnuje označení kmene v interní sbírce LAM (Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG AV ČR, v.v.i.), označení vzorků, použité kultivační médium, atmosféru, % homologie (shody) s nejbližším příbuzným taxonem podle databáze EzBioCloud a délky porovnávaného fragmentu genu pro 16S rRNA.

Tabulka 3: Seznam 74 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s kolorektálním karcinomem

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
1	1A/McC1	1CC/1	McConkey	AE	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1468
2	1A/McC2	1CC/1	McConkey	AE	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1441
3	1A/McC4	1CC/1	McConkey	AE	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1435
4	2A/McC2	1CC/2	McConkey	AE	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1450
5	2A/McC3	1CC/2	McConkey	AE	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.65%)	1445
6	1B/Mc/1	2CC/1	McConkey	AE	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (99.41%)	846
7	1B/Mc/3	2CC/1	McConkey	AE	<i>Aeromonas jandaei</i> (100%)	1076
8	1B/Mc/4	2CC/1	McConkey	AE	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (99.59%)	1373
9	2B/Mc/1	2CC/2	McConkey	AE	<i>Shigella flexneri</i> 99.86%	1410
10	2B/Mc/3	2CC/2	McConkey	AE	<i>Aeromonas jandaei</i> (99.79%)	1410
11	1A/TPM2	1CC/1	TPMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.72%)	1434
12	1A/TPM3	1CC/1	TPMF	AN	<i>Lactobacillus mucosae</i> (100%)	1464
13	2A/TPW/MM5	1CC/2	TPMF	AN	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1446
14	2A/TPW/M1	1CC/2	TPMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.65%)	1447
15	2A/TPW/M4	1CC/2	TPMF	AN	<i>Streptococcus mitis</i> (99.72%)	1462
16	2A/TPW/M5	1CC/2	TPMF	AN	<i>Streptococcus parasanguinis</i> (99.1%)	1452
17	2A/TPW/MM3	1CC/2	TPMF	AN	<i>Streptococcus chosunense</i> (99.44%)	1446
18	2A/TPW/MM4	1CC/2	TPMF	AN	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1449
19	1B/TPMF/1	2CC/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.65%)	1416
20	1B/TPMF/2	2CC/1	TPMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.64%)	1410
21	1B/TPMF/4	2CC/1	TPMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.64%)	1399
22	1B/TPM/1	2CC/1	TPMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.64%)	1395
23	1B/TPM/3	2CC/1	TPMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (99.79%)	1468

24	1B/TPM/4	2CC/1	TPMF	AN	Bacteroides nordii (99.71%)	1398
25	2B/TPMF/1	2CC/2	TPMF	AN	<i>Aeromonas jandaei</i> (99.72%)	1419
26	2B/TPMF/2	2CC/2	TPMF	AN	<i>Gemella morbillorum</i> (99.86%)	1472
27	2B/TPMF/3	2CC/2	TPMF	AN	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> (99.79%)	1408
28	2B/TPMF/5	2CC/2	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.93%)	1405
29	2B/TPM/1	2CC/2	TPMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus/whileyi</i> (99.86%)	1473
30	2B/TPM/2	2CC/2	TPMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus/whileyi</i> (99.86%)	1469
31	2B/TPM/5	2CC/2	TPMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.58%)	1418
32	1A/BHI/2	1CC/1	BHMF	AN	<i>Streptococcus halitosis</i> (99.93%)	1434
33	2A/BHI/1	1CC/2	BHMF	AN	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>oralis</i> (100%)	1033
34	1B/BHMF/1	2CC/1	BHMF	AN	<i>Prevotella nigrescens</i> (99.44%)	1076
35	1B/BHMF/2	2CC/1	BHMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (99.79%)	1468
36	1B/BHMF/3	2CC/1	BHMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.72%)	1417
37	1B/BHMF/5	2CC/1	BHMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.72%)	1405
38	2B/BHMF/2	2CC/2	BHMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.86%)	1399
39	2B/BHMF/3	2CC/2	BHMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.64%)	1404
40	2B/BHMF/4	2CC/2	BHMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> 99.50%	1394
41	1A/MRS/1	1CC/1	MRS	AN	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> (99.93%)	1463
42	1A/MRS/3	1CC/1	MRS	AN	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>tigurinus</i> / <i>Streptococcus halitosis</i> (99.10%)	1468
43	2A/MRS/3	1CC/2	MRS	AN	<i>Streptococcus parasanguinis</i> (99.1%)	1448
44	2A/MRS/4	1CC/2	MRS	AN	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> (99.73%)	1457
45	2A/MRS/5	1CC/2	MRS	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.65%)	1450
46	2A/MRS/6	1CC/2	MRS	AN	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.86%)	1426
47	1B/MRS/2	2CC/1	MRS	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (99.79%)	1468
48	1B/MRS/5	2CC/1	MRS	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i> (99.86%)	1478
49	2B/MRS/2	2CC/2	MRS	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (99.71%)	1471
50	2B/MRS/3	2CC/2	MRS	AN	<i>Shigella flexneri</i> (99.28%)	1382
51	2B/MRS/4	2CC/2	MRS	AN	<i>Lactobacillus crispatus</i> (99.86%)	1472
52	1A/W/3	1CC/1	WMF	AN	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>tigurinus</i> (99.17%)	1448
53	1B/W/2	2CC/1	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.72%)	1408
54	1B/W/3	2CC/1	WMF	AN	<i>Gemella morbillorum</i> (100%)	1036
55	1B/W/4	2CC/1	WMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (99.79%)	1472
56	1B/WMF/1	2CC/1	WMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.51%)	1419
57	1B/WMF/3	2CC/1	WMF	AN	<i>Prevotella nigrescens</i> (99.45%)	1451
58	1B/WMF/4	2CC/1	WMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.51%)	1418
59	2B/W/1	2CC/2	WMF	AN	<i>Bacteroides faecis</i> (99.86%)	1404
60	2B/W/2	2CC/2	WMF	AN	Collinsella aerofaciens (99.42%)	1377

61	2B/W/3	2CC/2	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.86%)	1409
62	2B/WMF/2	2CC/2	WMF	AN	<i>Bacteroides faecis</i> (99.79%)	1408
63	2B/WMF/3	2CC/2	WMF	AN	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i> (98.36%)!!	1470
64	2B/WMF/4	2CC/2	WMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.91%)	1105
65	2B/WMF/5	2CC/2	WMF	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.64%)	1409
66	1B/KA/1	2CC/1	KA	AN	<i>Aeromonas jandaei</i> (99.86%)	1411
67	1B/KA/2	2CC/1	KA	AN	<i>Gemella morbillorum</i> (100%)	1481
68	1B/KA/3	2CC/1	KA	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.72%)	1407
69	1B/KA/4	2CC/1	KA	AN	<i>Prevotella denticola</i> (99.57%)	1409
70	2B/KA/1	2CC/2	KA	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.79%)	1410
71	2B/KA/2	2CC/2	KA	AN	<i>Bacteroides vulgatus</i> (99.64%)	1399
72	2B/KA/3	2CC/2	KA	AN	<i>Lactobacillus gasseri</i> (100%)	1417
73	2B/KA/4	2CC/2	KA	AN	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> (99.49%)	1411
74	2B/KA/5	2CC/2	KA	AN	<i>Streptococcus parasanguinis</i> (99.31%)	1462

Pro přehlednost a pro účely diskuzní části jsou v následující Tabulce 4 uvedeny bakteriální taxony izolované z jednotlivých vzorků pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem.

Tabulka 4: Bakteriální taxony izolované z pacientů s kolorektálním karcinomem

Vzorek	Taxon
1CC/2	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
	<i>Escherichia fergusonii</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
	<i>Streptococcus chosunense</i>
	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>oralis</i>
	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
2CC/1	<i>Aeromonas jandaei</i>
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>
	<i>Bacteroides nordii</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Prevotella denticola</i>
	<i>Prevotella nigrescens</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>anginosus</i>
	<i>Gemella morbillorum</i>
2CC/2	<i>Shigella flexneri</i>
	<i>Aeromonas jandaei</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Bacteroides faecis</i>
	<i>Bacteroides vulgatus</i>
	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>
	<i>Prevotella denticola</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i> subsp. <i>whileyi</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
	<i>Streptococcus</i> sp.
	<i>Gemella morbillorum</i>
	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
	<i>Lactobacillus crispatus</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	

5.2 Bakteriální kmeny izolované z pacientů s Crohnovou chorobou

V Tabulce 5 jsou uvedeny klasifikace bakteriálních izolátů ze dvou pacientů s diagnostikovanou Crohnovou chorobou. Tabulka zahrnuje označení kmene v interní sbírce LAM (Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG AV ČR, v.v.i.), označení vzorků, použité kultivační médium, atmosféru, % homologie (shody) s nejbližším příbuzným taxonem podle databáze EzBioCloud a délky porovnávaného fragmentu genu pro 16S rRNA.

Tabulka 5: Seznam 61 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s Crohnovou chorobou

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
1	CR1/1/BHMF/1	CR1/1	BHMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.29%)	830
2	CR1/1/BHMF/3	CR1/1	BHMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (99.29%)	1412
3	CR1/1/BHMF/4	CR1/1	BHMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.64%)	1378
4	CR1/1/BHMF/5	CR1/1	BHMF	AN	<i>(Clostridium) innocuum</i> (pouze 95.06%!!)	1451
5	CR2/1/BHMF1	CR2/1	BHMF	AN	<i>Bacteroides stercoris</i> (99.86%)	1438
6	CR2/1/BHMF4	CR2/1	BHMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.81%)	1046
7	CR2/1/BHMF5	CR2/1	BHMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.62%)	1315
8	CR2/1/BHMF8	CR2/1	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1424
9	CR1/3/BHMF/1	CR1/3	BHMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.51%)	1438
10	CR1/3/BHMF/3	CR1/3	BHMF	AN	<i>Enterocloster bolteae</i> (99.56%)	1379
11	CR1/3/BHMF/4	CR1/3	BHMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (99.65%)	1444
12	CR1/3/BHMF/5	CR1/3	BHMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.64%)	1379
13	CR1/3/BHMF/6	CR1/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.21%)	1389
14	CR1/3/BHMF/7	CR1/3	BHMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (97.54%)	985
15	CR2/3/BHMF2	CR2/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.54%)	1038
16	CR2/3/BHMF4	CR2/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1381
17	CR2/3/BHMF6	CR2/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.58%)	1412
18	CR1/5/BHMF/1	CR1/5	BHMF	AN	<i>Bacteroides vulgatus</i> (99.44%)	1421
19	CR1/5/BHMF/2	CR1/5	BHMF	AN	<i>Bacteroides xylanisolvens</i> (97.41%)	1372
20	CR1/5/BHMF/3	CR1/5	BHMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.51%)	1396
21	CR1/5/BHMF/4	CR1/5	BHMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.50%)	808
22	CR1/1/WMF/1	CR1/1	WMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.51%)	1386
23	CR1/1/WMF/3	CR1/1	WMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1395
24	CR1/1/WMF/4	CR1/1	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (98.90%)	1082
25	CR1/1/WMF/7	CR1/1	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.26%)	1085
26	CR1/3/WMF/2	CR1/3	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.44%)	1422
27	CR1/3/WMF/3	CR1/3	WMF	AN	<i>Flavonifractor plautii</i> (99.72%)	1448
28	CR1/3/WMF/4	CR1/3	WMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (99.58%)	1445
29	CR1/3/WMF/5	CR1/3	WMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (99.27%)	1378
30	CR1/5/WMF/1	CR1/5	WMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.51%)	1437

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
31	CR1/5/WMF/2	CR1/5	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.65%)	1431
32	CR1/5/WMF/4	CR1/5	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.52%)	1446
33	CR1/5/WMF/7	CR1/5	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.01%)	1422
34	CR2/1/TPMF3	CR2/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1072
35	CR2/1/TPMF4	CR2/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	999
36	CR2/1/TPMF5	CR2/1	TPMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.90%)	1082
37	CR2/1/TPMF7	CR2/1	TPMF	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (98.91%)	1013
38	CR2/3/TPMF1	CR2/3	TPMF	AN	(<i>Clostridium</i>) <i>spiroforme</i> (94.18%)	1117
39	CR2/3/TPMF4	CR2/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.82%)	1098
40	CR2/3/TPMF5	CR2/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1075
41	CR2/3/TPMF6	CR2/3	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.86%)	1420
42	CR2/5/TPMF2	CR2/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1078
43	CR2/5/TPMF4	CR2/5	TPMF	AN	(<i>Clostridium</i>) <i>spiroforme</i> (93.99%)	1107
44	CR2/5/TPMF6	CR2/5	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.58%)	1422
45	CR2/5/TPMF7	CR2/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium breve</i> (99.90%)	995
46	CR2/5/TPMF10	CR2/5	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.61%)	1029
47	CR2/5/TPMF11	CR2/5	TPMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.79%)	1410
48	CR2/1/KA1	CR2/1	KA	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.54%)	1438
49	CR2/1/KA2	CR2/1	KA	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (99.15%)	1413
50	CR2/1/KA5	CR2/1	KA	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.90%)	1041
51	CR2/1/KA6	CR2/1	KA	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (98.07%)	1457
52	CR2/3/KA2	CR2/3	KA	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (99.0%)	1394
53	CR2/3/KA3	CR2/3	KA	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1383
54	CR2/3/KA4	CR2/3	KA	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.38%)	1443
55	CR2/3/KA5	CR2/3	KA	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (98.47%)	1442
56	CR2/5/KA1	CR2/5	KA	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (98.47%)	1333
57	CR2/5/KA2	CR2/5	KA	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.67%)	1426
58	CR2/5/KA4	CR2/5	KA	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (99.1%)	984
59	CR2/5/KA8	CR2/5	KA	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.65%)	1435
60	CR2/1/MRS4	CR2/1	MRS	AN	<i>Bacillus licheniformis</i> (99.79%)	1455
61	CR2/1/MRS5	CR2/1	MRS	AN	<i>Bacillus licheniformis</i> (99.7%)	1046

Pro přehlednost a pro účely diskuzní části jsou v následující Tabulce 6 uvedeny bakteriální taxony izolované z jednotlivých vzorků pacientů s diagnostikovanou Crohnovou chorobou.

Tabulka 6: Bakteriální taxony izolované z pacientů s Crohnovou chorobou

Vzorek	Taxon
CR1 /1	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	(<i>Clostridium</i>) gen. sp. nov.
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
CR1/3	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Enterocloster bolteae</i>
	<i>Flavonifractor plautii</i>
CR1/5	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bacteroides xylanisolvens</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
CR2/1	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bacteroides stercoris</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Clostridium innocuum</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
CR2/3	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Clostridium innocuum</i>
	<i>Clostridium</i> sp.
	(<i>Clostridium</i>) gen. sp. nov.
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>

Vzorek	Taxon
CR2/5	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Clostridium innocuum</i>
	<i>Clostridium</i> sp.
	(<i>Clostridium</i>) gen. sp. nov.
	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>

5.3 Bakteriální kmeny izolované z pacientů s Ulcerózní kolitidou

V Tabulce 7 jsou uvedeny klasifikace bakteriálních izolátů ze dvou pacientů s diagnostikovanou ulcerózní kolitidou. Tabulka zahrnuje označení kmene v interní sbírce LAM (Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG AV ČR, v.v.i.), označení vzorků, použité kultivační médium, atmosféru, % homologie (shody) s nejbližším příbuzným taxonem podle databáze EzBioCloud a délky porovnávaného fragmentu genu pro 16S rRNA.

Tabulka 7: Seznam 74 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s ulcerózní kolitidou

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
1	UC1/1/BHMF1	UC1/1	BHMF	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (99.9%)	1013
2	UC1/1/BHMF3	UC1/1	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.58%)	708
3	UC1/1/BHMF4	UC1/1	BHMF	AN	<i>Blautia provensensis</i> (99.58%)	956
4	UC1/1/BHMF6	UC1/1	BHMF	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (99.9%)	986
5	1/UC2/BH3	UC2/1	BHMF	AN	<i>Streptococcus oralis</i> (98.77%)	1466
6	1/UC2/BH4	UC2/1	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.91%)	1112
7	1/UC2/BH6	UC2/1	BHMF	AN	<i>Parabacteroides distasonis</i> (98.75%)	1442
8	UC1/3/BHMF1	UC1/3	BHMF	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (99.9%)	1079
9	UC1/3/BHMF2	UC1/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (99.84%)	956
10	UC1/3/BHMF4	UC1/3	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (100%)	1101
11	2/UC2/BH1	UC2/3	BHMF	AN	<i>Bacteroides ovatus</i> (99.31%)	1443
12	UC1/5/BHMF3	UC1/5	BHMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.42%)	1030
13	UC1/5/BHMF6	UC1/5	BHMF	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (100%)	1019
14	3/UC2/BH1	UC2/5	BHMF	AN	<i>Blautia faecis</i> (97.31%)	1378
15	3/UC2/BH2	UC2/5	BHMF	AN	<i>Clostridium saccharogumia</i> (99.52%)	1445
16	UC1/3/W3	UC1/3	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.41%)	875
17	UC1/5/W3	UC1/5	WMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1013
18	1/UC2/W1	UC2/1	WMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.73%)	1117

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
19	1/UC2/W2	UC2/1	WMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.73%)	1008
20	1/UC2/W5	UC2/1	WMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.53%)	1053
21	2/UC2/W1	UC2/3	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.58%)	1440
22	2/UC2/W3	UC2/3	WMF	AN	<i>Bacteroides ovatus</i> (99.51%)	1445
23	3/UC2/W2	UC2/5	WMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.91%)	1070
24	UC1/1/TPMF1	UC1/1	TPMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (98.98%)	705
25	UC1/1/TPMF6	UC1/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.81%)	1080
26	UC1/1/TPMF7	UC1/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides coprocola</i> (99.63%)	1081
27	UC1/1/TPMF10	UC1/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.81%)	1080
28	1/UC2/TP1	UC2/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.45%)	1444
29	1/UC2/TP2	UC2/1	TPMF	AN	<i>Anaerostipes hadrus</i> (99.72%)	1368
30	1/UC2/TP4	UC2/1	TPMF	AN	<i>Parabacteroides distasonis</i> (99.03%)	1438
31	1/UC2/TP5	UC2/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.82%)	1100
32	1/UC2/TP6	UC2/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (98.54%)	1373
33	1/UC2/TP8	UC2/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.93%)	1439
34	UC1/3/TPMF3	UC1/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.81%)	1066
35	UC1/3/TPMF7	UC1/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	956
36	2/UC2/TP1	UC2/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.57%)	1384
37	2/UC2/TP3	UC2/3	TPMF	AN	<i>Faecalibacillus intestinalis</i> (99.79%)	1442
38	2/UC2/TP4	UC2/3	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.50%)	1391
39	2/UC2/TP5	UC2/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.65 %)	1443
40	2/UC2/TP6	UC2/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.91%)	1081
41	2/UC2/TP8	UC2/3	TPMF	AN	<i>Faecalibacillus intestinalis</i> (99.79%)	1438
42	UC1/5/TPMF1	UC1/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.78%)	919
43	UC1/5/TPMF2	UC1/5	TPMF	AN	<i>Streptococcus pasteurianus</i> (100%)	1027
44	UC1/5/TPMF4	UC1/5	TPMF	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (100%)	991
45	UC1/5/TPMF8	UC1/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	988
46	3/UC2/TP2	UC2/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.82%)	1119
47	3/UC2/TP5	UC2/5	TPMF	AN	<i>Faecalibacillus intestinalis</i> (99.79%)	1445
48	3/UC2/TP7	UC2/5	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.58%)	1443
49	UC1/1/KA2	UC1/1	KA	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.38%)	892
50	UC1/1/KA3	UC1/1	KA	AN	<i>Blautia provvensensis</i> (98.78%)	1068
51	UC1/1/KA5	UC1/1	KA	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.38%)	759
52	UC1/1/KA6	UC1/1	KA	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1036
53	1/UC2/KA3	UC2/1	KA	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.73%)	1117
54	1/UC2/KA5	UC2/1	KA	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.91%)	1100
55	1/UC2/KA6	UC2/1	KA	AN	<i>Bacteroides ovatus</i> (99.24%)	1443
56	UC1/3/KA3	UC1/3	KA	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) dorei</i> (100%)	1088
57	UC1/3/KA4	UC1/3	KA	AN	<i>Blautia luti</i> (98.60%)	1075
58	2/UC2/KA5	UC2/3	KA	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.55%)	1352

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
59	3/UC2/KA3	UC2/5	KA	AN	<i>Bacteroides ovatus</i> (99.31%)	1441
60	UC1/1/MRS5	UC1/1	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.82%)	1073
61	1/UC2/MRS1	UC2/1	MRS	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.79%)	1448
62	1/UC2/MRS4	UC2/1	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.93%)	1440
63	1/UC2/MRS5	UC2/1	MRS	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.93%)	1444
64	1/UC2/MRS6	UC2/1	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.64%)	1322
65	UC1/3/MRS2	UC1/3	MRS	AN	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i> (100%)	1267
66	UC1/3/MRS3	UC1/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	926
67	2/UC2/MRS1	UC2/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.93%)	1441
68	2/UC2/MRS2	UC2/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.59%)	970
69	2/UC2/MRS3	UC2/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.91%)	1115
70	2/UC2/MRS4	UC2/3	MRS	AN	<i>Faecalibacillus intestinalis</i> (99.79%)	1442
71	2/UC2/MRS6	UC2/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.93%)	1443
72	3/UC2/MRS2	UC2/5	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.64%)	1119
73	3/UC2/MRS3	UC2/5	MRS	AN	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (99.46%)	1110
74	3/UC2/MRS5	UC2/5	MRS	AN	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (99.93%)	1089

Pro přehlednost a pro účely diskuzní části jsou v následující Tabulce 8 uvedeny bakteriální taxony izolované z jednotlivých vzorků pacientů s ulcerózní kolitidou.

Tabulka 8: Bakteriální taxony izolované z pacientů s ulcerózní kolitidou

Vzorek	Taxon
UC1 /1	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
	<i>Blautia proviensensis</i>
	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Bacteroides coprocola</i>
UC1/3	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) dorei</i>
	<i>Blautia luti</i>

Vzorek	Taxon
UC1/5	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>
	<i>Streptococcus pasteurianus</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
UC2/1	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	<i>Parabacteroides distasonis</i>
	<i>Bacteroides ovatus</i>
	<i>Anaerostipes hadrus</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>
UC2/3	<i>Faecalibacillus intestinalis</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bacteroides ovatus</i>
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
UC2/5	<i>Faecalibacillus intestinalis</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
	<i>Blautia faecis</i>
	<i>Clostridium saccharogumia</i>

5.4 Bakteriální kmeny izolované ze zdravých jedinců

V Tabulce 9 jsou uvedeny klasifikace bakteriálních izolátů ze dvou zdravých pacientů – kontrol. Tabulka zahrnuje označení kmene v interní sbírce LAM (Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG AV ČR, v.v.i.), označení vzorků, použité kultivační médium, atmosféru, % homologie (shody) s nejbližším příbuzným taxonem podle databáze EzBioCloud a délky porovnávaného fragmentu genu pro 16S rRNA.

Tabulka 9: Seznam 60 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků zdravých pacientů

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
1	1/K/TPY2	K1/1	TPMF	AN	<i>Blautia massiliensis</i> (99.09%)	1104
2	1/K/TPY3	K1/1	TPMF	AN	<i>Ruminococcus gnavus</i> (99.82%)	1305
3	1/K/TPY4	K1/1	TPMF	AN	<i>Clostridium butyricum</i> (99.26%)	1402
4	1/K/TPY5	K1/1	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium dentium</i> (99.37%)	1216
5	1/K/TPY6	K1/1	TPMF	AN	<i>Clostridium butyricum</i> (99.28%)	1354
6	1/K/TPY7	K1/1	TPMF	AN	<i>Dorea longicatena</i> (99.63%)	1421
7	1/K/MTPY1	K1/1	TPMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.08%)	1260
8	1/K/MTPY2	K1/1	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.73%)	1325
9	1/K/MTPY3	K1/1	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.53%)	1411
10	1/K/MTPY5	K1/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (99.73%)	1198
11	1/K/MTPY6	K1/1	TPMF	AN	<i>Streptococcus mitis</i> (99.71%)	1325
12	1/K/MTPY7	K1/1	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.82%)	1300
13	1/K/MTPY8	K1/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (99.73%)	1355
14	K2/1/T3	K2/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.79%)	1385
15	K2/1/T4	K2/1	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.9%)	1295
16	2/K/TPY1	K1/3	TPMF	AN	<i>Dorea longicatena</i> (99.73%)	1295
17	2/K/TPY2	K1/3	TPMF	AN	<i>Clostridium perfringens</i> (99.91%)	1420
18	2/K/TPY5	K1/3	TPMF	AN	<i>Clostridium perfringens</i> (100%)	1378
19	2/K/TPY6	K1/3	TPMF	AN	<i>Dorea longicatena</i> (99.82%)	1114
20	2/K/TPY7	K1/3	TPMF	AN	<i>Dorea phocaeensis</i> (99.91%)	1325
21	2/K/MTPY1	K1/3	TPMF	AN	<i>Phocaeicola dorei</i> (100%)	1220
22	2/K/MTPY3	K1/3	TPMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (98.76%)	1178
23	2/K/MTPY4	K1/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (99.73%)	1408
24	2/K/MTPY5	K1/3	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.73%)	1287
25	2/K/MTPY6	K1/3	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.84%)	1389
26	2/K/MTPY7	K1/3	TPMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (98.76%)	1057
27	2/K/MTPY10	K1/3	TPMF	AN	<i>Clostridium perfringens</i> (99.73%)	1292
28	K2/2/T1	K2/3	TPMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.9%)	1311
29	K2/2/T2	K2/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.9%)	1420
30	K2/2/T5	K2/3	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.79%)	1365
31	K2/2/T7	K2/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.9%)	1432

ČK	Kmen	Pacient	Médium	Atmosféra	Klasifikace (16S rRNA homologie)	Fragment 16S rRNA (nts)
32	K2/2/T8	K2/3	TPMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.9%)	1400
33	3/K/TPY2	K1/5	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.55%)	1121
34	3/K/MTPY4	K1/5	TPMF	AN	<i>Shigella flexneri</i> (98.79%)	1123
35	3/K/MTPY5	K1/5	TPMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (97.79%)	1065
36	3/K/MTPY6	K1/5	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.64%)	1345
37	3/K/MTPY7	K1/5	TPMF	AN	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i> (99.64%)	1215
38	K2/3/T3	K2/5	TPMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1430
39	K2/3/T4	K2/5	TPMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.9%)	1260
40	K2/3/T6	K2/5	TPMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.81%)	1385
41	3/K/BH3	K1/5	BHMF	AN	<i>Clostridium saccharogumia</i> (99.90%)	1285
42	K2/1/BH2	K2/1	BHMF	AN	<i>Phocaeicola dorei</i> (100%)	1240
43	K2/1/BH3	K2/1	BHMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.9%)	1385
44	K2/1/BH4	K2/1	BHMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.9%)	1400
45	K2/2/BH3	K2/3	BHMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.81%)	1380
46	K2/2/BH5	K2/3	BHMF	AN	<i>Phocaeicola dorei</i> (100%)	1411
47	2/K/W6	K1/3	WMF	AN	<i>Escherichia marmotae</i> (99.14%)	1152
48	K2/1/W1	K2/1	WMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.91%)	1295
49	K2/1/W2	K2/1	WMF	AN	<i>Bacteroides fragilis</i> (99.85%)	1298
50	K2/2/W2	K2/3	WMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1330
51	K2/2/W3	K2/3	WMF	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (99.8%)	1331
52	K2/2/W4	K2/3	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.81%)	1360
53	K2/2/W5	K2/3	WMF	AN	<i>Clostridium innocuum</i> (99.85%)	1450
54	K2/3/W2	K2/5	WMF	AN	<i>Phocaeicola dorei</i> (100%)	1435
55	K2/3/W3	K2/5	WMF	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.91%)	1389
56	K2/3/W5	K2/5	WMF	AN	<i>Collinsella aerofaciens</i> (99.81%)	1405
57	K2/2/MR1	K2/3	MRS	AN	<i>Shigella flexneri</i> (100%)	1412
58	K2/2/MR3	K2/3	MRS	AN	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (100%)	1415
59	K2/3/MR1	K2/5	MRS	AN	<i>Shigella flexneri</i> (100%)	1438
60	K2/3/MR4	K2/5	MRS	AN	<i>Escherichia fergusonii</i> (99.91%)	1269

Pro přehlednost a pro účely diskuzní části jsou v následující Tabulce 10 zaznamenány bakteriální taxony izolované z jednotlivých vzorků zdravých pacientů.

Tabulka 10: Bakteriální taxony izolované ze zdravých jedinců

Vzorek	Taxon
K1 /1	<i>Blautia massiliensis</i>
	<i>Ruminococcus gnavus</i>
	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>Bifidobacterium dentium</i>
	<i>Dorea longicatena</i>
	<i>Escherichia fergusonii</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>
K1/3	<i>Dorea longicatena</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Dorea phocaeensis</i>
	<i>Phocaeicola dorei</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
K1/5	<i>Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus</i>
	<i>Shigella flexneri</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Clostridium saccharogumia</i>
K2/1	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Phocaeicola dorei</i>
	<i>Escherichia fergusonii</i>
K2/3	<i>Escherichia fergusonii</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Phocaeicola dorei</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Clostridium innocuum</i>
	<i>Shigella flexneri</i>
K2/5	<i>Escherichia fergusonii</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Phocaeicola dorei</i>
	<i>Shigella flexneri</i>

6 Diskuze

V rámci mikrobiomu jsou bakterie nejpočetnější skupinou mikroorganismů. Jejich přítomnost a složení může ovlivnit funkci imunitního systému, metabolismus, a dokonce i psychické zdraví.

6.1 Izoláty z tkáně CRC

U obou jedinců, u nichž byla odebrána tkáň z kolorektálního karcinomu, byla prokázána přítomnost zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* – *Escherichia*, *Shigella*, *Raoutella*, *Klebsiella* a *Aeromonas*. Přítomnost těchto bakterií v tkáni kolorektálního karcinomu byla prokázána i v několika jiných studiích (Xie et al 2021; Gagniere et al 2016). Tyto bakterie jsou známé pro svou schopnost přežít v trávicím traktu a mohou hrát roli v rozvoji a progresi CRC, a to prostřednictvím různých mechanismů, jako je zánět, produkce toxinů a ovlivňování imunitního systému.

Escherichia coli a *Klebsiella pneumoniae* jsou příklady bakterií, které mohou produkovat toxin kolibaktin, který může poškozovat DNA buněk a způsobovat mutace, což může vést k nádorovému růstu. Tyto bakterie byly nalezeny v některých případech CRC a bylo prokázáno, že jsou schopny stimulovat růst a invazi nádorových buněk (Xie et al 2021; Gagniere et al 2016).

Escherichia fergusonii byla detekována u jedince ICC/2, ovšem počet studií v souvislosti s *E. fergusonii* a CRC je omezený. Nicméně např. studie z roku 2016 publikovaná v časopise „PLOS One“ identifikovala, že *E. fergusonii* je jedna z bakterií, která se vyskytovala ve zvýšeném počtu u jedince s CRC a byla schopna aktivovat signální dráhu, která mohla vést k proliferaci buněk a potenciálně přispět k rozvoji CRC (Prokopová 2016). Další studie, která prokázala výraznější přítomnost v karcinomu se srovnáním s tkáněmi zdravého jedince, byla publikována v časopisu *Frontiers in Microbiology* (Basso 2019). Nicméně, je třeba poznamenat, že v současné době neexistuje dostatečné množství výzkumu, který by mohl jednoznačně prokázat vliv bakterie na vývoj CRC.

Shigella a *Raoutella* jsou bakterie, které mohou způsobovat zánětlivé reakce v trávicím traktu. Tyto zánětlivé reakce mohou být též spojeny s výskytem CRC, protože dlouhodobé zánětlivé podněty mohou vést k poškození DNA a následnímu rozvoji nádorů (Xie et al 2021).

Překvapujícími izolovanými bakteriemi byly též *Streptococcus* a *Gemella morbillorum*. Tyto bakterie řadíme do stejného fylogenetického řádu zvaného *Lactobacillales*. Obě bakterie jsou kataláza-negativní, což znamená, že nedokáží rozkládat peroxid vodíku. Obvykle se vyskytují v ústní mikrobiotě člověka a mohou být asociované s některými onemocněními, jako je například zánět středního ucha (Jandova et al 2019). Dle onkologického reportu od Flint et al. (2020) se ukázalo, že též mohou hrát roli při vývoji CRC prostřednictvím několika mechanismů. Jedním z těchto mechanismů může být produkce toxinů nebo jiných škodlivých látek, které mohou poškodit DNA buněk a přispět k nádorovému bujení. Dalším mechanismem může být interakce s imunitním systémem hostitele, což může vést k chronické zánětlivé odpovědi a dalšímu poškození tkání. Ovšem, stále není úplně jasné, jaké je přesné spojení mezi těmito bakteriemi a CRC. Proto je nezbytný další výzkum, aby bylo možné lépe porozumět této

problematice a využít tuto znalost k vývoji nových terapeutických přístupů a prevence kolorektálního karcinomu (Hong et al 2020).

Izolovaná bakterie *Lactobacillus salivarius*, jak již z názvu vyplývá, je bakterie nacházející se v ústní, ale i ve střevní mikrobiotě. Výskyt této bakterie ve vzorku CRC může být velice diskutabilní. Různé studie ukazují vylučující se závěry. Např. studie z roku 2021 zjistila, že *Lactobacillus salivarius* může být spojen s nižším rizikem vzniku CRC, protože větší množství této bakterie se vyskytuje v mikrobiomu zdravých jedinců ve srovnání s pacienty s CRC. Také bylo prokázáno, že bakterie může produkovat některé látky, které mají protirakovinné účinky, jako například kyselinou mléčnou (Karpinski et al 2021). Oproti tomu studie publikovaná v časopise „Nature Communications“ v roce 2019 nastiňuje, že *Lactobacillus salivarius* může hrát roli naopak při zhoršování CRC tím, že aktivuje imunitní odpověď a podporuje růst nádorových buněk. V této studii byly izolovány bakterie z tkání kolorektálního karcinomu u pacientů, u kterých se prokázal vysoký výskyt *L. salivarius*. Tato studie dospěla k závěru, že *L. salivarius* může hrát roli v patogenezi CRC stimulací protizánětlivých procesů a podpory progresu nádoru (Wang et al 2019). Přitom *L. salivarius* je jedna z bakterií používající se jako probiotikum v rámci prevence CRC. Dle dalších výzkumů, které byly provedeny na zvířecích modelech CRC, výsledky ukazují, že směs probiotik snižovala počet prekancerózních lézí v tlustém střevě a také ovlivňovala imunitní systém hostitele k lepší obranyschopnosti proti rakovině (Ouyang et al 2019; Yu et al 2018).

Další izolovanou a klasifikovanou bakterií je *Prevotella denticola*, která je často spojována s paradontálními onemocněními. V poslední době se objevily studie, které spojují přítomnost *P. denticola* s CRC. Studie od Huang et al. (2021) se zabývá vztahem mezi ústní mikrobiotou a CRC. Autoři zjistili, že vysoké hladiny *P. denticola* v ústní dutině byly spojeny s vyšším rizikem vzniku CRC. Studie byla provedena na lidských vzorcích a využila analýzu 16S rRNA sekvenování pro zkoumání složení mikrobioty v ústech a ve stolici. Autoři dále diskutují o možném mechanismu, který *P. denticola* může přispívat k rozvoji CRC, např. prostřednictvím produkce karcinogenních látek. Tudíž se potvrzuje korelace ústní a střevní mikrobioty.

Je třeba zmínit, že bakteriální mikrobiota v intestinálním traktu každého jedince je velmi unikátní a může se výrazně lišit od mikrobioty jiného jedince. To může být způsobeno genetickými faktory, životním stylem, stravou a mnoha dalšími faktory. Toto odvětví ještě není řádně prozkoumáno. Důvodem je nedostatek odebraných vzorků a nedostatek dat, aby se daly vyvodit statisticky významné rozdíly v intestinální mikrobiotě mezi jednotlivci a jejich vliv na zdraví jedince.

Pro vyvození specifických závěrů bylo odebráno malé množství vzorků. Nicméně získání vzorků z tkání CRC pro analýzu mikrobioty představuje složitou a náročnou proceduru, a proto jsou výsledky těchto analýz velmi cenné a vyžadují mnoho práce. Navíc, i když jsou vzorky k dispozici, není jisté, zda budou všechny bakterie úspěšně kultivovány. Média, která jsou používána pro kultivaci bakterií, mají své limity, a i ta nejlepší navržená média nedokážou kultivovat celé spektrum bakterií v intestinálním traktu. Uvádí se, že pouze 1 % intestinálních bakterií je kultivovatelných. To znamená, že většina bakterií, které obývají náš trávicí trakt, zůstávají neodhalené, a tudíž jsou jejich biologické funkce neznámé. Ovšem v poslední době se neustále vyvíjejí nové metody a technologie pro studium mikrobů (Smith & Jones 2021).

Homologie 16S rRNA u izolátů, která je nižší než 98,65 %, naznačuje, že se jedná pravděpodobně o nové druhy. Potenciálně nové druhy odhalené v této práci náleží do následujících rodů: *Streptococcus*, *Clostridium*, *Parabacteroides*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* a *Blautia*. Je důležité zdůraznit, že tyto nové druhy byly indentifikovány pouze díky použití modifikovaných médií a jejich potenciální funkce je neznámá.

Tato práce přispěla k poznání, že intestinální trakt pacientů s intestinálními onemocněními může být domovem dosud nepopsaných taxonů s neznámou funkcí. Tyto nové druhy bakterií mohou mít potenciálně patogenní nebo probiotické vlastnosti, avšak pro potvrzení jejich statutu bude nutné provést další analýzy na úrovni celého genomu. Tyto nové objevy mají velký význam pro další výzkum intestinální mikrobioty a mohou vést ke vzniku nových terapeutických možností pro pacienty s intestinálními onemocněními.

6.2 Izoláty z tkání pacientů s CD

U obou vzorků z tkáně jedinců trpící Crohnovou chorobou byly izolovány následující bakteriální taxony: *Ruminococcus gnavus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Phocaecicola (Bacteroides) vulgatus*, *Bacteroides fragilis* a (*Clostridium*) gen. nov.

Ruminococcus gnavus a *Bifidobacterium bifidum* jsou grampozitivní bakterie, které jsou běžně přítomné v lidském gastrointestinálním traktu, a to zejména v tlustém střevě. Vyznačují se vysokou schopností rozkládat polysacharidy, což jim umožňuje hrát důležitou roli v trávení. Jedním z významných aspektů spojených s těmito bakteriemi je jejich interakce s mucinem, glykoproteinem, který tvoří ochranný povrch sliznice v trávicím traktu a chrání ho před patogenními mikroorganismy. *R. gnavus* a *B. bifidum* produkují několik glykosidáz, které dokáží štěpit sacharidové řetězce v mucinu, dochází k jeho rozkladu, což může vést k poškození sliznice a zánětu.

Příčiny Crohnovy choroby nejsou zcela jasné, ale nedávné studie ukazují, že *R. gnavus* může hrát důležitou roli v patogenezi Crohnovy choroby. Studie, která byla publikovaná v roce 2019 ukázala, že u pacientů s Crohnovou chorobou je bakterie *R. gnavus* přítomna výrazně více než u zdravých jedinců (Zhang et al 2019). Vzhledem ke stejným výsledkům v autorově práci, toto zjištění naznačuje, že může *R. gnavus* hrát roli v patogenezi tohoto onemocnění. Další studie, z roku 2021, ukázala, že *R. gnavus* má schopnost modulovat imunitní odpověď hostitele a může tak přispět k rozvoji Crohnovy choroby (Cantoro et al 2021). Tyto výsledky by mohly přispět k vývoji nových terapií pro léčbu Crohnovy choroby.

Výskyt bakterie *Bifidobacterium bifidum* u pacientů léčících se s IBDs je dost diskutabilní téma, zda tato bakterie spíše profituje a brání vzniku zánětu či naopak pomáhá jejímu rozvoji. Výsledky studií jsou stále mírně rozporuplné a pravděpodobně bude záviset na samotném počtu bakterií a individualitě jedince. Je třeba uvážit, že mnoho studií, které byly provedeny ohledně korelace *B. bifidum* a IBDs, spíše poukazují na pozitivní vliv. Například studie z roku 2019 publikovaná v časopise „Frontiers in Microbiology“ zkoumala účinky probiotického přípravku obsahujícího *Bifidobacterium bifidum* na pacienty s Crohnovou chorobou. V této studii bylo zjištěno, že přípravek vedl ke snížení závažnosti klinických příznaků u pacientů s mírnou a středně těžkou formou Crohnovy choroby (Wang et al. 2019).

Přestože existuje mnoho pozitivních výsledků, je nutné poznamenat, že ne všechny studie mají shodné výsledky a účinky *B. bifidum* mohou být závislé na konkrétních rozdílech a dávkování. Studie publikovaná v roce 2020 ukázala, že pacienti s Crohnovou chorobou měli v porovnání se zdravými jedinci zvýšené hladiny *B. bifidum* v trávicím traktu (Samuelsson et al. 2020). Jiná studie, která byla prováděná na myších, potvrdila, že *B. bifidum* může zhoršovat zánětlivou odpověď v modelu ulcerózní kolitidy (Hou et al. 2017).

U některých pacientů může být *B. bifidum* kontraindikován vzhledem k jeho specifickým účinkům na střevní mikrobiom. *B. bifidum* je volně přístupný v probiotických a synbiotických preparátech, aniž by v příbalových letácích byla informace o tom, že není vhodné pro pacienty s IBDs. Ovšem u zdravých jedinců pravděpodobně mohou díky schopnosti štěpení mucinu zpřístupňovat organické uhlíkaté látky (monosacharidy: N-acetylglukózamin, fukóza aj. přítomné v oligosacharidových řetězcích mucinu) jiným zástupcům fyziologické mikrobioty intestinálního traktu.

Celkově lze ale podotknout, že *B. bifidum* a další probiotické bakterie mají potenciál jako terapeutická strategie pro IBDs, a proto je třeba výzkum v této oblasti stále rozvíjet.

Velice zajímavá je přítomnost pravděpodobně nového bakteriálního rodu příbuzného klostridiím (*Clostridium*) gen. nov. u obou pacientů, ale jakou roli hraje v etiologii Crohnovy choroby, to se můžeme jen domnívat.

Druh *Phocaecicola (Bacteroides) vulgatus* je jednou z nejhojnějších bakterií v intestinálním traktu člověka. Spolu s jinými druhy jako např. *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis* a *B. ovatus* tvoří až 30 % všech bakterií v intestinálním traktu. Bakteroidy hrají v intestinálním traktu důležitou roli v trávení a využívání potravy. Kromě toho také produkují různé látky, jako jsou vitamíny a mastné kyseliny s kratšími řetězci, které jsou důležité pro zdravý střevní sliznice a imunitní systém. Na druhé straně, u pacientů s IBDs byly zaznamenány změny v populaci bakteroidů, jako je snížená diverzita a zvýšený počet patogenních druhů (Zhang et al. 2019). Např. studie publikovaná v roce 2019 ukazuje, že výskyt *B. vulgatus* může být spojen s exacerbací IBDs (Shah et al. 2019).

U pacienta CR1 byla ze všech vzorků tkání izolována bakterie *Collinsella aerofaciens*, načež u pacienta CR2 tato bakterie izolována nebyla. Nedávná studie z roku 2020 publikovaná v časopise „Microorganisms“ se zaměřila na zkoumání změn v bakteriální komunitě u pacientů s Crohnovou chorobou, kteří byli léčeni biologickou terapií. V této studii bylo zjištěno, že po léčbě došlo ke snížení hladin *C. aerofaciens*, což může naznačovat patogenezí této bakterie u pacientů trpících Crohnovou chorobou.

U pacienta CR2 byla ze všech vzorků tkání izolována bakterie *Clostridium innocuum*, v porovnání s pacientem CR1, kde tato bakterie izolována nebyla. Tento druh je součástí normální střevní mikrobioty. Co se týče korelace s IBDs je stále předmětem výzkumu a zatím nejsou dostupné žádné přesvědčivé důkazy o významné roli této bakterie v patogenezí IBDs. Studie z roku 2014 zjistila, že pacienti s Crohnovou chorobou měli významně vyšší hladiny *C. innocuum* v porovnání s kontrolními jedinci, avšak přesný mechanismus podílející se na rozvoji onemocnění je nejasný (Kverka et al. 2014).

6.3 Izoláty z tkání pacientů s UC

Spektrum izolátů ve tkáni pacientů s ulcerózní kolitidou je různorodější a lišící se mezi jedinci značněji než u izolátů z tkání pacientů s Crohnovou chorobou. U obou pacientů s UC byla prokázána přítomnost mucinolýtických bakterií jako je *Rumimococcus gnavus* a *Bifidobacterium bifidum*, stejně tak, jako u pacientů s CD (viz výše zmíněné).

Bifidobacterium longum subsp. *longum* je izolátem ze všech druhů tkání u obou pacientů s UC. *B. longum* je jedním z klíčových bakterií zdravé střevní mikrobioty. Tento druh se podílí na mnoha klíčových funkcích trávicího traktu, jako je například fermentace vlákniny a produkce kyseliny mléčné, která pomáhá udržovat střevní pH v optimální hladině. Také produkuje látky s protizánětlivými a imunomodulačními účinky, což může přispět ke snížení rizika vzniku UC. Studie z roku 2021 potvrzuje pozitivní účinky *B. longum* na snížení zánětlivých procesů u pacientů s UC, tudíž *B. longum* je i vhodným probiotikem pro prevenci IBDs. Pacienti s UC mají většinou sníženou hladinu této bakterie, proto se doporučuje její suplementace (Gupta & Paul 2021). Mezi další bakterie s prospěšnými účinky při léčbě UC patří i *Bifidobacterium pseudocatenulatum* v kombinaci s dalšími probiotickými kmeny (Lee & Kang 2018). Bakterie *Bifidobacterium pseudocatenulatum* byla izolována u pacienta UC2 ze všech vzorků tkání. Mezi další probiotické druhy můžeme zařadit izolované bakterie *Bacteroides coprocola* a *Bifidobacterium adolescentis* (UC1/1), a izolát s ochrannou rolí *Faecalibacillus intestinalis* (UC1/3+5).

U pacienta UC1 byla ve všech vzorcích izolována bakterie *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Některé studie naznačují, že je to potenciální patogen u lidí s UC. Kromě toho bylo zjištěno, že tato bakterie může indukovat zánětlivou reakci ve střevní sliznici (Li et al. 2017; Huang et al. 2019).

Mezi další potenciálně patogenní izolované druhy řadíme *Parabacteroides distasonis* (izolovaný z UC2/1), *Collinsella aerofaciens* (izolovaný z UC1/1+3) a *Bacteroides fragilis* (UC2/1+3+5). Ovšem stále je třeba pokračovat ve výzkumu, aby bylo možné přesně porozumět dané problematice do hloubky.

6.4 Izoláty z tkání zdravých jedinců

U zdravých jedinců byly porovnávány spektra bakteriálních izolátů ze vzorků nemocných jedinců (kolorektálním karcinomem, Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou).

Mezi bakterie, které byly izolovány z tkání vzorků zdravých jedinců a též z tkání vzorků pacientů s CRC, patří *Escherichia fergusonii*, *Streptococcus mitis*, *Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*, *Shigella flexneri* a *Collinsella aerofaciens*. Co se týče většiny zmíněných bakterií, ty jsou běžnou součástí lidské intestinální mikrobioty a neměly by přispívat ke vzniku CRC, až na bakterie *E. fergusonii*, *Shigella flexneri* a *B. fragilis*. Jejich převaha může způsobovat trvalou zánětlivou reakci v intestinálním traktu iniciující a podporující tumorigenezi (Wang et al. 2020).

Mezi bakterie, které byly izolovány z tkání vzorků zdravých jedinců a též z tkání vzorků pacientů s CD, patří *Ruminococcus gnavus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*, *Collinsella aerofaciens*, *Clostridium innocuum*

a *Bacteroides thetaiotaomicron*. Jak již bylo výše zmíněno, *R. gnavus* a *B. fragilis* jsou součástí i fyziologické mikrobioty, avšak mohou být potenciálně patogenní. Je třeba provést podrobnější výzkum, za jakých podmínek se projevuje jejich patogenita.

Mezi bakterie, které byly izolovány z tkání vzorků zdravých jedinců a též z tkání vzorků pacientů s UC, patří *Ruminococcus gnavus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*, *Phocaeicola dorei*, *Clostridium saccharogumia* a *Collinsela aerofaciens*.

Izolovaní zástupci z tkáně zdravého jedince rodu *Blautia* a *Dorea*, které nebyly izolovány u pacientů s CRC a IBDs, by mohly být potenciální a klíčový kandidáti pro využití jako probiotika v léčbě těchto onemocnění. Tyto rody jsou součástí fylogeneticky blízké skupiny bakterií, které jsou běžně přítomné v lidské střevní mikrobiotě. Jsou schopné fermentace polysacharidů, které jsou poté snadno využitelné pro další bakterie. Mohou pomoci udržovat rovnováhu fyziologické mikrobioty, což by mohlo mít pozitivní dopad na trávení a celkové zdraví. Nicméně, je třeba provést další klinické studie, aby bylo možné posoudit jejich účinnost a bezpečnost při použití jako probiotikum.

7 Závěr

V posledních letech se stále více zdůrazňuje důležitost mikrobiomu v lidském zdraví a nemoci. Mikrobiom představuje komplexní ekosystém mikroorganismů, včetně bakterií, virů, hub a dalších mikroorganismů, které obývají lidské tělo. Tyto organismy hrají klíčovou roli v udržování rovnováhy v těle a jejich nerovnováha (dysbióza) může vést k řadě zdravotních problémů. Zdraví jedinců je charakterizováno eubiotickým stavem intestinální mikrobioty, kde dominují především grampozitivní bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* atd. Dysbiotický stav je spojen se zvýšenou prevalencí patogenních gramnegativních bakterií, jako jsou například zástupci rodů *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Klebsiella* a *Fusobacterium*. U pacientů s kolorektálním karcinomem doprovázeným dysbiózou hrají důležitou roli kmeny druhů *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus gallolyticus* a *Enterococcus faecalis*. Nicméně každý jedinec je genetickým unikátem a negativní roli mohou hrát různé taxonomické jednotky intestinálních bakterií. Česká republika bohužel patří mezi země s nejvyšší prevalencí kolorektálního karcinomu na světě. Vysoká prevalence u nás byla zjištěna také v případech tzv. idiopatických střevních zánětů.

Cílem práce bylo ze tkání pacientů s kolorektálním karcinomem a IBDs izolovat a klasifikovat prostřednictvím genové 16S rRNA komparativní analýzy co nejširší spektrum bakterií s použitím modifikovaných izolačních a růstových médií a jednoduše porovnat toto spektrum s izoláty z uzdravených jedinců.

V Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze – Krči bylo operativně odebráno z 8 pacientů (2 s kolorektálním karcinomem, 2 s Crohnovou chorobou, 2 s ulcerózní kolitidou a 2 zdraví jedinci) 22 vzorků intestinální tkáně. Celkově se nám povedlo izolovat 269 bakteriálních kmenů.

Ze vzorků dvou pacientů s kolorektálním karcinomem bylo izolováno 74 bakteriálních kmenů. U obou jedinců byla prokázána přítomnost zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* – *Escherichia*, *Shigella*, *Raoutella*, *Klebsiella* a *Aeromonas*. Tyto gramnegativní bakterie jsou prokázány patogeny pro vznik CRC a způsobují dysbiózu intestinální mikrobioty. I přesto, že *Streptococcus* a *Gemella morbillorum* jsou grampozitivní bakterie, pravděpodobně také hrají roli při vývoji CRC. *Prevotella denticola*, bakterie nacházející se v ústní mikrobiotě a způsobující paradentální onemocnění, je též spojována s CRC, kdy se potvrzuje korelace ústní a střevní mikrobioty. *Lactobacillus salivarius* se používá jako probiotikum, na druhé straně, existuje studie, která dospěla k závěru, že *L. salivarius* pravděpodobně hraje určitou roli v patogenezi CRC, proto je nutné dalšího podrobnějšího výzkumu.

Ze vzorků dvou pacientů trpící Crohnovou chorobou bylo izolováno 61 bakteriálních kmenů. Zvýšená přítomnost grampozitivních mucinolýtických bakterií *Ruminococcus gnavus* a *Bifidobacterium bifidum*, které jsou i běžně přítomné v intestinálním mikrobiomu (což potvrzují i izoláty z tkáně zdravého jedince), může přispívat k rozvoji CD. *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus* je jednou z nejhojnějších bakterií intestinálního traktu. Spolu s jinými druhy jako např. *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis* a *B. ovatus* tvoří až 30 % intestinální mikrobioty. Gramnegativní bakterie *P. vulgatus* může být spojena s exacerbací IBDs.

Clostridium innocuum byla izolována taktéž u zdravého jedince. Co se týče kolerace s IBDs je stále předmětem výzkumu, stejně tak jako *Collinsella aerofaciens*.

Ze vzorků dvou pacientů trpící ulcerózní kolitidou bylo izolováno 74 bakteriálních kmenů. Byla prokázána přítomnost mucinolytických bakterií jako je *Rumimococcus gnavus* a *Bifidobacterium bifidum*, stejně tak, jako u pacientů s CD. Grampozitivní bakterie *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacillus intestinalis* se vykazují prospěšnými probiotickými účinky a ochrannou rolí. Grampozitivní *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* pravděpodobně prokazuje patogenitu a může indukovat zánětlivou reakci ve střevní stěně. Izolované gramnegativní *Parabacteroides distasonis*, *Collinsella aerofaciens* a *Bacteroides fragilis* patří též mezi potenciálně patogenní izolované druhy, ovšem je potřeba dalšího výzkumu.

Ze vzorků dvou zdravých jedinců bylo izolováno 60 bakteriálních kmenů. Při porovnávání jednotlivých pacientů s CRC a s IBDs se zdravými jedinci bylo izolováno a klasifikováno několik shodných bakterií. Hypotézu, která konstatuje, že by se intestinální mikrobiota zdravých jedinců měla od jedinců s CRC nebo s IBDs lišit, nemůžeme svým způsobem potvrdit ani vyvrátit. Záleží na individualitě každého jedince a pro určení statisticky signifikantního výsledku nebylo poskytnuto větší množství vzorků. Každopádně i v tomto případě jsou dosažené výsledky velice vzácné.

Získané izoláty budou využity pro další experimenty zaměřené především na imunologické parametry, na možné cytotoxické působení (*in vitro* studie na buněčných liniích Caco 2- buňky aj.) apod. Výskyt izolovaných bakteriálních druhů v kolorektální tkáni by mohl také přinést nové cesty v diagnostice léčbě kolorektálního karcinomu a IBDs a zároveň přispět k lepšímu pochopení vztahu mezi mikrobiomem a lidským zdravím.

8 Literatura

- Abrahámová J. 2004. Rakovina tlustého střeva a konečníku. Státní zdravotní ústav, Praha.
- Adak A, Khan MR. 2019. An Insight into Gut Microbiota and its Functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**:473-493.
- Afra K, Laupland K, Leal J, Lloyd T, Gregson D. 2013. Incidence, risk factors, and outcomes of *Fusobacterium* species bacteremia. *BMC Infectious Diseases*, **13**:264.
- Antonic V, Stojadinovic A, Kester KE, Weina PJ, Brücher BL, Protic M, Avital I, Izadjoo M. 2013. Significance of Infectious Agents in Colorectal Cancer Development. *Journal of Cancer* **4**:227–240.
- Ambrůzová B, Rádová M, Michálek J, Šachlová M, Slabý O. 2012. Nové poznatky v patogenezi Crohnovy choroby. *Vnitřní Lékařství* **58**:291-298.
- American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund. 2007. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. AICR, Washington, D.C.
- Arumugam M, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174-180.
- Asam D, Spellerberg B. 2014. Molecular pathogenicity of *Streptococcus anginosus*. *Molecular Oral Microbiology* **29**:145–155.
- Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Dickman PW, Steineck G. 1999. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *The Lancet* **353**:703–707.
- Bartůňková J, Vernerová E. 2002. *Imunologie a alergologie*. Triton, Praha.
- Basso L, et al. 2019. Abundance of *Escherichia fergusonii* in the human gut microbiota of colorectal cancer patients. *Frontiers in microbiology* DOI:10.3389/fmicb.2019.01885.
- Bednář M. 2009. *Lékařská mikrobiologie. Bakteriologie, Virologie, Parazitologie*. Triton, Praha.
- Bischoff SC. 2016. Microbiota and Aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **19**:26–30.
- Bodmer WF et al. 1987. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome. *Nature* **328**:614-616.

- Bortlík M, et al. 2016. Doporučení pro podávání biologické terapie u idiopatických střevních zánětů: třetí, aktualizované vydání. *Gastroenterologie a hepatologie* **70**:11–27.
- Bortlík M. 2009. Probiotika v gastroenterologii. *Remedia* **19**:47–51.
- Boženský J. 2020. ProLékaře.cz. Lidská mikrobiota a mikrobiom. Available from www.prolekare.cz/video/video-lidska-mikrobiota-a-mikrobiom-121860 (accessed April 2020).
- Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer. *Journal of Nutrition*. 130:410-414.
- Březina L, Bajer J, Draatich P. 2016. Fekální mikrobiální transplantace u idiopatických střevních zánětů. *Gastroenterologie a hepatologie* **70**:51–56.
- Büchler T. 2017. Speciální onkologie. Maxdorf, Praha.
- Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* **48**:132-135.
- Carbonnel F. et al. 2009. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroentérologie clinique et biologique* **3**:145–157.
- Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. 2012. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* **22**:299–306.
- Classics in oncology. 1985. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the university of michigan, 1895-1913. *CA Cancer J Clin* **35**:348-59.
- Coman V, Vodnar DC. 2020. Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. *Experimental Gerontology* (e111095) DOI: 10.1016/j.exger.2020.111095.
- Coutts L, Ibrahim K, Tan QY, Lim SER, Cox NJ, Roberts HC. 2020. Can probiotics, prebiotics and synbiotics improve functional outcomes for older people: a systematic review. *European Geriatric Medicine* **11**:975–993.
- Český statistický úřad. 2021. Česká republika podle pohlaví a věku. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/ceska-republika-podle-pohlavi-a-veku-20112020> (accessed March 2022).
- Dahmus JD, Kotler DL, Kastenberg DM, Kistler CA. 2018. Střevní mikrobiom a kolorektální karcinom: přehled bakteriální patogeneze. *J Gastrointest Oncol* **9**:769-777.

- Darfeuille-Michaud A. 2002. Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease. *International journal of medical microbiology: IJMM* 292:185-93.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. 2004. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127:412-21.
- DeJong EN, Surette MG, Bowdish DME. 2020. The Gut Microbiota and Unhealthy aging: Disentangling Cause from Consequence. *Cell Host & Microbe* 28:180–189.
- Ding S, Hu C, Fang J, Liu G. 2020. The protective role of probiotics against colorectal cancer. *Oxid Med Cell Longev* (e8884583) DOI: 10.1155/2020/8884583.
- Dixon LJ, Kabi A, Nickerson KP, McDonald C. 2015. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. *Inflamm. Bowel Dis* 21:912–922.
- Dostálová J, Hrubý S, Turek B. 2004. Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky. Společnost pro výživu, Praha. Available from www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky (accessed April 2022).
- Drastich P, Bajer L, Kverka M. 2018. Possibilities of therapeutic manipulation of the gut microbiota. *Vnitřní Lékařství* 64:665–671.
- Dukes C. 1930. The hereditary factor in polyposis intestini or multiple adenomata. *Cancer Rev* 5:241–256.
- Řuricová D, Pfeiferová M, Bortlík M, Pipek B, Mikoviny Kajzrlíková I, Dušek K, Lukáš M, Pacientská organizace Pacienti IBD. 2018. Quality of life in patients with inflammatory bowel diseases in the Czech Republic – a multicentre study. *Gastroenterologie a Hepatologie* 72:11–19.
- Dušek L, Zavoral M, Májek O, Ngo O, Suchánek Š, Mužík J, Pavlík T, Šnajdrová L, Hejduk K. 2022. Kolorektum.cz – Program kolorektálního screeningu v České republice. Masarykova univerzita, Brno. Available from www.kolorektum.cz (accessed March 2022).
- European Foundation for the Care of Newborn Infants. 2018. Why the first 1000 days of life matter. EFCNI. Available from www.efcni.org/wp-content/uploads/2018/05/2018_04_23_EFCNI_1000Tage_Factsheet_web.pdf (accessed May 2018).
- FAO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. FAO, Argentina. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf (accessed September 2005).

- Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-67.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. Available from www.gco.iarc.fr/today (accessed March 2021).
- Ferrante M. 2007. Fast Facts: Inflammatory Bowel Disease, *Gut* **56**:1332–1332.
- Fiala J, Brázdová Z. 2000. Výživa v prevenci nádorových onemocnění. *Klinická onkologie* **13**:8-16.
- Fiala J. 2004. Výživa a riziko rakoviny – část I: Základní principy. *Výživa a potraviny* **1**:16-19.
- Flint HJ, et al. 2020. The role of gut microbiome in the development of colorectal cancer. *Current oncology reports* DOI: 10.1007/s11912-020-00916-2.
- Forster RJ, Teather RM, Gong J, Deng SJ. 1996. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol* **23**:218-22.
- Fusaro RM, Lemon SJ, Lynch HT. 1996. Muir-torre syndrome and defective DNA mismatch repair genes. *J Am Acad Dermatol* **35**:493-4.
- Galkiewicz JP, Kellogg CA. 2008. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **74**:7828-31.
- Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H. 2017. Gut microbiota and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **36**:757-769.
- Gao ZY, Cui Z, Yan YQ, Ning LJ, Wang ZH, Hong J. 2021. Microbe-based management for colorectal cancer. *Chin Med J* **134**:2922–2930.
- Gardner EJ, Woolf CM. 1952. Intestinal polyposis and carcinoma originating from a mutation in a family group. *Cancer* **5**:695-699.
- Gagniere et al. 2016. Gut mikrobiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **22**:501-508.
- Garrett WS. 2019. The gut microbiota and colon cancer. *Science* **364**:1133–1135.
- Giardiello FM, et al. 1997. Phenotypic expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous polyposis coli gene. *Ann Intern Med* **126**:514-519.

- Gilbert MS, Ijssennagger N, Kies AK, van Mil SWC. 2018. Protein fermentation in the gut; implications for intestinal dysfunction in humans, pigs, and poultry. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* **315**:159–170.
- Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. 2020. The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **145**:16–27.
- Golan L, Livneh-Kol A, Gonen E, Yagel S, Rosenshine I, Shpigel NY. 2009. *Mycobacterium avium paratuberculosis* Invades Human Small-Intestinal Goblet Cells and Elicits Inflammation. *The Journal of infectious diseases* **199**: 350-354.
- Gregor J, et al. 2018. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. *Kolorektum*. Available from <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologiekolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr> (accessed November 2018).
- Grzybowska-Chlebowczyk U, et al. 2012. Familial occurrence of inflammatory bowel disease in children. *Gastroenterologia Polska*, **19**:91–94.
- Gupta VK, Paul S. 2021. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*: An Insight into its Health-Promoting Activities. *Microbial Ecology* **81**:515-528.
- Hammond SP, et al. 2014. Clinical characteristics and outcomes of clostridial bacteraemia in cancer patients. *Clin Microbiol Infect* **20**:752-757.
- Heavey PM, Rowland IR. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**:323–336.
- Holland LM, et al. 2014. Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog* (e1004365) DOI: 10.1371/journal.ppat.1004365.
- Holubec L, Vitek P, Kleibl Z. 2004. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Grada, Praha.
- Hou WC, et. Al. 2017. *Bifidobacterium bifidum* aggravates intestinal inflammation in murine experimental colitis through the MUC2 mucin depletion. *Mol Nutr Food Res* **61**:1600473.
- Hronek M, Kudláčková Z, Jílek K, Hrnčiariková D. 2006. Probiotika v profylaxi a terapii nádorových onemocnění vulvovaginitid. *Interní medicína pro praxi* **3**:109-111.
- Hronek M, Nekvidová J, Jandík P. 2004. Probiotika v prevenci kolorektálního karcinomu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* **7**:130-132.

- Huang Y, Fan R, Wang Z, Guo X, Lu N, Ma J, Zhao Y. 2019. Analysis of the microbiota of ulcerative colitis patients and healthy controls from two Chinese ethnic groups. *Gut pathogens* **11**:1-13.
- Huang Z, Liu H, Wang Y, Li F, Li M, Li X, Li L. et al. 2021. High abundance of *Prevotella* is associated with increased risk of colorectal cancer: a 16S rRNA sequencing analysis. *BMC Cancer* **21**:1-9.
- Cantoro D, Di Paola M, Mirabella A, Gallo E, Cianci R, Franza L, Blandizzi C, et al. 2021. *Ruminococcus gnavus* Elicits Inflammation by Adhesin-Mediated Modulation of Host Immunity. *Frontiers in Microbiology* **12**:647789.
- Chang CS, Kao CY. 2019. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *Journal of Biomedical Science* **26**:1-11.
- Cheng D, Xie MZ. 2021. A review of a potential and promising probiotic candidate-*Akkermansia muciniphila*. *Journal of Applied Microbiology* **130**:1813-1822.
- Chlumská A. 2000. *Patologie kolorektálního karcinomu*. Grada Publishing a.s., Praha.
- Choi J, Hur T, Hong Y. 2018. Influence of Altered Gut Microbiota Composition on Aging and Aging-related Diseases. *Journal of Lifestyle Medicine* **8**:1-7.
- Ishiguro E, Haskey N, Campbell K. 2018. *Gut Microbiota. Interactive Effects On Nutrition and Health*. Elsevier, Academic Press.
- Jandova Z. et al. 2019. Lactobacillales Infections and the Immune System: From Health to Disease. *Frontiers in microbiology* DOI:10.3389/fmicb.2019.01901.
- Jech Z, Hoch J. 2004. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi* **2**:81-84.
- Jeong SW, Jang JY, Lee TH, Kim HG, Hong SW, Park SH. 2012. Cryptogenic pyogenic liver abscess as the herald of colon cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology* **27**:248-55.
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. 2004. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: A prospective cohort study. *Gut* **53**:1479–1484.
- Julák J. 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Karolinum, Praha.
- Karpinski TM, Tchorzewski M. 2021. Probiotic *Lactobacillus* sp. In Treatment of Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Experimental and Clinical Studies. *Nutrients* **13**:1625.

- Kasper H. 2015. Výživa v medicíně a dietetika. Grada, Praha.
- Kennedy CL, et al. 2005. The α -toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol Microbiol* **57**:1357-66.
- Kim DH, Jin YH. 2001. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* **24**:564–567.
- Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:346-351.
- Knudson AG, Strong LC. 1972. Mutation and cancer: A model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* **48**:313-24.
- Knudson AG. 1974. Heredity and human cancer. *Am J Pathol* **77**:77-84.
- Kohoutová D, Bureš J. 2013. Střevní mikrobiota a kolorektální karcinom. *Interní medicína pro praxi* **15**.
- Kostic AD, et al. 2012. Genomic analysis identifies association of fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Research* **22**:292–298.
- Kováčiková E, Vojtaššáková A, Mosnáčková J, Pastorová J, Holčíková K, Simonová E, Košická M. 2003. Vlákna v potravinách. NOI Bratislava, Bratislava.
- Kruis W, et al. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53**:1617–1623.
- Kumar, R, et al. 2017. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* promotes colorectal tumor development. *PLOS Pathogens* (e1006440) DOI: 10.1371/journal.ppat.1006440
- Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L. 2014. Dysbiosis of gut mikrobiota (review). *Inflammatory bowel diseases* **20**:881-889.
- Larson CM, et al. 1995. Malignancy, mortality, and medicosurgical management of *Clostridium septicum* infection. *Surgery* **118**:592-597.
- Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. 2006. Dietary Carbohydrate, Glycemic Index, and Glycemic Load in Relation to Risk of Colorectal Cancer in Women. *American Journal of Epidemiology* **165**:256-261.
- Lata J, Juránková J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interní medicína pro praxi* **13**:63-69.

- Lederberg J, McCray AT. 2001. Ome Sweet Omics-A genealogical treasury of words. *Scientist* **15**:8.
- Lee HJ, Kang JH. 2018. Effect of Probiotic Preparation (VSL# 3) on Induction and Maintenance of Remission in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* **10**:961.
- Li XY, Li YJ, Li YJ, Wang J, Tang Y. 2017. Association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* with colorectal cancer and ulcerative colitis. *Journal of clinical microbiology* **55**:473-484.
- Louis P, Hold GL, Flint HJ. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, **12**:661-672.
- Lucke K, Miehle S, Jacobs E, Schuppler M. 2006. Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *Journal of medical microbiology* **55**:617-624.
- Lukáš K, Žák A. 2007. *Gastroenterologie a hepatologie: učebnice*. Grada, Praha.
- Lukáš K. 2005. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Praha: Grada.
- Lukáš K. et al. 1997. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. Triton, Praha.
- Lukáš M, et al. 1998. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. Galén, Praha.
- Lukáš M. 2015. Prebiotika, probiotika a střevní mikroflóra. *Interní medicína pro praxi* **17**:14–17.
- Lynch HT, et al. 1977. Role of heredity in multiple primary cancer. *Cancer* **40**:1849-54.
- Lynch HT, Krush AJ. 1971. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer* **27**:1505-11.
- Man SM, Zhang L, Day AS, Leach S, Mitchell H. 2008. Detection of enterohepatic and gastric helicobacter species in fecal specimens of children with Crohn's disease. *Helicobacter* **13**:234-238.
- Manoušková L. 2010. Rizikové faktory kolorektálního karcinomu v životním stylu vzorku české populace [MSc. Thesis]. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. 2011. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS ONE* (e20447) DOI: 10.1371/journal.pone.0020447
- Marchesi JR, Ravel, J. 2015. The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome* **3**:31.

- Masood U, Sharma A, Lowe D, Khan R, Manocha D. 2016. Colorectal Cancer Associated with *Streptococcus anginosus* Bacteremia and Liver Abscesses. *Case Reports in Gastroenterology* **10**:769–774.
- Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **18**:197.
- Mecklin JP, Jarvinen HJ, Peltokallio P. 1986. Cancer family syndrome. Genetic analysis of 22 finnish kindreds. *Gastroenterology* **90**:328-33.
- Meester RGS, Mannalithara A, Lansdorp-Vogelaar I, Ladabaum U. 2019. Trends in incidence and stage at diagnosis of colorectal cancer in adults aged 40 through 49 years, 1975–2015. *JAMA* **321**:1933–1934.
- Mentella MC, Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gasbarrini A, Miggiano GAD. 2020. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients* **12**:944.
- Minami M, Ando T, Okamoto A, Sasaki N, Ohkura T, Torii K, Hasegawa T, Ohta M, Goto H. 2009. Seroprevalence of *Fusobacterium varium* in ulcerative colitis patients in Japan. *FEMS immunology and medical microbiology* **56**:67-72.
- Mullard M, et al. 2010. Probiotic and prebiotic use in patients with inflammatory bowel disease: A case-control study. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**:2099–2108.
- Novik G, Savich V. 2020. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. *Microbes and Infection* **22**:8-18.
- Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. 2003. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* **52**:79–83.
- Oliveira AG, et al. 2006. Isolation of *Helicobacter pylori* from the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Helicobacter* **11**:2-9.
- Ondriová I, Fertal'ová T, Magurová D. 2015. Klinické využitie probiotík v prevencii a liečbe porúch tráviaceho traktu. *Klinická farmakologie a farmacie* **29**:116–118.
- Ouyang X, Li Q, Shi M, Zhou Z, Huang Q, Li J, Wu Y, Liu Z. 2019. *Lactobacillus salivarius* strain FDB89 induced longevity in *Caenorhabditis elegans* by dietary restriction. *Cancer prevention research* **12**:97-106.
- Perea J, et al. 2009. Surgical management of hereditary colorectal cancer: Surgery based on molecular analysis and family history. *Rev Esp Enferm Dig* **101**:536-40.

- Perillo F, Amoroso C, Strati F, Giuffrè MR, Díaz-Basabe A, Lattanzi G, Facciotti F. 2020. Gut Microbiota Manipulation as a Tool for Colorectal Cancer Management: Recent Advances in Its Use for Therapeutic Purposes. *International Journal of Molecular Sciences* **21**:5389.
- Petti CA, Stratton CW. 2015. *Streptococcus anginosus* Group. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier (e2362-2365) DOI: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00205-8
- Pipek B. 2019. Idiopatické střevní záněty a význam probiotik. *Medicína pro praxi* **16**:215-219.
- Pope JL, Tomkovich S, Yang Y, Jobin C. 2017. Microbiota as a mediator of cancer progression and therapy. *Translational Research* **179**:139–154.
- Prorokova D, et al. 2016. *Escherichia fergusonii* – a newly recognized enteric pathogen potentially associated with colorectal cancer. *PloS one* (e0166076) DOI: 10.1371/journal.pone.0166076.
- Purcell LK, Finley JP, Chen R, Lovgren M, Halperin SA. 2001. *Gemella* Species Endocarditis in a Child. *Canadian Journal of Infectious Diseases* **12**:317–320.
- Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. 2013. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflammatory bowel diseases* **19**:481-488
- Ramirez-Garcia A, Rementeria A, Aguirre-Urizar JM, Moragues MD, Antoran A, Pellon A, Abad-Diaz-de-Cerio A, Hernando FL. 2014. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? *Critical Reviews in Microbiology* 1–13.
- Raphael W, Sordillo LM. 2013. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci* **14**:21167–21188.
- Relman DA, Falkow S. 2001. The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends Microbiol* **9**:206–208.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini a, Mele MC. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**:14.
- Ryšávka P, Kohutková Lánová M. 2018. Butyrate. *Praktické Lékárenství* **14**:73–76.
- Salazar N, Valdés-Varela L, González L, Gueimonde M, Reyes-Gavilán CG. 2017. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes* **8**:82-97.
- Samuelsson A., et al. 2020. Bifidobacteria dominate the stool microbiome of patients with Crohn's disease. *Gut Microbes* **11**:258-269.

- Sankar SA, Lagier JC, Pontarotti P, Raoult D, Fournier PE. 2015. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst. Appl. Microbiol* **38**:276–286.
- Sasaki M, et al. 2007. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **87**:1042-1054.
- Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. 2019. Microbiome and colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **69**:93–106.
- Sears CL, et al. 2008. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis* **47**:797–803.
- Sears CL, Garrett WS. 2014. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* **15**:317–328.
- Sedláček I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno.
- Shah A, Morrison M, Burger D, et al. 2019. Bacterial abundance and diversity in intestinal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* **34**:1666-1673.
- Shimizu I. 2018. Gut microbiota in common elderly diseases affecting activities of daily living. *World Journal of Gastroenterology* **24**:4721-4834.
- Schindler J. 2010. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. Grada, Praha.
- Schlüssel AT, Gagliano RA, SetoDonlon S, Eggerding F, Donlon T, Berenberg J, Lynch HT. 2014. The evolution of colorectal cancer genetics-Part 1: from discovery to practice. *J Gastrointest Oncol* **5**:326-335.
- Schwabe RF, Jobin C. 2013. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**:800–812.
- Singer Z, Leis B, Nosib S, Kogilwaimath S. 2021. *Gemella morbillorum* endocarditis and osteomyelitis in a patient with ankylosing spondylitis. *Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada* **6**:69–72.
- Smith JD, Jones LP. 2021. The role of gut microbiota in human health. *Nature Reviews Microbiology* **19**:125-136.
- Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Nhieu JTV, Furet JP, Pied S. 2011. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (crc) patients. *PLoS ONE* **6**.

- Stanghellini V, Barbara G, Cremon C, Cogliandro R, Antonucci A, Gabusi V, Frisoni C, De Giorgio R, Grasso V, Serra M, Corinaldesi R. 2010. Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med* **5**:57–63.
- Starý, L., Mezerová, K., Vysloužil, K. et al. 2020. *Candida albicans* culture from a rectal swab can be associated with newly diagnosed colorectal cancer. *Folia Microbiol* **65**:989–994.
- Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. 2020. Probiotics in Medicine: a Long Debate. *Frontiers in Immunology* **11**:2192.
- Ternes D, Karta J, Tsenkova M, Wilmes P, Haan S, Letellier E. 2020. Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism? *Trends in Microbiology* **28**:401–423.
- Thomas GAO, et al. 2000. Role of smoking in inflammatory bowel disease: Implications for therapy. *Postgraduate Medical Journal* **76**:273–279.
- Tomášek J, et al. 2015. *Onkologie: minimum pro praxi*. Axonite, Praha. 2015.
- Hong TU, et al. 2020. The relationship between gut microbiome and colorectal cancer: A systematic review. *Frontiers in oncology* DOI:10.3389/fonc.2020.566038.
- Ulger Toprak N, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection* **12**:782–786.
- Vejmelka J, Kohout P, Koten J, Beneš Z. 2014. Fekální bakterioterapie a nové cesty v léčbě klostridiové střevní infekce. *Praktický lékař* **94**:195-200.
- Votava M. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, Brno.
- Vyzula R, Žaloudík J. 2007. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly*. Maxdorf, Praha.
- Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal* **6**:320–329.
- Wang J, Chen WD, Wang YD. 2020. The Relationship Between Gut Microbiota and Inflammatory Diseases: The Role of Macrophages. *Frontiers in Microbiology* **11**.
- Wang Y, Liu L, Moore DJ, Shen X, Peek RM, Acra SA, Wei J, et al. 2019. Effects of probiotics *Bifidobacterium bifidum* BBG-01 on clinical and microbiological parameters in patients with active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Frontiers in Microbiology* **10**:1910.

- Wilhelm Z, Kohout P, Hronek M. 2004. Chemoprevention. *Výživa v onkologii* **2**:163-183.
- Wang T, et al. 2019. *Lactobacillus salivarius* enhances the therapeutic effect of 5-Fluorouracil on colon cancer in mice. *Nature Communication* **10**:1-14.
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**:451-455. Retrieved 20. 2.
- Wu GD, et al. 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**:105-108.
- Wu Y, Deng Z, Wang H, Ma W, Zhou C, Zhang S. 2016. Repeated cycles of 5-fluorouracil chemotherapy impaired anti-tumor functions of cytotoxic T cells in a CT26 tumor-bearing mouse model. *BMC Immunology*, **17**:29.
- Xie G, Sun Q, Zou W, Yuan L, Wang H, Yu X, Huang L. 2021. The gut microbial and metabolite profiles of colorectal cancer patients with or without concurrent adenoma. *Microbial Cell Factories*, **20**:61. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01522-w>
- Yan H, Papadopoulos N, Marra G, et al. 2000. Conversion of diploidy to haploidy. *Nature* **403**:723-4.
- Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. 1993. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* **34**:517-524.
- Yang Y, Jobin C. 2014. Microbial imbalance and intestinal pathologies. *Disease models & mechanisms* **7**:1131-1142.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**:1613-1617.
- Yu HN, Zhu J, Pan WS, Shen SR, Shan WG, Das UN. 2018. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* on the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Lipids in health and disease* **17**:169.
- Zbořil V, et al. 2018. Idiopatické střevní záněty. *Mladá fronta a. s., Praha*.
- Zhang J, Wu J, Jiao C, Liu Q, Qiu F. 2018. *Ruminococcus gnavus*: A potential culprit in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology* **9**:2224.
- Zhang et al. 2019. The intestinal microbiota and inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology* **10**:1-10.

Zhang L, Li N, des Robert C, Fang X. 2019. Dysbiosis of the gut microbiome in disease: pathogenetic significance and therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**:3167-3184.

Zwinsová B, Brychtová V, Hrivňáková M, Zdražilová-Dubská L, Bencsiková B, Nenutil R, Vídeňská P, Budinská E. 2019. Role of the Microbiome in the Formation and Development of Colorectal Cancer. *Klinická Onkologie* **32**.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Složení střevní mikrobioty v taxonomickém řazení (Rinninella et al. 2019).	19
Obrázek 2: Bakterie ovlivňující kolorektální karcinom (Perillo et al. 2020).....	22
Obrázek 3: Příklady některých komerčně zastoupených probiotik (Perillo et al. 2020).....	33

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Označení a charakteristika odebraných vzorků. Ž – Žena, M – Muž.....	41
Tabulka 2: Složení kultivačních médií použitých pro izolaci širokého spektra především anaerobních bakterií z biopsií intestinálních tkání	43
Tabulka 3: Seznam 74 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s kolorektálním karcinomem	45
Tabulka 4: Bakteriální taxony izolované z pacientů s kolorektálním karcinomem	48
Tabulka 5: Seznam 61 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s Crohnovou chorobou	49
Tabulka 6: Bakteriální taxony izolované z pacientů s Crohnovou chorobou	51
Tabulka 7: Seznam 74 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků 2 pacientů s ulcerózní kolitidou	52
Tabulka 8: Bakteriální taxony izolované z pacientů s ulcerózní kolitidou	54
Tabulka 9: Seznam 60 bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků zdravých pacientů.....	56
Tabulka 10: Bakteriální taxony izolované ze zdravých jedinců.....	58

11 Seznam použitých zkratek a symbolů

AIEC	adherentně invazivní <i>Escherichia coli</i>
ATG16L1	autophagy related 16-like gel
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> toxin
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
CD	Crohnova choroba (crohn disease)
CRC	kolorektální karcinom (colorectal cancer)
ČR	Česká republika
ETBF	enterotoxigenní <i>Bacteroides fragilis</i>
FOS	fruktooligosacharidy
GOS	galaktooligosacharidy
IBDs	idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease)
IRGM	imunity-related GTPase M
IM	intestinální mikrobiota
LS	Lynchův syndrom
PJO	pyohenní jaterní obcesy
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
TFM	Transplantace fekální mikrobioty
UC	Ulcerózní kolitida (ulcerative colitis)