

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Katabolismus rutinu v lidském trávicím traktu jeho
stanovení s pomocí *in vitro* modelu v kombinaci
s nukleární magnetickou rezonancí**

Bakalářská práce

Autor práce: Sabina Farková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Katabolismus rutinu v lidském trávicím traktu jeho stanovení s pomocí *in vitro* modelu v kombinaci s nukleární magnetickou rezonancí" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho ochotu, cenné rady a odbornou pomoc při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Veronice Jarošové a Ing. Kateřině Tomisové za získávání potřebných informací a podkladů. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu během studií a při psaní této práce.

Katabolismus rutinu v lidském trávicím traktu jeho stanovení s pomocí *in vitro* modelu v kombinaci s nukleární magnetickou rezonancí

Souhrn

Velké množství flavonoidů jsou (poly)fenolové sloučeniny přírodního původu, které se nacházejí zejména v ovoci a zelenině, a tvoří tak součást rostlinné stravy člověka. Rutin je flavonolový glykosid a za jeho hlavní zdroj v potravě je považována pohanka. Během trávení prochází až do tlustého střeva, kde je pomocí střevní mikrobioty metabolizován zejména na fenolové kyseliny. Teoretická část této práce se zabývala i změnami ve složení střevní mikrobioty a souvislostmi se zdravím. Pro identifikaci metabolitů přítomných ve vzorku byla použita nukleární magnetická rezonance, která má schopnost detekovat najednou všechny látky nesoucí vodík. Cílem této práce bylo ověřit vhodnost NMR při katabolismu rutinu v lidském tlustém střevě. Dále bylo posuzováno, zda rutin ovlivňuje spektrum mastných kyselin s krátkým řetězcem po jeho přidání do média. Byla též zhodnocena produkce metabolitů z jeho rozkladu.

Byla provedena pilotní studie se dvěma dárci. Byly odebrány vzorky čerstvé stolice, které byly fermentovány v médiu s obsahem rutinu a bez a analyzovány pomocí nukleární magnetické rezonance, NMR 500 MHz. Spektra byla manuálně upravena, analyzována pomocí programu Chenomx a následně vyhodnocena v programu SPSS Statistics. Celkem jsme z přibližně 50 možných sloučenin viditelných ve spektru kvantifikovali 6, z toho 4 mastné kyseliny s krátkým řetězcem, na kterých se odrazila možná antimikrobiální aktivita látky, a dva deriváty fenylctové kyseliny pocházejících z katabolismu rutinu.

Pilotní studie neukázala vliv na produkci SCFA, ale ukázala rozdíly mezi dárci v produkci metabolitů. Bylo potvrzeno, že NMR je vhodná metoda na stanovení katabolismu rutinu v tlustém střevě.

Klíčová slova: Stolice, fermentace, metabolická kapacita, antioxidanty, stáří

Rutin catabolism in human digestive tract and its assessment using *in vitro* model combined with nuclear magnetic resonance

Summary

A large number of flavonoids are (poly)phenolic compounds of natural origin that are present especially in fruits and vegetables and they are part of the plant component of the diet. Rutin is a flavonol glycoside and buckwheat is considered to be its main source in food. During the process of digestion it passes into the large intestine, where it's metabolized by intestinal microbiota mainly to phenolic acids. The theoretical part of this work also dealt with changes in the composition of the intestinal microbiota and the connection to health. For identifying metabolites in the sample was used nuclear magnetic resonance, which has the ability to detect all substances bearing a hydrogen. The aim of this work was to verify the suitability of NMR in the catabolism of rutin in the human colon. It was further assessed whether rutin affects the spectrum of short chain fatty acids after its addition to the medium. It was also evaluated the metabolites of rutin decomposition.

Pilot study was performed with two donors. Fresh stool samples were taken, fermented in rutin containing medium and without, and analyzed by nuclear magnetic resonance, NMR 500 MHz. The spectra were manually adjusted, analyzed by Chenomx and evaluated in the SPSS Statistics. In total, of the approximately 50 possible compounds visible in the spectrum, we quantified 6, of which 4 were short chain fatty acids, which reflected the possible antimicrobial activity of the substance, and two phenylacetic acid derivatives arising from the catabolism of rutin.

The pilot study didn't show an effect on SCFA's production, but showed differences among donors in metabolite production. NMR has been shown to be a suitable method for determining the catabolism of rutin in the colon.

Keywords: stool, fermentation, metabolic capacity, antioxidant, age

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíl práce.....	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Flavonoidy	11
3.1.1	Rutin	11
3.2	Střevní mikrobiom.....	12
3.2.1	Význam střevního mikrobiomu.....	13
3.2.2	Složení normálního střevního mikrobiomu.....	13
3.2.2.1	Mikrobiální složení	13
3.2.2.2	Enterotypy	14
3.3	Změny ve složení střevní mikrobioty.....	14
3.3.1	Vliv porodu.....	14
3.3.2	Vliv věku	15
3.3.3	Vliv stravy	15
3.3.3.1	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem–SCFA	16
3.3.4	Vliv antibiotik.....	16
3.4	Souvislost složení mikrobioty se zdravím	17
3.4.1	Obezita.....	17
3.4.2	Alergie	18
3.5	Vliv bakterií, probiotik a prebiotik na lidské zdraví.....	18
3.5.1	<i>Akkermansia muciniphila</i>	18
3.5.2	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	19
3.5.3	Probiotika	19
3.5.3.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	20
3.5.3.2	Rod <i>Lactobacillus</i>	20
3.5.4	Prebiotika.....	21
3.6	Stolice	21
3.6.1	Fekální voda	22
3.6.2	Fekální bakterioterapie	22
3.7	Metody složení metabolomu stolice.....	23
4	Metodika.....	24
4.1	Průběh studie	24
4.2	Odběr vzorků stolice.....	24
4.3	Chemikálie, spotřební materiál, zařízení a software.....	24
4.3.1	Příprava roztoků pro fermentaci.....	25
4.4	Fermentace <i>in vitro</i>	26

4.5	Příprava vzorků pro NMR analýzu	26
4.6	Měření a analýza dat	26
5	Výsledky	27
5.1	Metabolity z rozkladu rutinu.....	28
5.2	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem.....	29
6	Diskuze.....	30
7	Závěr	32
8	Literatura	33
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	40

1 Úvod

Sekundární metabolity jsou sloučeniny produkované rostlinami, které však nejsou nezbytně nutné pro jejich základní životní funkce. Kromě toho, že rostlině poskytují například ochrannou schopnost, mají i příznivé účinky na zdraví člověka. Tyto sloučeniny jsou dále metabolizovány v lidském trávicím traktu. Mezi sekundární metabolity rostlin se řadí i flavonoidy a konkrétně i rutin, který je v této práci zkoumán. Flavonoidy jsou polyfenoly, které se vyskytující nejen v květech, ovoci a zelenině, ale i ve výrobcích jako je káva, čaj, víno nebo med.

Rutin je flavonolový glykosid, který se syntetizuje zejména ve vyšších rostlinách, kde chrání rostlinu před ultrafialovým zářením. Rutin se více vyskytuje ve stopkách, stoncích či horních částech listů ve srovnání s ostatními částmi rostliny. Chemicky se rutin skládá z fenolové části, která je spojena s molekulou cukru, což sice snižuje jeho biologickou aktivitu, ale činí molekulu rozpustnější v polárních rozpouštědlech. Mikrobiota střeva vytváří glykosidázy, které jsou schopné uvolnit aglykonovou část z cukru a také produkuje fenylactové kyseliny. Rutin také posiluje kapiláry krevních cév díky jeho vysoké antioxidační aktivitě a schopnosti vychytávat volné radikály. (Patel & Patel 2019)

Metabolomika je obor zabývající se kvalitativním i kvantitativním popisem všech metabolitů přítomných ve zkoumaném biologickém vzorku. Pro identifikaci metabolitů ze stolice se v dnešní době nejvíce používají 2 metody: nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo hmotnostní spektrometrie (MS). Na NMR je cenný její univerzální a necílený přístup, daný schopností detekovat najednou ve vzorku veškeré látky nesoucí vodík. (Pelantová 2015) Příprava vzorků pro NMR analýzu je většinou rychlá a jednoduchá. Proces zahrnuje odběr vzorku, jeho přípravu pro analýzu, měření spekter pomocí NMR, úpravu naměřených dat a identifikaci metabolitů.

2 Cíl práce

Ověřit vhodnost nukleární magnetické rezonance (NMR) na stanovení katabolismu rutinu v modelu tlustého střeva. Stolice několika probandů byla fermentována v médiu s obsahem rutinu. Byl stanoven vliv rutinu na spektrum mastných kyselin s krátkým řetězcem ve fermentačním médiu a produkce metabolitů pocházející z rozkladu aglykonu rutinu–kvercetinu s pomocí NMR. V rámci této pilotní studie byla testována hypotéza, že NMR je vhodná metoda na stanovení katabolismu rutinu v rozsáhlejších studiích, s pokrytím všech jeho hlavních metabolitů, navíc s možností studovat ovlivnění dalších nepřímo souvisejících změn střevního metabolomu.

3 Literární rešerše

3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou rozsáhlou třídou přírodních polyfenolových sloučenin. (Russo et al. 2000) Jejich název byl odvozen z latinského slova *flavus*, který označuje žlutou barvu, a mnoho z těchto látek je zodpovědných za zbarvení květů, žlutků nebo listů na podzim. (Sharma et al. 2013) Běžně se nacházejí v ovoci, zelenině, ořechách, semenech, stoncích a květech, ale i v čaji, víně, propolisu a medu a představují tak častou složku lidské stravy. Po staletí se přípravky obsahující tyto látky jako hlavní fyziologicky aktivní složky používají k léčbě lidských chorob. (Cushnie & Lamb 2005) Předpokládá se, že mnoho terapeutických účinků flavonoidů je výsledkem jejich silných antioxidačních vlastností a schopnosti odstraňovat volné radikály. (Sharma et al. 2013)

Flavonoidy se dále dělí na podskupiny, a to na anthokyanidiny, katechiny, flavanony, flavony, flavonoly a isoflavony. (Panche et al. 2016) Kvercetin (3'4'-dihydroxyflavonol) je nejintenzivněji studovaná flavonoidní látka, a to kvůli její antioxidační aktivitě a významné absorpci ze stravy. Existuje převážně v glykosylovaných formách jako je rutin (quercetin-3-O-beta-rutinosid). (Jiang et al. 2007)

3.1.1 Rutin

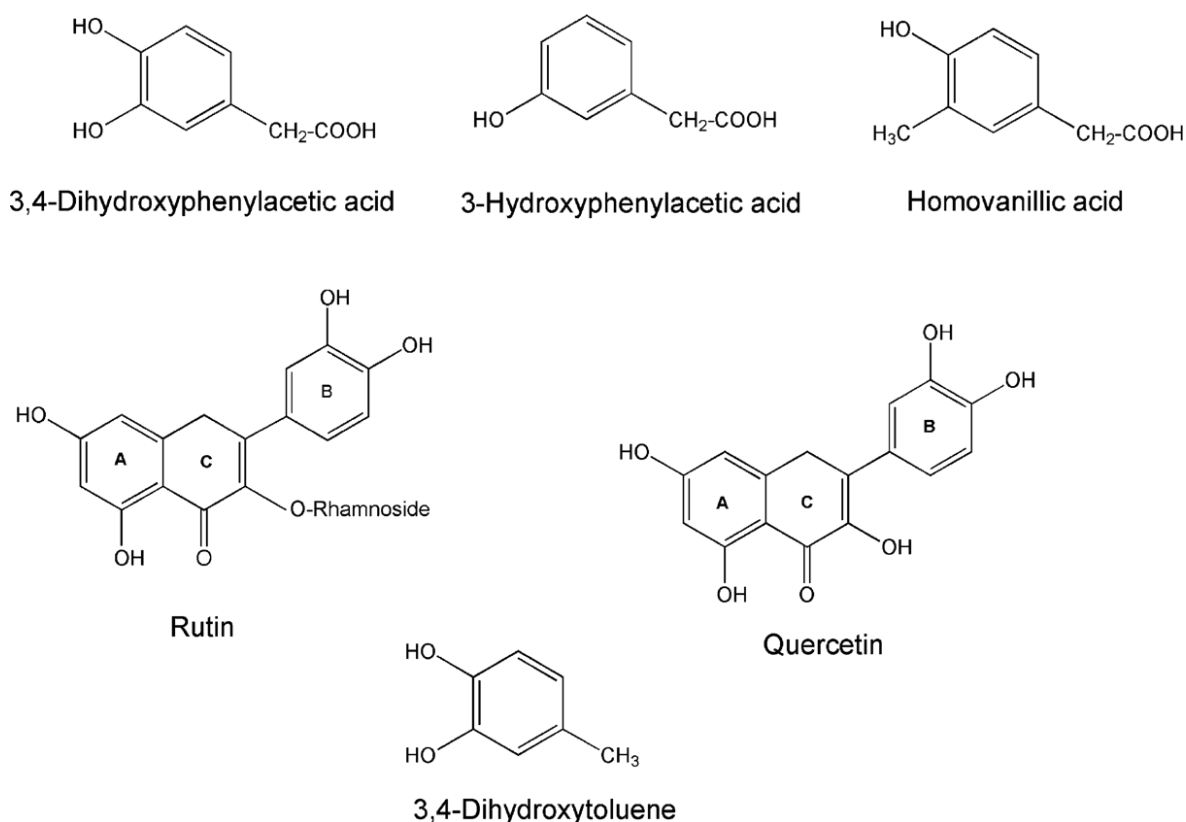
Rutin je flavonolový glykosid tvořený flavonolovým kvercetinem a disacharidem rutinózou. (Sharma et al. 2013) Poprvé byl objeven v 19. století v pohance a je též známý jako vitamin P. (Yang et al. 2008)

Rutin má mnoho zajímavých účinků. Fenolová část molekuly je spojena s cukrem – hydrofilní částí molekuly. Tím se biologický účinek trochu sníží, ale molekula se stane rozpustnější. Rutin se v mnoha zemích používá jako léčivo ke snížení křehkosti krevních kapilár spojené s některými hemoragickými onemocněními nebo hypertenzí u lidí. (Jiang et al. 2007) Snižuje vysoký krevní tlak a riziko aterosklerózy. (Kreft et al. 2006)

Byla prokázána antioxidační aktivita a zdravotní přínosy rutinu a jeho aglykonového zbytku, kvercetinu. Například bylo zjištěno, že potkani ve stravě obsahující 0,2% kvercetin mají přibližně o 60 % více antioxidantů v plasmě než potkani v kontrolní dietě. Bylo také zjištěno, že jak kvercetin, tak rutin snižují výskyt nádorů tlustého střeva u myši vyvolané azomethanem, karcinogenní sloučeninou. Skutečností je, že účinky rutinu a jeho aglykonů prokázané ve studiích na buňkách a zvířatech mohou nebo nemusí být použitelné nebo relevantní pro člověka. (Chin & Garrison 2008)

Rutin je bioflavonoid, který se často používá v kombinaci s vitamínem C, protože je nezbytný k jeho vstřebávání. (Chua 2013) Střevní mikrobiota metabolizuje rutin na řadu sloučenin, které mohou být následně vstřebávány. Po požití tvoří rutin metabolity, které zahrnují 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu, 3,4-dihydroxytoluen, m-hydroxyfenyloctovou kyselinu, 3-methoxy-4-hydroxyfenyloctovou kyselinu (homovanilová kyselina,) a aglykon kvercetin. (Cervantes-Laurean et al. 2006) Metabolity rutinu jsou dále znázorněny v obrázku č.1.

Pohanka je považována za hlavní zdroj rutinu v potravě. (Yang et al. 2008) Existuje však velká variabilita obsahu rutinu v semenech pohanky v závislosti na druhu, odrůdě a okolních podmínkách, za kterých jsou produkovány. Zvýšení obsahu rutinu v semenech pohanky je již dlouho důležitým cílem programů zlepšování plodin. Mezi druhy pohanky, které jsou pěstovány jako lidské zdroje potravy patří pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*) a pohanka tatarská (*Fagopyrum tatarium*). (Jiang et al. 2007)



Obrázek č.1: Struktura rutinu a jeho metabolitů v tlustém střevě (Cervantes-Laurean et al. 2006)

3.2 Střevní mikrobiom

Lidské střevo je kolonizováno značným množstvím mikroorganismů, zejména bakterií. (Duda & Tomasz 2015) Toto komplexní společenství, souhrnně nazývané jako mikrobiota (jejich geny jsou známy jako mikrobiom), obsahuje různé viry, bakterie, archaea a eukaryoty. (Knight 2015) V dutině ústní se nachází vysoký počet bakterií— 10^{12} . Žaludek obsahuje pouze 10^3 – 10^4 bakterií, jejunum obsahuje 10^5 – 10^6 a ileum obsahuje 10^8 – 10^9 bakterií. Avšak největší počet bakteriálních buněk se nachází v tlustém střevě (10^{11} na gram střevního obsahu). (Tlaskalová-Hogenová et al. 2011)

Mikrobiota střeva je ve srovnání s jinými místy těla poměrně různorodá a mezi očividně zdravými jedinci existuje značná variabilita složek střevní mikrobioty. (Shreiner et al. 2015) Více než jako „spolucestující“ je naše střevní mikrobiota nezbytná pro trávení a získávání živin,

vývoj a pohyblivost střeva a modulaci imunitního systému. Je známo, že řada faktorů, včetně výživy, pohlaví, rasy, etnického původu nebo obezity, formují a modifikují mikrobiální společenství, která tvoří lidský mikrobiom. (Hollister et al. 2015) Metabolická kapacita střevního mikrobiomu je přibližně stokrát větší než kapacita lidských jater. Je to důsledek velké rozmanitosti bakteriálních druhů tvořících populaci, a tedy velkého počtu genů, které obsahují. (Duda & Tomasz 2015)

Zdravý dospělý střevní mikrobiom je obecně považován za stabilní až do vyššího věku (např. 65–100 let), který se vyznačuje poklesem stability a funkce mikrobiomu. (Hollister et al. 2015) Charakterizace mikrobiomu u zdravých jedinců je důležitým počátečním krokem k pochopení role mikrobiomu v přispívání ke zdraví, resp. nemoci. (Shreiner et al. 2015)

3.2.1 Význam střevního mikrobiomu

Mikrobiota nabízí hostiteli mnoho výhod, a to prostřednictvím celé řady fyziologických funkcí, jako je posílení integrity střev nebo formování střevního epitelu, získávání energie, ochrana před patogeny a regulace imunity hostitele. Existuje však riziko, že tyto mechanismy budou narušeny v důsledku změněné mikrobiální kompozice, známé jako dysbióza. (Thursby & Juge 2017)

Střevní mikrobiota se podílí na trávení určitých potravin, které nemohou být samy o sobě tráveny v žaludku nebo tenkém střevě, a hraje klíčovou roli při udržování energetické homeostázy. Mikrobiota má potenciál zvýšit energetickou hodnotu z potravy, zvýšit příjem živin nebo ovlivnit signalizaci chuti k jídlu. (Wang et al. 2017) Střevní mikrobiota poskytuje nezbytnou schopnost fermentace nestravitelných substrátů, jako je vláknina a endogenní střevní hlen. Tato fermentace podporuje růst speciálních mikrobů, které produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a plyny. (Valdes et al. 2018) Mikrobiota střeva je také rozhodující pro syntézu esenciálních vitaminů, které hostitel není schopen produkovat, jako je například vitamin B12. Další vitaminy, které střevní mikrobiota syntetizuje u lidí, zahrnují vitamin K, riboflavin, biotin, kyselinu nikotinovou, kyselinu panthotenovou, pyridoxin a thiamin. (Thursby & Juge 2017)

3.2.2 Složení normálního střevního mikrobiomu

S dostupností vysoce výkonné technologie sekvenování genů se studium střevní mikrobioty v současné době skládá ze dvou hlavních fází: 1) 16S rRNA sekvenování bakteriálního genomu, 2) bioinformatická analýza. (Jandhyala et al. 2015) Analýza bakteriálního genu 16S ribozomální RNA je oblíbený přístup, protože tento gen je přítomen ve všech bakteriích a archaea. Obsahuje devět vysoce variabilních oblastí, které umožňují snadno rozlišit jednotlivé druhy. (Thursby & Juge 2017) Z praktických důvodů většina našich znalostí o střevní mikrobiotě pochází ze vzorků stolice. (Tiihonen et al. 2010)

3.2.2.1 Mikrobiální složení

Tlusté střevo je hlavním místem mikrobiálního osídlení a obsahuje odhadem 1,5 kg mikroorganismů. (Tiihonen et al. 2010) Ačkoli bylo dosud popsáno více než 50 bakteriálních kmenů, lidské střevní mikrobiotě dominují především 2 z nich: *Bacteroidetes* a *Firmicutes*,

zatímco *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* a *Cyanobacteria* jsou přítomny v menším množství. (Sekirov et al. 2016) Kromě skupin *Firmicutes* a *Bacteroidetes* obsahuje lidské tlusté střevo také primární patogeny, např. druhy jako *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera* a *Escherichia coli* a *Bacteroides fragilis*, ale s nízkým výskytem (0,1 % nebo méně z celého střevního mikrobiomu).

Zatímco *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus* jsou převažující lumenální mikrobiální rody (lze identifikovat ve stolici), rody *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Akkermansia* se vyskytují pouze ve sliznici a hlenu (objeveno ve slizové vrstvě a epiteliálních tenkého střeva). (Jandhyala et al. 2015)

3.2.2.2 Enterotypy

Byla odhalena přítomnost tří enterotypů člověka identifikovatelných změnami na úrovni jednoho ze tří rodů: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) a *Ruminococcus* (enterotyp 3). (Arumugam et al. 2011) Enterotypem se rozumí klasifikace organismů na základě bakteriálního osídlení střevní mikrobioty.

V enterotypu 1 se nachází zástupci bakterií z rodu *Bacteroides*, kteří se vyskytují společně s *Parabacteroides*. (Arumugam et al. 2011) Enterotyp 2, ve kterém se vyskytují bakterie z rodu *Prevotella*, se chová převážně jako degradátor mucinových glykoproteinů, které lemují střevní slizniční stěnu. (Jandhyala et al. 2015) V Enterotypu 3 převažují bakterie z rodu *Ruminococcus* a dále se vyskytují i bakterie rodu *Akkermansia*. (Arumugam et al. 2011)

Přestože koncept enterotypů byl částečně vyvrácen s realizací daleko většího souboru vzorků v rámci projektu Human Microbiome Project a dnes se ví, že se jedná o spojitý gradient, nikoliv o jasně vymezené skupiny (Jeffery et al. 2012), přesto se jedná o stále citovanou práci demonstrující tři extrémní typy v populaci.

3.3 Změny ve složení střevní mikrobioty

Lidská mikrobiota tlustého střeva je považována za relativně stabilní a obvykle se vrací k původnímu stavu po přechodných poruchách, ke kterým dochází v důsledku krátkodobých dietních změn nebo antibiotické terapie. (Scott et al. 2013)

Vývoj mikrobioty může být výrazně ovlivněn řadou funkcí včetně způsobu porodu (vaginální versus císařský řez), mateřských mikrobiomů, hygienou novorozeneckého prostředí, používáním antibiotik, způsobů výživy kojence (mateřská versus kojenecká mléčná výživa) a výživou po odstavení. (Doré & Blottière 2015)

3.3.1 Vliv porodu

Způsob porodu novorozenců je obzvláště důležitý, protože kojenci rozeni císařským řezem postrádají první vstup mateřských bakterií a jejich střevní mikrobiota se podstatně liší. (Tlaskalová-Hogenová et al. 2011) Kolonizace vaginálně narozených dětí je ovlivněna hlavně vaginální mikrobiotou matky, zatímco novorozenci narozeni pomocí císařského řezu jsou kolonizováni převážně mikroorganismy z nemocničního prostředí. (Orrhage & Nord 1999)

Kolonizace střeva postupuje po následujících krocích, v nichž dominují nejprve fakultativní anaeroby, jako jsou enterobakterie, koliformní bakterie a laktobacily, a následují anaerobní rody jako je *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* a *Eubacterium*. (Huurre et al. 2008) Kojenci narození císařským řezem mají nižší počet bifidobakterií a *Bacteroides* a jsou častěji kolonizováni *Clostridium difficile* ve srovnání s vaginálně narozenými dětmi. (Biasucci et al. 2010) Ve věku jednoho měsíce nebyly zjištěny žádné rozdíly v počtu klostridií, laktobacilů nebo bakteroidů. Počet bifidobakterií byl však u vaginálně narozených dětí 1300krát vyšší ve srovnání s dětmi narozenými císařským řezem. To se následně odrazilo na celkovém počtu bakteriálních buněk, které byly 3krát vyšší u dětí narozených vaginálně ve srovnání s císařským řezem. Ve věku 6 měsíců nebyly tyto rozdíly pozorovány. (Huurre et al. 2008)

3.3.2 Vliv věku

Mikrobiální složení lidského střeva se mění s věkem a změny v tomto složení ovlivňují lidské zdraví. (Odamaki et al. 2016) Sterilní *in utero*, střevo novorozence je kolonizováno hned od narození. (Doré & Blottière 2015) Střevní mikrobiotu kojenců lze po dvou letech označit jako podobnou dospělým, i když populace fakultativních anaerobů je často větší než pozorované populace u zdravých dospělých jedinců. Ve skutečnosti je pravděpodobné, že se střevní mikrobiota úplně podobá na dospělou až mnohem později v dětství. (Hopkins et al. 2002)

Nedávné studie využívající metody molekulární biologie rovněž naznačily jasné rozdíly ve složení střevní mikrobioty u kojenců, batolat, dospělých a starších osob. (Odamaki et al. 2016) Bylo zjištěno, že celkový počet bakterií je u kojenců výrazně nižší než u dospělých a seniorů. V kojenecké fekální mikrobiotě bylo pozorováno *Bifidobacterium* jako dominantní rod. U dospělých jsou nejčastější kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Rod *Bifidobacterium* je přítomen v osmi až desetinásobně nižším počtu než dva hlavní kmeny. (Mariat et al. 2009) Jak lidé stárnou, vyvíjí se všeobecně postupná ztráta funkce ve více orgánových systémech související s růstem, metabolismem, energetickou homeostázou a imunitou. (Kundu et al. 2017) Bylo zjištěno, že starší lidé mají ve srovnání s mladšími dospělými méně bifidobakterií a vyšší populace hub a enterobakterií. (Hopkins et al. 2002)

3.3.3 Vliv stravy

Strava silně ovlivňuje lidské zdraví, částečně i modulací střevního mikrobiomu. (Wu et al. 2011) Strava je hlavní faktor, který ovlivňuje složení a metabolismus střevní mikrobioty. Množství, druh a vyváženost hlavních potravinových makronutrientů (sacharidy, bílkoviny a tuky) má velký vliv na mikrobiotu tlustého střeva. (Scott et al. 2013) Strukturu a aktivitu mikroorganismů, které se nacházejí v lidském střevě dlouhodobě ovlivňuje příjem potravy. Stále ale zůstává nejasné, jak rychle a reprodukovatelně střevní bakterie reagují na změnu stravy. (David et al. 2014) Způsob výživy také ovlivňuje mikrobiotu střeva dítěte. Mateřské mléko obsahuje živiny, mateřské protilátky a také různé komenzální mateřské bakterie včetně bifidobakterií a laktobacilů. Ve srovnání s uměle kojenými novorozenci, kojenci krmení mateřským mlékem mají nižší zastoupení rodu *Atopobium* a vyšší zastoupení *Bifidobacterium*. (Knight 2015)

Způsob stravování je nejsnadněji změnitelný a představuje tak nejjednodušší cestu terapeutického zákroku. (Wu et al. 2011) Zvýšení příjmu vlákniny zvyšuje průchod střev, celkový počet bakterií a koncentraci fermentačních produktů. (Flint 2012) Důležité je, že strava s vysokou rozmanitostí vlákniny podporuje diverzitu mikrobioty, zvýhodňuje nadměrné zastoupení bakteriálních druhů vybavených k metabolismu rostlinných polymerů a podporuje zvýšenou produkci SCFA na úkor zánětlivých gramnegativních bakterií. (Doré & Blottière 2015) Doplnění stravy prebiotiky může podpořit růst specifických členů reziduální střevní mikrobioty, stimulovat produkci SCFA, snižovat pH a tím napomáhat vyloučení patogenů. (Scott et al. 2013)

3.3.3.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem–SCFA

SCFA jsou nasycené alifatické organické kyseliny, které se skládají z jednoho až šesti uhlíků. (Den Besten et al. 2013) Hlavními produkovanými SCFA jsou acetát, propionát a butyrát. (Valdes et al. 2018) Bakteriální SCFA poskytují tělu další zdroj energie. (Schwiertz et al. 2010) V tlustém střevě a stolici jsou acetát, propionát a butyrát přítomny v přibližném molárním poměru 60:20:20. (Den Besten et al. 2013)

Acetát vstupuje do periferní cirkulace, kde je metabolizován periferními tkáněmi a je substrátem pro syntézu cholesterolu. Propionát je z velké části absorbován játry a je dobrým prekurzorem pro glukoneogenezi, liponeogenezi a syntézu proteinů. (Schwiertz et al. 2010) Butyrát je hlavním zdrojem energie pro lidské kolonocyty, může indukovat apoptózu buněk rakoviny tlustého střeva a může aktivovat střevní glukoneogenezi, což má příznivé účinky na homeostázu glukózy a energie. Zdá se pravděpodobné, že butyrát a propionát ovládají střevní hormony a snižují chuť k jídlu a příjem potravy u myši. (Valdes et al. 2018)

Sacharidy hrají kvantitativně nejdůležitější roli při tvorbě SCFA. (Abed-Meraim & Combescure 2011) Střevní bakterie ve slepém a tlustém střevě produkují SCFA převážně z nestravitelných sacharidů, které prochází tenkým střevem. (Den Besten et al. 2013) Fermentace proteinů a aminokyselin proteolytickými bakteriemi poskytuje rozvětvené SCFA, H₂, CO₂, CH₄, fenolové sloučeniny a aminy. (Abed-Meraim & Combescure 2011)

3.3.4 Vliv antibiotik

Antibiotika jsou nezbytnými život zachraňujícími léky, které způsobily převrat v medicíně, počínaje objevem penicilinu v roce 1928. Odhaduje se, že rozšířená dostupnost antibiotik prodloužila život člověka v rozvinutých zemích o 30 let. Od objevu penicilinu bylo nalezeno a vyvinuto množství vysoce účinných antibiotik pro klinické použití při léčbě bakteriálních infekcí. Mnoho z těchto antibiotik má široké spektrum účinnosti, je účinné při léčbě infekcí způsobených grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Jiná antibiotika jsou účinná pouze při léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi. (Singh et al. 2017)

Téměř všechna antibiotika se podílejí na potlačení některé složky mikrobioty. Účinek antibiotik na střevní mikrobiotu závisí primárně na jejím složení, spektru aktivity, dávce, době užívání a koncentraci aktivního léčiva v lumenu. (Levy 2000) Často se vyskytují zejména průjem spojený s užíváním antibiotik. Mnohdy jsou spojovány s organismy jako je *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a nejvíce obávaným *C. difficile*. Ty mohou způsobit

neléčitelné dlouhodobě opakující se infekce, a dokonce i potenciálně smrtící pseudomembranózní kolitidu. Jednou z hrozeb změn střevní mikrobioty je zvýšená náchylnost ke střevním infekcím, které mohou pramenit z nově získaných patogenů nebo náhlého přerůstání a patogenního chování organismů, které jsou již v mikrobiotě přítomné. (Francino 2016) Podávání antibiotik myším změnilo složení jejich střevní mikrobioty a také se zvýšila jejich celková hmotnost tělesného tuku a hustota kostí. Dochází také ke změně v produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem střevní mikrobiotou. Jiná studie na myších naznačuje, že antibiotika vedou ke zvýšené hojnosti volné kyseliny sialové ve střevech, která pochází z hostitele. Ta může být využita patogeny, jako je *Salmonella typhimurium* a *C. difficile* pro zvýšení jejich růstu. (Modi et al. 2014)

3.4 Souvislost složení mikrobioty se zdravím

Zatímco hlavní příčinou úmrtí v méně rozvinutém světě zůstává infekční onemocnění, hlavními zabijáky v rozvinutém světě jsou kardiovaskulární choroby a rakovina. (Tlaskalová-Hogenová et al. 2011)

Nízká rozmanitost mikrobiomových genů (nízká bakteriální diverzita) se trvale objevuje jako rizikový faktor spojený se škodlivými účinky na zdravou symbiózu hostitel-mikrob a je charakteristická pro četná chronická onemocnění. (Doré & Blottière 2015) Souvislost mezi sníženou diverzitou a chorobou naznačuje, že střevní ekosystém bohatý na druhy je odolnější vůči vlivům prostředí, protože funkčně příbuzné mikroby v intaktním ekosystému mohou kompenzovat funkci ostatních chybějících druhů. (Valdes et al. 2018)

3.4.1 Obezita

V posledních padesáti letech se stala obezita mezinárodní problematikou veřejného zdraví. Ovlivňuje kvalitu života, zvyšuje riziko onemocnění a zvyšuje náklady na zdravotní péči. Obezita dospělých je spojena se zvýšenou morbiditou a mortalitou. (Alamuddin et al. 2016)

Patologie obezity je spojena se změnami rozmanitosti a složením střevní mikrobioty, tj. se změnami hojnosti na úrovni kmene, rodu nebo druhu. Studie ukazující tyto změny střevní mikrobioty byla provedena u obézních myší. Odhalila nárůst *Firmicutes* a pokles *Bacteroidetes* jako dvou dominantních kmenů střevní mikrobioty. (Everard & Cani 2013)

Roste obava, že nedávné změny životního stylu, zejména pak strava s vysokým obsahem cukrů a tuků, změnila genetické složení a metabolickou aktivitu našich rezidentních mikroorganismů (lidského střevního mikrobiomu). (David et al. 2014) Střevní mikrobiota má schopnost zvýšit energii získanou ze stravy a může hrát klíčovou roli ve vývoji tukové hmoty. Nejčastější důkazy podporující tuto hypotézu jsou ze studie na myších. Myši bez mikrobioty jsou štíhlejší ve srovnání s myši, které mají mikrobiotu od narození. Tato studie odhalila střevní mikrobiotu jako faktor, který reguluje ukládání tuku v organismu. (Everard & Cani 2013) Střevní mikrobiota, která má vyšší hustotu bifidobakterií, může chránit před rozvojem obezity a přírůstkem hmotnosti, ale přesný druh bifidobakterií zůstává neznámý. (Kallus & Brandt 2012)

3.4.2 Alergie

Současně s pokroky v medicíně, sanitaci a v dalších postupech došlo za posledních 50 let v rozvinutém světě k častějšímu výskytu alergických onemocnění včetně astma, ekzému a alergiím na potraviny. (Russell & Finlay 2012) V rozvojových zemích je však výskyt alergických onemocnění výrazně nižší. (Yazdanbakhsh et al.2002)

Existují důkazy z lidských a zvířecích studií o tom, že střevní mikroby hrají roli při vývoji alergických onemocnění. (Russell & Finlay 2012) Cesta k první alergické reakci často vzniká z gastrointestinálního traktu a potravinové alergie jsou běžným problémem u kojenců s atopickým ekzémem. (Turrone et al. 2014) Pokud jde o potravinovou alergii, nedávná publikace prokázala, že složení střevních mikroorganismů je u kojenců s alergií změněno ve srovnání se zdravými jedinci. Zejména byly sníženo zastoupení kmenů *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria*, zatímco kmen *Firmicutes* převažoval. (Legatzki et al. 2014)

Kojenci narození císařským řezem jsou více náchylní na rozvoj astma a atopie. (West et al. 2015) Bylo opakovaně zjištěno že, tyto stavy jsou často doprovázeny změnami složení střevní mikrobioty brzy po narození, kdy často chybí bifidobakterie, a naopak se více vyskytují klostridie. Vliv má také možná i druhové složení bifidobakterií, častější výskyt alergií je spojován s *Bifidobacterium longum*, méně naopak s *Bifidobacterium bifidum*. (Rada 2010)

Existuje několik studií, které naznačují, že střevní mikrobiální kolonizace nemá pouze lokální, ale také systémový imunitní regulační účinek. Děti s astma nebo alergiemi mohou mít nižší střevní mikrobiální diverzitu v prvním roce života ve srovnání se zdravými dětmi. (Legatzki et al. 2014) Studie na myších ukazuje, že léčba antibiotiky, které narušují mikrobiom, může potlačovat toleranci dýchacích cest vůči vzdušným alergenům jako jsou například plísňové spóry. Rostou důkazy o tom, mikrobiom plic a střevní mikrobiom určují riziko astma a alergií. (Riiser 2015)

3.5 Vliv bakterií, probiotik a prebiotik na lidské zdraví

3.5.1 *Akkermansia muciniphila*

Gastrointestinální trakt je pokryt vrstvou hlenu. Ta poskytuje svému hostiteli ochrannou bariéru proti patogenním mikroorganismům, ale i proti chemickému, fyzikálnímu a enzymatickému poškození. Hlen je viskózní gel tvořený převážně glykoproteiny, které se nazývají muciny. Degradace mucinu je považována za faktor patogenity, protože ztráta ochranné vrstvy hlenu může vystavit buňky gastrointestinálního traktu patogenům. Mucin může sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro střevní mikrobiotu.

Akkermansia muciniphila je střevní bakterie, která byla izolována před deseti lety ze vzorku lidské stolice. (Derrien et al. 2017) *A. muciniphila* je u zdravého člověka přítomna ve vysokých hladinách, přibližně 3 % v tlustém střevě, což z ní činí jednu z nejhojnějších druhů a svědčí tak o její bezpečnosti. *A. muciniphila* žije se svým hostitelem v symbióze a je hojným obyvatelem střevního traktu lidí ale i mnoha zvířat. Je to střevní bakterie z kmene *Verrucomicrobia*. *A. muciniphila* degraduje střevní mucin hlavně na kyselinu propionovou a octovou. (de Vos 2017)

A.muciniphila je schopna využívat hlen jako jediný zdroj uhlíku a dusíku. Kvůli jeho hojnosti na zdravé sliznici a nepřímé korelaci mezi jeho hojností a několika střevními

poruchami včetně IBD, Crohnovou chorobou, ulcerativní kolitidou a apendicitidou, byli členové rodu *Akkermansia* navrženi jako biomarkery zdravého střeva. Zejména byly pozorovány snížené hladiny *A. muciniphila* u pacientů se zánětlivými onemocněními střev (hlavně ulcerativní kolitida) a metabolickými poruchami, což naznačuje, že může mít potenciální protizánětlivé vlastnosti. (Derrien et al. 2017) Významným objevem bylo zjištění, že *A. muciniphila* chrání myši před obezitou vyvolanou stravou, zvyšuje funkci slizniční bariéry a snižuje inzulínovou rezistenci. (de Vos 2017) Četnost *A. muciniphila* klesá u starších osob. Množství této bakterie u člověka může záviset na tělesné hmotnosti, tloušťce střevního hlenu a imunitnímu stavu jedince. (Derrien et al. 2017)

3.5.2 *Faecalibacterium prausnitzii*

Faecalibacterium prausnitzii je grampozitivní, nepohyblivá, nesporotvorná bakterie patřící do kmene *Firmicutes*. Je součástí normální střevní mikrobioty mnoha živočišných druhů a představuje jednu z nejhojnějších bakterií, se kterými se setkáváme ve stolici zdravých lidí ale i u skotu, prasat, myši nebo drůbeže. (Foditsch et al. 2014) Odhaduje se, že *F. prausnitzii* představuje přibližně 5 % všech bakterií detekovaných ve vzorcích stolice od zdravých dospělých osob. (Ferreira-Halder et al. 2017) *F. prausnitzii* je bakterie extrémně citlivá na kyslík a obtížně roste i za anaerobních podmínek. (Miquel et al. 2013)

F. prausnitzii je producentem butyrátu, který má nejvyšší energetickou hodnotu ve srovnání s ostatními kyselinami s krátkým řetězcem. (Foditsch et al. 2014) *F. prausnitzii*, produkující právě butyrát, má klíčovou roli při produkci energie pro kolonocyty. Hlavním přínosem metabolismu této bakterie je prebiotická fermentace. Kyselina salicylová je další klíčový metabolit produkovaný touto bakterií. (Ferreira-Halder et al. 2017) Hlavními konečnými produkty fermentace glukózy pomocí *F. prausnitzii* jsou kyselina mravenčí, malé množství D-laktátu a podstatné množství butyrátu.

Změny v hojnosti *F. prausnitzii* byly spojeny s dysbiózou u několika lidských onemocnění. (Miquel et al. 2013) Bylo zjištěno, že bakterie *F. prausnitzii* je nedostatečně zastoupena ve střevní mikrobiotě jedinců, kteří trpí Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou, syndromem dráždivého tračníku a diabetem typu II. (Heinken et al. 2014) Bylo prokázáno, že množství buněk *F. prausnitzii* významně vzrůstá v mikrobiotě izolované z fekálních vzorků obézních dětí ve srovnání s mikrobiotou od neobézních dětí. Toto zjištění naznačuje, že *F. prausnitzii* souvisí s energií získanou ve střevní mikrobiotě. (Foditsch et al. 2014) Byly prokázány protizánětlivé účinky *in vitro* a *in vivo* na modelu myši kolitidy, díky čemuž *F. prausnitzii* můžeme považovat za klíčového člena mikrobioty. (Miquel et al. 2013)

3.5.3 Probiotika

Probiotika jsou mono nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikrobioty. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky a saccharomyces. (Nevoral 2005) Při vývoji probiotických potravin se nejčastěji používají rody mléčných bakterií, jako je *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Je to dáno především tím, že jsou vnímány jako žádoucí členové střevní mikrobioty a kolonizují střeva novorozenců jako jedny z prvních rodů. (Bielecka 2007)

Při průchodu trávicím traktem musí probiotické organismy odolat nepříznivým podmínkám, kterým jsou vystaveny (např. působení kyseliny chlorovodíkové, žlučových kyselin nebo proteolytických enzymů) Použité kmeny musí prokazatelně pozitivně ovlivňovat stav hostitele. Praktičtí lékaři by měli doporučit podání probiotik především u pacientů léčených antibiotiky, dále u pacientů se zácpou, průjmem, dyspeptickými obtížemi, chronickými infekcemi, systémovou mykózou a jejími komplikacemi, lépe v prevenci než léčbě postantibiotické dysmikrobie. (Kohout 2009)

3.5.3.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou popisovány jako přísně anaerobní, i když některé kmeny mohou tolerovat kyslík. Citlivost na kyslík se však může lišit mezi různými druhy uvnitř rodu. (Leahy et al. 2005) Bifidobakterie jsou nesporeující tyčinkovité gram–pozitivní bakterie, které jsou běžnou složkou tlustého střeva lidí. Více se ale tyto střevní organismy vyskytují u kojených dětí. (Lievin et al. 2000) Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy a mají schopnost fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu. (Leahy et al. 2005) Zejména prebiotika mohou zvyšovat hladinu bifidobakterií. (Lievin et al. 2000)

Okyselují tlusté střevo, omezují hnilobné a potenciálně patogenní bakterie; produkují vitamíny a aminokyseliny; podněcují imunitní odpověď; potlačují přeměnu primárních žlučových solí; vykazují protizánětlivou aktivitu; a snižují riziko rakoviny tlustého střeva. Z důvodu těchto příznivých účinků na zdraví se bifidobakterie obecně považují za probiotické organismy a stále více se používají ve funkčních potravinách a farmaceutických výrobcích. (Pompei et al. 2007) *In vitro* laboratorní studie na zvířatech prokazuje, že bifidobakterie vykazují antagonistickou aktivitu proti patogenům. (Lievin et al. 2000) Bylo prokázáno, že bifidobakterie, které produkují kyselinu mléčnou mají ochrannou funkci proti ničivým účinkům akutního průjmového onemocnění. (Leahy et al. 2005)

3.5.3.2 Rod *Lactobacillus*

Bakterie z rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní tyčinky, které nevytvářejí spóry a jsou důležitou součástí normální lidské bakteriální složky běžně se vyskytující v ústech, gastrointestinálním traktu a ženském genitourinárním traktu. (Slover 2008)

Druhy laktobacilů, které kolonizují gastrointestinální trakt, přináší několik zdravotních výhod. Patří mezi ně patří například produkce imunoglobulinu, okyselení prostředí, vazba mutagenních sloučenin, produkce bakteriocinu a prevence adheze patogenních bakterií k epiteliální buňce. (De Angelis & Gobbetti 2004) Fermentací vzniká kyselina mléčná, která způsobuje pokles pH. Tento pokles pH pak inhibuje růst hnilobných a patogenních bakterií. Tyto organismy navíc zvyšují nutriční hodnotu fermentovaných potravin. K tomu dochází, protože bakterie produkující kyselinu mléčnou způsobují zvýšení produkce esenciálních aminokyselin a vitamínů spolu se zvýšenou biologickou dostupností minerálů. (Slover 2008)

3.5.4 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné sacharidy obsažené v potravinách, které podporují selektivně růst nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného počtu střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva, čímž mají celkově pozitivní vliv na zdraví a celkovou pohodu příslušného jedince. (Nevoral 2005) Aby mohla být prebiotika účinná, musí uniknout trávení v horním gastrointestinálním traktu a musí být přednostně využívána prospěšnými mikroby, které jsou součástí střevní mikrobioty. (Leahy et al. 2005)

U člověka patří k prebiotikům zejména různé formy vlákniny (celulóza, pektiny, xylany) a oligosacharidů (zejména fruktooligosacharidy, např. inulin), laktulóza a laktosacharóza. Reakčními produkty štěpení prebiotik mikrobiálními enzymy jsou krátké mastné kyseliny (zejména kyselina máselná), některé aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory, vitaminy a antioxidantia. Tyto látky se významně podílejí na výživě střevního epitelu a řadě dalších metabolických procesů. (Frič 2005)

3.6 Stolice

V tlustém střevě se dokončuje vstřebávání vody a některých iontů z tráveniny, která se zde výrazně zahušťuje a proměňuje se na stolici. Denně vstoupí do tlustého střeva zhruba 1500 ml tráveniny, z níž se (podle složení potravy) vytvoří asi 150–500 gramů stolice. Při tvorbě stolice se uplatňují nejen resorpční procesy, ale také působení střevní mikrobioty. Některé bakterie zčásti zpracovávají jinak nestravitelnou rostlinnou vlákninu. Při kvasných a hnilobných procesech se vytvářejí střevní plyny (konkrétně metan, vodík, sirovodík a oxid uhličitý) Abnormální produkce, respektive hromadění střevních plynů je příčinou nepříjemné plynatosti neboli nadýmání. (Kočárek 2010)

Hnědá barva stolice je způsobena pigmenty, které vznikají při bakteriálním působení na žlučová barviva. V případě, že do střeva žluč nepřitéká, má stolice barvu bílou (acholická stolice). Zápach stolice je závislý na složení potravy, na bakteriálním osídlení tlustého střeva a přítomnosti indolu, skatolu, sirovodíku a metakaptanů. Tyto látky jsou ze střeva vstřebávány a jejich přítomnost v krvi ovlivňuje i zápach dechu. Obsah je peristaltickými pohyby posouván do rekta, jehož naplnění spouští defekační reflex. Průchod střevního obsahu tlustým střevem je velmi pomalý a normálně trvá dva až tři dny. (Kittnar 2011)

Lidské střevo se skládá z bilionů bakterií, 1 g stolice obsahuje přibližně 10^{11} bakterie. (Gill et al. 2006) Zkoumání lidské stolice má velký význam v mnoha oblastech výzkumu, jako je medicína, vývoj hygienických produktů nebo provoz a údržba kanalizačních systémů. (Penn et al. 2018)

Stolice je složena z vody, bílkovin, nestrávených tuků, polysacharidů, bakteriální biomasy, popela a nestrávených zbytků potravin. Hlavními prvky, které se nacházejí ve stolici jsou v procentech: 74 % kyslík, 10 % vodík, 5 % uhlík a 0,7 % dusík. (Rose et al. 2015) Její chemické a fyzikální vlastnosti se liší v závislosti na zdravotní kondici nebo stravě dané osoby. Průměrný počet stolic produkovaných dospělými za den je jedna stolice. Živé a mrtvé bakterie tvoří mezi 25 a 54 % suché hmotnosti stolice. Obsah vody ve stolici je 75 %, průměrné hodnoty se ve studiích pohybují v rozmezí 63–86 %. Rozdíly v obsahu vody ve stolici jsou připisovány

vláknině, protože dokáže absorbovat více vody v tlustém střevě a stimuluje růst bakteriální biomasy.

Výkaly jsou také variabilní ve své fyzické struktuře. Stolicí lze na základě Bristol Stool Chart klasifikovat do jednoho ze sedmi typů, od typu 1 (tvrdé hrudky) po typ 7 (průjem). Typy 3 a 4 jsou klasifikovány jako normální stolice. (Penn et al. 2018)

3.6.1 Fekální voda

Jako fekální voda je označována vodná fáze stolice, a jedná se o komplexní směs různých metabolitů, včetně mastných kyselin, aminokyselin, aminů a fenolových sloučenin se širokým rozsahem fyzikálně-chemických vlastností a teplot varu. (Gao et al. 2009) Mnoho studií v posledních letech ukázalo, že složky vodné fáze lidských výkalů, fekální voda, jsou schopny účinněji měnit růstové charakteristiky kolonocytů než složky pevné fáze. Obecně se tedy předpokládá, že fekální voda interaguje mnohem více s epitelem tlustého střeva než pevná fáze a má větší vliv na vývoj onemocnění tlustého střeva. (Jenner et al. 2005)

Právě kvůli široké rozmanitosti sloučenin v lidské fekální vodě je obtížné udělat komplexní analýzu metabolitů. Potenciální analytické metody zahrnují nukleární magnetickou rezonanci, hmotnostní spektrometrii založené na vysoce účinné kapalinové chromatografii, kapilární elektroforézu a plynovou chromatografii. Dnes je fekální voda běžným prostředkem ve studiích výživy a zdraví lidí. (Gao et al. 2009)

3.6.2 Fekální bakterioterapie

Transplantace fekální mikrobioty nebo infuze fekální suspenze od zdravého jedince do gastrointestinálního traktu jiné osoby za účelem vyléčení specifického onemocnění je nejlépe známá jako léčba opakující se infekce *C. difficile*. Transplantace fekální mikrobioty se však také úspěšně používá pro zánětlivé onemocnění střev, syndrom dráždivého střeva, idiopatickou zácpu a řadu nemocí gastrointestinálního traktu. (Bibbò et al. 2017) FMT může mít terapeutické využití pro celou řadu nejen gastrointestinálních onemocnění, ale i například pro diabetes, obezitu nebo autoimunitní onemocnění, u nichž se zjistilo, že mají patogenezi související s gastrointestinální dysbiózou. (Borody et al. 2014) FMT dočasně zmírňuje inzulinovou rezistenci a mění složení střevní mikrobioty u obézních jedinců, pokud jsou podány výkaly od dárců s normální váhou. (Van Nood et al. 2014)

Hlavní výhodou transplantace fekální mikrobioty je to, že poskytuje úplné spektrum mikrobiálních organismů od zdravého jedince, a proto dokáže léčit dosud necharakterizované dysbiotické stavy, přičemž obchází potřebu dešifrovat složité a funkční patogenní komplikace dysbiózy. (Borody et al. 2014) FMT může poskytnout drastickou restrukturalizaci mikrobiot a ukázalo se, že umožňuje funkční restart mikrobioty. (Doré & Blottière 2015)

3.7 Metody složení metabolomu stolice

Metabolomika je nově vznikající analytický nástroj, který lze popsat jako systematické studium celého profilu malých molekul v klinickém vzorku, které jsou detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. (Brown et al. 2016) Metabolity jsou malé molekuly, které se účastní obecných metabolických reakcí a které jsou potřebné pro udržení, růst a normální funkci buněk. Metabolom je kompletní sada metabolitů v organismu. Metabolomika je identifikace a kvantifikace všech metabolitů v biologickém systému a je cenným nástrojem, který studuje fenotyp a změny fenotypu způsobené vlivy prostředí, nemocí nebo změnou genotypu. Metabolom představuje velké množství složek, které patří do široké škály tříd sloučenin, jako jsou aminokyseliny, lipidy organické kyseliny, nukleotidy atd. (Dettmer et al. 2007) Metabolomické hodnocení může být prováděno *in vitro* i *in vivo* za použití buněk, tekutin nebo tkání. S ohledem na získání a jednoduchost přípravy vzorků jsou biofluidy nejjednodušší vzorky, se kterými lze pracovat. Mohou zahrnovat sérum, plazmu, moč, sliny, prostatické sekrece nebo fekální vodu. (Spratlin et al. 2009)

Vzorky stolice umožňují zhodnocení bakterií, které se nacházejí ve střevním lumen, a proto se malé molekuly stolice považují za důsledek ko-metabolismu nebo metabolické výměny mezi mikroby a hostitelskými buňkami. (Weir et al. 2013) Suchá část stolice se skládá z bakteriální biomasy, exfoliovaných epitelálních buněk tlustého střeva, nestrávených zbytků potravin a makromolekul (vláknina, proteiny, DNA, mukopolysacharidy atd). Dále také z tisíců malých molekul nebo metabolitů, jako jsou cukry, organické kyseliny a aminokyseliny. Právě tyto malé molekuly tvoří fekální metabolom. Fekální voda a fekální vodné extrakty obsahují ve vodě rozpustné metabolity, u kterých se předpokládá, že odrážejí potravinové složky, střevní exkrece a také rozpustné mikrobiální vedlejší produkty, které hrají důležitou roli ve zdraví hostitele. (Karu et al. 2018)

Nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie jsou analytické techniky používané k pozorování a kvantifikaci metabolitů z biologických vzorků a každá technika má svoje výhody a nevýhody. (Lamichhane et al. 2015) NMR našla četné využití v lokalizaci a charakterizaci metabolitů v biologických tekutinách *in vivo* a *in vitro*, a proto může být použita v diagnostice mnoha druhů onemocnění. (Gerothanassis et al. 2002) NMR, konkrétně ¹H-NMR, se široce používá k detekci metabolitů v biologických tekutinách a dalších vzorcích. Nabízí řadu výhod, které se nenacházejí v LC-MS nebo GC-MS. NMR je však mnohem méně citlivá než MS, což vede k mnohem menšímu pokrytí analytů. (Karu et al. 2018) NMR je dnes dobře zavedená metoda, která poskytuje rychlé, robustní a reprodukovatelné profily. Příprava vzorků je většinou jednoduchá a rychlá. (Jacobs et al. 2008)

4 Metodika

4.1 Průběh studie

Byla provedena pilotní studie fermentace rutinu střevní mikrobiotou v *in vitro* modelu tlustého střeva v kombinaci s analýzou pomocí nukleární magnetické rezonance. Jako zdroj střevní mikrobioty byly použity vzorky stolice od dvou dárců, ačkoliv původně mělo být odebráno 6 vzorků od dvou různých věkových skupin. Vzhledem k technickým obtížím došlo k odběru pouze dvou, což ale zásadně nesnižuje význam pilotní studie.

Průběh studie:

- 1) Oslovení dárců
- 2) Odběr stolice dárcem do odběrové sady přímo na fakultě univerzity
- 3) Fermentace vzorků *in vitro*
- 4) Analýza vzorků pomocí NMR
- 5) Statistické zpracování dat

4.2 Odběr vzorků stolice

Vzorek stolice byl získán od dvou dárců ženského pohlaví ve věku 25 a 29 let. Odběr vzorků probíhal v areálu České zemědělské univerzity a oba dárci byli předem seznámeni se studií. Odběr proběhl do jednorázových sad a vzorky stolice byly uzavřeny do sáčku společně s anaerogenem. Vzorky byly následně zpracovány do 2 hodin od odběru.

4.3 Chemikálie, spotřební materiál, zařízení a software

Použité chemikálie byly hydrogenuhličitan amonný NH_4HCO_3 , hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3 , hydrogenfosforečnan sodný $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 , síran hořečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, chlorid vápenatý $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, chlorid manganatý $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, chlorid kobaltnatý $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, chlorid železitý $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, trypton, glukóza, maltóza, kvasnicový extrakt, resazurin, cystein hydroxychlorid, hydroxid sodný NaOH , sulfid sodný $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, dusík (bez kyslíku, OFN), kyselina chlorovodíková, vitamin K1, hemin, azid sodný a rutin.

Spotřebním materiálem byly mikrozkuhavky, pipetovací špičky značky Eppendorf, nylonové filtry, NMR kyvety, jednorázové sady v podobě uzavíratelného plastového kelímku s igelitovým sáčkem, destičky, anaerogeny a vakuovací sáčky.

Pro analýzu vzorků byl použit NMR spektrometr Bruker Avance III pracující při protonové frekvenci 500,23 MHz. Pro navážení byly použity analytické váhy a ultra mikrováhy. Dále byl použit pH metr, vortex pro homogenizaci vzorku, stomacher, varná deska, pipety, vakuová balička, termostat pro skladování vzorků a centrifuga pro odstředění vzorku. K analýze spekter jednotlivých vzorků byl použit program Chenomx NMR v 8.5 a pro vyhodnocení byl použit IBM SPSS Statistics.

4.3.1 Příprava roztoků pro fermentaci

Pro fermentaci bylo použito médium, které se skládalo z CO₃ pufru, makrominerálního roztoku, mikrominerálního roztoku, sodno-fosfátového pufru, roztoku resazurinu, tryptonu, glukózy, maltózy, kvasnicového roztoku, vitamínu K1 a heminu. Jednotlivé roztoky byly připraveny smícháním jednotlivých složek podle tabulky č.1. Pro zastavení procesu fermentace byl použit roztok azidu sodného.

Tabulka č.1: Jednotlivé složky pro přípravu zásobních roztoků

Název složky	Složení a poměr složek
CO ₃ pufr	4 g NH ₄ HCO ₃ , 35 g NaHCO ₃ , destilovaná voda do objemu 1 L.
Makrominerální roztok	5,7 g of Na ₂ HPO ₄ , 6,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,3 g MgSO ₄ , destilovaná voda do objemu 1 L.
Mikrominerální roztok	2,5 g CaCl ₂ , 2,5 g MnCl ₂ * 4H ₂ O, 0,25 g CoCl ₂ *6H ₂ O, 1,25 g FeCl ₃ , destilovaná voda do objemu 25 mL.
Sodno-fosfátový pufr pH = 7, při 20 °C	3,54 g 1/15M KH ₂ PO ₄ v 390 mL 5,78 g 1/15M Na ₂ PO ₄ v 610 mL
Vitamin K1	roztok vitamínu K1 v methanolu (10 mg/mL)
Fermentační médium	2,25 g tryptonu + 2,25 g glukózy + 1,125 g maltózy + 2,25 g kvasnicového extraktu + 50,7 µL vitamínu K1 + 5,07 mg heminu v 450 mL destilované vody, 112,5 µL mikrominerálního roztoku, 225 mL CO ₃ pufru, 225 mL makrominerálního roztoku, 1,125 mL 0,1% roztoku resazurinu.
Redukční roztok	312,5 mg cystein hydrochloridu, 2 mL NaOH, 101,5 mg Na ₂ S, destilovaná voda do objemu 50 mL.
Azid sodný	roztok azidu sodného o koncentraci 3 mg/mL

4.4 Fermentace *in vitro*

Vzorek čerstvé stolice (24 g) od dárce byl společně homogenizován se sodno-fosfátovým pufrům (75 mL) ve stomacheru. Výsledná fekální směs měla koncentraci 32 %. Následně byla směs přefiltrována přes nylonový filtr.

Rutin byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu na koncentraci 10 mg/mL, tak aby byla výsledná koncentrace DMSO 0,5 %.

Sodno-fosfátový pufr a fermentační médium byly přivedeny na 7 minut k varu a následně schlazeny pomocí dusíku na teplotu 37 °C. Pomocí 6M HCl bylo upraveno pH na 7. Do destiček bylo odpipetováno 835 µL fermentačního média a 40 µL redučního roztoku. Následně bylo do destiček přidáno 100 µL fekální suspenze nebo sodno-fosfátový pufr pro kontrolní vzorek a 25 µL roztoku rutinu nebo DMSO jako kontrola.

Vzorky byly postupně odebírány z destiček v časech 0, 2, 4, 8 a 24 hodin. Při odběru byly vzorky smíchány s 50 µL azidu sodného pro zastavení procesu fermentace a ihned po odběru byly zmrazeny na -80 °C. Mezi časovými intervaly byly skladovány v termostatu při teplotě 37 °C v anaerobním prostředí.

4.5 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Před měřením byly vzorky rozmrazeny a následně byly zpracovány podle následujícího postupu: 1000 µl vzorku bylo centrifugováno při 15 000 rpm, poté bylo odebráno 600 µl, k nimž bylo přidáno 66 µl NMR pufru (1.5M fosfátový pufr, pH 7,4 0,2% azid sodný a 5mM TSP v D₂O). Roztok byl znovu zcentrifugován (5 min, 15 000 rpm) a 600 µl supernatantu přeneseno do NMR kyvet.

4.6 Měření a analýza dat

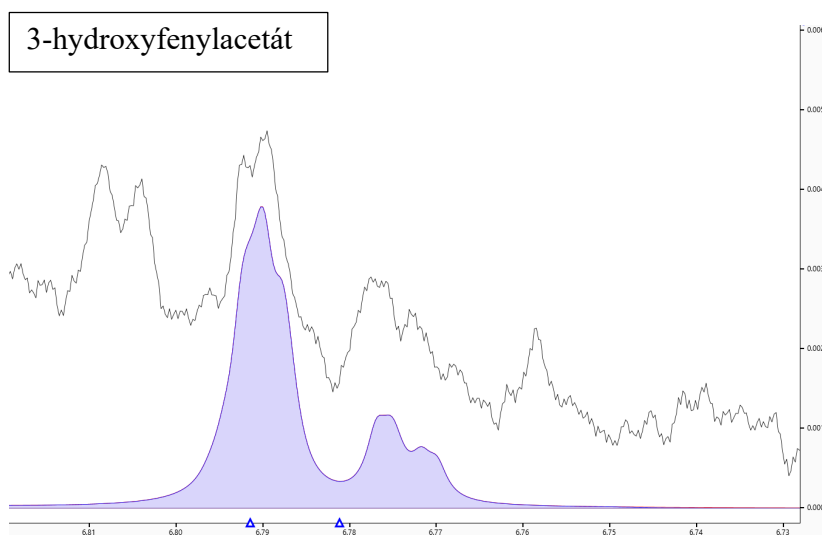
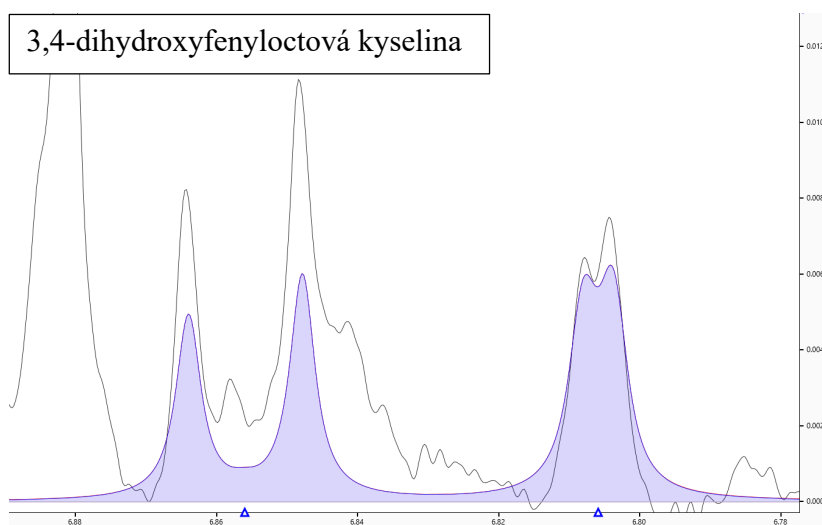
Spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance III vybaveném broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe s gradienty v ose Z (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo) pracující při protonové frekvenci 500,23 MHz. Teplota měření byla 298 K (25 °C). ¹H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla použita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Pro každý vzorek byl použit jednodimenzionální ¹H experiment s následujícími parametry: počet skenů NS 128, počet datových bodů 32k při šířce spektra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4 s, směšovací čas 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací zpracován zero filling, line broadening 0,3 Hz a exponenciální multiplikací.

Spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, anotace látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

Statistická analýza byla provedena v programu Microsoft Excel a SPSS v. 25.

5 Výsledky

Přibližně z 50 možných sloučenin viditelných ve spektru bylo kvantifikováno pomocí programu Chenomx 8.5 celkem 6 sloučenin. Na obrázku č.2 jsou zobrazena ukázková spektra z NMR analýzy s detailnějším pohledem na píky. Naměřená spektra jsou vyznačena černou linkou. Metabolity, které byly ve spektru identifikovány jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, propionát, butyrát, valerát) a metabolity z rozkladu rutinu (3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 3-hydroxyfenylacetát).



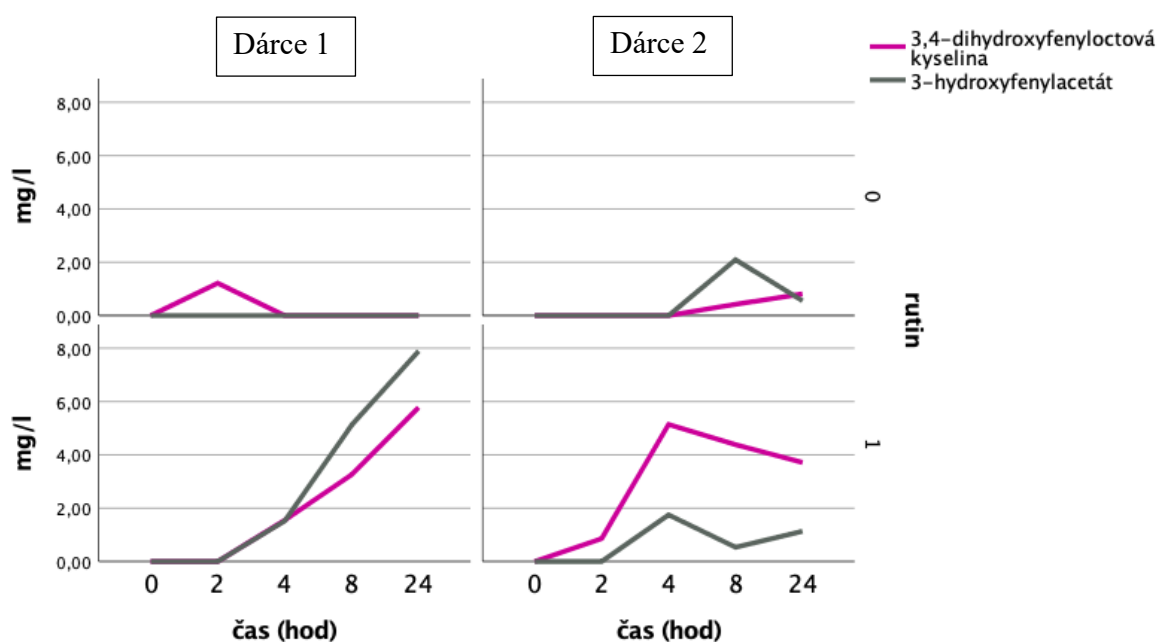
Obrázek č. 2: Ukázková NMR spektra s detailnějším pohledem

5.1 Metabolity z rozkladu rutinu

Byl sledován vývoj metabolitů rutinu u dvou dárců v závislosti na obsahu rutinu v médiu. Rutin se v médiu rozkládal pomocí střevní mikrobioty na 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu a 3-hydroxyfenylacetát. Na obrázku č. 3 je zobrazen vývoj metabolitů.

Bez přítomnosti rutinu v médiu netvořil dárcem 1 3-hydroxyfenylacetát a tvořil pouze 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v čase 2 hodin. Dárcem 2 naopak tvořil v 8 hodinách 3-hydroxyfenylacetát a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny pouze stopové množství od 8 hodiny.

V přítomnosti rutinu v médiu tvořil dárcem 1 3-hydroxyfenylacetát i 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu lineárně a maxima dosáhl ve 24 hodinách. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina dosáhla koncentrace 5,77 mg/l a 3-hydroxyfenylacetát koncentrace 7,89 mg/l. V porovnání s dárcem 1 tvořil dárcem 2 naopak více 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a méně 3-hydroxyfenylacetátu. Nejvíce tvořil 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v čase 4 hodin (5,14 mg/l) a následně koncentrace klesala. I 3-hydroxyfenylacetát dosáhl svého maxima v čase 4 hodin. Grafické znázornění naznačuje, že metabolismus testovaných látek probíhá u dárců odlišným způsobem a různou mírou rozkladu.



Obrázek č. 3: Vývoj metabolitů u dárců v závislosti na obsahu rutinu v médiu

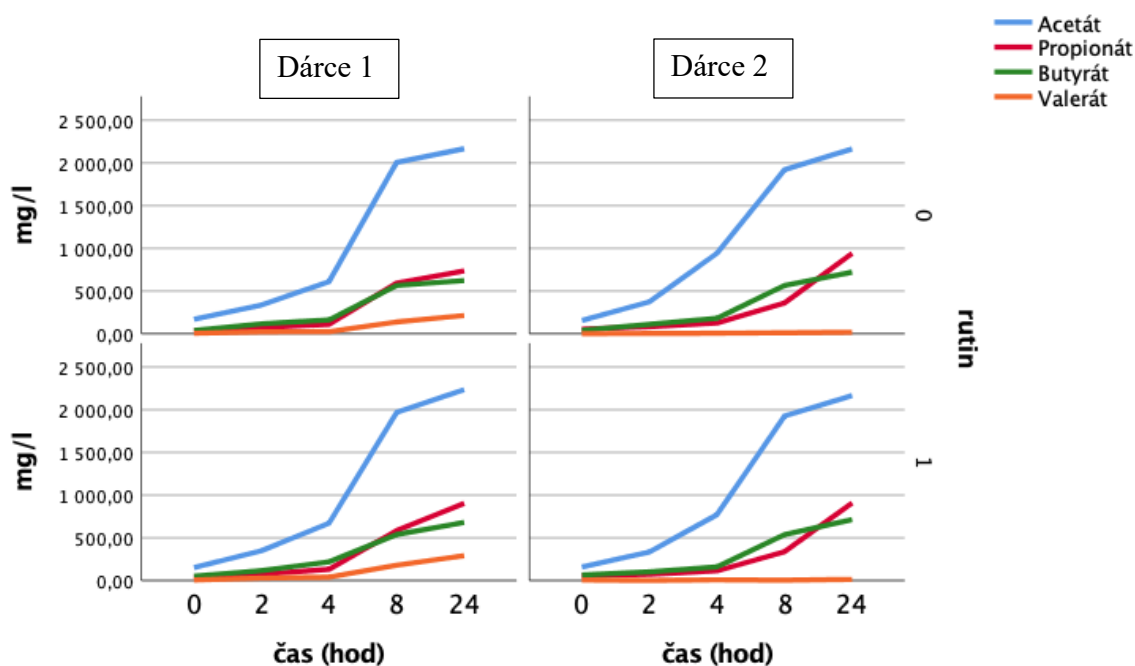
5.2 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

Byl sledován i vliv rutinu na spektrum mastných kyselin s krátkým řetězcem. Na obrázku č. 4 je zobrazen vývoj v závislosti na obsahu rutinu v médiu.

Dárce 1 tvořil bez přítomnosti rutinu v médiu nejvíce acetátu a nejméně valerátu. Kyseliny tvořil lineárně a nejvyšších hodnot dosahovaly v čase 24 hodin. S přítomností rutinu v médiu se jejich koncentrace zvedla o 3 % u acetátu, 23 % u propionátu, 9 % u butyrátu a 36 % u valerátu.

Dárce 2 tvořil bez přítomnosti rutinu v médiu také nejvíce acetátu a valerátu pouze stopové množství. Oproti dárce 1 tvořil dárce 2 v čase 8 hodin o 39 % méně propionátu. V přítomnosti rutinu tvořil dárce 2 naopak o 5 % více butyrátu než dárce 1 v čase 24 hodin.

V obou případech tvořil valerát významněji pouze dárce 1. V přítomnosti rutinu tvořil dárce 1 po 24 hodinách 291,78 mg/l, kdežto dárce 2 pouze 13 mg/l. Zatímco koncentrace mastných kyselin po 24 hodinách u dárce 1 rostla v přítomnosti rutinu, u dárce 2 v některých případech klesala. Například u propionátu, kterého dárce 2 tvořil bez rutinu v médiu 941,22 mg/l a s rutinem v médiu 909,35 mg/l. V přítomnosti rutinu tvořil i méně butyrátu a valerátu.



Obrázek č. 4: Vývoj mastných kyselin s krátkým řetězcem u dárců v závislosti na obsahu rutinu v médiu

6 Diskuze

Velké množství flavonoidů, zejména *O*-glykosidů, jsou (poly)fenolové sloučeniny přírodního původu, které se nacházejí v ovoci a zelenině. Průměrný příjem těchto sloučenin lidmi při běžné stravě činí přes 1 g za den. (Kim et al. 2005) Většina přijímaných flavonoidů se dostane do tlustého střeva bez degradace, kde slouží jako substráty pro střevní mikrobiotu o níž je známo, že obsahuje bakteriální skupiny, které mohou mít různé účinky na zdraví hostitele. Střevní mikrobiota je hlavní metabolické místo pro uvolňování flavonoidních aglykonů z jejich konjugovaných forem po štěpení glykosidových vazeb. (Rechner et al. 2004) Během trávení se flavonoidy přemění na škálu fenolových kyselin pomocí bakterií v tlustém střevě. (K. Gao et al. 2006)

Ve vzorcích byly identifikovány dva hlavní metabolity rutinu–3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina a 3-hydroxyfenylacetát. U dárců byl značný rozdíl v produkci těchto metabolitů v přítomnosti rutinu v médiu. Dárce 1 tvořil primárně 3-hydroxyfenylacetát a dárce 2 naopak 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu. U dárce 1 tyto metabolity rostly v obou případech lineárně, kdežto u dárce 2 po dosažení 4 hodin začaly klesat. Odlišnost vzniku u dárců může být obecně vysvětlena různým složením střevní mikrobioty (Rechner et al. 2004) nebo odlišnými stravovacími návyky co se týče zastoupení tří hlavních makroživin a vlákniny. Dárce 2 je původem ze středomoří, zatímco dárce 1 z České republiky, což může přispívat částečně odlišnému bakteriálnímu osídlení.

Kyselina 3-hydroxyfenyloctová se odlišuje od kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové pouze v nepřítomnosti jedné hydroxylové skupiny. Podle Mansoorian et al. (2019) je 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina dominantní fenolová kyselina z rozkladu rutinu v tlustém střevě, následuje 3-hydroxyfenyloctová kyselina. Bylo též navrženo, že existují různé metabolické typy, kde mikrobiota může produkovat různé metabolické vzorce včetně fenolových kyselin ze stejného zdroje polyfenolu. Antibakteriální a prebiotické účinky byly prokázány pro polyfenolické sloučeniny a u fenolových kyselin byl prokázán antimikrobiální účinek zejména na patogenní bakterie. Dále se ukázalo, že aglykony jako je kvercetin mají silnější antibakteriální vlastnosti než jejich glykosylované formy, jako je rutin. (Mansoorian et al. 2019)

Hlavními konečnými produkty katabolismu polysacharidů v tlustém střevě jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Průměrná lidská strava obsahuje kolem 300–600 mmol SCFA za den, což odpovídá přibližně 10 % denní energetické potřeby. Při průchodu ze střeva do jaterní žíly se SCFA metabolizují kolonocyty v pořadí butyrát–acetát–propionát. Zbytek SCFA je z velké části absorbován v játrech. (den Besten et al. 2013)

Většina mikroorganismů upřednostňuje pro fermentaci sacharidy před proteiny. K bakteriální fermentaci sacharidů dochází zejména v proximálním tlustém střevě, zatímco k fermentaci proteinů dochází v distální části tlustého střeva po vyčerpání sacharidů. Tato část střeva je primárním místem pro výskyt chorob jako je ulcerózní kolitida nebo pro nádory tlustého střeva. Lze tedy předpokládat, že nižší dostupnost SCFA po vyčerpání sacharidů je spojena z patogenezí těchto nemocí. (Hamer et al. 2008) Ze studií u lidí vychází, že vyšší koncentrace SCFA ve stolici obecně souvisí se sníženým výskytem nádorů tlustého střeva. Výsledky ze studií na extraktech z fekálních vod podporují hypotézu, že zejména acetát a

butyrát mohou hrát roli při ochraně proti nádorům tlustého střeva a konečníku. (Monleón et al. 2009)

U dárce 1 byl pozorován růst mastných kyselin s krátkým řetězcem lineárně. Nejvíce bylo produkováno zejména acetátu. U dárce 2 byl nejdříve pozorován vyšší nárůst butyrátu oproti propionátu. Následně se ale množství butyrátu ustálilo a zvýšila se produkce propionátu. Zajímavým zjištěním je, že oproti dárce 1 netvořil dárce 2 valerát. Množství SCFA ve střevě závisí na mnoha faktorech, jako jsou mikroorganismy, které se ve střevě nacházejí, potrava, kterou konzumujeme, nebo doba, kterou potrava traktem prochází.

Co se týče vlivu rutinu na spektrum mastných kyselin s krátkým řetězcem, nebyl jeho vliv v této studii pozorován. Tento fakt je v souladu s poznatky v literatuře. (Mansoorian et al. 2019) Zajímavé je, že se u prvního dárce koncentrace SCFA s rutinem v médiu lehce zvyšovala, ale u druhého dárce naopak po 24 hodinách klesala u propionátu, butyrátu a valerátu. I zde to ale může záviset například na stravě, kterou dárce konzumovali. Po obou nebyl požadován speciální jídelníček ani záznam stravy.

Cílem této práce bylo ověřit vhodnost nukleární magnetické rezonance na katabolismus rutinu v modelu tlustého střeva. Profilování metabolitů ze stolice pomocí NMR umožňuje kvantitativní holistický pohled na všechny vznikající procesy. NMR spektra odrážejí výhradně fyzikální vlastnosti studované látky a jsou jen minimálně ovlivněna vnějšími faktory, experimenty jsou tedy velmi dobře reprodukovatelné a k identifikaci lze snadno použít databáze spekter. NMR analýza je obvykle rychlá, snadno přizpůsobitelná pro režim s vysokou průchodností („high-throughput“), a jelikož nevyžaduje žádnou předchozí informaci o povaze zkoumaných látek, může poskytnout kompletní spektrální data i od neznámých či neočekávaných sloučenin. Výše zmíněné charakteristiky dělají z NMR nezastupitelnou metodu pro metabolický fingerprinting. Na NMR je cenný její univerzální a necílený přístup, daný schopností detekovat najednou ve vzorku veškeré látky nesoucí vodík. (Pelantová 2015) NMR, konkrétně tedy $^1\text{H-NMR}$ je široce využíváno v detekci metabolitů v biofluidech. Kvůli citlivosti na různé třídy metabolitů se doporučuje použití více než jedné analytické metody, např. GC-MS pro těkavé látky a organické kyseliny, NMR pro polární sloučeniny a LC-MS pro hydrofobní molekuly. (Karu et al. 2018)

Naše práce toto prokázala. Nukleární magnetická rezonance se potvrdila jako vhodná metoda ke stanovení katabolismu rutinu v tlustém střevě. Je tedy vhodné tuto metodu použít při rozsáhlejších studiích a pokrýt tak všechny metabolity, které rutin tvoří. Je také vhodné studovat ovlivnění dalších nepřímo souvisejících změn střevního metabolomu.

7 Závěr

Cílem této práce byla pilotní studie s cílem ověřit vhodnost nukleární magnetické rezonance na stanovení katabolismu rutinu v modelu tlustého střeva, respektive tedy ve fekální vodě u dvou dárců. Získané vzorky byly změřeny pomocí nukleární magnetické rezonance. Výsledná spektra byla dále analyzována pomocí programu Chenomx a statisticky vyhodnocená v programu SPSS Statistics. Ve spektrech bylo identifikováno celkem 6 sloučenin, které byly porovnávány v závislosti na tom, zdali byl do média přidán rutin.

I když studie zahrnovala pouze dva dárce, její význam se zásadně nesnížil. Byla stanovena hypotéza, že rutin ovlivňuje spektrum mastných kyselin s krátkým řetězcem. Tato hypotéza se však nepotvrdila. Dále byl pozorován i vliv rutinu na produkci metabolitů z jeho rozkladu. Množství fenolových kyselin však bylo u dárců značně rozdílné a bylo by proto vhodné zapojit do studie více dárců a pokrýt všechny hlavní metabolity pocházející z rozkladu rutinu v tlustém střevě.

Základní hypotéza, že NMR je vhodná metoda při stanovení katabolismu rutinu v modelu tlustého střeva, byla potvrzena, a je vhodná pro rozsáhlejší studie. Analýza fekálních vzorků pomocí NMR nabízí příležitost k pochopení interakcí mezi hostitelem a jeho střevní mikrobiotou. (Wu et al. 2010)

8 Literatura

- Abed-Meraim F, Combescure A. 2011. New Prismatic Solid-Shell Element: Assumed Strain Formulation and Hourglass Mode Analysis. *Structural Engineering and Mechanics* 37 (2): 253–56. DOI:10.12989/sem.2011.37.2.253.
- Alamuddin N, Bakizada Z, Wadden TA. 2016. Management of Obesity. *Journal of Clinical Oncology* 34 (35): 4295–4305. DOI:10.1200/JCO.2016.66.8806.
- Angelis M, Gobbetti M. 2004. Environmental Stress Responses in *Lactobacillus*: A Review. *Proteomics* 4 (1): 106–22. DOI:10.1002/pmic.200300497.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, et al. 2011. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* 473 (7346): 174–80. DOI:10.1038/nature09944.
- Besten G, Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. 2013. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *Journal of Lipid Research* 54 (9): 2325–40. DOI:10.1194/jlr.R036012.
- Besten G, Lange K, Havinga R, Dijk TH, Gerding A, Eunen K, Müller M, et al. 2013. Gut-Derived Short-Chain Fatty Acids Are Vividly Assimilated into Host Carbohydrates and Lipids. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 305 (12): 900–911. DOI:10.1152/ajpgi.00265.2013.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. 2010. Mode of Delivery Affects the Bacterial Community in the Newborn Gut. *Early Human Development* 86 (SUPPL. 1): 13–15. DOI:10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004.
- Bibbò S, Ianiro G, Gasbarrini A, Cammarota G. 2017. Fecal Microbiota Transplantation: Past, Present and Future Perspectives. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* 63 (4): 420–30. DOI:10.23736/S1121-421X.17.02374-1.
- Bielecka M. 2007. 16 Probiotics in Food Functionality and Justification. 413–26.
- Borody T J, Brandt LJ, Paramsothy S. 2014. Therapeutic Faecal Microbiota Transplantation: Current Status and Future Developments. *Current Opinion in Gastroenterology* 30 (1): 97–105. DOI:10.1097/MOG.000000000000027.
- Brown DG, Rao S, Weir TL, O'Malia J, Bazan M, Brown RJ, Ryan EP. 2016. Metabolomics and Metabolic Pathway Networks from Human Colorectal Cancers, Adjacent Mucosa, and Stool. *Cancer and Metabolism* 4 (1): 1–12. DOI:10.1186/s40170-016-0151-y.
- Cervantes-Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, Halaweish I, Bruckner GG, Boissonneault GA. 2006. Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation on Collagen by Rutin and Its Metabolites. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17 (8): 531–40. DOI:10.1016/j.jnutbio.2005.10.002.
- Chin CK, Garrison SA. 2008. Functional Elements from Asparagus for Human Health. *Acta Horticulturae* 776: 219–25. DOI:10.17660/actahortic.2008.776.27.
- Chua LS. 2013. A Review on Plant-Based Rutin Extraction Methods and Its Pharmacological Activities. *Journal of Ethnopharmacology* 150 (3): 805–17. DOI:10.1016/j.jep.2013.10.036.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (5): 343–56. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.

- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, et al. 2014. Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome. *Nature* 505 (7484): 559–63. DOI:10.1038/nature12820.
- Derrien M, Belzer C, de Vos WM. 2017. Akkermansia Muciniphila and Its Role in Regulating Host Functions. *Microbial Pathogenesis* 106: 171–81. DOI:10.1016/j.micpath.2016.02.005.
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.*, 26: 51-78. DOI:10.1002/mas.20108
- Doré J, Blottière H. 2015. The Influence of Diet on the Gut Microbiota and Its Consequences for Health. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 195–99. DOI:10.1016/j.copbio.2015.01.002.
- Duda A, Chodak T. 2015. Interaction of Dietary Compounds , Especially Polyphenols, with the Intestinal Microbiota:A Review. DOI:10.1007/s00394-015-0852-y.
- Everard A, Cani PD. 2013. Diabetes, Obesity and Gut Microbiota. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 27 (1): 73–83. DOI:10.1016/j.bpg.2013.03.007.
- Ferreira-Halder CV, de Sousa Faria AV, Andrade SS. 2017. Action and Function of Faecalibacterium Prausnitzii in Health and Disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 31 (6): 643–48. DOI:10.1016/j.bpg.2017.09.011.
- Flint HJ. 2012. The Impact of Nutrition on the Human Microbiome. *Nutrition Reviews* 70 (SUPPL. 1). DOI:10.1111/j.1753-4887.2012.00499.x.
- Foditsch C, Santos TMA, Teixeira AGV, Pereira RVV, Dias JM, Gaeta N, Bicalho RC. 2014. Isolation and Characterization of Faecalibacterium Prausnitzii from Calves and Piglets. *PLoS ONE* 9 (12): 1–19. DOI:10.1371/journal.pone.0116465.
- Francino MP. 2016. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Frontiers in Microbiology* 6 (JAN): 1–11. DOI:10.3389/fmicb.2015.01543.
- Frič P. 2005. Probiotika v Terapii Chorob Trávicího Ústrojí. *Interní Medicína pro Praxi* 7 (10): 434–37.
- Gao K, Xu A, Krul C, Venema K, Liu Y, Niu Y, Lu J, et al. 2006. Of the Major Phenolic Acids Formed during Human Microbial Fermentation of Tea, Citrus, and Soy Flavonoid Supplements, Only 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Has Antiproliferative Activity. *Journal of Nutrition* 136 (1): 52–57. DOI:10.1093/jn/136.1.52.
- Gao X, Pujos-Guillot E, Martin JF, Galan P, Juste C, Jia W, Sebedio JL. 2009. Metabolite Analysis of Human Fecal Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Ethyl Chloroformate Derivatization. *Analytical Biochemistry* 393 (2): 163–75. DOI:10.1016/j.ab.2009.06.036.
- Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. 2002. Nuclear Magnetic Resonance (Nmr) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and Their Applications To Chemistry, Biology and Medicine. *Chem. Educ. Res. Pract.* 3 (2): 229–52. DOI:10.1039/b2rp90018a.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312 (5778): 1355–59.

- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. 2008. Review Article: The Role of Butyrate on Colonic Function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 27 (2): 104–19. DOI:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.
- Heinken AM, Khan T, Paglia G, Rodionov DA, Harmsen HJM, Thiele I. 2014. Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium Prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe. *Journal of Bacteriology* 196 (18): 3289–3302. DOI:10.1128/JB.01780-14.
- Hollister EB, Riehle K, Luna RA, Weidler EM, Rubio-gonzales M, Mistretta T, Raza S, et al. 2015. Structure and Function of the Healthy Pre-Adolescent Pediatric Gut Microbiome. *Microbiome*, 1–13. DOI:10.1186/s40168-015-0101-x.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. 2002. Variation in Human Intestinal Microbiota with Age. *Digestive and Liver Disease* 34:12–18. DOI:10.1016/S1590-8658(02)80157-8.
- Huurde A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. 2008. Mode of Delivery-Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology* 93 (4): 236–40. DOI:10.1159/000111102.
- Jacobs DM, Deptemple N, Velzen E. 2008. RF Coil Technology for Small-Animal MRI. *NMR in Biomedicine* 20 (3): 304–25. DOI:10.1002/nbm.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar DR. 2015. Role of the Normal Gut Microbiota. *World Journal of Gastroenterology* 21 (29): 8836–47. DOI:10.3748/wjg.v21.i29.8787.
- Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Shanahan F. 2012. Categorization of the Gut Microbiota: Enterotypes or Gradients? *Nature Reviews Microbiology* 10 (9): 591–92. DOI:10.1038/nrmicro2859.
- Jenner AM, Rafter J, Halliwell B. 2005. Human Fecal Water Content of Phenolics: The Extent of Colonic Exposure to Aromatic Compounds. *Free Radical Biology and Medicine* 38 (6): 763–72. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.020.
- Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ. 2007. Rutin and Flavonoid Contents in Three Buckwheat Species *Fagopyrum Esculentum*, *F. Tataricum*, and *F. Homotropicum* and Their Protective Effects against Lipid Peroxidation. *Food Research International* 40 (3): 356–64. DOI:10.1016/j.foodres.2006.10.009.
- Julák J. 2006. Úvod do lékařské bakteriologie. Karolinum, Praha.
- Kallus SJ, Brandt LJ. 2012. The Intestinal Microbiota and Obesity. *Journal of Clinical Gastroenterology* 46 (1): 16–24. DOI:10.1097/MCG.0b013e31823711fd.
- Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, Wine E, Wishart DS. 2018. A Review on Human Fecal Metabolomics: Methods, Applications and the Human Fecal Metabolome Database. *Analytica Chimica Acta* 1030: 1–24. DOI:10.1016/j.aca.2018.05.031.
- Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim JM, Neckers L, Jung Y. 2005. Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutical Research* 22 (9): 1499–1509. DOI:10.1007/s11095-005-6250-z.
- Kittnar O. 2011. Lékařská fyziologie. Grada, Praha.
- Knight R. 2015. Dietary Effects on Human Gut Microbiome Diversity. *The British Journal of Nutrition* 113:1–5. DOI:10.1017/S0007114514004127.
- Kočárek E. 2010. Biologie člověka 1. Nakladatelství Scientia, Praha.

- Kohout P. 2009. Probiotika v Rukou Praktického Lékaře. *Medicína pro Praxi* 6 (3): 135–39
- Kreft I, Fabjan N, Yasumoto K. 2006. Rutin Content in Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench) Food Materials and Products. *Food Chemistry* 98 (3): 508–12. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.05.081.
- Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. 2017. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell* 171 (7): 1481–93. DOI:10.1016/j.cell.2017.11.024.
- Lamichhane S, Yde CC, Schmedes MS, Jensen HM, Meier S, Bertram HC. 2015. Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces. *Analytical Chemistry* 87 (12): 5930–37. DOI:10.1021/acs.analchem.5b00977.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting Better with Bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 98 (6): 1303–15. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x.
- Legatzki A, Rösler B, Mutius E. 2014. Microbiome Diversity and Asthma and Allergy Risk. *Current Allergy and Asthma Reports* 14 (10): 1–9. DOI:10.1007/s11882-014-0466-0.
- Levy J. 2000. The Effects of Antibiotic Use on Gastrointestinal Function. *American Journal of Gastroenterology* 95: 0–2. DOI:10.1016/S0002-9270(99)00808-4.
- Lievín V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 2000. Bifidobacterium Strains from Resident Infant Human Gastrointestinal Microflora Exert Antimicrobial Activity. *Gut* 47 (5): 646–52. DOI:10.1136/gut.47.5.646.
- Mansoorian B, Combet E, Alkhalidy A, Garcia AL, Edwards CA. 2019. Impact of Fermentable Fibres on the Colonic Microbiota Metabolism of Dietary Polyphenols Rutin and Quercetin. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (2). DOI:10.3390/ijerph16020292.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes VD, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio of the Human Microbiota Changes with Age. *BMC Microbiology* 9: 1–6. DOI:10.1186/1471-2180-9-123.
- Miquel S, Martin R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, Thomas M, Wells JM, Langella P. 2013. Faecalibacterium Prausnitzii and Human Intestinal Health. *Current Opinion in Microbiology* 16 (3): 255–61. DOI:10.1016/j.mib.2013.06.003.
- Modi SR, Collins JJ, Relman DA. 2014. Antibiotics and the Gut Microbiota Find the Latest Version: Antibiotics and the Gut Microbiota. *The Journal of Clinical Investigation* 124 (10): 4212–18. DOI:10.1172/JCI72333.themselves.
- Monleón D, Morales JM, Barrasa A, López JA, Vázquez C, Celda B. 2009. Metabolite Profiling of Fecal Water Extracts from Human Colorectal Cancer. *NMR in Biomedicine* 22 (3): 342–48. DOI:10.1002/nbm.1345.
- Nevoral J. 2005. Prebiotika, Probiotika a Synbiotika. *Pediatric pro Praxi* 2: 59–65.
- Nood E, Speelman P, Nieuwdorp M, Keller J. 2014. Fecal Microbiota Transplantation: Facts and Controversies. *Current Opinion in Gastroenterology* 30 (1): 34–39. DOI:10.1097/MOG.0000000000000024.
- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R. 2016. Age-Related Changes in Gut Microbiota Composition from Newborn to Centenarian: A Cross-Sectional Study. *BMC Microbiology* 16 (1): 1–12. DOI:10.1186/s12866-016-0708-5.

- Orrhage K, Nord CE. 1999. Factors Controlling the Bacterial Colonization of the Intestine in Breastfed Infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement 88* (430): 47–57. DOI:10.1111/j.1651-2227.1999.tb01300.x.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An Overview. *Journal of Nutritional Science* 5. DOI:10.1017/jns.2016.41.
- Patel K, Patel DK. 2019. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. 2nd ed. Elsevier Inc. DOI:10.1016/b978-0-12-813820-5.00026-x.
- Pelantová H. 2015. Aplikace NMR spektroskopie v metabolomice [disertační práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Penn R, Ward BJ, Strande L, Maurer M. 2018. Review of Synthetic Human Faeces and Faecal Sludge for Sanitation and Wastewater Research. *Water Research* 132: 222–40. DOI:10.1016/j.watres.2017.12.063.
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Folate Production by Bifidobacteria as a Potential Probiotic Property. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 179–85. DOI:10.1128/AEM.01763-06.
- Rada V. 2010. Využití Probiotik, Prebiotik a Synbiotik.” *Interní Medicína pro Praxi* 12 (2): 92–97.
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SK, Moore KP, Rice-Evans KA. 2004. Colonic Metabolism of Dietary Polyphenols: Influence of Structure on Microbial Fermentation Products. *Free Radical Biology and Medicine* 36 (2): 212–25. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022.
- Riiser A. 2015. The Human Microbiome, Asthma, and Allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 11 (1): 1–7. DOI:10.1186/s13223-015-0102-0.
- Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. 2015. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 45 (17): 1827–79. DOI:10.1080/10643389.2014.1000761.
- Russell SL, Finlay BB. 2012. The Impact of Gut Microbes in Allergic Diseases. *Current Opinion in Gastroenterology* 28 (6): 563–69. DOI:0.1097/MOG.0b013e3283573017.
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A. 2000. Bioflavonoids as Antiradicals, Antioxidants and DNA Cleavage Protectors. *Cell Biology and Toxicology* 16 (2): 91–98. DOI:10.1023/A:1007685909018.
- Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. 2010. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* 18 (1): 190–95. DOI:10.1038/oby.2009.167.
- Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. 2013. The Influence of Diet on the Gut Microbiota. *Pharmacological Research* 69 (1): 52–60. DOI:10.1016/j.phrs.2012.10.020
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. 2016. Gut Microbiota in Health and Disease *Gut Microbiota in Health and Disease*, 859–904. DOI:10.1152/physrev.00045.2009.

- Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. 2013. Rutin: Therapeutic Potential and Recent Advances in Drug Delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 22 (8): 1063–79. DOI:10.1517/13543784.2013.805744.
- Shreiner AB, Kao JY, Young VB. 2015. The Gut Microbiome in Health and in Disease, 69–75. DOI:10.1097/MOG.000000000000139.
- Singh SB, Young K, Silver LL. 2017. What Is an ‘Ideal’ Antibiotic? Discovery Challenges and Path Forward. *Biochemical Pharmacology* 133: 63–73. DOI:10.1016/j.bcp.2017.01.003.
- Slover CM. 2008. Lactobacillus: A Review. *Clinical Microbiology Newsletter* 30 (4): 23–27. DOI:10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006.
- Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. 2009. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clinical Cancer Research* 15 (2): 431–40. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-1059.
- Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochemical Journal* 474 (11): 1823–36. DOI:10.1042/BCJ20160510.
- Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. 2010. Human Intestinal Microbiota and Healthy Ageing. *Ageing Research Reviews* 9 (2): 107–16. DOI:10.1016/j.arr.2009.10.004.
- Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuková L, Rossmann P, et al. 2011. The Role of Gut Microbiota (Commensal Bacteria) and the Mucosal Barrier in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases and Cancer: Contribution of Germ-Free and Gnotobiotic Animal Models of Human Diseases. *Cellular and Molecular Immunology* 8 (2): 110–20. DOI:10.1038/cmi.2010.67.
- Turrone F, Ventura M, Buttó LF, Duranti S, O’Toole PW, O’Connell Motherway M, Sinderen D. 2014. Molecular Dialogue between the Human Gut Microbiota and the Host: A Lactobacillus and Bifidobacterium Perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (2): 183–203. DOI:10.1007/s00018-013-1318-0.
- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. 2018. Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health. *BMJ (Online)* 361: 36–44. DOI:10.1136/bmj.k2179.
- de Vos WM. 2017. Microbe Profile: Akkermansia Muciniphila: A Conserved Intestinal Symbiont That Acts as the Gatekeeper of Our Mucosa. *Microbiology (United Kingdom)* 163 (5): 646–48. DOI:10.1099/mic.0.000444.
- Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 3 (1): 71–82. DOI:10.1016/J.ENG.2017.01.008.
- Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. 2013. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. *PLoS ONE* 8 (8). DOI:10.1371/journal.pone.0070803.
- West CE, Jenmalm MC, Prescott SL. 2015. The Gut Microbiota and Its Role in the Development of Allergic Disease: A Wider Perspective. *Clinical and Experimental Allergy* 45 (1): 43–53. DOI:10.1111/cea.12332.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, et al. 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns With. *Science (New York, N.Y.)* 334 (October): 105–9. DOI:10.1126/science.1208344.

- Wu J, An Y, Yao J, Wang Y, Tang H. 2010. An Optimised Sample Preparation Method for NMR-Based Faecal Metabonomic Analysis. *Analyst* 135 (5): 1023–30. DOI:10.1039/b927543f.
- Yang J, Guo J, Yuan J. 2008. In Vitro Antioxidant Properties of Rutin. *LWT - Food Science and Technology* 41 (6): 1060–66. DOI:10.1016/j.lwt.2007.06.010.
- Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, Van Ree R. 2002. Immunology: Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 296 (5567): 490–94. DOI:10.1126/science.296.5567.490.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

BMI	Body Mass Index, index tělesné hmotnosti
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FMT	Fecal Microbiota Transplantation, transplantace fekální mikrobioty
GC–MS	Gas chromatography–mass spectrometry, plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GIT	Gastrointestinální trakt
IBD	Inflammatory Bowel Disease, zánětlivá onemocnění střev
LC–MS	Liquid chromatography–mass spectrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OFN	Oxygen Free Nitrogen, dusík bez kyslíku
pH	Potential of hydrogen, vodíkový exponent
ppm	Parts per million
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
SCFA	Short chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem