

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**^1H NMR metabolom stolice pacientů s Crohnovou
chorobou**

Diplomová práce

Bc. Michaela Řeháková

Výživa a potraviny

doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "¹H NMR metabolom stolice pacientů s Crohnovou chorobou" 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 15.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za pomoc, vstřícnost a rady při výzkumu i psaní diplomové práce, dále Ing. Josému Jaimesovi za veškerou pomoc, obrovskou ochotu a trpělivost v celém procesu vytváření diplomové práce, MUDr. Jakobovi Hurychovi za spolupráci, vlídnost a rady, a také svým rodičům za veškerou podporu.

¹H NMR metabolom stolice pacientů s Crohnovou chorobou

Souhrn

Crohnova choroba patří do skupiny tzv. zánětlivých střevních onemocnění. Jedná se o chronická onemocnění s dosud neznámou příčinou. Předpokládá se však, že významnou roli hraje střevní mikrobiom, který úzce souvisí s metabolomem. Je známo, že pacienti trpící Crohnovou chorobou mají mikrobiom odlišný, i když není jisté, zda se jedná o příčinu či následek onemocnění.

Cílem práce bylo porovnat profil metabolitů ve stolici dětských pacientů s Crohnovou chorobou a kontrolní skupiny pomocí metody ¹H nukleární magnetické rezonance (NMR). Dále také najít rozdíly, které by mohly sloužit jako markery pro diagnostiku a monitorování Crohnovy choroby. Ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Motole byly odebrány vzorky stolice od 6 dětských pacientů. Kontrolní skupinu tvořilo 11 dětí z Olivovy dětské léčebny v Říčanech u Prahy.

Vzorky byly analyzovány metodou NMR 500 MHz, s pomocí pulzní sekvence (1D NOESY) s presaturací pro potlačení signálu vody. Spektra byla zpracována s pomocí cílené a necílené analýzy. Pro cílenou analýzu byla spektra manuálně upravena a profilována v programu Chenomx s použitím databáze látek. Bylo kvantifikováno 69 různých sloučenin. Pro necílenou analýzu byla provedena redukce spekter na 0,01 ppm binny, s pomocí programu MNova. Matice binnů byla zpracována s pomocí vícerozměrných statistických metod, analýzy hlavních komponent (PCA) a ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA). Obě tyto analýzy potvrdily statisticky významný rozdíl mezi zkoumanými skupinami.

S pomocí Mann-Whitney U testu bylo mezi skupinami identifikováno 19 statisticky významně rozdílných látek, např. alanin ($p < 0,001$), methanol ($p = 0,021$), či mastné kyseliny s krátkým řetězcem, propionát ($p = 0,003$) a butyrát ($p = 0,003$). Vzhledem ke známému sníženému zastoupení bakterií produkujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem u pacientů s Crohnovou chorobou, by mohly právě tyto kyseliny sloužit jako jeden z markerů pro Crohnovu chorobu.

Klíčová slova: Crohnova choroba, nukleární magnetická rezonance, metabolom, mikrobiota, stolice

¹H NMR metabolome of stool of patients with Crohn's disease

Summary

Crohn's disease is a type of inflammatory bowel disease (IBD), which encompass various chronic inflammatory digestive conditions. Although the causes of IBD are unknown, one factor that may play an important role is the intestinal microbiome, which is closely related to the metabolome. Patients with Crohn's disease appear to have a different microbiome than healthy subjects, although it is uncertain whether this is part of the cause or an effect of the condition.

The aim of this study was to evaluate the faecal metabolic profile of paediatric patients with Crohn's against those of healthy controls using ¹H nuclear magnetic resonance (NMR). Differences could potentially serve as biomarkers for the diagnosis and monitoring of the condition. In cooperation with Motol University Hospital in Prague, stool samples were obtained from 6 paediatric patients with Crohn's. These were compared with 11 healthy controls from the Olivova dětská léčebna in Říčany.

The samples were analysed with NMR at 500 MHz using a pulse sequence (1D NOESY) with pre-saturation to suppress the water signal. Targeted and untargeted analyses were applied to the spectra. For targeted analysis, the spectra were manually adjusted and profiled using Chenomx's database of compounds. A total of 69 different compounds were quantified. For non-targeted analysis, the spectra were reduced to 0.01 ppm bins using the MNova program. The bin matrix was processed using multivariate statistical methods, namely principal component analysis (PCA) and orthogonal least squares discriminant analysis (OPLS-DA).

The Mann-Whitney U test identified 19 statistically significantly different compounds between the two groups: alanine ($p < 0.001$), methanol ($p = 0.021$), and short-chain fatty acids (SCFA) propionate ($p = 0.003$) as well as butyrate ($p = 0.003$). Due to the known reduced proportion of SCFA-producing bacteria in patients with Crohn's, these acids could potentially serve as biomarkers of the disease.

Keywords: Crohn's disease, nuclear magnetic resonance, metabolome, microbiota, stool

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Crohnova choroba	9
3.1.1	Výskyt a diagnostika	9
3.1.2	Dietní faktory	10
3.1.3	Mikrobiom	13
3.1.4	Léčba	16
3.2	Nukleární magnetická rezonance v metabolomice	20
3.2.1	Diagnostika IBD	22
3.2.2	Statistické vyhodnocení	23
4	Metodika	24
4.1	Průběh studie	24
4.2	Metadata pacientů	24
4.3	Vzorky	25
4.4	Laboratorní pomůcky, chemikálie a software	25
4.5	Příprava vzorků	25
4.6	Analýza a zpracování dat	26
4.7	Statistické vyhodnocení dat	26
5	Výsledky	28
6	Diskuze	33
7	Závěr	36
8	Literatura	37
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	43

1 Úvod

Zánětlivá střevní onemocnění představují chronická a nespecifická onemocnění gastrointestinálního traktu, ve kterém způsobují zánětlivý proces. Mezi tato onemocnění patří Crohnova choroba (CD). Zánět při CD může vzniknout v jakékoliv části gastrointestinálního traktu a může postihnout celou stěnu střeva. Incidence a prevalence onemocnění závisí na konkrétním území a prostředí, obecně se však počet pacientů trpících CD neustále zvyšuje, a zároveň se snižuje věk, ve kterém je nemoc pacientům diagnostikována. Příčina onemocnění nebyla dosud objasněna (Gajendran et al. 2018), předpokládá se však, že vzniká u jedinců s genetickými predispozicemi díky neregulované imunitní odpovědi po vystavení specifickým vlivům prostředí (Lee et al. 2015). Mezi rizikové faktory pro vznik CD patří např. kouření, život ve městě, apendektomie nebo některé dietní faktory (Piovani et al. 2019).

Diagnostiku onemocnění předchází několik různých vyšetření, které vždy zakončuje endoskopické vyšetření. Vzhledem k tomu, že endoskopie je invazivní metoda, hledá se jiný, neinvazivní způsob, který by se dal v této problematice využívat. Metabolomika by mohla představovat přesně takový neinvazivní způsob, protože má potenciál pro hledání markerů použitelných jak pro diagnostiku nemoci, tak pro monitorování jejího průběhu. Jedná se o profilování metabolitů v různých biologických materiálech. Je známo, že pacienti s CD mají menší rozmanitost a celkové zastoupení bakterií ve střevě, s čímž souvisí také odlišný metabolom pacientů. Ukázkovou souvislostí je snížené zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem a zároveň snížené množství bakterií, které tyto mastné kyseliny produkují. Existují studie, ve kterých se podařilo odlišit skupinu nemocných pacientů a skupinu zdravých jedinců na základě metabolomického profilování.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jednou z metabolomických metod, pomocí které lze identifikovat široké spektrum látek. NMR spektroskopie fekálních vzorků představuje velice nadějnou možnost pro diagnostiku a sledování průběhu CD, ale zatím existuje jen málo studií, které by se touto metodou zabývaly.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo porovnat profil metabolitů ve stolici dětských pacientů s Crohnovou chorobou a zdravých jedinců pomocí NMR spektroskopie a najít rozdíly, které by v budoucnu mohly sloužit buď jako diagnostické markery, nebo by mohly sloužit k pochopení původu a průběhu onemocnění, souvislostí se stravou a mikrobiálním osídlením.

Hypotéza: Metabolom pacientů s Crohnovou chorobou se liší od metabolomu zdravých jedinců.

3 Literární rešerše

3.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé střevní onemocnění, které postihuje primárně gastrointestinální trakt. Dle současného pohledu se jedná o jeden z pólů zánětlivých střevních onemocnění (inflammatory bowel diseases, IBD). Výskyt nemoci v populaci má stále zvyšující se tendenci. Nepostihuje pouze dospělé, ale čím dál častěji se začíná projevovat u mladších pacientů. U dětí se za průměrný věk pro stanovení této diagnózy považuje 12-13 let, může se však projevit již v nejnižších věkových skupinách (Mitrová 2012). Zánět vznikající při Crohnově chorobě může prostoupit celou stěnou střeva a postihnout jakoukoliv část trávicího traktu, avšak u 50 % pacientů postihuje ileocekální část střeva (Gajendran et al. 2018). Pro průběh onemocnění je typické střídání období remisní fáze a relapsů. Remise je klidové období bez výrazných klinických obtíží, zatímco relaps, aktivní fázi onemocnění, charakterizuje zvýšený zánět probíhající ve střevě a tím i výrazné klinické obtíže (Konikoff & Denson 2006). Mezi zánětlivá střevní onemocnění se řadí ještě ulcerózní kolitida (UC), a také tzv. indeterminovaná kolitida, kam spadají případy, jenž nelze jednoznačně diagnostikovat jako CD nebo UC (Douda 2010; Mitrová 2012).

Etiologie IBD stále nebyla přesně odhalena. Předpokládá se však, že jde o výsledek interakce mezi genetickými predispozicemi, změnami ve složení střevní mikrobioty (Chassaing & Darfeuillemichaud 2011) a vlivy prostředí (např. cigaretový kouř, stres, infekce) (Gajendran et al. 2018). V souvislosti s genetickým vlivem bylo zjištěno, že příbuzní prvního stupně od pacientů s CD také podléhají zvýšenému riziku (Hedin et al. 2014). Za rizikové faktory se považuje kouření, nízký přísun vlákniny ve stravě, životní styl a apendektomie při perforaci appendixu. Co se týče životního stylu, záleží především na spánku, stresu a cvičení. Málo spánku, nízká fyzická aktivita a stres či úzkost mohou zvýšit riziko rozvoje choroby. U již nemocných pacientů jsou špatný spánek a stres, úzkost či deprese spojovány s relapsem nemoci (Gajendran et al. 2018). Dalšími rizikovými faktory jsou život ve městě, odstranění krčních mandlí, užívání antibiotik a orální antikoncepce a porod císařským řezem (Piovani et al. 2019). U dětí zvyšuje riziko vzniku kromě nízké fyzické aktivity také přijetí do nemocnice zapříčiněné gastrointestinálními infekcemi, atopický ekzém či dokonce rozvod rodičů (Jakobsen et al. 2013). Naopak snížit riziko může fyzická aktivita, sdílení postele, více sourozenců, infekce způsobená bakterií *Helicobacter pylori*, chování domácích mazlíčků, kojení a některé další dietní faktory (Piovani et al. 2019).

3.1.1 Výskyt a diagnostika

Incidence i prevalence se liší v závislosti na lokalitě, životním prostředí, a také etnicitě (Gajendran et al. 2018). Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2013) uvádí, že Crohnova choroba v ČR zaujímá 12 % z evidovaných gastroenterologických onemocnění. Dále udává, že na 10 000 osob vychází 17,8 osob trpících tímto onemocněním, což oproti roku 2005 znamená 51% navýšení. CD se běžněji vyskytuje v průmyslových částech světa, především v severní Americe a západní Evropě. Incidence však narůstá také v Asii a jižní Americe (Feuerstein & Cheifetz 2017).

Počátky diagnostiky CD se zakládají na kombinaci úvodních příznaků, laboratorních a zobrazovacích nálezů a fyzikálního vyšetření (Gajendran et al. 2018). Počáteční příznaky nemusejí mít pouze gastrointestinální původ, ale mohou být také extraintestinální. Patří mezi ně např. průjem, bolesti břicha, hubnutí, nevolnost či horečka (Feuerstein & Cheifetz 2017). Vzhledem k tomu, že u dětí bývá často jediným příznakem porucha růstu, růstové percentilové grafy představují nezbytnou součást pravidelných dětských kontrol u dětského praktického lékaře (Mitrová 2012). Co se týče laboratorního vyšetření, základem je testování krevních parametrů spolu s typickými protilátkami (u CD se jedná o protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*) a stanovení zánětlivých parametrů ve stolici, konkrétně fekálního kalprotektinu (Mitrová 2012; Gajendran et al. 2018). Jedná se o stabilní protein, který je odolný vůči proteolytickému štěpení ve stolici (Konikoff & Denson 2006). V klinické praxi slouží jako senzitivní, avšak nespecifický ukazatel střevního zánětu. Jeho elevace může být kromě IBD způsobena i jiným onemocněním, např. infekcí trávicího traktu (Jensen et al. 2011). Využívá se zejména k monitorování průběhu onemocnění, kdy lze na základě jeho hodnot předpovědět hrozící relaps (Konikoff & Denson 2006).

Ze zobrazovacích vyšetření se využívá ultrasonografie, magnetická resonance a kapslová endoskopie (Mitrová 2012; Gajendran et al. 2018). Kapslová endoskopie se dá využít jak v diagnostice při podezření, tak u již diagnostikovaných pacientů, např. pro zjištění rozsahu postižení tenkého střeva. S výhodou se dá využít také u dětských pacientů, i u mladších 10 let. Využití v České republice ale není vůbec veliké, neboť vyšetření není hrazeno zdravotní pojišťovnou. Kontraindikaci kapslové endoskopie zapříčiňují stenózy či těžká postižení tenkého střeva (Douda 2010).

Další důležitou součástí diagnostiky zastupují endoskopická vyšetření horní i dolní části trávicího traktu. Slouží k nalezení místa postižení, a především k odebrání vzorků pro následné histologické vyšetření, po kterém nastává definitivní diagnóza (Mitrová 2012; Gajendran et al. 2018).

Diagnostika však není důležitá pouze pro odhalení nemoci, ale také pro sledování nemoci u již léčených pacientů. U dětských pacientů se v klinické praxi využívají speciální indexy pro určení aktivity zánětu. Těmi nejdůležitějšími jsou Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) a weighted PCDAI (wPCDAI). Tyto indexy korelují se střevním zánětem, avšak na potřebné hodnocení slizničního hojení nestačí (Turner et al. 2017). Pro dospělé pacienty existuje také Crohn's Disease Activity Index (CDAI), ale jeho vypovídající hodnota ohledně zánětu je ještě slabší než u dětské varianty. PCDAI klade na rozdíl od CDAI menší důraz na subjektivně popsané symptomy (Otley et al. 1999).

3.1.2 Dietní faktory

Výživa hraje roli v mnoha aspektech nemoci, a to již od jejího původu, až po udržování a léčbu (Penagini et al. 2016). Strava může ovlivňovat jak složení a funkčnost střevního mikrobiomu, tak mikrobiální produkci vstřebatelných metabolitů (Lee et al. 2015; Levine et al. 2018). Dietní faktory mají vliv také na bariérovou funkci hostitele a vrozenou imunitu. Obecně je však těžké hledat jednotlivé rizikové dietní faktory a jejich příčinnou souvislost s nemocí, neboť mnoho potravin podléhá průmyslovému zpracování a mísení dohromady, např. konzumace zpracovaného masa bude pravděpodobně spojená s konzervačními látkami (Levine

et al. 2018). Z všeobecného hlediska se jako důvod zvýšené incidence CD považuje rozšíření tzv. západní stravy, ke které se váže bohatá konzumace tuků a bílkovin, zatímco konzumace ovoce a zeleniny není dostačující (Penagini et al. 2016).

Z přehledového článku zabývajícího se nalezením nějakého vzorce ve stravování, jež ovlivňuje riziko CD, vyplynulo, že zvýšené riziko CD podporuje strava bohatá na omega-6 mastné kyseliny, nasycené tuky a maso (Hou et al. 2011). Omega-6 mastné kyseliny patří spolu s omega-3 mastnými kyselinami do skupiny polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a považují se za prozánětlivé sloučeniny díky arachidonové kyselině, která funguje jako prekurzor zánětlivým mediátorům (Marion-Letellier et al. 2015). Další rizikové dietní faktory mohou představovat zejména nedostatek vitamínu D, dále také sacharóza (při zvýšení příjmu o 10 g/den) a špatné trávení laktózy. Kojení, vysoké hladiny vitamínu D, vláknina a ovoce naopak riziko snižují (Piovani et al. 2019).

Podle studie, ve které zkoumali rizikové faktory u dětí, zvyšuje riziko vzniku vysoký příjem cukrů z nealkoholických nápojů a naopak protektivní efekt má zelenina a celozrnný chléb (Jakobsen et al. 2013). D'Souza et al. (2008) provedli studii, ve které se také zaměřili na dětské pacienty, a ještě je rozdělili dle pohlaví. Zkoumali souvislost vzniku CD a stravovacích vzorců, které si kategorizovali do několika skupin. Zvýšené riziko u dívek dle výsledků vykazuje „západní“ vzorec stravování, který se vyznačuje konzumací masa, smaženého jídla, rychlého občerstvení a sladkostí. Naopak významně negativní souvislost jak u dívek, tak u chlapců, má další typ vzorce, který je charakterizován konzumací zeleniny, ovoce, mléčných produktů, celozrnného pečiva, obilnin, vajíček, olivového oleje, ryb a ořísků.

Jedním z nejvíce diskutovaných dietních faktorů je vláknina. Ve studii (Ananthakrishnan et al. 2013) zaměřené právě na vlákninu bylo zjištěno, že nejvíce pomáhá vláknina obsažená v ovoci. Předpokládaný mechanismus protektivního efektu vlákniny spočívá v její metabolizaci střevními bakteriemi na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), čímž se zabraňuje transkripci prozánětlivých mediátorů. Dále však také uvádí, že je třeba udělat další studie ohledně tohoto mechanismu a potenciální možnosti prevence pomocí vlákniny.

Co se týče příjmu tuků, Chan et al. (2014) uvádějí, že pouze příjem dokosahexaenové kyseliny pomáhá snížit riziko vzniku CD. Takový příjem by měl odpovídat 1 až 2 mořským rybám týdně. Oproti tomu Ananthakrishnan et al. (2014) neshledali souvislost mezi žádným z tuků a vlivem na CD.

Kromě makronutrientů však mohou mít ve výživě vliv také mikronutrienty. Některé mají důležitou roli jako koenzymy potřebné pro udržování střevní epitelové bariéry, jiné přímo ovlivňují střevní imunitní odpovědi nebo mikrobiální zastoupení ve střevě. Například se jedná o zinek, jehož nedostatek se spojuje s porušením bariéry, a tím i zvýšené propustnosti (Ananthakrishnan et al. 2018). Pacienti s IBD obecně na nutriční deficienci trpí, zejména díky celkovému sníženému příjmu potravy, omezujícím dietám, malabsorpci a nadměrným ztrátám živin. Ohledně této problematiky byla provedena studie, ve které byl zkoumán stav sledovaných mikronutrientů v době diagnózy a po průměrné době sedmi let u dětských pacientů trpících IBD. Zjistilo se, že především nedostatek železa, zinku a vitamínu D je v době diagnózy běžný. V průběhu následující zmíněné doby nastalo omezené zlepšení těchto hodnot. Tyto deficiencie souvisejí se sledovanými markery, jako vysoké CRP či nízká hodnota sérového albuminu. Co se týče hořčíku a vitamínu B12, jejich nedostatek se objevuje spíše vzácně (Ehrlich et al. 2020). Konzumaci zinku v souvislosti s prevencí nemoci se věnovala studie Ananthakrishnan et al.

(2015) zaměřená na ženy s CD a UC, dle které je vyšší příjem zinku spojen se sníženým rizikem vzniku CD. Tento efekt se týká výrazněji zinku přijímaného stravou než suplementovaného. Mezi významné zdroje zinku patří např. maso, celozrnné potraviny nebo mléko a mléčné výrobky (Olza et al. 2017).

Dalším diskutovaným faktorem výživy v souvislosti s původem CD je v tučích rozpustný vitamin D, neboť to vypadá, že jeho nedostatek hraje roli v zánětlivých procesech střeva. Byla realizována studie (Schäffler et al. 2018), ve které se zjišťovalo, zda má orálně podávaný vitamin D vliv na zastoupení bakterií u pacientů s CD v porovnání se zdravými kontrolami. Obě skupiny účastníků zároveň trpěli deficiencí vitamínu D. Po celou dobu studie byly ve stolici pacientů obou skupin nejvíce zastoupenými kmen *Bacteroidetes* a rod *Clostridium*. Co se týče ostatních taxonů, u kontrolní skupiny nebyly shledány po celou dobu studie žádné významné změny v zastoupení. Oproti tomu u pacientů s CD došlo ke změnám hned v prvním týdnu podávání vitamínu, avšak v dalších týdnech došlo ke zpětnému navrácení změn. Vzhledem k tomu, že vitamin D neměl u kontrolní skupiny významný vliv, avšak u skupiny pacientů s CD ano, lze předpokládat jeho důležitou roli v patogenezi CD. Přestože dalším efektem bylo u pacientů s CD také snížení bakteriální diverzity. Ve studii Ananthakrishnan et al. (2013) porovnávali naměřené hladiny 25-hydroxycholecalciferolu (25(OH)D) v krevní plazmě u pacientů s IBD. 25(OH)D vzniká v játrech po hydroxylaci vitamínu D a využívá se jako ukazatel množství vitamínu D v organismu. Dle výsledků studie deficitní hladina 25(OH)D v plazmě u pacientů s CD souvisí se zvýšeným rizikem operací a hospitalizací zapříčiněných nemocí ve srovnání s hladinou dostatečnou. Dále také pacienti s CD, kteří vykazovali výchozí nedostatečné hodnoty, ale následně hladinu 25(OH)D normalizovali, měli sníženou pravděpodobnost operace oproti těm, kterým se hladinu normalizovat nepodařilo. Strisciuglio et al. (2018) provedli studii, ve které se zaměřili na nově diagnostikované dětské pacienty s IBD a jejich hodnoty proteinu vázajícího vit. D a celkového i volného 25(OH)D v porovnání se zdravou kontrolní skupinou. Z výsledků bylo patrné, že hladina celkového 25(OH)D byla vyšší u zdravých jedinců, avšak koncentrace volného byla stejná, či dokonce vyšší u pacientů. Co se týče proteinu, jeho hladina byla nižší u pacientů, což souvisí i s nižší hladinou celkového 25(OH)D. Dle autorů tedy zánět inverzně koreluje s hladinou vit. D vázajícího proteinu. Co se týče vitaminů rozpustných v tučích obecně, podle Fabisiak et al. (2017) mají pacienti s CD nižší hladiny těchto vitaminů oproti zdravým jedincům a měla by se zvážet jejich suplementace.

Z hlediska výživy se s rizikem výskytu CD nepojí pouze samotné živiny, ale také další součásti přidané do potravin v průběhu jejich zpracování, jako např. emulgátory. V rámci studie byly zkoumány dva vybrané emulgátory – karboxymethylcelulózu (CMC) a polysorbát 80 (P80), a jejich přímé působení na mikrobiom při použití simulátoru lidského střevního mikrobiomu. Ukázalo se, že emulgátory mění střevní mikrobiotu do prozánětlivého stavu. CMC způsobil změnu rychle, v rámci jednoho dne. P80 působil pomaleji a byl úzce spjat se změnou druhového zastoupení bakterií (Chassaing et al. 2017).

Ovlivnit riziko vzniku CD se dá však již od narození dítěte, neboť kojení se díky protektivnímu efektu mateřského mléka považuje za faktor snižující riziko pro CD. Mateřské mléko mění novorozencům složení střevní mikrobioty, avšak po odstavení dojde stejně opět k výrazným změnám (Lee et al. 2015).

Narozdíl od výše zmíněných studií a pohledů, Racine et al. (2016) ve své studii v rámci Evropy vyhodnotili, že s rizikem pro CD se žádné dietní vzorce spojit nedají.

Vzhledem k tomu, že dietní faktory ovlivňují střevní mikrobiotu, předpokládá se jejich podíl na patogenezi onemocnění. Avšak z výše uvedených informací je zřejmé, že nelze jednoznačně a s jistotou identifikovat samostatný dietní faktor, který by působil protektivně nebo naopak rizikově pro vznik onemocnění (Levine et al. 2018).

3.1.3 Mikrobiom

Veškeré mikroorganismy přítomné jak na povrchu, tak uvnitř lidského těla společně tvoří jedinečnou mikrobiotu. Geny, které mikrobiota kóduje, představují mikrobiom. Poprvé byl termín „mikrobiom“ použit pro označení společného genomu našich vlastních mikroorganismů, které byly dříve v souvislosti celkového zdraví člověka velmi podceňované. Lidská střevní mikrobiota je tedy rozsáhlá a komplexní komunita mikrobů, jenž osidlují oblast střev (Clemente et al. 2012).

Střevní mikrobiom se stále více studuje a zkoumá, a to především v souvislosti se zdravím člověka. Zřejmé je, že mikrobiom hraje důležitou roli v patogenezi mnohých onemocnění člověka, mimo jiné právě CD. Lidská střevní mikrobiota je u každého jedince naprosto jedinečná. Skládá se nejen z rozmanitých komunit komenzálních bakterií, ale také z virů, mikromycet či jednobuněčných parazitů, přičemž většinové zastoupení mají bakterie. Zdravé střevo osidluje přes 1000 různých druhů bakterií a více než 90 % z nich patří čtyřem hlavním kmenům – *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Také v rámci těchto hlavních kmenů existují významné interindividuální rozdíly v diverzitě jejich zastoupení. Střevní mikrobiota udržuje se svým hostitelem vzájemně prospěšný vztah, kdy hostitel poskytuje prostor s živinami, zatímco mikrobiota napomáhá hostiteli v regulaci některých fyziologických funkcí. Mezi ně patří fermentace nestravitelné vlákniny a tím produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, dále tvorba vitamínů, energie, obrana před patogeními mikroorganismy a porušením střevní sliznice. Za normálních fyziologických podmínek se tedy střevní mikrobiom chová jako samostaný orgán. Některé mikroorganismy také významně podporují fungování imunitního systému, např. prostřednictvím ochrany před patogenními bakteriemi. Udržování eubiózy, tedy stavu optimálního osídlení střevními bakteriemi, patří mezi důležité faktory pro zdravotní stav. Její narušení, neboli dysbióza, může vyústit do různých střevních patologií či střevních zánětů a v několika studiích byla považována za jednu z možných příčin původu IBD (Khan et al. 2019).

S CD souvisí významné změny ve skladbě mikrobiomu, u kterých stále není jasné, pokud se projevují jako příčina, nebo jako následek zánětlivé odpovědi hostitele. Vývoj imunitní odpovědi závisí na mikrobiálním osídlení gastrointestinálního traktu. Pro chronické zánětlivé nemoci, jako např. CD, je typická zvýšená střevní propustnost. Jedná se o narušení propustnosti střevního epitelu, který za normální stavu selektivně omezuje průchod určitých molekul, např. patogenů. Existují kmeny bakterií, které zlepšují bariérovou funkci epitelu, čímž mohou snížit zánětlivou odpověď. Pacienti s CD vykazují ještě menší rozmanitost bakteriálního osídlení střeva než pacienti s ulcerózní kolitidou, zejména v částech postižených zánětem (Nagalingam & Lynch 2012). Diverzita mikrobiomu u pacientů s CD se liší individuálně ještě více než u mikrobiomu zdravých jedinců (Mondot et al. 2011). Navíc jak již bylo zmíněno, CD nejčastěji

postihuje ileocekální oblast střeva a právě v terminálním ileu a tlustém střevě se nacházejí nejvyšší koncentrace střevních bakterií (Sartor 2008). Terapie cílená na změny střevní mikrobioty by mohla být v budoucnu slibným posunem v léčbě pacientů s IBD, avšak je třeba provedení dalších studií (Khan et al. 2019).

Co se týče konkrétních druhů bakterií, u pacientů s IBD bylo zpozorováno významné snížení u jinak hojných bakterií z kmene *Firmicutes*, který u zdravých jedinců tvoří hlavní část osídlení střevní mikrobioty. Tyto kmény patří mezi známé producenty důležitých metabolitů, mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), které mají protizánětlivé účinky a slouží jako výživa pro buňky střevního epitelu (Nagalingam & Lynch 2012). Se sníženým počtem těchto bakterií a také dalších producentů SCFA, jako je čeleď *Lachnospiraceae* nebo rod *Roseburia*, souvisí snížené množství SCFA ve stolici pacientů s CD (Sartor & Wu 2017). Z již zmíněného kmene *Firmicutes* nastává u pacientů redukce skupiny *Clostridium leptum*, a to zejména *Faecalibacterium prausnitzii*. Tato bakterie svými protizánětlivými účinky napomáhá fyziologickému střevnímu prostředí a snížení jejího zastoupení se může podílet na rozvoji či udržování střevního zánětu (Nagalingam & Lynch 2012). Sokol et al. (2008) ve své studii zkoumali složení mukózní mikrobioty u pacientů s aktivní fází CD v době, kdy absolvovali chirurgickou resekci terminálního ilea a ještě 6 měsíců poté. Z výsledků v době operace bylo zjevné významně nižší zastoupení bakterie *Faecalibacterium prausnitzii*. Stejně dopadly také výsledky po 6 měsících u pacientů s endoskopickou recidivou v porovnání s pacienty, kteří byli stále v remisní fázi. *F. prausnitzii* by se tedy dle autorů dala využít formou probiotik a podpořit tím léčbu CD. Autoři jiné studie zjistili u pacientů se zánětem kromě *F. prausnitzii* také nižší množství dalšího člena skupiny *Clostridium leptum*, a to *Ruminococcus bromii*. Dalšími méně zastoupenými bakteriemi byly *Ruminococcus albus*, *Eubacterium rectale*, *Bifidobacterium bifidum* a *Parabacteroides distasonis*. Naopak zvýšení zaznamenali u kmene *Proteobacteria*, kde se konkrétně nejednalo pouze o bakterii *Escherichia coli*, ale také o *Proteus vulgaris* nebo *Enterobacter cowanii* a u některých pacientů ještě o *Enterococcus faecium* či *Streptococcus* spp (Mondot et al. 2011). Negativně působí také např. bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, která se kromě toho, že může způsobovat zánětlivé reakce, dokáže v zánětlivých podmínkách množit. Bakterií, jejichž přítomnost se při onemocnění zvyšuje, není málo. Patří mezi ně také např. rod *Peptostreptococcus* (kmen *Firmicutes*), jenž osidluje ve vyšším relativním množství pacienty s CD, a dá se předpokládat, že tyto bakterie mohou hrát individuální či kolektivní roli v patologii nemoci. Důležité jsou také vzájemné interakce mezi mikroby (Nagalingam & Lynch 2012).

Darfeuille-Michaud et al. (2004) se zaměřili na výskyt adherentně-invazivních *E. coli*. Tyto *E. coli* se změněnou funkcí se přichytí a napadnou buňky střevního epitelu a nadále v buňkách přetrvávají a replikují se. Porovnávali tedy jejich zastoupení u pacientů s CD lokalizovanou v ileu i části tlustého střeva, a také u zdravých kontrol. Z výsledků byla patrná asociace *E. coli* s ileálním typem CD a bakterie byly nalezeny častěji u pacientů trpících časnými recidivujícími pooperačními lézemi. Na základě tohoto zjištění mohli autoři předpokládat, že se mohou podílet na iniciaci zánětlivých procesů. Byly však identifikovány také u pacientů bez potíží, takže vyvolání recidivy může vyžadovat ještě jiné další faktory. *Escherichia coli* kolonizuje lidské střevo již od prvních měsíců života a podílí se na složení střevního mikrobiomu po celý život. Který patovar *E. coli* bude ve složení dominantní se odvíjí od stravování a zastoupení dalších mikroorganismů. Mikrobiom se samozřejmě liší i mezi

dítětem a dospělým a patogenní *E. coli* jsou běžnější u dětí (Walczuk et al. 2019). Walczuk et al. (2019) zkoumali právě vztah mezi IBD u dětských pacientů a difuzně-adherentními *E. coli*, které se běžně u lidí podílejí na infekcích močových cest a u dětí zapříčiňují dlouhotrvající průjmy. Tyto bakterie se vyskytovaly u většiny zkoumaných pacientů. Zároveň zjistili, že mají schopnost indukovat zvýšenou sekreci TNF- α , tudíž se dá předpokládat, že se mohou spolupodílet na odpovědnosti za vyvolání zánětlivých procesů u dětských pacientů s IBD.

Seksik et al. (2003) sledovali rozdíly ve složení dominantních bakterií u pacientů s CD v remisní i aktivní fázi a u zdravých jedinců. Zjistili, že se mikrobiota pacientů od zdravých liší a přibližně 30 % dominantních bakterií do běžných dominantních skupin ani nepatří. Mikrobiom nemocných s CD obsahoval významně vyšší zastoupení bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (kmen *Proteobacteria*), do které patří i již zmíněná *E. coli*. Zvýšené zastoupení *E. coli* u pacientů uvádí i Sartor (2008).

Hedin et al. (2014) provedli studii, ve které zkoumali také rozdíly ve střevním mikrobiomu mezi pacienty s CD, jejich sourozenci a zdravými kontrolami. Ve srovnání s kontrolní skupinou měli pacienti podstatně nižší koncentraci celkového množství bakterií, dále konkrétně nižší zastoupení bakterií *F. prausnitzii* a *Bifidobacterium adolescentis* (kmen *Actinobacteria*) a rodů *Ruminococcus* spp., *Roseburia* spp. (kmen *Firmicutes*) a *Prevotella* (kmen *Bacteroides*). Skupina sourozenců se však od kontrolní skupiny také lišila, neboť u nich byla zaznamenána významně nižší koncentrace *F. prausnitzii* a *Roseburia* spp. oproti kontrolám. Oproti tomu zastoupení *Prevotella* a *B. adolescentis* se u těchto dvou skupin nelišilo. Relativní zastoupení *E. coli* bylo u pacientů oproti kontrolní skupině vyšší, zatímco mezi skupinou sourozenců a kontrolní skupinou se rozdíl neprokázal. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že poměr *F. prausnitzii* zjevně mezi sourozenci (mezi pacientem a jeho sourozencem) koreloval. Z výsledků Hedin et al. (2014) vyvodili, že vzhledem k některým sdíleným dysbiotickým vlastnostem mezi sourozenci (pacientem a jeho sourozencem), speciálně poklesem v četnosti *F. prausnitzii*, nejsou poruchy mikrobiální rovnováhy pouze následkem již rozběhlé nemoci. Oproti tomu zase redukce některých bakterií u pacientů, ale ne u jejich sourozenců nasvědčuje, že tyto změny mohou nastat již jako následek nemoci.

Další studie zabývající se střevní mikrobiotou s velice početnou skupinou dětí ve věku od 3 do 17 let, a to jak pacientů s CD, tak kontrolní skupinou ukázala, že s Crohnovou chorobou pozitivně koreluje hojně zastoupení *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* (*Haemophilus* sp.), *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae* a *Fusobacteriaceae*. Naopak negativní asociace byly zaznamenány u mnohých rodů, např. *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* a *Roseburia*, jejichž snížené počty byly také zpozorovány již v jiných zmíněných studiích. V této studii byly ještě navíc zaznamenány např. rody *Blautia* či *Coprococcus*. Střevní mikrobiální dysbióza se prokázala pouze v biotických vzorcích mukózních tkání (terminálního ilea a rekta), zatímco ve vzorkách stolice odebrané v době diagnózy nemoci prokázána nebyla. U pacientů, kteří trpěli různě hlubokými vředy (v ileu či části tlustého střeva) byla pozorována zvýšená množství *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, *Rothia mucilaginosa* a také patogenní *E. coli*. Nedokázali však určit, zda se zvýšené množství bakterií podílí na příčině vzniku nemoci, nebo se tyto bakterie pouze dokážou na takové prostředí adaptovat a přežít v něm. Dále vyzpozovali, že mikrobiální zastoupení přidružené k epitelu postiženému zánětem obsahovalo zvýšené množství aerobních a fakultativně anaerobních bakterií, zatímco ty striktně anaerobní převládaly ve stolici. Toto zjištění podporuje informaci, že hladina kyslíku ve střevním lumen

roste v souvislosti se střevním zánětem až do takového množství, že se střevní mikrobiota začne přizpůsobovat přeměnou na aerotolerantní složení (Gevers et al. 2014).

Na rod *Fusobacterium*, jehož zvýšené množství u pacientů s CD detekovali Gevers et al. (2014), se zaměřila i studie Strauss et al. (2011), ve které porovnávali množství těchto bakterií u pacientů s IBD (z nichž většina pacientů trpěla CD) a zdravých kontrol ze vzorků tkáně z biopsie. Bakterie byly dle výsledků objeveny významně častěji ve tkáni pacientů s IBD, než ve tkáni zdravých jedinců. Co se týče konkrétního druhu, většinu ze všech detekovaných bakterií z rodu *Fusobacterium* tvořila bakterie *F. nucleatum*. Ačkoliv je tato bakterie spojovaná především se zánětlivými nemocemi v ústní dutině, osidluje také běžně i lidské střevo. Vzhledem k tomu, že se považuje za prozánětlivý patogen, autoři studie předpokládali její vyšší zastoupení právě u pacientů s IBD. Kromě výskytu zkoumali autoři studie také invazivitu na modelu Caco-2 buněčné linie nádoru adenokarcinomu. Ukázalo se, že *F. nucleatum* izolovaná ze tkáně pacientů s CD postižené zánětem projevila významně zvýšenou schopnost napadnout buňky, než tkáň zdravých pacientů či dokonce tkáň pacientů s CD, která zánětem postižená není. Dle autorů by kolonizace střeva touto bakterií mohla sloužit jako indikátor pro gastrointestinální onemocnění.

Za další bakterii jako možný faktor v etiologii CD se považuje *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). Tato bakterie byla díky izolaci z hojného počtu pacientů navržena v této souvislosti již před mnoha lety. Kromě zdrojů potvrzujících příčinnou souvislost se však také vyskytuje nemálo zdrojů tvrdících opak (Chiodini et al. 2012). Na výskyt MAP u pacientů s CD se zaměřila studie Zarei-Kordshouli et al. (2019), ve které hledali přítomnost MAP ve vzorcích z biopsie jak pacientů s CD, tak kontrolní skupiny bez IBD. U pacientů s CD byla MAP identifikovaná oproti kontrolní skupině jednoznačně mnohem častěji. Dle autorů studie existuje souvislost mezi MAP a etiologií CD.

Vliv střevní mikrobioty na zdravotní stav hostitele se nedá zpochybnit, stejně jako její souvislost s CD. Vzhledem k nejasnostem, zda odlišná střevní mikrobiota a konkrétní zmíněné bakterie hrají roli v patogenezi onemocnění, či tyto změny nastávají jako následek CD, je nutné provést další studie střevního mikrobiomu pro bližší pochopení (Nagalingam & Lynch 2012).

3.1.4 Léčba

Základní myšlenka léčby IBD spočívá v prvotním zaměření na navození remisní fáze nemoci a druhotně na jejím udržení (Aardoom et al. 2019). Hlavním cílem léčby však není pouze potlačení zánětlivého procesu, ale především zahojení střevní sliznice, neboli dosažení tzv. slizničního hojení. Díky tomu se také dostane pacient do dlouhodobé remisní fáze nemoci. V této souvislosti se tedy upřednostňují takové léky, jenž mohou tento efekt navodit (Mitrová 2016). Co se týče dětských pacientů, měla by léčba navíc také znormalizovat růst a vývoj dítěte (Mitrová 2012).

Obecně lze rozdělit léčbu na dva typy - indukční a udržovací. Indukční léčbu můžeme ještě dále rozdělit na tzv. „step-up strategii“ a „top-down strategii“. Step-up strategie léčby začíná u mírnějších forem terapie, které mají také méně potenciálních vedlejších účinků. K intenzivnějším formám léčby se přechází až při selhání těch mírnějších. U CD by měla začít exkluzivní enterální výživou (EEV). U dětských pacientů se navíc od začátku využívá také léčba imunosupresivou (azatioprin, případně metotrexát). V některých případech je i v časných

fázích nemoci indikováno chirurgické řešení (Mitrová 2012). Top-down strategie spočívá v intenzivním a efektivním zahájení léčby. Při tomto druhu léčby se indikuje, zejména u těžkých případech, léčba biologická. Top-down strategie se začala u nás využívat více, a to vzhledem ke stále klesajícímu věku diagnostikovaných pacientů a frekventovanějším závažným endoskopickým nálezům. (Mitrová 2016). Co se týče udržovací léčby, u dětských pacientů má nejlepší účinek léčba imunosupresivou, konkrétně z řady thiopurinů (azatioprin). Při relapsech či komplikacích nemoci se mohou použít i antibiotika (metronidazol, azitromycin). U dětských pacientů se obvykle nevyužívá léčba pomocí kortikosteroidů v první vlně léčby, vzhledem k jejich četným nežádoucím účinkům. Pokud farmakologická léčba selže, či se naskytnou závažné komplikace onemocnění (píštěle, abscesy či stenózy), je indikována také léčba chirurgická (Mitrová 2012).

Exkluzivní enterální výživa zastává, zejména v Evropě, jediný zavedený způsob dietní léčby Crohnovy choroby u dětských pacientů (Svolos et al. 2019). Kromě toho, že napomáhá k zahojení střevní sliznice, také zlepšuje pacientův nutriční stav a zároveň nezpůsobuje žádné závažné vedlejší nežádoucí účinky. Díky těmto zmíněným faktorům se využívá jako první volba léčby pro navození remisní fáze. Obvykle se podává šest až osm týdnů formou sippingu, případně nasojejunální sondou (Mitrová 2016). EEV působí efektivně také při léčbě komplikací, a při užívání po více jak 4 týdnů může i snížit riziko chirurgických resekcí (Levine et al. 2018). Mechanismus působení EEV však zatím stále nebyl úplně odhalen (Mitrová 2016; Svološ et al. 2019). Dle Mitrové (2016) se díky vyloučení antigenů ze stravy a úpravě střevní propustnosti a mikrobioty sníží produkce zánětlivých cytokinů. Vyřazení západní stravy právě díky nahrazení EEV u dětských pacientů s CD také způsobilo výrazné snížení v zastoupení kmene *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a dalších rodů již zmíněných v souvislosti se zvýšeným výskytem u pacientů s CD, jako jsou *Escherichia*, *Haemophilus* či *Veillonella* (Levine et al. 2018). Svološ et al. (2019) považují EEV za sice úspěšnou, avšak přísnou a omezující dietu, jež se nedá dlouhodobě akceptovat zejména u dospělých pacientů. Rozhodli se tedy vyvinout novou efektivní a hlavně přijatelnější variantu dietologické léčby, odvíjející se od jejich poznatků o mechanismu účinku EEV a patogenezi CD. Základní hypotézou jejich projektu, tzv. treatment-with-eating diet (CD-TREAT) bylo, že mohou dosáhnout podobných terapeutických výsledků jako EEV s běžnou dietou, jež bude založená na složení EEV, čímž se napodobí efekt na střevní mikrobiom. Vytvořili tedy individualizované diety, jejichž společným základem je vyřazení určitých dietních článků - např. lepku, laktózy a alkoholu, a naopak propojení důležitých základních látek, jako jsou makronutrienty, vitamíny, minerální látky či vláknina. Scházející mikronutrienty doplnili multivitaminovou tabletou. CD-TREAT splňuje individuální denní energetické požadavky, a také zohledňuje potravinové preference. Ze studie, do které zapojili také několik dětských pacientů s aktivním zánětem vyplynulo, že se CD-TREAT jeví jako více přijatelný, snadněji proveditelný a více sytící způsob než EEV. Navíc způsobuje méně vedlejších gastrointestinálních účinků. Také rodiny dětských pacientů léčených EEV uvedli, že by preferovali pevnou stravovací alternativu. CD-TREAT by tedy po rozsáhlejších studiích a důkladnějším prozkoumání odpovědi mikrobiomu mohla mít potenciál pro využití jako samostatná dlouhodobá dietní udržovací léčba.

Další zmíněná forma léčby, biologická léčba, se v současnosti považuje za ten nejefektivnější typ u pacientů trpících IBD. Spočívá v působení proti tumor nekrotizujícímu faktoru alfa (TNF- α). Konkrétně byly zatím oficiálně schváleny pro léčbu dětských pacientů

přípravky infliximab a adalimumab. Další možnou modalitou z řad biologické léčby IBD jsou vedolizumab a ustekinumab. U dospělých pacientů je v ČR povolen ještě golimumab (Mitrová 2016). Kugathasan et al. (2017) vytvořili studii, ve které porovnávali dvě skupiny nově diagnostikovaných dětských pacientů s CD, z nichž jedna skupina obdržela brzkou a druhá pozdější biologickou léčbu. Pacientům s včasnou TNF- α terapií hrozilo významně nižší riziko vzniku penetrujících komplikací, avšak v případě striktur se významný rozdíl nepotvrdil. Ani tento způsob léčby však není bezchybný. Při monoterapeutické variantě může po nějaké době docházet u nemalé části pacientů ke ztrátě odpovědi na léčbu, neboť TNF- α blokátory ovlivňují imunogenicitu. K prevenci této problematiky se s výhodou využívá také kombinovaná léčba, kdy se k biologické léčbě přidá ještě lék z řady imunosupresiv (Aardoom et al. 2019). Ke stejnému výsledku došla i studie Chi et al. (2018), ve které se zaměřili konkrétně na infliximab u dětských pacientů, a to v kombinaci s metotrexátem.

Kortikoidy mají sice pozitivní protizánětlivé a imunosupresivní účinky, ale doprovázejí je také mnohé vedlejší nežádoucí účinky. Indikují se tedy pouze v případě relapsu nemoci, ale pro udržovací léčbu již nikoliv (Dujsíková 2018). U dětských pacientů jejich využití nahradila EEV a využívají se pouze pokud není EEV efektivní, tolerovaná, a nebo není pacient léčen pomocí biologické léčby. V zásadě se však jejich použití u dětí považuje za nevhodné, neboť obzvláště u této skupiny pacientů nastávají závažné nežádoucí účinky, např. porucha růstu (Mitrová 2016).

Častou volbu léčby zastávají zmíněná imunosupresiva, jenž působí dlouhodobě efektivně a pro terapii IBD se využívají již mnoho let. Využívají se jak při léčbě relapsů, tak při udržování remisní fáze. Také u dětských pacientů se běžně využívají jak při zahájení léčby, tak při udržovací fázi. Konkrétně se podávají léky z řady thiopurinů, především azatioprin. Pokud je CD chronicky aktivní či nejsou thiopuriny účinné nebo dobře tolerované pacientem, využívá se také metotrexát. Přestože jsou imunosupresiva obecně považována za bezpečnou formu terapie, mohou se i tato léčiva potýkat s některými nežádoucími účinky, např. s intolerancemi gastrointestinálního traktu (Mitrová 2016; Dujsíková 2018).

Další skupinou léků, které se využívají pro terapii IBD, jsou aminosalicyláty. Tyto léky se však podávají především pacientům s UC. U terapie CD s ileocekálním postižením střeva a mírnou aktivitou onemocnění nemají skoro žádný efekt, a to ani ve vyšších dávkách. Nedoporučuje se ani jejich kombinování s jinými typy léků. Existují pouze některé výjimky (např. významné postižení tlustého střeva), při kterých lze aminosalicyláty podávat i u pacientů s CD (Dujsíková 2018). V zahraniční literatuře však existuje mnoho studií, ve kterých byli pacienti s CD léčeni právě touto skupinou léků (Guslandi et al. 2000; Romano et al. 2005).

Z hlediska výživy existují kromě EEN ještě další, avšak oficiálně nezavedené způsoby speciálních diet (Kaenkumchorn & Kesavan 2019). Jedním z nich je tzv. specifická sacharidová dieta (SCD), která by měla obnovit bakteriální rovnováhu ve střevě, a tím zde i snížit zánětlivý proces. Svým působením tedy může navodit a udržovat remisní fázi u pacientů s IBD. Dieta redukuje příjem sacharidů především na monosacharidy. Vyřazuje příjem disacharidů, většiny polysacharidů, zeleniny s vyšším obsahem amylopektinu než amylozy, potravin s vysokým obsahem přídatných látek a zpracovaná masa. Skládá se z bílkovin, ovoce, zeleniny, luštěnin, ořechů a mouky z nich, kokosové mouky a medu. Dieta sice dle studií vykazuje pozitivní klinické účinky, ale pro pacienty není jednoduché takto přísnou dietu dodržovat (Obih et al. 2016; Kaenkumchorn & Kesavan 2019). Další návrh přídatné dietní léčby vytvořili

prostřednictvím studie Olendzki et al. (2014), a to tzv. protizánětlivou dietu. Dieta spočívá v omezení určitých sacharidů, především laktózy a rafinovaných sacharidů, dále užívání prebiotických a probiotických přípravků, snížení příjmu celkových a saturovaných tuků, zvýšení příjmu omega 3 mastných kyselin, identifikaci nedostatečně přijímaných živin, intolerancí a úpravě textury potravin pro lepší vstřebávání živin a minimalizování nerozpustné vlákniny (např. vaření, mixování či mletí). U pacientů s IBD účastnících se studie nastala redukce symptomů onemocnění, a také mohli ukončit alespoň jednu z jejich předchozích medikací. Studie však neprokázala zlepšení laboratorních nebo histologických parametrů. Další variantou, avšak pouze pro CD, je tzv. CD exkluzivní dieta. Vylučuje zpracované a konzervované potraviny, lepek, mléčné výrobky, bezlepkové pečené výrobky včetně pečiva, zpracovaná a uzená masa, produkty obsahující emulgátory, sojové produkty a naopak povoluje omezené množství vlákniny. Menší studie (47 pacientů) na dětech a mladých dospělých pacientech s touto samotnou dietou či v kombinaci s EEV prokázala dosažení klinické remise u většiny pacientů a také zlepšení zánětlivých markerů (Sigall-Boneh et al. 2014).

Co se týče dietních faktorů v souvislosti s léčbou, bylo zkoumáno již mnoho potravinových komponentů, avšak jako dva nejčastější v literatuře vítězí kurkumin a omega 3 mastné kyseliny. Kurkumin se však s výhodou využívá pouze u UC (Kaenkumchorn & Kesavan 2019). V souvislosti s CD se dle studie, ve které porovnávali účinek kurkuminu v porovnání s placebem u pacientů po operaci jako prevenci proti recidivě, žádný efekt oproti placebo neprokázal (Bommelaer et al. 2019). Omega 3 mastné kyseliny mají protizánětlivé vlastnosti a různé další prospěšné účinky. Byla provedena studie s dětskými pacienty trpícími CD, kteří byli rozděleni do dvou skupin, z nichž byly obě léčeny aminosalicylovou kyselinou. Jedna skupina obdržela ještě omega 3 a druhá jen placebo. Skupina s omega 3 měla významně nižší počet relapsů než placebo skupina (Romano et al. 2005). Oproti tomu však studie Feagan et al. (2009), ve které byli rozděleni dospělí pacienti s CD do dvou skupin - jedna s omega 3 suplementací, jedna placebo skupina, neshledala žádný významný efekt v prevenci relapsů.

Zajímavý způsob léčby, jenž by mohl být v budoucnosti čím dál větším přínosem nejen v souvislosti s léčbou IBD, představuje fekální mikrobiální transplantace (FMT). Zatím se však oficiálně využívá pouze pro léčbu infekce *Clostridium difficile*. Protože má fekální transplantace potenciál pro napravení mikrobiální dysbiózy, předpokládá se možná efektivita u léčby onemocnění, v jejichž patogenezi hraje roli právě střevní mikrobiom - tedy i IBD (Paramsothy et al. 2017; Zou et al. 2020). Podle studie Zou et al. (2020), i když provedené na malém počtu pacientů, se většina z pacientů dostala 3 dny po transplantaci do remisní fáze. Také byla potvrzena skutečnost, že zejména pacienti s CD mají nižší bakteriální osídlení, a to na úrovni druhů i kmenů. Po transplantaci se bakteriální zastoupení změnilo, např. obecně vzrostlo zastoupení rodu *Bacteroides*, jenž je jinak u pacientů s IBD zastoupen méně. Wang et al. (2018) se ve své studii zaměřili na bezpečnost transplantace u pacientů s CD a zkoumali vedlejší účinky. Zjistili, že některé vedlejší účinky nastávali u pacientů pouze v průběhu prvního měsíce po transplantaci, a to např. častější defekace, horečka či bolesti břicha. Po uplynutí prvního měsíce již vedlejší účinky zpozorovány nebyly. Dalším zjištěním bylo, že způsob přípravy transplantace ovlivňuje výskyt vedlejších účinků, ale neovlivní efektivitu. Příprava pomocí automatizovaného přístroje vykazovala významně nižší výskyt vedlejších účinků. Dále klinická odpověď a remise byly významně více zastoupeny u pacientů bez vedlejších účinků. Oproti tomu Gutin et al. (2019) dle své studie s nízkým počtem pacientů

s CD uvádějí, že po transplantaci nastalo zlepšení formou klinické odpovědi pouze u menšího počtu pacientů. Navíc u pacientů, kterých se klinická odpověď týkala, nenastalo zlepšení v zánětlivých parametrech. Tito pacienti byli také ti s původně nejnižší mikrobiální diverzitou. Dle autorů se také musí více prozkoumat bezpečnost této metody.

V souvislosti se střevním mikrobiomem se mohou pacientům s CD podávat také probiotika, což je směs nepatogenních mikroorganismů. Jejich podávání může mít pozitivní vliv, a to díky změně a stabilizaci střevní mikrobioty (Dujšíková 2018). Konkrétně byla v rámci studií zkoumána např. kvasinka *Saccharomyces boulardii*, která působí protektivně proti střevní infekci *C. difficile*, nebo také pomáhá v prevenci průjmu způsobeném podáváním antibiotik. Byla provedena studie, ve které se zkoumal její možný efekt při udržovací léčbě neaktivní CD. Jedna skupina pacientů byla léčena pouze aminosalicyláty, zatímco druhé skupině byly podávány kromě aminosalicylátů ještě kapsle obsahující kvasinku *S. boulardii*. Dle výsledků studie nastal relaps nemoci u významně více pacientů bez probiotické podpory (Guslandi et al. 2000). Se stejným účelem byla provedena i jiná studie, kde se však žádný významný rozdíl mezi skupinami pacientů neprokázal (Bourreille et al. 2013). Dále byla provedena také studie, která byla zaměřena na vliv *S. boulardii* na střevní permeabilitu pacientů s CD v remisní fázi. Dle výsledků studie se střevní permeabilita u pacientů po přidání probiotické podpory k základní léčbě zlepšila, i když k úplné normalizaci nedošlo (Garcia Vilela et al. 2008). Obecně se probiotika v rámci samostatné udržovací léčby u pacientů s CD v remisní fázi zatím neověřily. V kombinaci se standardní farmakologickou léčbou však mohou výsledky terapie zlepšit (Guslandi 2015).

Se všemi zmíněnými druhy léčby musí zároveň probíhat samozřejmě také psychologická podpora pacienta (zejména dětského) a jeho rodiny a také podpurná medikamentózní léčba, jako jsou různé suplementace vitaminů či sipping (Mitrová 2016).

3.2 Nukleární magnetická rezonance v metabolomice

Nukleární magnetická rezonance (NMR) patří mezi spektrální analytické přístroje. Jedná se o již nepostradatelný nástroj jak pro chemii, biochemii, fyziku, tak zejména pro medicínské vědy. Ze začátku se měřilo pouze jednodimenzionálním způsobem, avšak postupem času se vyvinul i dvoudimenzionální systém měření. Hlavní úkol NMR spočívá v určování struktur molekul, což probíhá na základě měření, analyzování a interpretování spekter vysokého rozlišení (Friebolin 2011). NMR měří magnetické rezonance atomových jader v molekulách. Frekvenci rezonance ovlivňuje počet a vlastnosti ostatních jader, které měřené jádro obklopují, takže nám poskytne strukturální informace (Lin et al. 2011). Nejčastější předmět zájmu měření zastávají právě rezonance ^1H protonů, díky kterým se dá struktura organických molekul určit. Velmi důležitou součástí NMR spektrometru je kryogenní supravodivý magnet, jehož kvalita hraje roli v úspěšnosti měření a samotného spektra (Friebolin 2011).

Metabolomika se stala velmi důležitým nástrojem pro mnoho oblastí vědeckých výzkumů (Cevallos-Cevallos et al. 2009). Využívá se např. ve studiích v souvislosti se zánětlivými střevními onemocněními, kolorektálním karcinomem či dietními intervencemi. Jedná se o disciplínu studující metabolom, což je celkové množství metabolitů, které mohou být v biologickém vzorku měřeny (Kostidis et al. 2017). Samotné metabolity se definují jako konečné produkty a meziprodukty metabolismu. Lin et al. (2011) však tvrdí, že zatím není

možné změřit kompletní metabolom kvůli velkému rozsahu koncentrací metabolitů, jejich chemické rozmanitosti a omezení analytických technik. Metabolomika mimo jiné může posloužit k nalezení nových markerů k různým stavům. Detekce, identifikace a kvantifikace velkého počtu metabolitů, které se navíc často výrazně koncentračně liší, je však velmi náročná. Mezi nejvíce rozšířené používané metody v tomto oboru patří kromě NMR také plynová a kapalinová chromatografie. Zkoumají se především biologické tekutiny, např. vzorky krevní plazmy a séra, moč či žluč, nebo tkáně. Oproti tomu stolice nebývala hlavním předmětem zkoumání v metabolomice, avšak právě tento biologický materiál se pro výzkum, který se zaměřuje na odhalování vlivu střevní mikrobioty na hostitelský organismus, nejvíce hodí. Stolice, fyziologický produkt gastrointestinálního traktu, jako vzorek není homogenní, ale tvoří bohatý nestrávený komplex makromolekul a částic, jehož přesné složení závisí na krátkodobých dietních faktorech. Zároveň představuje primární vzorek, ze kterého lze posoudit společný metabolismus hostičího organismu a střevní mikrobioty (Deda et al. 2015). Metabolická analýza stolice tedy zajišťuje zajímavý, a hlavně neinvazivní způsob pro monitorování změn od optimálního stavu (Kostidis et al. 2017).

Protože specifické metabolity vyvolávají jedinečné rezonance, kvantifikace a identifikace metabolitů pomocí NMR může proběhnout bez předešlé separace látek ve vzorku. Ne všechny metabolity mohou být snadno jednotlivě identifikovány, neboť se jejich signály mohou překrývat. Tento nedostatek může být problém u vzorků složených z mnoha druhů metabolitů, protože roste riziko překrytí signálů metabolitů s nižšími koncentracemi těmi více zastoupenými. V porovnání s dalšími zmíněnými možnostmi metabolomické analýzy NMR vítězí v kvantifikaci a reprodukovatelnosti. Navíc nepůsobí na vzorky destruktivně, takže se vzorky mohou použít pro analýzu znovu. Má však zase nižší citlivost, takže pokrývá menší množství metabolitů, které jsou ve vzorku majoritní (Pan & Raftery 2007; Lin et al. 2011). Získaná data z metabolomické analýzy představují matici buď naměřených koncentrací metabolitů, nebo jejich relativních odezví, které společně tvoří metabolický profil vzorku či organismu. Po jejich patřičných úpravách dochází k různým statistickým metodám vyhodnocení. Běžně se využívá např. analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) nebo diskriminační analýza nejmenších čtverců (Partial-Least Squares discriminant analysis, PLS-DA) (Lin et al. 2011).

Co se týče konkrétních metabolitů ve stolici, jenž se dají detekovat pomocí NMR, záleží i na přípravě vzorku, konkrétně extrakci. V případě extrakce vodou se přednostně detekují aminokyseliny, glukóza a glycerol, zatímco tuky, kyselina cholová a malát jsou viditelné pouze při extrakci methanolem. Pouze ve vodných extraktech můžeme najít pyruvát, fumarát, sukcinát a malonát. SCFA lze také lépe objevit ve vodných vzorcích, neboť mnoho jejich signálů překrývají rozsáhlé odezvy tuků. Extrakci vodou tedy preferujeme, pokud chceme obdržet informace o SCFA a organických kyselinách. Dle autorů studie je výhodnější provést extrakci lyofilizovaných vzorků stolice, protože nedochází k chybám zapříčiněným významnými individuálními rozdíly v obsahu vody ve stolici. Kromě již zmíněných metabolitů se pomocí NMR dají odhalit také produkty fermentace dietních složek a činnosti mikrobioty. Mezi takové metabolity patří např. trimethylamin, který se vytváří fermentací karnitinu a cholinu, degradační produkty polyfenolů či již zmíněné SCFA v souvislosti s činností střevní mikrobioty (Jacobs et al. 2008).

Kostidis et al. (2017) ve své metabolomické studii s NMR analýzou stolice detekovali široké spektrum metabolitů, např. aminokyseliny a jejich deriváty, SCFA, karboxylové kyseliny, sacharidy či alkoholy.

Před samotným odběrem vzorků stolice se může provádět ještě hodnocení její konzistence, a to pomocí tzv. Bristol Stool Chart stupnice. Tato pomůcka reflektuje rozdíly v obsahu vody ve stolici a v aktivitě střevní mikrobioty, a také dobu průchodu stolice střevem. Delší doba průchodu stolice souvisí se zvýšením proteolytických dějů a s produkcí potenciálně škodlivých metabolitů. Bristol Stool Chart rozděluje lidskou stolici do sedmi kategorií dle konzistence, a to s nejvyšším skóre odpovídajícím rozpadající se stolici a krátké době průchodu střevem. Naopak nižší skóre představují tvrdou a déle procházející stolici (Vandeputte et al. 2016).

3.2.1 Diagnostika IBD

NMR spektroskopie fekálních vzorků slouží jako potenciální neinvazivní diagnostický nástroj, jenž může pomoci charakterizovat změny způsobené střevním zánětem prostřednictvím metabolického profilování souvisejícího s malabsorpcí a mikrobiální dysbiózou. Díky signifikantním rozdílům v metabolickém profilování se dají rozlišit nejen IBD pacienti od zdravých kontrol, ale také pacienti s UC oproti pacientům s CD (Bjerrum et al. 2014). Dle Marchesi et al. (2007) se metabolity ve stolici pacientů s CD liší výrazněji, což nasvědčuje, že zánět probíhající u CD působí oproti UC rozsáhleji, a tím nastávají i vážnější metabolické následky. Mezi metabolity tvořící významné rozdíly patří aminokyseliny, SCFA související s mikrobiotou a laktát. Tzv. „omics“ metody, pod které spadá i metabolomika, by mohly přispět také ke zlepšení diagnostiky a porozumění patogeneze IBD. Najít efektivní neinvazivní metody je velice potřebné jak pro diagnostiku, tak pro sledování aktivity onemocnění, neboť díky nim můžeme dosáhnout lepší kontrole pacientů s IBD. Proto autoři studie chtěli dokázat vhodnost využití NMR spektroskopie jako neinvazivní nástroj pro diagnostiku a charakterizování střevního metabolomu (Bjerrum et al. 2014). K získání informací o aktivitě a závažnosti zánětu by mohly pomoci záznamy o změnách koncentrací metabolitů (Storr et al. 2014). Stejný pohled mají ve své studii i Marchesi et al. (2007), kteří tvrdí, že metabolomika představuje dosud zcela nevyužitý možný přístup k identifikaci markerů onemocnění ze vzorků stolice pacientů s IBD. Pro analýzu používali NMR a uvádějí, že kombinace NMR spektroskopie s tzv. chemometrií, tedy analýzou chemických dat, je jedna z nejefektivnějších a robustních metod metabolického profilování biologických vzorků. Bjerrum et al. (2014) však ještě poukazují na to, že se musí brát v potaz každá operace střev, biologická léčba a medikace obecně, neboť tyto faktory mohou nechtěně ovlivnit výsledky studie. Ideální volbu pro tyto studie nabízí vzorky získané od nově diagnostikovaných a zatím neléčených pacientů.

Výsledky studie Marchesi et al. (2007) ukázaly, že kromě již zmíněného nižšího zastoupení SCFA u pacientů s CD, zapříčiněného střevní mikrobiální dysbiózou, obsahuje jejich stolice oproti zdravým kontrolám také méně methylaminu a trimethylaminu. Tyto dvě látky vznikají degradací složek potravin, cholinu a karnitinu, střevní mikrobiotou. Protože se jedná o metabolity související s mikrobiotou, jejich snížení opět naznačuje porušení, či dysbiózu bakteriálního osídlení střev pacientů. Naopak množství aminokyselin u pacientů s IBD převyšuje, což může být následek malabsorpce způsobené zánětem. U pacientů s CD

zaznamenali vyšší koncentraci glycerolu jak oproti kontrolám, tak oproti pacientům s UC. Původ a role glycerolu ve stolici pacientů však dle autorů není jasná. Dále ve všech vzorcích pacientů s CD i UC identifikovali N-acetyl-5-aminosalicylovou kyselinu, která souvisí s léky. Ve studii Santoru et al. (2017) obsahovala stolice pacientů s CD, analyzovaná s pomocí NMR, oproti zdravým kontrolám nižší koncentraci kyseliny 2-hydroxy-3-methylvalerové, kyseliny citronové a methylaminu. Naopak vyšší koncentrace byla u kadaverinu, putrescinu a fenylalaninu.

Se stejným cílem, tedy najít neinvazivní způsob diagnostiky IBD pomocí metabolického profilování, byly provedeny také studie, které nezkoumaly vzorky stolice, nýbrž vzorky jiného biologického materiálu - např. moči nebo krve. Jedna z takových studií byla realizovaná pomocí NMR, kde se analyzovali vzorky krevního séra, plazmy a moči u pacientů s IBD a zdravých jedinců. Bylo identifikované rozdílné zastoupení několika látek mezi zkoumanými skupinami, takže se vyhodnotilo kvantitativní metabolické profilování jako přínosná metoda pro odlišení zdravých jedinců a pacientů s IBD. Nicméně odlišnost mezi CD a UC dle autorů tak znatelná není (Schicho et al. 2012). Daniluk et al. (2019) uskutečnili studii s dětskými pacienty, kde pro své záměry použili vzorky krevního séra a kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií.

3.2.2 Statistické vyhodnocení

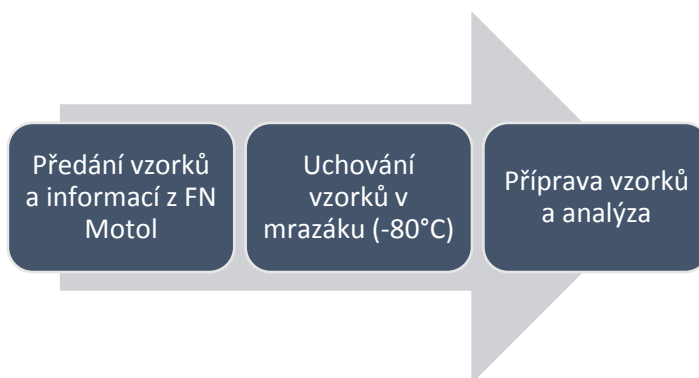
NMR spektra produkují velký objem informací, k jejichž vyhodnocování je zapotřebí použití multivariálních statistických metod. Mezi hlavní přístupy patří PCA, PLS-DA, OPLS-DA, nebo například random forest hierarchical clustering.

PCA se považuje za nesupervizovanou klasifikační metodu, která bez předchozího zařazení vzorků do skupin zanalyzuje rozdíl mezi daty. Zatímco PLS-DA řadíme mezi supervizované klasifikační metody, kde se vzorky rozřadí do skupin pro vzájemné srovnání (Lin et al. 2011). Nejvíce se využívá její varianta ortogonální - OPLS-DA, která maximalizuje nezávislost proměnných pro lepší rozlišení skupiny nemocných a skupiny zdravých jedinců (Storr et al. 2014).

4 Metodika

4.1 Průběh studie

Byla provedena case-control studie se 6 dětskými pacienty s Crohnovou chorobou a 11 kontrolami. Studie proběhla ve spolupráci s lékaři z Fakultní nemocnice v Motole, konkrétně z dětské gastroenterologie, kde proběhl i sběr vzorků. Jednalo se o pacienty, kteří se zapsali do studie („Střevní mikrobiom u dětských pacientů s Crohnovou chorobou a jeho změny vlivem biologické léčby protilátkami proti TNF α “) organizované lékaři z FN v Motole. Jelikož je tato studie navržena jako longitudinální sledování, v době psaní této diplomové práce nebyla dokončena a nebylo k dispozici potřebné množství kontrol, byla jako kontroly využita data z jiné, námi dříve realizované studie. Jednalo se o obézní děti nebo děti s respiračním onemocněním, které se léčily v Olivově dětské léčebně v Říčanech u Prahy. Více informací o této kontrolní skupině je uvedeno v diplomové práci (Slavičková 2019). Stručný průběh studie zobrazuje obrázek 1.



Obrázek 1 Průběh studie

4.2 Metadata pacientů

Dětských pacientů s Crohnovou chorobou léčených ve FN Motol bylo tedy celkem 6. Od pěti pacientů byly obdrženy 3 vzorky stolice s různým časovým rozestupem a od jednoho pacienta byly vzorky 4. Dohromady bylo tedy poskytnuto 19 vzorků stolice. Pro účely studie byla předána od FN Motol potřebná data o pacientech. Jednalo se o pseudonymizovaná data neobsahující osobní data, pouze data související s onemocněním: pohlaví, věk, BMI, Z-score, Bristol Stool Chart, hodnoty kalprotektinu, doba odběru vzorku stolice a informace o léčbě a enterální výživě. V rámci kontrolní skupiny bylo náhodně vybráno 11 kontrolních subjektů z již uskutečněné studie. V tabulce 1 jsou uvedené základní informace o probandech.

Tabulka 1 Demografie probandů

	CD (n = 6)	HC (n = 11)	p
Dívky	4	4	
Chlapci	2	7	
Věk	12,8±5,4	10,9±2,4	0,39
BMI	18,8±4,4	25,2±8,3	0,122

Z-score -0,4±1,0 1,4±1,1 0,01

4.3 Vzorky

Vzorky byly transportovány na suchém ledu v chladícím boxu, a poté uchovávány do samotné analýzy v mrazáku při teplotě -80°C. Spolu s nimi jsme obdrželi také potřebná data o konkrétních vzorcích. Vzorky stolice již smíchaný s ultračistou vodou a připraveny v mikrozkušnicích v navážkách 200 mg.

4.4 Laboratorní pomůcky, chemikálie a software

Laboratorní pomůcky

- Mikrozkušnice
- Pipetovací špičky
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7 Standard series (USA)
- Automatické pipety 20–200 µl a 100–1000 µl (CZ)
- Vortex IKA MS 3 Basic (DE)
- Centrifuga VWR Micro Star 17
- NMR spektrometr Avance III s ¹H frekvencí 500,23 MHz (Bruker Biospin, DE)

Chemikálie

- NMR roztok – 1,5M K₂HPO₄, 1,5M NaH₂PO₄, 5mM TSP ((3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-d₄), 0,2% NaN₃ v 99% deuterium oxidu, pH 7,4

Software

- Topspin 3.5 pl7, Bruker (DE)
- Chenomx NMR suite 8.4, Chenomx Inc. (CA)
- MNova 12, Mestrelab Research (ESP)
- Metaboanalyst 4.0 (CA)
- IBM SPSS Statistics 25, IBM (USA)
- Microsoft Office Excel

4.5 Příprava vzorků

Vzorky byly rozmrazeny na pokojovou teplotu. Po rozmrazení byly vzorky nejdříve homogenizovány na vortexu po dobu 10 sekund, a poté centrifugovány při 15,000 RPM po dobu 10 minut. Následně bylo odebráno 540 µl supernatanu do předem označené příslušné mikrozkušnice. K supernatanu se dále přidalo 60 µl NMR roztoku a opět následoval vortex 10 sekund. Následně byl vzorek znovu centrifugován za stejných podmínek. Takto připravené

vzorky byly pipetovány do předem označených připravených NMR kyvet. Následovalo samotné měření na NMR.

4.6 Analýza a zpracování dat

Vzorky byly analyzovány pomocí NMR spektrometru Bruker Avance III s operační ^1H frekvencí 500,23 MHz při teplotě 298 K, s pomocí pulzní sekvence 1D NOESY, umožňující potlačení signálu vody s pomocí presaturace.

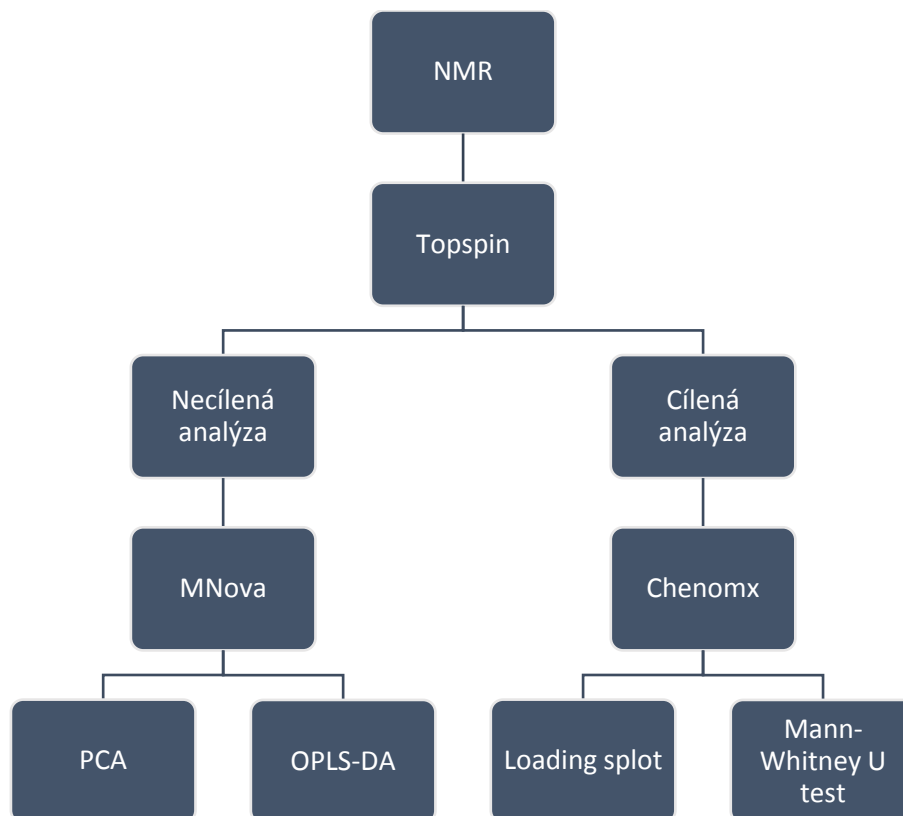
Naměřená spektra byla nejdříve upravena v programu Topspin, kde proběhla nejen Fourierova transformace, ale také byla spektra manuálně upravena. Jednalo se o úpravu baseline a signálu TSP reference.

Dále byl využit program MNova (Mestrenova, Španělsko), ve kterém byla spektra opět manuálně upravena. Proběhla znovu korekce baseline a standardu, který byl srovnán na 0,000 ppm. V tomto programu se také vizuálně porovnávala spektra a hledaly se viditelné rozdíly u jednotlivých peaků. Dále byl zde proveden binning se šířkou jednoho binu 0,01 ppm bez úseku artefaktů zbylých po supresi vody (oblast se středem na 4.704 ppm).

Dalším programem pro úpravu spekter byl Chenomx Processor, ve kterém byla znovu provedena korekce baseline a kalibrace CSI. V Chenomx Profiler následovalo hledání a anotace konkrétních látek pomocí knihovny. Celkem bylo identifikováno 69 látek zastoupených v minimálně 75 % spekter.

4.7 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data byla statisticky vyhodnocena jak cílenou, tak necílenou analýzou. Postup vyhodnocení a druhy statistických analýz, které byly využity při měření na NMR spektrometru, zobrazuje obrázek 2.



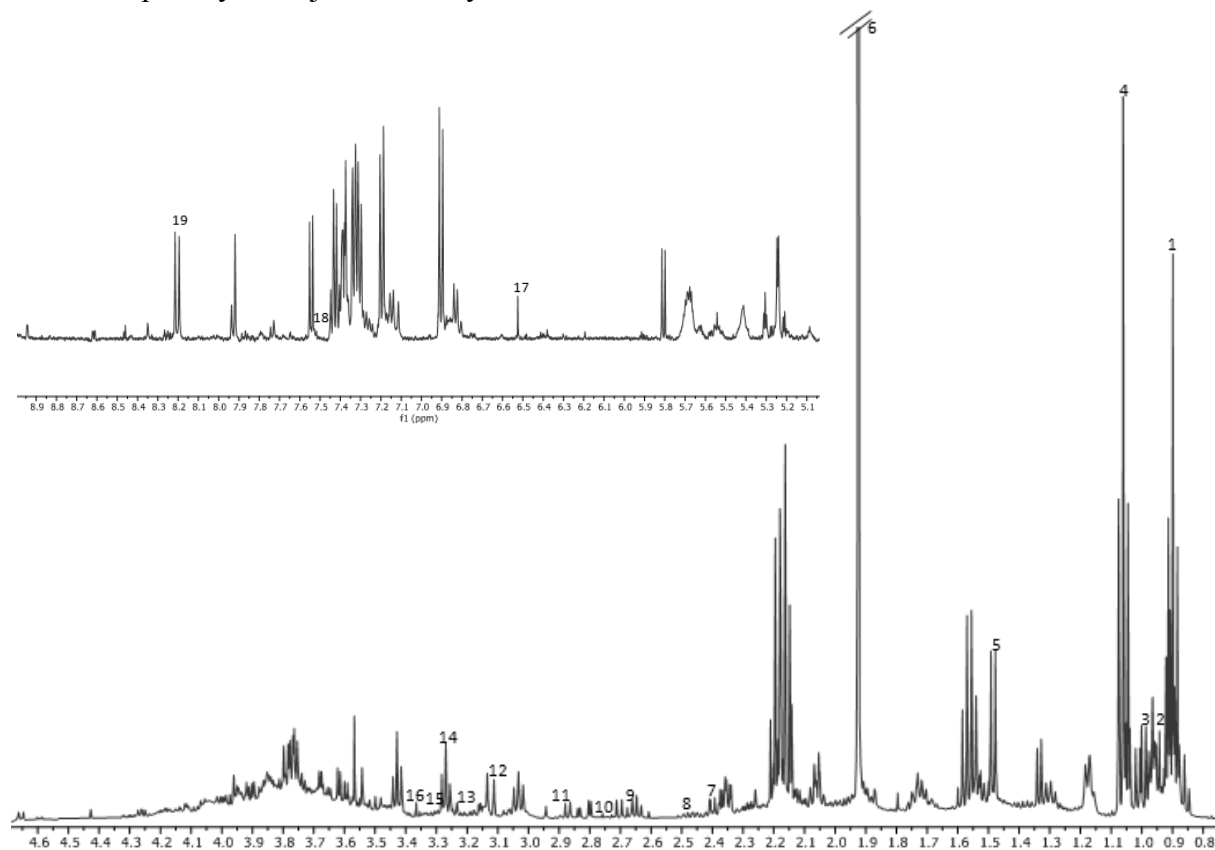
Obrázek 2 Postup vyhodnocení dat

Jak je tedy uvedeno ve vizuálním přehledu, v rámci necílené analýzy byl nejdříve proveden binning (MNOVA) a ze získaných dat byla poté provedena analýza v programu Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Zde byla data nejdříve normalizována podle sumy, logaritmičsky transformována a automaticky škálována. V tomto programu byly provedeny konkrétně analýzy PCA a OPLS-DA.

K cílené analýze byl využit program Chenomx, kde byly identifikovány a kvantifikovány konkrétní látky dle knihovny. Dále z programu byla získána data, která byla dále statisticky vyhodnocena neparametrickým Mann-Whitney U testem v programu IBM SPSS Statistics. Také byla data z Chenomx využita pro loadings plot grafy, které byly vytvořeny v programu Excel a znázorňují statisticky významné látky u jednotlivých skupin. Jako poslední byl vytvořen graf znázorňující korelaci látek s kalprotektinem.

5 Výsledky

Bylo vytvořeno ukázkové spektrum z NMR, upravené a bez úseku vody (obr. 3). Ve spektru lze vidět zakreslené statisticky významné látky u jejich příslušných peaků. Názvy a chemické posuny látek jsou uvedeny v tab. 2.



Obrázek 3 NMR spektrum

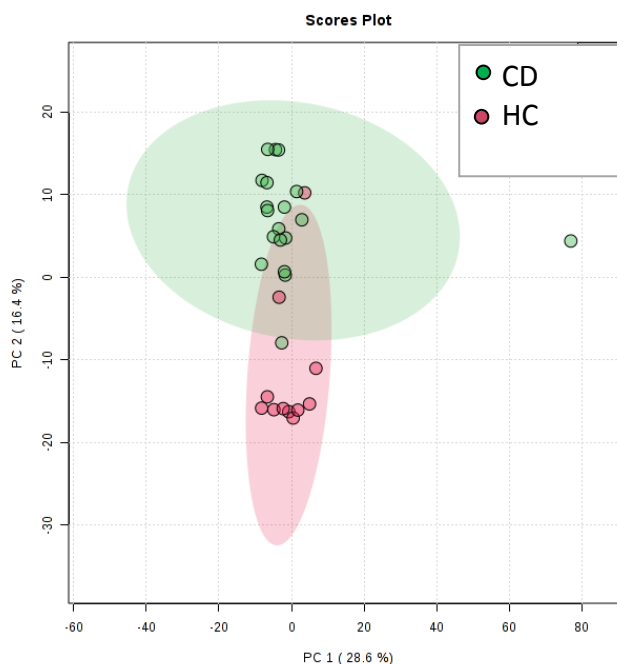
Tabulka 2 Informace o látkách k NMR spektru

Číslo látky	Název látky	Chemický posun (ppm)
1	butyrát	0,88 (t), 1,52 (m), 2,14 (t)
2	leucin	0,94 (d), 0,96 (d), 1,7 (m), 3,72 (q)
3	valin	0,98 (d), 1,04 (d), 2,24 (m), 3,61 (d)
4	propionát	1,04 (t), 2,16 (q)
5	alanin	1,47 (d), 3,76 (q)
6	acetát	1,92 (s)
7	karnitin	2,4 (m), 3,23 (s), 3,4 (m), 4,55 (m)
8	3-fenylpropionát	2,47 (m), 2,86 (m), 7,25 (t), 7,3 (d), 7,36 (t)
9	aspartát	2,66 (q), 2,79 (q), 3,89 (q)
10	sarkosin	2,75 (s), 3,61 (s)
11	trimethylamin	2,89 (s)
12	malonát	3,11 (s)
13	xylóza	3,22 (q), 3,3 (t), 3,42 (t), 3,51 (q), 3,60 (m), 3,91 (q), 4,57 (d), 5,2 (d)
14	betain	3,26 (s), 3,9 (s)

15	tryptofan	3,28 (q), 3,47 (q), 4,05 (q), 7,18 (t), 7,27 (t), 7,32 (s), 7,53 (d), 7,72 (d)
16	methanol	3,36 (s)
17	fumarát	6,52 (s)
18	nikotinát	7,51 (q), 8,24 (m), 8,6 (q), 8,94 (d)
19	hypoxantin	8,19 (s), 8,21 (s)

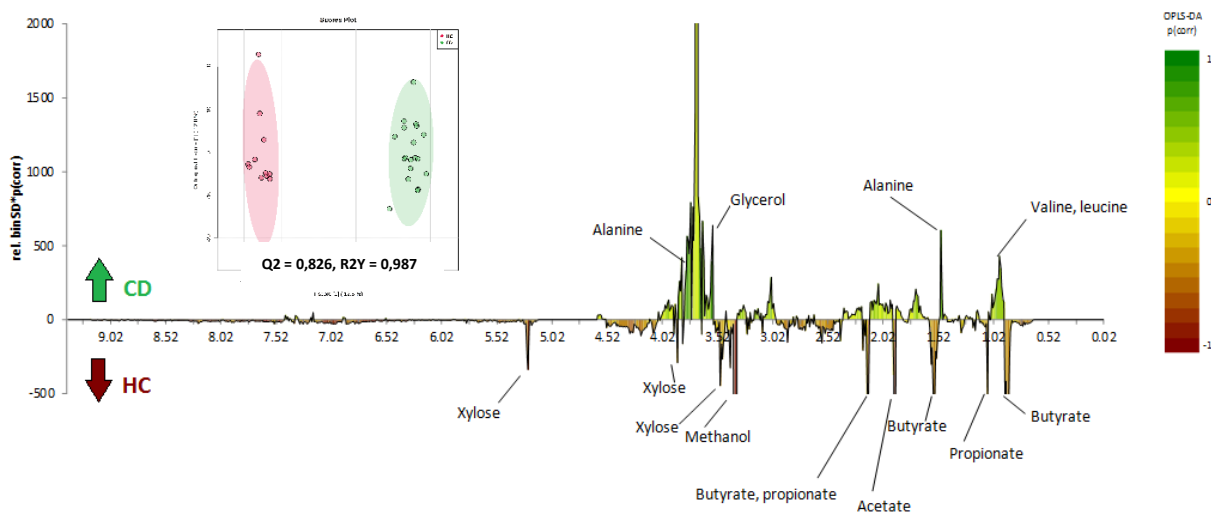
S = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet

Základní PCA binnů prokázala, že existuje významný rozdíl mezi skupinou pacientů a zdravých jedinců. Výsledek analýzy zobrazuje obr. 4, kde je patrný také jeden odlehlý vzorek. Osa PC1 reprezentuje hlavní zdroj variability mezi vzorky (28,6 %). Ta je vyšší u skupiny CD z důvodu přítomnosti jednoho odlehlého vzorku. Tento vzorek nebyl záměrně eliminován, neboť se nejednalo o technickou chybu, ale o odlišného pacienta. Osa PC2 představuje hlavní zdroj variability mezi skupinami HC a CD (16,4 %).



Obrázek 4 PCA analýza

Významný rozdíl mezi skupinami potvrdila také OPLS-DA analýza, která byla zároveň validní – při 1000 permutacích byly hodnoty: $Q^2=0,826$ a $R^2Y=0,987$. Po vynásobení $p(\text{corr})$ hodnot získaných z S-plot OPLS-DA analýzy se směrodatnou odchylkou intenzity binnů bylo vytvořeno syntetické spektrum, které indikuje intenzitu a směr binnů zodpovědných za separaci obou skupin v OPLS-DA analýze (dále jen NMR loadings plot; obr. 5). Spektrum je barevně kódováno dle $p(\text{corr})$. Zelená barva představuje látky významně zastoupené u pacientů s CD oproti HC, zatímco červená barva prezentuje naopak významné látky u kontrolní skupiny oproti CD. Čím je barva sytější, tím vyšší je význam binnu pro separaci obou skupin, zatímco absolutní výška peaku přibližně odpovídá intenzitě v průměrném spektru.



Obrázek 5 OPLS-DA loadings binů

Peaky byly anotovány v programu Chenomx. Dle zobrazeného NMR loadings plotu byly u pacientů s CD ve vyšším množství zastoupeny některé aminokyseliny, a to včetně esenciálních větvených aminokyselin – valinu a leucinu. Dále skupina pacientů dominovala v koncentraci glycerolu. Co se týče látek převládajících u kontrolní skupiny, největší rozdíl byl u methanolu a SCFA.

Dále byl proveden Mann-Whitney U test na datech koncentrací látek získaných v programu Chenomx, jehož výsledky zobrazuje tab. 3. Dle výsledků lze vidět, že statisticky významné látky dle loading splotu kromě glycerolu potvrdil také Mann-Whitney U test.

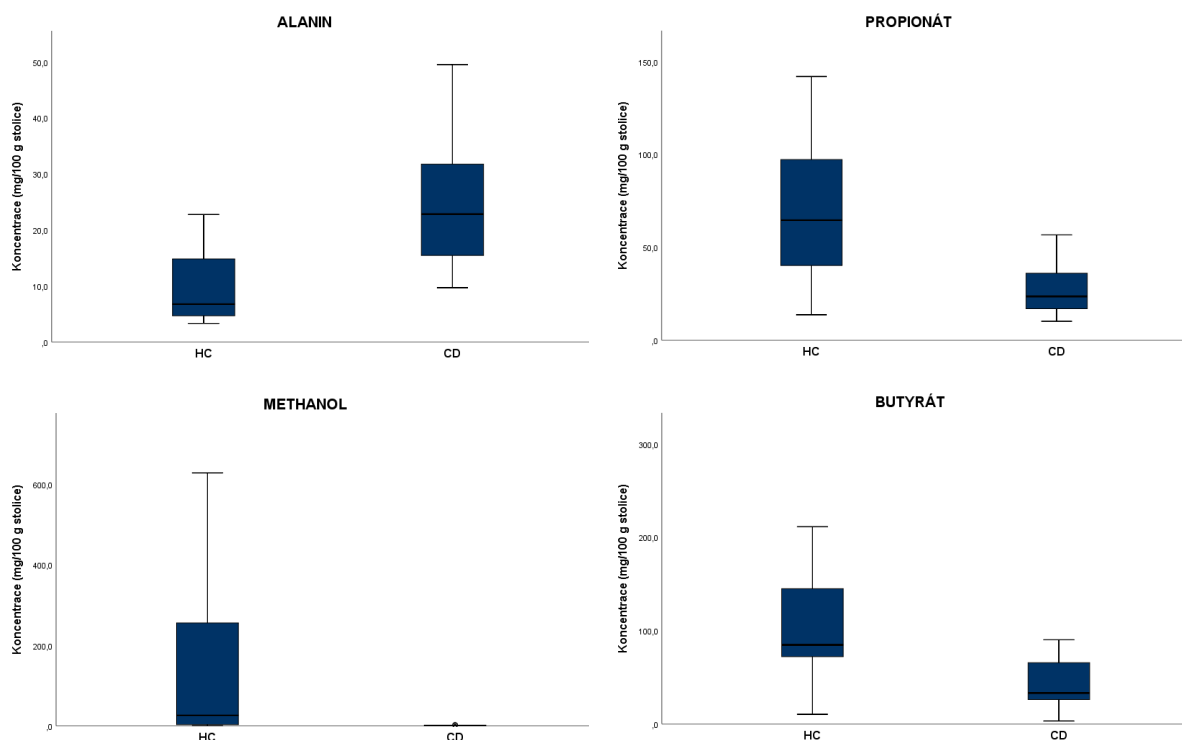
Tabulka 3 Statisticky významné látky na základě Mann-Whitney U testu

Sloučenina	n (HC)	n (CD)	průměr* (HC)	průměr* (CD)	p-hodnota
Alanin	11	19	10,3	24,7	0,000
Trimethylamin	11	19	0,1	0,03	0,000
Propionát	11	19	72,4	29,5	0,003
Butyrát	11	19	112,7	47,5	0,003
Sarkosin	11	19	1,0	0,5	0,004
Malonát	11	19	19,5	6,0	0,005
3-fenylpropionát	11	19	2,3	0,9	0,008
Karnitin	11	19	1,2	0,4	0,011
Xylóza	10	19	12,2	5,0	0,012
Nikotinát	11	19	1,6	1,0	0,016
Methanol	11	19	163,7	0,9	0,021
Valin	11	19	9,3	16,5	0,021
Aspartát	11	19	5,0	12,7	0,023
Hypoxanthin	11	19	4,9	2,5	0,030
Tryptofan	11	19	1,3	2,1	0,030
Betain	10	19	2,2	0,4	0,035
Leucin	11	19	9,8	17,1	0,037
Acetát	11	19	228,8	142,9	0,047
Fumarát	10	19	0,6	1,2	0,050

Tučně jsou vyznačeny vybrané látky, které jsou dále uvedeny na obr. 6.

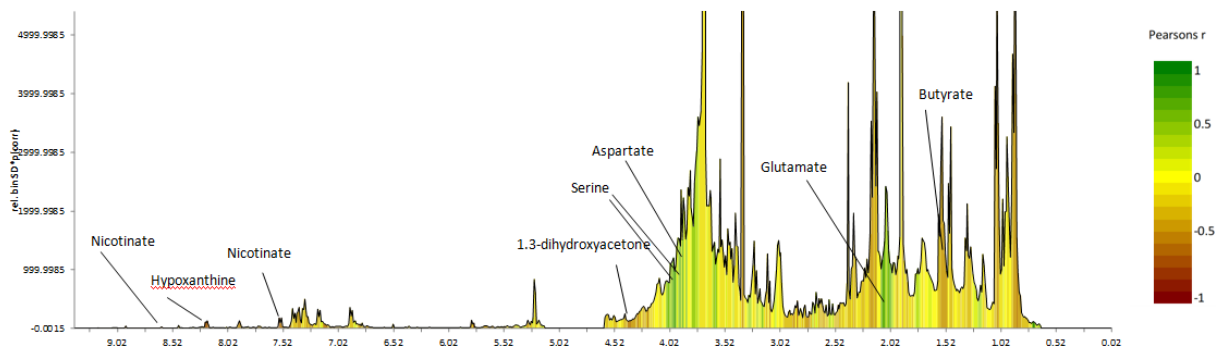
* Průměrné koncentrace metabolitů u obou skupin, uvedené v mg/100 g stolice.

Z tab. 3 lze vidět, že statisticky významných látek bylo na základě Mann-Whitney U testu vyhodnoceno celkem 19. Alanin, valin, leucin, tryptofan, aspartát a fumarát byly významně více zastoupené u pacientů s CD. Naopak metabolity trimethylamin, propionát, butyrát, acetát, karnitin, xylóza, nikotinát, methanol, hypoxantin, 3-fenylpropionát, betain, malonát a sarkosin byly u pacientů významně snižené. Koncentrace některých významně odlišných sloučenin zobrazuje obr. 6. Jedná se o aminokyselinu alanin, methanol a SCFA propionát a butyrát.



Obrázek 6 Koncentrace vybraných metabolitů

Doprovodná data z FN Motol mimo jiné zahrnovala informaci o hladině kalprotektinu detekovaného ve vzorcích. Byl vytvořen graf korelující intenzitu jednotlivých binnů s kalprotektinem, který zobrazuje obrázek č. 7. Barva a její intenzita vyjadřuje Pearsonův korelační koeficient mezi zkoumanou proměnnou (kalprotektin) a binny NMR spektra. Čím sytější zbarvení, tím vyšší korelace. Zelené zbarvení odpovídá pozitivní korelaci s kalprotektinem, a naopak červené zbarvení představuje negativní korelaci. Významné binny byly identifikovány v programu Chenomx.



Obrázek 7 Korelace s kalprotektinem

Dle výsledků negativně korelují látky nikotínát, hypoxanthin a butyrát, které byly zároveň zaznamenány v Mann-Whitney U testu jako významně méně zastoupené u pacientů s CD. Naopak pozitivně korelují aspartát, serin a 1,3-dihydroxyaceton. Z těchto látek byl ve statistických testech uveden pouze aspartát, a to ve zvýšeném množství u pacientů.

Ze všech zobrazených výsledků je tedy patrné, že byla zjištěna rozdílnost mezi sledovanými skupinami, a to u některých metabolitů velmi výrazná. Co se týče metabolitů snížených u pacientů, jednalo se především o SCFA. Naopak zvýšené zastoupení u pacientů bylo podstatné zejména u některých aminokyselin.

6 Diskuze

I přes nízký počet subjektů se potvrdil základní rozdíl, který uvádějí i další literární zdroje (Marchesi et al. 2007; Sartor & Wu 2017), a to významně nižší zastoupení SCFA u pacientů s CD oproti zdravým jedincům. V této práci se jednalo konkrétně o acetát, butyrát a propionát. Dalšími statisticky významnými metabolity dle Mann-Whitney U testu, které byly zjištěny ve sníženém množství u pacientů, byly trimethylamin, karnitin, xylóza, nikotinát, methanol, hypoxantin, 3-fenylpropionát, betain, malonát a sarkosin. Naopak ve zvýšeném zastoupení u pacientů byly vyhodnoceny alanin, valin, leucin, tryptofan, aspartát a fumarát. Dle NMR loadings plotu vycházejícího z OPLS-DA analýzy byly u skupiny CD pacientů významně zvýšené látky alanin, valin, leucin a glycerol. U kontrolní skupiny se jednalo o acetát, butyrát, propionát, methanol a xylózu. Co se týče vyhodnocení korelace identifikovaných metabolitů s kalprotektinem, negativní korelace byla zaznamenána u nikotinátu, hypoxanthinu a butyrátu. Naopak pozitivně koreloval aspartát, serin a 1,3-dihydroxyaceton.

Snížené množství SCFA je u pacientů s CD známé. Tento rozdíl souvisí a odpovídá doposud zjištěným informacím o střevní mikrobiotě pacientů s CD, které uvádí drtivá většina literárních zdrojů, a to sice snížené rozmanitosti bakterií, zejména *Faecalibacterium prausnitzii*, jedné z významných producentů právě SCFA (Sokol et al. 2008; Nagalingam & Lynch 2012; Hedin et al. 2014). Butyrát navíc také negativně koreloval s kalprotektinem, takže by mohl mít potenciální vliv na snižování zánětu.

Další významně méně zastoupenou látku u pacientů s CD, methanol, autoři jiných studií se stejnou problematikou jako významnou látku neuvádějí. Methanol vzniká ve střevě jako produkt metabolismu bakterií, které pro svůj růst metabolizují pektin (Schink & Zeikus 1980). Snížené množství methanolu může tedy souviset opět s mikrobiálním narušením, anebo zde může být souvislost s nízkou konzumací pektinu. Navíc se konkrétně konzumace vlákniny z ovoce, tedy také pektinu, považuje za protektivní faktor pro vznik Crohnovy choroby (Ananthakrishnan et al. 2013).

Xylóza, další snížený metabolit u pacientů, v ostatních studiích také roli nehrála. Tento sacharid se vyskytuje v rostlinných zdrojích a může souviset s příjmem arabinoxylanů, frakcí vlákniny, jež jsou typické například pro obilniny (Gill et al. 2006). Opět se tedy nabízí souvislost se sníženou konzumací vlákniny. Vzhledem k tomu, že sacharidy v NMR spektru představují velmi složitou rezonanční strukturu s velmi vysokým množstvím peaků reprezentujících všechny v roztoku přítomné anomery a jejich spektra jsou podobná, není vyloučeno, že se jedná i o jiný sacharid. Plná identifikace by byla nad rámec této diplomové práce.

Snížené množství trimethylaminu uvedli i Marchesi et al. (2007). Trimethylamin vzniká při fermentaci cholinu a karnitinu střevní mikrobiotou, takže jeho snížené množství může souviset s mikrobiální dysbiózou u pacientů. Navíc mezi běžné producenty trimethylaminu patří bakterie z kmene *Firmicutes* (Fennema et al. 2016), jež patří mezi výrazně snížené bakterie u pacientů s CD. Trimethylamin může také vznikat v rámci střevní mikrobioty i nepřímou cestou při oxidaci cholinu či karnitinu na betain nebo potenciálně i přímo při redukci betainu (Fennema et al. 2016). Vzhledem k jeho vzniku v organismu se nabízí souvislost s také méně zastoupeným karnitinem a betainem. Ačkoliv je zvláštní, že karnitin, jakožto aminokyselina se nacházel v nižší koncentraci, zatímco jiné aminokyseliny byly právě u

pacientů ve zvýšeném množství. Může to však souviset se sníženým příjmem masa, neboť se maso považuje za nejvýznamnější zdroj karnitinu (Koeth et al. 2019).

Zbývající uvedené metabolity ve sníženém zastoupení u pacientů v jiných studiích nebyly uváděny. Nikotinát je ve střevě syntetizován prostřednictvím střevních bakterií. Nižší zastoupení tohoto metabolitu by tedy mohlo opět souviset se změnou střevní mikrobioty. Sarkosin je derivát aminokyseliny glycinu a jeho zastoupení souvisí také s příjmem cholinu stravou, neboť vzniká jako meziproduct při metabolismu cholinu (Sreekumar et al. 2009).

Co se týče metabolitů se zvýšeným zastoupením u pacientů CD, jednalo se především o metabolity ze skupiny aminokyselin, k čemuž došli také autoři jiných studií (Marchesi et al. 2007; Bjerrum et al. 2014). Santoru et al. (2017) identifikovali pouze zvýšení esenciální aminokyseliny fenylalanin, což však zrovna tato práce nepotvrdila. Zvýšení aminokyselin by mohlo být zapříčiněno jejich sníženým vstřebáváním, které je opět způsobené probíhajícím zánětlivým procesem ve střevě. Ze zde identifikovaných zvýšených aminokyselin jsou esenciální tryptofan, valin a leucin. Poslední dvě aminokyseliny patří navíc do skupiny tzv. aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Zvýšené neesenciální aminokyseliny zastupuje alanin a aspartát. Aspartát může sloužit jako zdroj pro bakteriální fermentaci na propionát (Rowland et al. 2018). Jeho zvýšení by tedy mohlo souviset také s nižším zastoupením kmene *Firmicutes*, který tuto fermentaci zprostředkovává, a se sníženým množstvím propionátu.

Střevní mikrobiota produkuje při fermentaci různé meziproducty, mezi které patří také poslední zvýšený metabolit dle Mann-Whitney U testu, fumarát. Tyto meziproducty jsou však u zdravých jedinců běžně identifikované v nízkých koncentracích, protože jsou široce využívány dalšími bakteriemi (Rowland et al. 2018). Zvýšená koncentrace fumarátu u pacientů může tedy opět souviset se změnami ve skladbě střevní mikrobioty.

Dle analýzy binnů – NMR loadings plotu byl jako zvýšený metabolit u pacientů vyhodnocen ještě glycerol. Jeho významně vyšší zastoupení bylo identifikováno i v jiné studii, a to jak oproti zdravým kontrolám, tak i ve srovnání s pacienty trpícími UC (Marchesi et al. 2007). Glycerol se ve stolici běžně nachází ve velmi nízkých koncentracích, protože i když může být některými střevními bakteriemi tvořen, je však zároveň většinou střevních bakterií využíván. Zvýšená koncentrace glycerolu u pacientů s CD může souviset s narušeným vstřebáváním tuků v tenkém střevě. Dále jeho koncentraci ovlivňují také některé fermentační procesy, protože určité fermentační produkty mohou podporovat jeho vstřebávání, např. butyrát (De Weirdt et al. 2010). Zvýšení glycerolu by tedy mohlo souviset i s nižším zastoupením butyrátu.

Většina identifikovaných metabolitů tedy pravděpodobně souvisí především s mikrobiální dysbiózou, tedy narušením optimálního osídlení střevních bakterií. Toto narušení bylo v některých studiích vyhodnoceno jako jedna z možných příčin vzniku CD (Khan et al. 2019), neboť pro pacienty s CD bývají významné změny skladby střevní mikrobioty typické. Zatím se však neví, zda změny nastávají právě jako příčina, či až jako důsledek probíhajícího zánětu (Nagalingam & Lynch 2012).

Fekální kalprotektin se využívá u CD jako hlavní laboratorní marker, a to jak při počáteční diagnostice onemocnění, tak při sledování průběhu. Koreluje s endoskopickou aktivitou CD a dají se díky němu zjišťovat informace o zánětlivém procesu ve střevě. Využívá se tedy pro monitorování aktivity onemocnění, pro sledování funkčnosti léčby nebo může sloužit i pro předpovídání klinického relapsu onemocnění (Gajendran et al. 2018). Kvůli vypovídající

schopnosti ohledně zánětlivého procesu byla provedena korelace kalprotektinu s identifikovanými metabolity. Negativně korelovaly butyrát, nikotinát a hypoxanthin. Jak již bylo zmíněno, pacienti s CD mají obecně významně nižší zastoupení SCFA, tedy i butyrátu. Korelace tedy odpovídá tomu, že čím menší bude zánět, tím vyšší bude koncentrace butyrátu. V této souvislosti se nabízí nápad, který byl již zmíněný v jiné studii (Sokol et al. 2008), a to vytvořit probiotika s konkrétními bakteriemi, které patří mezi významné producenty SCFA a u pacientů s CD je jejich zastoupení významně sniženo. Zvýšené množství SCFA by tak mohlo přispět ke zklidnění zánětlivých procesů ve střevě a celkově podpořit léčbu. Co se týče nikotinátu a hypoxanthinu, jejich zastoupení bylo u pacientů také významně sniženo, takže by zde mohla být stejná souvislost jako v případě butyrátu.

Naopak pozitivně s kalprotektinem korelovaly metabolity aspartát, serin a 1,3-dihydroxyaceton. Jak již bylo výše zmíněno, aspartát mohou využívat střevní bakterie pro fermentaci na propionát. Stejně tak mohou jako zdroj pro fermentaci využívat i serin, avšak za vzniku butyrátu (Rowland et al. 2018). Existuje tedy souvislost serinu s butyrátem, a opět také s mikrobiotou, konkrétně s bakteriemi se sníženým zastoupením u pacientů s CD. Se skladbou střevní mikrobioty souvisí i poslední metabolit, 1,3-dihydroxyaceton. Existují bakterie, které mohou tento metabolit produkovat, ale také existují bakterie, které ho metabolizují. Zároveň může jeho zvýšené množství ovlivňovat růst, či dokonce životaschopnost některých populací bakterií (Trinchieri et al. 2017). Jeho pozitivní korelace s kalprotektinem tedy naznačuje, že by ho mohly produkovat bakterie působící prozánětlivě, a že naopak množství bakterií působících protektivně mohou vyšší hladiny 1,3-dihydroxyacetonu snižovat. Také byla provedena studie na myších v souvislosti s IBD, kde bylo zjištěno, že 1,3-dihydroxyaceton zvyšoval jak střevní propustnost, tak zánětlivé markery (Biagioli et al. 2017).

Zajímavé je, že s kalprotektinem nekorelovaly části spektra, kde jsou zastoupeny aminokyseliny, přestože tyto binny byly zodpovědné za separaci v OPLS-DA. Pacienti v naší studii byli obvykle ve fázi remise, kdy jsou hladiny kalprotektinu nízké. Kalprotektin je jako biomarker výhodný zejména při aktivní fázi onemocnění, kdy jeho hladiny stoupají několika násobně, nebo při odhalení hrozícího relapsu, kdy se jeho hodnoty opět zvyšují. Fakt, že se v NMR spektru vyskytovaly látky/binny, které s kalprotektinem nekorelovaly, a zároveň s jejich pomocí bylo možné v multivariální analýze odlišit zdravé pacienty od nemocných naznačuje, že NMR diagnostika cílí na jinou biochemickou podstatu onemocnění, a že po optimalizaci by mohla být dobrým nástrojem na odhalení nemoci i v klidové fázi.

I přes nízký počet pacientů výsledky našeho metabolického profilování pomocí NMR v této práci podpořily názor, že by NMR metoda ve spojení s chemometrií mohla sloužit jako diagnostický a monitorovací nástroj pro Crohnovu chorobu. Jako nejlepší marker se zatím jeví SCFA spolu s vybranými aminokyselinami. NMR metabolomika by mohla, při bližším prozkoumání souvislostí metabolitů se střevní mikrobiotou a s onemocněním celkově, pomoci pro porozumění patogeneze onemocnění. Výsledky práce také potvrdily hypotézu, že se metabolom pacientů s Crohnovou chorobou liší od metabolomu zdravých jedinců.

7 Závěr

Tato práce podpořila naši úvahu o vysokém potenciálu NMR metabolického profilování u pacientů trpících Crohnovou chorobou. Byla potvrzena hypotéza, že se metabolom pacientů s Crohnovou chorobou liší od metabolomu zdravých jedinců. Rozdílné bylo především zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), jejichž koncentrace byly významně sníženy u pacientů oproti kontrolám. SCFA by mohly sloužit jako potenciální markery při využití metabolomiky v diagnostice onemocnění. Dále byl významný rozdíl v koncentracích některých aminokyselin, které byly u pacientů oproti kontrolám zvýšeny. Konkrétně se jednalo o alanin, valin, leucin, tryptofan a aspartát.

Vzhledem k tomu, že i při velmi nízkém počtu subjektů lze metabolom pacientů odlišit, mohl by tento způsob pomoci mimo diagnostiky také k lepšímu porozumění původu onemocnění.

Nové diagnostické metody by výrazně přispěly k poznání a léčbě tohoto onemocnění. Pro reálné využití je potřeba studií na větším počtu lidí a validace nalezených biomarkerů pomocí robustnějších metod.

8 Literatura

- Aardoom MA, Veereman G, de Ridder L. 2019. A review on the use of anti-TNF in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (e2529) DOI: 10.3390/ijms20102529.
- Ananthakrishnan AN et al. 2013a. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **19**:1921–1927.
- Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, Vavricka SR, Fiocchi C. 2018. Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **15**:39–49.
- Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Fuchs CS, Willett WC, Richter JM, Chan AT. 2014. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **63**:776–784.
- Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Korzenik JR, Fuchs CS, Willett WC, Richter JM, Chan AT. 2013b. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* **145**:970–977.
- Ananthakrishnan AN, Khalili H, Song M, Higuchi LM, Richter JM, Chan AT. 2015. Zinc intake and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis: A prospective cohort study. *International Journal of Epidemiology* **44**:1995–2005.
- Biagioli M, Laghi L, Carino A, Cipriani S, Distrutti E, Marchianò S, Parolin C, Scarpelli P, Vitali B, Fiorucci S. 2017. Metabolic Variability of a Multispecies Probiotic Preparation Impacts on the Anti-inflammatory Activity. *Frontiers in Pharmacology* **8**:1–10.
- Bjerrum JT, Wang Y, Hao F, Coskun M, Ludwig C, Günther U, Nielsen OH. 2014. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. *Metabolomics* **11**:122–133.
- Bommelaer G et al. 2019. Oral Curcumin No More Effective Than Placebo in Preventing Recurrence of Crohn's Disease After Surgery in a Randomized Controlled Trial. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **18**:1553–1560.
- Bourreille A et al. 2013. *Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **11**:982–987.
- Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science and Technology* **20**:557–566.
- Chan SSM et al. 2014. Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **39**:834–842.
- Chassaing B, Darfeuille-michaud A. 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**:1720–1728.
- Chassaing B, Van De Wiele T, De Bodt J, Marzorati M, Gewirtz AT. 2017. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut* **66**:1414–1427.
- Chi LY, Zitomersky NL, Liu E, Tollefson S, Bender-Stern J, Naik S, Snapper S, Bousvaros A. 2018. The Impact of Combination Therapy on Infliximab Levels and Antibodies in Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **24**:1344–1351.
- Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, McCallum RW. 2012. Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? *Critical Reviews in Microbiology* **38**:52–93.

- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**:1258–1270.
- D'Souza S, Levy E, Mack D, Israel D, Lambrette P, Ghadirian P, Deslandres C, Morgan K, Seidman EG, Amre DK. 2008. Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children. *Inflammatory Bowel Diseases* **14**:367–373.
- Daniluk U, Daniluk J, Kucharski R, Kowalczyk T, Pietrowska K, Samczuk P, Filimoniuk A, Kretowski A, Lebensztejn D, Ciborowski M. 2019. Untargeted metabolomics and inflammatory markers profiling in children with Crohn's disease and ulcerative colitis - A preliminary study. *Inflammatory Bowel Diseases* **25**:1120–1128.
- 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**:412–421.
- De Weirdt R, Possemiers S, Vermeulen G, Moerdijk-Poortvliet TCW, Boschker HTS, Verstraete W, Van De Wiele T. 2010. Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* **74**:601–611.
- Deda O, Gika HG, Wilson ID, Theodoridis GA. 2015. An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**:137–150.
- Douda M. 2010. Kapslová endoskopie u IBD. *Endoskopie* **19**:117–120.
- Dujsíková H. 2018. Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. *Klinická farmakologie a farmacie* **32**:7–10.
- Ehrlich S, Mark AG, Rinawi F, Shamir R, Assa A. 2020. Micronutrient Deficiencies in Children With Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrition in Clinical Practice* **35**:315–322.
- Fabisiak N, Fabisiak A, Watala C, Fichna J. 2017. Fat-soluble Vitamin Deficiencies and Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Gastroenterology* **51**:878–889.
- Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U, Bar-Meir S. 2009. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: The EPIC randomized controlled trials. *Nutrition in Clinical Practice* **24**:102–103.
- Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. 2016. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition* **44**:1839–1850.
- Feuerstein JD, Cheifetz AS. 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings* **92**:1088–1103.
- Friebolin H. 2011. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. WILEY-VCH, Weinheim.
- Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. 2018. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month* **64**:20–57.
- Garcia Vilela E, De Lourdes De Abreu Ferrari M, Oswaldo Da Gama Torres H, Guerra Pinto A, Carolina Carneiro Aguirre A, Paiva Martins F, Marcos Andrade Goulart E, Sales Da Cunha A. 2008. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **43**:842–848.
- Gevers D et al. 2014. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host and Microbe* **15**:382–392.
- 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**:1355–1359.
- Guslandi M. 2015. Role of probiotics in Crohn's disease and in pouchitis. *Journal of Clinical*

- Gastroenterology **49**:S46–S49.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* **45**:1462–1464.
- Gutin L et al. 2019. Fecal microbiota transplant for Crohn disease: A study evaluating safety, efficacy, and microbiome profile. *United European Gastroenterology Journal* **7**:807–814.
- Hedin CR et al. 2014. Altered intestinal microbiota and blood T cell phenotype are shared by patients with Crohn's disease and their unaffected siblings. *Gut* **63**:1578–1586.
- Hou JK, Abraham B, El-Serag H. 2011. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *American Journal of Gastroenterology* **106**:563–573.
- Jacobs DM, Deltimple N, van Velzen E, van Dorsten FA, Bingham M, Vaughan EE, van Duynhoven J. 2008. 1H NMR metabolite profiling of feces as a tool to assess the impact of nutrition on the human microbiome. *NMR in Biomedicine* **21**:615–626.
- Jakobsen C, Paerregaard A, Munkholm P, Wewer V. 2013. Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease - A population based study 2007-2009. *Journal of Crohn's and Colitis* **7**:79–88.
- Jensen MD, Kjeldsen J, Nathan T. 2011. Fecal calprotectin is equally sensitive in Crohn's disease affecting the small bowel and colon. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **46**:694–700.
- Kaenkumchorn T, Kesavan A. 2019. Dietary Management of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Medicinal Food* **22**:1092–1099.
- Khan I, Ullah N, Zha L, Bai Y, Khan A, Zhao T, Che T, Zhang C. 2019. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens* **8** (e126) DOI: 10.3390/pathogens8030126.
- Koeth RA et al. 2019. L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *Journal of Clinical Investigation* **129**:373–387.
- Konikoff MR, Denson LA. 2006. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**:524–534.
- Kostidis S, Kokova D, Dementeva N, Saltykova I V., Kim HK, Choi YH, Mayboroda OA. 2017. 1H-NMR analysis of feces: New possibilities in the helminthes infections research. *BMC Infectious Diseases* **17**:1–8.
- Kugathasan S et al. 2017. Prediction of complicated disease course for children newly diagnosed with Crohn's disease: a multicentre inception cohort study. *The Lancet* **389**:1710–1718.
- Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD, Wu GD. 2015. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **148**:1087–1106.
- Levine A, Sigall Boneh R, Wine E. 2018. Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut* **67**:1726–1738.
- Lin HM, Helsby NA, Rowan DD, Ferguson LR. 2011. Using metabolomic analysis to understand inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**:1021–1029.
- Manichanh C et al. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**:205–211.
- Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. 2007. Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Proteome Research* **6**:546–551.
- Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. 2015. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life* **67**:659–667.

- Mitrová K. 2012. Zánětlivá střevní onemocnění u dětí. *Pediatric pro Praxi* **13**:388–390.
- Mitrová MK, Ph D. 2016. Novinky v léčbě zánětlivých střevních onemocnění u dětí **17**:344–347.
- Mondot S, Kang S, Furet JP, Mcsweeney C, Leclerc M, Morrison M, Marteau P, Dore J. 2011. Highlighting New Phylogenetic Specificities of Crohn ' s Disease **17**:185–192.
- Nagalingam NA, Lynch S V. 2012. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **18**:968–980.
- Olendzki BC, Silverstein TD, Pursuitte GM, Ma Y, Baldwin KR, Cave D. 2014. An anti-inflammatory diet as treatment for inflammatory bowel disease: A case series report. *Nutrition Journal* **13**:1–7.
- Olza J, Aranceta-Bartrina J, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G, Gil Á. 2017. Reported dietary intake and food sources of zinc, selenium, and vitamins a, e and c in the spanish population: Findings from the anibes study. *Nutrients* **9** (e697) DOI: 10.3390/nu9070697.
- Otley A, Loonen H, Parekh N, Corey M, Sherman PM, Griffiths AM. 1999. Assessing Activity of Pediatric Crohn ' s Disease: Which index to use? *Gastroenterology* **116**:527–531.
- Pan Z, Raftery D. 2007. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:525–527.
- Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, Castaño-Rodríguez N. 2017. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis* **11**:1180–1199.
- Penagini F, Dilillo D, Borsani B, Cococcioni L, Galli E, Bedogni G, Zuin G, Zuccotti GV. 2016. Nutrition in pediatric inflammatory bowel disease: From etiology to treatment. A systematic review. *Nutrients* **8**:1–27.
- Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. 2019. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* **157**:647–659.
- Racine A et al. 2016. Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. *Inflammatory Bowel Diseases* **22**:345–354.
- Romano C, Cucchiara S, Barabino A, Annese V, Sferlazzas C. 2005. Usefulness of ω -3 fatty acid supplementation in addition to mesalazine in maintaining remission in pediatric Crohn's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *World Journal of Gastroenterology* **11**:7118–7121.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition* **57**:1–24.
- Santoru ML et al. 2017. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. *Scientific Reports* **7**:1–14.
- Sartor BR, Wu GD. 2017. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* **152**:327–339.
- Sartor RB. 2008. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **134**:577–594.
- Schäffler H, Herlemann DPR, Klinitzke P, Berlin P, Kreikemeyer B, Jaster R, Lamprecht G. 2018. Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's disease patients, but not in healthy controls. *Journal of Digestive Diseases* **19**:225–234.
- Schicho R, Shaykhutdinov R, Ngo J, Nazyrova A, Schneider C, Panaccione R, Kaplan GG, Vogel HJ, Storr M. 2012. Quantitative metabolomic profiling of serum, plasma, and

- urine by ¹H NMR spectroscopy discriminates between patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals. *Journal of Proteome Research* **11**:3344–3357.
- Schink B, Zeikus JG. 1980. Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology* **4**:387–389.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Doré J. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**:237–242.
- Sigall-Boneh R, Pfeffer-Gik T, Segal I, Zangen T, Boaz M, Levine A. 2014. Partial enteral nutrition with a Crohn's disease exclusion diet is effective for induction of remission in children and young adults with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **20**:1353–1360.
- Slavičková A. 2019. NMR biomarkery obezity u dětí a vztah se stravovacími zvyklostmi [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Sokol H et al. 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:16731–16736.
- Sreekumar A et al. 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **457**:910–914.
- Storr M, Vogel HJ, Schicho R. 2014. Metabolomics : is it useful for IBD ? *Curr Opin Gastroenterol* **29**:378–383.
- Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, Devinney R, Lynch T, Allen-Vercoe E. 2011. Invasive potential of gut mucosa-derived fusobacterium nucleatum positively correlates with IBD status of the host. *Inflammatory Bowel Diseases* **17**:1971–1978.
- Strisciuglio C et al. 2018. The role of inflammation on Vitamin D levels in a cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **67**:501–506.
- Svolos V et al. 2019. Treatment of Active Crohn's Disease With an Ordinary Food-based Diet That Replicates Exclusive Enteral Nutrition. *Gastroenterology* **156**:1354–1367.
- Trinchieri V, Laghi L, Vitali B, Parolin C, Giusti I, Simone C De. 2017. Efficacy and Safety of a Multistrain Probiotic Formulation Depends from Manufacturing. *Frontiers in Pharmacology* **8**:1–13.
- Turner D et al. 2017. Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **64**:254–260.
- ÚZIS. 2013. Činnost oboru gastroenterologie v ČR v roce 2012. ÚZIS, Praha. Available from https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/ai_2013_43.pdf (accessed September 2013).
- Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. 2016. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* **65**:57–62.
- Walczuk U, Sobieszczkańska B, Turniak M, Rzeszutko M, Duda-Madej A, Iwańczak B. 2019. The prevalence of mucosa-associated diffusely adherent Escherichia coli in children with inflammatory bowel disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* **28**:899–905.
- Wang H, Cui B, Li Q, Ding X, Li P, Zhang T, Yang X, Ji G, Zhang F. 2018. The Safety of Fecal Microbiota Transplantation for Crohn's Disease: Findings from A Long-Term Study. *Advances in Therapy* **35**:1935–1944.
- Zarei-Kordshouli F, Geramizadeh B, Khodakaram-Tafti A. 2019. Prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: Histopathological and molecular comparison with Johne's

disease in Fars province of Iran. *BMC Infectious Diseases* **19**:1–11.
Zou M et al. 2020. Fecal microbiota transplantation results in bacterial strain displacement in patients with inflammatory bowel diseases. *FEBS Open Bio* **10**:41–55.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

25(OH)D	25-hydroxycholecalciferolu
BMI	Body Mass Index
CA	Kanada
CD	Crohn's disease
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CD-TREAT	Crohn's disease-Treatment-with-eating diet
CMC	Karboxymethylcelulóza
CZ	Česká republika
DE	Německo
ESP	Španělsko
FN	Fakultní nemocnice
HC	Healthy control
EEV	Exkluzivní enterální výživa
FMT	Fekální mikrobiální transplantace
IBD	Inflammatory bowel disease
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i>
MHz	Megahertz
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	Orthogonal Partial-Least Squares discriminant analysis
P80	Polysorbát 80
PCA	Principal Component Analysis
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PLS-DA	Partial-Least Squares discriminant analysis
ppm	Parts per million
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
SCD	Specifická sacharidová dieta
SCFA	Short-chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SP	Species
SPP	Subspecies
TMA	Trimethylamin
TNF	Tumor necrosis factor
UC	Ulcerative colitide
USA	Spojené státy americké
wPCDAI	weighted PCDAI