

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (FAPPZ)



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Střevní mikrobiota v souvislosti s metabolickým
syndromem, obezitou a rozvojem dysbiózy u pacientů
s onemocněním diabetes mellitus II. typu**

Diplomová práce

Mgr. Anna Štorková

Výživa a potraviny (NUTRIM)

Mgr. Ing. Hana Sechovcová, Ph.D .

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Střevní mikrobiota v souvislosti s metabolickým syndromem, obezitou a rozvojem dysbiózy u pacientů s onemocněním diabetes mellitus II. typu“ 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 20.4 .2025

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Ing. Haně Sechovcové, Ph.D . za trpělivost, ochotu a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Chaherezaď Mekadim, Ph.D . za obětavou pomoc při zpracovávání praktické části práce a Ing. Jakubovi Mrázkovi, Ph.D . za konzultační podporu.

Střevní mikrobiota v souvislosti s metabolickým syndromem, obezitou a rozvojem dysbiózy u pacientů s onemocněním diabetes mellitus II. typu

Souhrn

Mikrobiota označuje celou populaci mikroorganismů – zahrnuje nejen bakterie, ale také houby, archea, viry a prvoky. Normální lidský mikrobiom se skládá převážně z kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, dále pak z *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*. Právě první dva zmíněné kmeny tvoří až 90 % střevní mikrobioty. Mikrobiom zajišťuje organismu specifické funkce v metabolismu živin, xenobiotik a léčiv, udržuje strukturovanou integritu střevní slizniční bariéry a podílí se na imunomodulaci a ochraně před patogeny.

U pacientů s obezitou, diabetem 2. typu (T2DM) nebo metabolickým syndromem dochází ke změnám ve složení mikrobiomu, mimo jiné v důsledku užívání antibiotik. Předpokládá se, že složení mikrobiomu ovlivňuje více faktorů, přičemž jedním z nich je právě antibiotická terapie. Cílem této diplomové práce je popsat a porovnat bakteriální profil střevního mikrobiomu pacientů. Na výzkumu se podílel Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny (IKEM).

Literární rešerše se zaměřuje na teoretické poznatky o metabolickém syndromu, diabetu 2. typu, obezitě a střevním mikrobiomu. Dále na metody molekulární genetiky (včetně sekvenování nové generace), které byly využity i v praktické části práce.

V rámci experimentální části byly odebrány vzorky stolice od 24 pacientů, ze kterých byla následně izolována DNA. Složení mikrobiomu bylo sledováno pomocí mikrobiologické metody PCR-DGGE. Z celkového počtu 19 získaných sekvencí bylo identifikováno devět různých druhů. Pro určení druhové příslušnosti byla použita metoda BLAST a pro každou sekvenci byla vybrána ta s nejvyšší procentuální shodou.

Při porovnání výsledků nebyly zjištěny významné rozdíly v bohatosti mikrobioty mezi jednotlivými časovými body – před zahájením antibiotické terapie, po dvou týdnech užívání a po pěti týdnech léčby. Také ve vztahu k druhové rozmanitosti mikrobiomu nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly. Mezi nejčastěji identifikované druhy patřily *Blautia hominis* a *Enterococcus faecium*.

Klíčová slova: střevní mikrobiota, obezita, metabolický syndrom, T2DM, molekulárně – genetické metody

Gut microbiota in relation to metabolic syndrome, obesity and the development of dysbiosis in patients with type II diabetes mellitus

Summary

The term *microbiota* refers to the entire population of microorganisms – not only bacteria, but also fungi, archaea, viruses, and protozoa. The normal human microbiome is predominantly composed of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, along with *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, and *Verrucomicrobia*. The first two phyla mentioned account for up to 90 % of the gut microbiota. The microbiome plays a key role in nutrient, xenobiotic, and drug metabolism, helps maintain the structural integrity of the intestinal mucosal barrier, and contributes to immunomodulation and protection against pathogens.

In patients with obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), or metabolic syndrome, alterations in the microbiome composition have been observed, partly due to antibiotic use. It is assumed that several factors influence microbiome composition, with antibiotic therapy being one of them.

The aim of this thesis is to describe and compare the bacterial profile of the intestinal microbiome in patients. The research was conducted by the Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences in collaboration with the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM).

The literature review focuses on theoretical knowledge of metabolic syndrome, T2DM, obesity, and the gut microbiome, as well as on molecular genetics methods (including next-generation sequencing) that were also employed in the experimental part of this thesis.

In the experimental part, stool samples were collected from 24 patients, and DNA was subsequently isolated. The composition of the microbiome was analyzed using the PCR-DGGE microbiological method. A total of 24 DGGE gel bands were selected and sent for sequencing by SequeMe (in both forward and reverse directions), with each band sequenced twice. Sequencing failed for five samples, most likely due to low concentration or poor quality of the PCR template. From the 19 successful sequences, nine different bacterial species were identified. Species identification was performed using the BLAST tool, selecting the bacterium with the highest percentage match.

Comparison of results revealed no significant differences in microbial richness across the three time points – before antibiotic treatment, after two weeks of use, and after five weeks of therapy. Likewise, no statistically significant changes were observed in microbial diversity. The most frequently identified species were *Blautia hominis* and *Enterococcus faecium*.

Keywords: intestinal microbiota, obesity, metabolic syndrome, T2DM, molecular genetic methods

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Obezita	11
3.1.1 Definice obezity a její etiologie	11
3.1.2 Patofyziologie obezity a metabolické změny organismu	12
3.1.3 Mikrobiom v souvislosti s obezitou.....	15
3.2 Definice a rozdělení diabetu	17
3.2.1 Charakteristika diabetu mellitu II. typu (T2DM) a jeho klinické projevy	17
3.2.2 Metabolické změny organismu u pacientů s diabetem	18
3.2.3 Léčba diabetu a doporučené vědecké postupy	19
3.3 Metabolický syndrom	22
3.3.1 Definice metabolického syndromu	22
3.3.2 Prevence a léčba metabolického syndromu	23
3.3.3 Souvislost metabolického syndromu a složení mikrobiomu	24
3.4 Mikrobiom	24
3.4.1 Složení střevního mikrobiomu a jeho funkce	25
3.4.2 Faktory, které ovlivňují střevní mikrobiom	27
3.4.3 Mikrobiom a obezita	27
3.4.4 Mikrobiom a T2DM.....	28
3.4.5 Mechanismy, kterými bakterie ovlivňují rozvoj T2DM a obezity	29
3.4.6 Složení mikrobiomu u obézních pacientů a pacientů s T2DM.....	29
3.4.7 Porovnání mikrobiomu pacientů T2DM se zdravými jedinci	30
3.5 Molekulárně genetické metody	31
3.5.1 Stanovení diverzity pomocí PCR - DGGE se sekvenováním bakteriálních kmenů pomocí 16S rRNA – detekce 16S rRNA genu	34
3.5.2 NGS	34
3.5.3 Shannonův index.....	35
4 Materiál a metody	36
4.1 PCR – DGGE metoda	36
4.1.1 DNA cleanup and concentration – protocol steps	38
5 Výsledky	41
5.1 DGGE	42
6 Diskuze	50
7 Závěr.....	52

8	Seznam literatury	54
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	60
11	Seznam obrázků a tabulek	62

1 Úvod

Střevní mikrobiota je úzce spojena se vznikem obezity, s metabolickým syndromem a dřívejším nástupem diabetu II. typu (T2DM). Navzdory moderním a dostupným léčebným postupům počty pacientů s tímto onemocněním rostou. Nekompenzovaný T2DM v kombinaci s nezájmem a nechutí spolupracovat s odborníky u pacienta může vést k velmi závažným zdravotním komplikacím, které pacienta přímo ohrožují na životě. Mezi nejčastější z nich se řadí zhoršená funkce ledvin, zvýšené riziko mrtvice a infarktu myokardu, zhoršené vidění až slepota, špatné hojení ran. Také následná progresse dekubitů, která často končí amputací článků prstů nebo končetin. Řada studií prokázala úzkou souvislost mezi změnami ve složení profilu střevní mikrobioty a vzniku diabetu. U pacientů s obezitou byla často popisována změna poměru v zastoupení kmene *Bacteroides/Firmicutes*. Nicméně v současné době se již tento poměr nedoporučuje.

Zánětlivá reakce střeva, která je typická pro T2DM, je způsobena narušením eubiózy a jejich poměru dvou výše zmíněných kmenů bakterií. Nicméně je potřeba zmínit, že na druhou stranu existují bakterie, které mají ochrannou funkci a dokážou pomoci snížit protizánětlivé markery při rozvoji diabetu. Jedná se především o bakterie *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* a *L. casei*, *Roseburia inneris*, *Akkermansia muciniphila* a *Bacteroides fragilis*.

Antibiotika jsou účinným lékem i důležitou prevencí pro nespočet bakteriálních či ostatních infekčních onemocnění, diabetu či střevních zánětů. Bohužel terapie pomocí antibiotik zejména působí nejen na cílené patogeny, ale i na prospěšné střevní bakterie. Způsobuje tak změnu poměru složení v bakteriálních kmenech či jejich úbytek a je základním parametrem pro vznik střevní dysbiózy.

Tato diplomová práce byla vypracována ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je popsat a zpracovat nejnovější epidemiologické studie na výše zmíněná onemocnění a jejich kombinaci společně s mikrobiomem a dále zmapovat vznik střevní dysbiózy u pacientů s T2DM. V experimentální části je cílem sledovat a popsat bakteriální profily vzorků stolice pacientů s T2DM pomocí molekulárně genetických metod PCR DGGE.

Hypotéza: Forma (druh) a typ podání antibiotik zásadně ovlivní složení mikrobioty trávicího traktu pacientů z krátkodobého i dlouhodobého hlediska (5 týdnů).

3 Literární rešerše

3.1 Obezita

3.1.1 Definice obezity a její etiologie

Obezita je definována jako celosvětový rozsáhlý zdravotní problém, který je podmínován dědičností a prostředím. Složitá interakce mezi genetikou, životním prostředím a střevní mikrobiotou je nadále považována za nedostatečně prozkoumanou (Lin et al., 2021). Je definována jako chronické systémové onemocnění, které je charakterizováno nadbytkem tukové tkáně, která je vytvářena v důsledku pozitivní energetické bilance a nedostatečným množstvím pohybové aktivity. Je mimo jiné spojována s nerovnováhou mezi anabolickými a katabolickými procesy zapojenými do metabolismu lipidů (Bischoff et al., 2020; Lin et al., 2021).

Etiologie obezity definována jako výsledek komplexní interakce několika faktorů, přičemž zásadní význam je přisuzován genetické predispozici a životnímu stylu jedince. Variabilita prevalence obezity je dokumentována v závislosti na socioekonomickém statusu populace. V průběhu posledních tří desetiletí bylo celosvětově zaznamenáno mnohonásobné zvýšení jejího výskytu. Většina evropských zemí eviduje v uplynulých deseti letech nárůst prevalence z přibližně 10 % na 40 %, přičemž v Anglii bylo registrováno téměř trojnásobné zvýšení. Podle údajů Světové zdravotnické organizace WHO (World Health Organization) byla celosvětová prevalence obezity od roku 1975 ztrojnásobena a od roku 1980 zdvojnásobena. Prognózy uvádějí, že do roku 2025 bude obezita diagnostikována u přibližně 18 % mužské a 21 % ženské populace. Podle predikcí uvedených Liu et al., 2021 se očekává, že do roku 2030 dosáhne počet obézních osob na celosvětové úrovni přibližně 1,12 miliardy.

Obezita je spojována s rozvojem četných patologických stavů, jako je diabetes mellitus 2. typu (T2DM), arteriální hypertenze a kardiovaskulární onemocnění. Je rovněž asociována s různými typy malignit, osteoporózou a obstrukční spánkovou apnoí. Léčba obezity je vyžadována jako multidisciplinární a multimodální, přičemž její charakter se liší v závislosti na fázi onemocnění. Za cíl léčby obezity je považováno dlouhodobé snížení tělesné hmotnosti prostřednictvím redukce tukové hmoty v kombinaci s modifikací chování a zlepšením rizikových faktorů spojených s obezitou (Barakat et al., 2021; Endalifer et al., 2020; Bischoff et al., 2020; Lin et al., 2021).

Klasifikace obezity je celosvětově prováděna na základě známého parametru, kterým je index tělesné hmotnosti (BMI). Hodnoty BMI vyšší než 30 kg/m² jsou klasifikovány jako obezita. Přesnost BMI je však zpochybňována, neboť není zohledňováno množství svalové a tukové tkáně u jednotlivých pacientů. Na tento parametr je proto nutné nahlížet kriticky a kombinovat jej s dalšími diagnostickými kritérii. V kohortové studii realizované ve Velké Británii podle Iyen et al., 2021, do které bylo zařazeno 264 230 obézních dospělých s průměrnou hodnotou BMI 33,8 kg/m², bylo potvrzeno, že celkové riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, srdečního selhání a úmrtí bylo zvyšováno s rostoucí mírou obezity. Zvýšené riziko cévní mozkové příhody bylo popsáno ve třetí, nejrizikovější skupině pacientů. Nicméně statisticky signifikantní zvýšení rizika ischemické choroby srdeční a mrtvice v této skupině prokázáno nebylo. Po zohlednění věku, pohlaví a dalších komorbidit bylo ve

skupině pacientů s nejzávažnější formou obezity zaznamenáno zvýšení rizika srdečního selhání 3,3krát a úmrtí spojeného s kardiovaskulárními onemocněními 2,7krát.

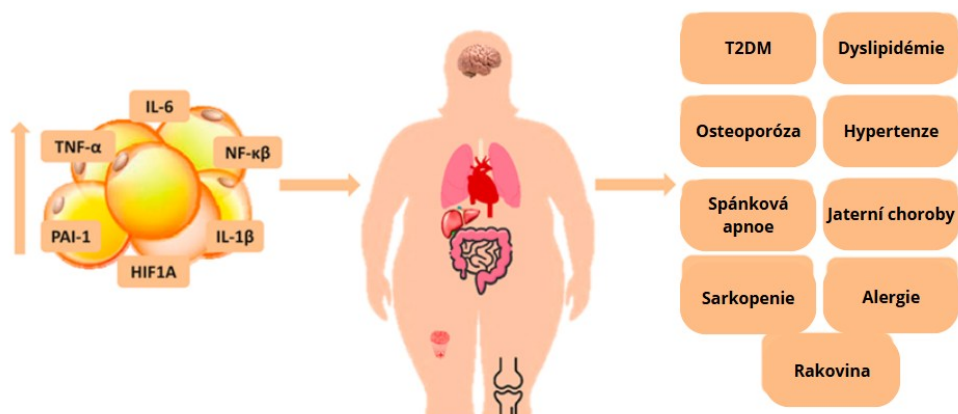
Za nejúčinnější strategii prevence obezity je považována dostatečná nutriční edukace, šíření povědomí o rizicích tohoto chronického onemocnění, podpora pravidelné fyzické aktivity, prosazování zdravého životního stylu a správné nastavení životních návyků, které spolu s dostatečnou délkou spánku a dalšími intervencemi mohou zmírnit dopady obezity (Iyen et al., 2021).

3.1.2 Patofyziologie obezity a metabolické změny organismu

Obezita a nadváha jsou spojovány se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, srdečního selhání a jsou považovány za významnou příčinu úmrtnosti na celosvětové úrovni. V metaanalýze provedené Bogers et al., 2007 bylo prokázáno, že zvýšení hodnoty BMI o dalších 5 jednotek je spojeno s 29 % nárůstem rizika vzniku ischemické choroby srdeční.

U zdravých jedinců je správná funkce metabolismu udržována endokrinním systémem prostřednictvím hormonů a růstových faktorů. Funkce hormonů a růstových faktorů (například inzulinu, glukokortikoidů, androgenů a hormonů štítné žlázy) je zajišťována modulací chuti k jídlu, pocitu sytosti, regulací obsahu a počtu adipocytů. U obézních pacientů je zaznamenáváno zvýšení hladin TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), GDF-15 (growth and differentiation factor 15) a OGT (O-linked N-acetylglukosamin transferáza), což je spojováno se vznikem inzulinové rezistence, mitochondriální dysfunkce, inhibice lipolýzy a zvýšené akumulace viscerálního tuku (Barakat et al., 2021).

U obézních dospělých je tuk predominantně ukládán v rámci bílé tukové tkáně, která je považována za hlavní energetický zásobní orgán. Tato tkáň je tvořena podkožní a viscerální složkou a je složena převážně z adipocytů, v nichž jsou akumulovány tukové kapénky pocházející z triacylglycerolů. Tyto kapénky mohou být následně mobilizovány za účelem zajištění energetických potřeb periferních tkání. Expanze bílé tukové tkáně u obézních jedinců je asociována s rozvojem chronické zánětlivé odpovědi, při níž dochází ke zvýšení koncentrace mediátorů negativně ovlivňujících imunitní systém. Tuková tkáň je rovněž zodpovědná za aktivaci enzymu c-Jun NH₂ terminální kinázy (JNK) a signální dráhy nukleárního faktoru kappa B (NF-κβ). Aktivace těchto signálních cest podporuje zvýšenou expresi prozánětlivých cytokinů, včetně tumor nekrosis faktoru alfa (TNF-α), interleukinu-1 (IL-1) a interleukinu-6 (IL-6). Tyto cytokiny významně přispívají k rozvoji inzulinové rezistence, aterosklerózy, jaterních onemocnění a ke zvýšenému riziku vzniku některých malignit (Barakat et al., 2021).



Obrázek č.1 Změny v metabolismu u pacientů s obezitou, upraveno dle studie Barakat et al., 2021. *Biochemical and immunological changes in obesity, 2021. In: National Library of Medicine [online]. [cit. 2025-04-18]. Dostupné z : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34102165/>*

T2DM je podrobněji probíráán v kapitolách níže. Další komorbiditou metabolického syndromu je dyslipidémie, která se vyznačuje zvýšenou hladinou lipoproteinů LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou), celkového cholesterolu a triacylglycerolů, a naopak sníženou hladinou HDL (lipoproteiny s vysokou hustotou) frakce. Tento stav je korelován s rozvojem aterosklerotických plátů, které jsou považovány za hlavní faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění a mozkových příhod – například ischemie mozku, srdce a dolních končetin. Nejčastěji k těmto úkazům dochází v koronárních tepnách či krkavicích. LDL částice pronikají do lézí v endotelu tepen a vážou se na proteoglykany. Dochází k oxidaci LDL frakcí, zvýšení obsahu monocytů a leukocytů. Tyto frakce se spojují ve fibrózní tkáň, a to i v důsledku současného vylučování kolagenu, elastinu, proteoglykanů a glykosaminoglykanů. V průběhu let, jsou buňky vystaveny apoptóze, jejíž výsledkem jsou nekrotická jádra v pokročilých stádiích, která kalcifikují (Barakat et al., 2021).

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou hlavními příčinami morbidit a mortality. Arteriální hypertenze je definována hodnotami systolického krevního tlaku ≥ 140 mmHg a diastolického krevního tlaku ≥ 90 mmHg. Angiotenzin-renin systém je považován za hlavní mechanismus regulace krevního tlaku, elektrolytů a vodní bilance. U obézních jedinců je zaznamenána zvýšená koncentrace reninu v krevní plazmě, což naznačuje přetížení tohoto regulačního systému a současnou dysfunkci endotelu.

Další komplikace, jež se vyskytují u pacientů s obezitou, zahrnují onemocnění jater. Tzv. nealkoholické ztukovatění jater (steatóza) může progredovat do fibrózy a v závěrečném stádiu i do cirhózy. Nadměrný příjem kalorií, nezdravých tuků a konzumace alkoholu jsou faktory, které vedou k hromadění tukových depozit kolem jater a k akumulaci lipidů v hepatocytech.

Mezi další významné komplikace obezity patří i zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění. Genetické predispozice představují jeden z rizikových faktorů. Nicméně vliv prostředí je považován za klíčový. Zahrnuje expozici karcinogenním faktorům, jako jsou UV záření, kouření, nadměrný příjem alkoholu a obezita. Ztráta funkce kritických genů (např. MSH2 - MutS homolog 2 a BRCA1 - BReast CAncer gene 1) a následná modifikace

reparačních proteinů DNA, které umožňují neomezené dělení buněk, přispívá k riziku vzniku metastáz a modifikaci energetického metabolismu.

U obézních pacientů hormonální změny přispívají k procesu karcinogeneze, progresi nádorů a jejich metastázování. Přebytek bílé tukové tkáně je přímo spojen s proliferací neoplastických buněk, které se vyskytují v mléčné žláze, žaludku a děloze. Tyto buňky využívají mastné kyseliny (MK) ze sousední tukové tkáně k produkci energie. Tyto vedlejší účinky vedou ke zintenzivnění progresu nádorových procesů. Makrofágy, které jsou přítomny v tukových tkáních, se nacházejí v bezprostřední blízkosti nádorových buněk. Tyto buňky aktivují prozánětlivé cytokiny a přímo ovlivňují progresi nádorových procesů. Tato skutečnost je považována za důkaz intenzivnějšího protumorového fenotypu, který je charakterizován zvýšenou proliferací, invazí a migrací neoplastických buněk. Kromě toho dochází k podpoře změněné sekrece autofagie a zvýšení uvolňování volných MK, leptinu, IGF-1 (inzulin-like growth factor) a současnému poklesu adiponektinu, což přispívá k rychlému rozvoji nádorových buněk u obézních jedinců.

Pacienti s nadváhou mohou vykazovat vyšší sklony k rozvoji alergických reakcí, osteoporóze a sarkopenii (Barakat et al., 2021).

Osteoporóza je patologický stav, který je charakterizován ztrátou kostní hmoty. Tento stav je způsoben biomechanickým a mikroarchitektonickým poškozením, které vzniká v důsledku nerovnováhy mezi procesem tvorby a resorpce kosti. Vedle toho dochází ke zlomeninám, přičemž postihuje zejména kosti zápěstí, páteře, kyčle, proximálního humeru a tibie. Vysoká hladina prozánětlivých látek, jako jsou TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-17, je spojena se zhoršenou funkcí receptorového aktivátoru jaderného faktoru- κ B ligandu (RANKL), který podporuje demineralizaci kostí prostřednictvím osteoklastů.

Zvýšené koncentrace TNF- α a IL-6 potlačují produkci osteoblastů a podílejí se na deregulaci drah TGF- β (Tumor Growth Factor β) a kostních morfogenetických proteinů (BMP). Sarkopenie je charakterizována nízkým procentem aktivní svalové hmoty a zvýšeným procentem tělesného tuku. Doprovází ji snížená pohyblivost v důsledku fyzické nečinnosti a může být klasifikována jako primární (postihuje seniory, kde je věk považován za podmíněný faktor) a sekundární (postihuje mladší populaci, přičemž nejčastěji vzniká jako důsledek chronického onemocnění). Sarkopenická obezita je definována negativní oboustrannou biochemickou interakcí mezi svalovou hmotou a tukovou tkání (Barakat et al., 2021).

Tuková tkáň	Změny	Následky
<i>Viscerální</i>	↑TRAIL ↑GDF-15 ↑OGT	Inzulinová rezistence, mitochondriální dysfunkce, inhibice lipolýzy a zvýšená cirkulace a ukládání viscerálního tuku
	↑TNF- α , IL-1, IL-6	Zánětlivost, metabolické změny, hypertrofie adipocytů, inzulinová rezistence
	↑Makrofágy ↑H1F1A	
<i>Podkožní</i>	↑Cholesterol	Inhibice PDGH- α genu
	Hypertrofie a hyperplasie adipocytů	↑TAG a diferenciace adipocytů
	Genová aktivace (Saa3, Agt, Opgn)	Exprese zánětlivých cytokinů
<i>Mesenterický</i>	Infiltrace makrofágů a zánětlivá odpověď (CRP)	Systematická zánětlivá odpověď

Tabulka č. 1 popisuje hlavní biochemické a imunologické změny a jejich následky, upraveno dle Barakat et. al., 2021. Biochemical and immunological changes in obesity, 2021. In: National Library of Medicine [online]. [cit. 2025-04-18]. Dostupné z : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34102165/>

3.1.3 Mikrobiom v souvislosti s obezitou

Ve střevech je přítomno až 100 bilionů symbiotických mikrobů, přičemž strava hraje jednu ze zásadních rolí. Mikrobiota lidského trávicího traktu je ovlivňována genetickými, imunologickými a environmentálními faktory. Podílí se na etiologii obezity tím, že ovlivňuje absorpci energie, centrální chuť k jídlu, ukládání tuků nebo cirkadiální rytmus. Je prokázáno, že variace střevního mikrobiomu způsobují změny v hostitelském organismu. Aktivní střevní mikrobiota produkuje relativně velké množství fyziologicky aktivních látek, mezi které patří mastné kyseliny s krátkým řetězcem, vitaminy, antioxidanty, ale i potenciálně škodlivé látky. Mezi tyto látky patří například neurotoxiny, karcinogeny nebo imunotoxiny. Tyto látky mohou vstupovat do krve, přímo regulovat expresi genů a negativně ovlivňovat jejich funkci. Také mají negativní vliv na imunitní a metabolické procesy (Liu et al., 2021; Bischoff et al., 2020).

Normální střevní mikrobiota lidského těla je tvořena především bakteriemi z kmene *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteus*, *Actinomycetes*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*. U obézních pacientů je často popisována snížená diverzita střevních bakterií, v níž převažuje kmen *Firmicutes* díky nárůstu tělesného tuku. Při obezitě je často popisován nárůst bakterií rodu *Lactobacillus*, *E. coli* a *Faecalibacterium*. Tyto druhy jsou spojeny s funkcí odstraňováním většího množství energie ze stravy, což může přispívat k pozitivní energetické bilanci. Střevní mikrobiota je u jedinců s vyváženou stravou, která je bohatá na vlákninu, udržována v homeostáze (Bischoff et al., 2020; Lin et al., 2021).

U obézních pacientů s vysokým kalorickým příjmem a nízkým přísunem vlákniny jsou pozorovány změny v buňkách střevního imunitního systému trávicího traktu. Tato skutečnost prohlubuje dysbiózu ve střevní mikrobiotě. Nerovnováha mikrobiálních populací je spojována s celou řadou onemocnění, například se zánětlivými střevními onemocněními, rakovinou nebo T2DM. Dochází ke zvyšování IFN γ (Interferon γ), T – lymfocytů a zároveň ke snižování hladin molekul, které pomáhají udržovat stav v rovnováze. Také dochází ke zvýšení exprese lipopolysacharidů a ke transkripci prozánětlivých molekul (například IL – 1 a 6 nebo TNF- α). Postupně dochází k destrukci hlenové vrstvy, podpoře zánětlivých reakcí a změně v trávicím traktu. U obezity jsou kromě střevní dysbiózy popisovány také dysfunkce metabolismu, především glukózy a lipidů, jež má za následek vznik diabetu T2DM (Bischoff et al., 2020; Lin et al., 2021; Barakat et al., 2021).

Z výše zmíněných důvodů je střevní dysbióza často pozorována u obezity a u s ní často souvisejících metabolických onemocnění. Řešením by mohla být možnost FMT (fekální mikrobiální transplantace). Touto problematikou se zabývala studie podle Aron-Wisnewsky et al., 2019. Nicméně je potřeba zmínit, že momentálně existují pouze omezené důkazy o použití FMT v metabolickém kontextu a je zapotřebí provedení dalšího výzkumu.

Modulaci střevní mikrobioty, kterou by mohla ovlivnit kontrola glukózy, se zabývala také studie podle Gérard et al., 2019, která mimo jiné zkoumala i vliv na produkci SAFA (mastných kyselin s krátkým řetězcem), změny se složením žlučových kyselin a zánětem tukové tkáně. U některých pacientů údaje ze studie podle Aron-Wisnewsky et al., 2019 prokázaly, že osoby trpící nejzávažnější inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem nevykazují žádný příznivý účinek FMT od štíhlého dárce v souvislosti s citlivostí na inzulin. K dosažení relevantních výsledků v oblasti metabolických poruch je nezbytné více dopodrobna zhodnotit a prozkoumat vliv FMT u pacientů s poruchou metabolismu a různým stupněm inzulinové rezistence u diabetiků 2. typu. A ačkoliv FMT prokázala svou účinnost u CD (clostridiové infekce) infekce a IBD (nespecifické střevní záněty) je potřeba provést mnohem rozsáhlejší výzkum, zda lze tento postup rozšířit i na pacienty s T2DM a na ty, kterým se hodnoty glykémie i přes farmakologickou léčbu nezlepšují. Nicméně stále nelze s jistotou říci, zda má FMT nějaký účinek u pacientů s chronickým onemocněním, těžkou inzulinovou rezistencí právě kvůli nadměrnému užívání léků několikrát denně, které snižují hladinu glukózy. Výsledky sice poukazují na fakt, že by FMT mohla zlepšit metabolický stav a citlivost na inzulin, nicméně dalším výzkumem je nutné ověřit, zda má nějaký vliv na úbytek hmotnosti u obézních osob (Aron-Wisnewsky et al., 2019).

Na závěr této kapitoly je vhodné zmínit, že souvislost mezi diverzitou střevní mikrobioty a nemocemi nemusí být nutně přítomna. Konkrétně se touto problematikou zabývala například studie podle Ma et al., 2019. Statistická analýza ukázala, že pouze v 1/3 případů existoval významný vztah mezi bakteriální diverzitou a onemocněními souvisejícími s mikrobiotou. Vzhledem k tomu, že bakteriální ekosystémy mohou být do značné míry stabilní a mohou prokazovat určitou odolnost vůči nemocem, je potřeba se zaměřit na to, zda se může objevit souvislost mezi onemocněním a jeho náhlou progresí v případě konkrétního stavu u pacienta.

Obezita jako onemocnění může přímo souviset s dysbiózou bakteriálního ekosystému (Ma et al., 2019; Lin et al., 2021).

3.2 Definice a rozdělení diabetu

Diabetes 1. a 2. typu jsou popsány jako hlavními podtypy, každý s jinou patofyziologií, projevy a léčbou. T1DM je zpravidla diagnostikován v dětském věku nebo u dospívajících, zatímco T2DM postihuje dospělé pacienty středního a vyššího věku, u nichž je dlouhodobá hyperglykémie způsobena nezdravým životním stylem. Patogeneze těchto dvou typů je výrazně odlišná, což vede k odlišné etiologii, projevům a léčbě. Celosvětově stále převládá T2DM, který tvoří 90 – 95 % případů (Cole et al., 2020; Sapra et al., 2023).

Diabetes je rozdělen do několika typů – T1DM, T2DM, diabetes typu MODY (maturity-onset diabetes of the young) a gestační diabetes. MODY je považován za heterogenní onemocnění, které se projevuje diabetem nezávislým na inzulínu, diagnostikovaným v mladém věku, obvykle do 25 let. Onemocnění se dědí autozomálně dominantně a nezahrnuje autoprotilátky, jak je tomu u T1DM. Na vzniku tohoto typu diabetu se podílí několik genů, včetně mutací HNF1 α (Hepatic Nuclear Factor 1 α) a GCK (glukokináza), které jsou přítomny v 15 až 32 % případů (Cole et al., 2020; Sapra et al., 2023; Fajans et al., 2001; Shields et al., 2010).

V problematice gestačního diabetu není přesný vývoj znám, přičemž výsledky studií ukazují na roli antigenů HLA (Human Leucocyte Antigene) a nadměrného množství proinsulinu, který může vyvolat stres beta buněk slinivky, nebo vyšší koncentrace hormonů, jako jsou progesteron, kortizol, prolaktin a estrogen, které mohou ovlivnit periferní citlivost na inzulín (Sapra et al., 2023).

3.2.1 Charakteristika diabetu mellitu II. typu (T2DM) a jeho klinické projevy

T2DM je považováno za jedno z nejrychleji rostoucích onemocnění endokrinního systému na světě. Podle dosavadních prognóz se očekává, že do roku 2045 jím bude trpět přibližně 693 milionů dospělých, což představuje nárůst o přibližně 50 % ve srovnání s rokem 2017. Projevuje se abnormálně zvýšenou hladinou glukózy v krvi, přičemž tomuto stavu obvykle předchází inzulínová rezistence. Je považováno spíše za soubor stavů, které jsou široce kategorizovány podle různých kritérií. Komplikace spojené s diabetem, jako například zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, zhoršená funkce ledvin, diabetická retinopatie a neuropatie, vedou k vyšší úmrtnosti, slepotě, selhání ledvin a celkovému zhoršení kvality života pacientů s tímto onemocněním. Nárůst T2DM je obvykle pozorován v pozdějším věku, ačkoliv obezita u dospívajících vedla k nástupu T2DM i v mladší populaci. Prevalence T2DM je pozorována přibližně v 9 % celkové populace USA a 25 % z nich je tvořena obyvateli starších 65 let (Sapra et al., 2023).

Inzulinová rezistence je považována za multifaktoriální stav, jehož vznik je nejčastěji spojen s obezitou a procesem stárnutí. Pro vznik tohoto typu diabetu, stejně jako pro T1DM, je genetický základ považován za klíčový rizikový faktor. Nicméně, u T2DM se jedná o složitou interakci genetických predispozic a faktorů životního stylu. Existují rozsáhlé důkazy, které naznačují, že většina pacientů trpících tímto onemocněním má alespoň jednoho rodiče, který trpí stejným typem diabetu. Tato zjištění byla potvrzena prostřednictvím rozsáhlé populační studie, jak ukazuje výzkum Klein et al., 1996 (Klein et al., 1996; Sapra et al., 2023).

Mezi nejčastější klinické projevy rozvíjejícího se onemocnění je žízeň, polyurie a s nimi spojená únava, která je neustále stupňována. Pacient může být asymptomatický a nemusí nevykazovat žádné příznaky i při hodnotách glykémie, které převyšují hranici 10 mmol/l. Zřídka bývá diagnóza potvrzena v souvislosti s diagnózou jiného onemocnění (například ischemické choroby dolních končetin nebo srdce, cévní mozkové příhody, srdečního selhání atp). T2DM je diagnostikován například pomocí zvýšených hladin glykémie (nad 10 mmol/l), OGTT (glukózovým tolerančním testem) či pomocí výše glykovaného hemoglobinu (Goyal et al., 2023).

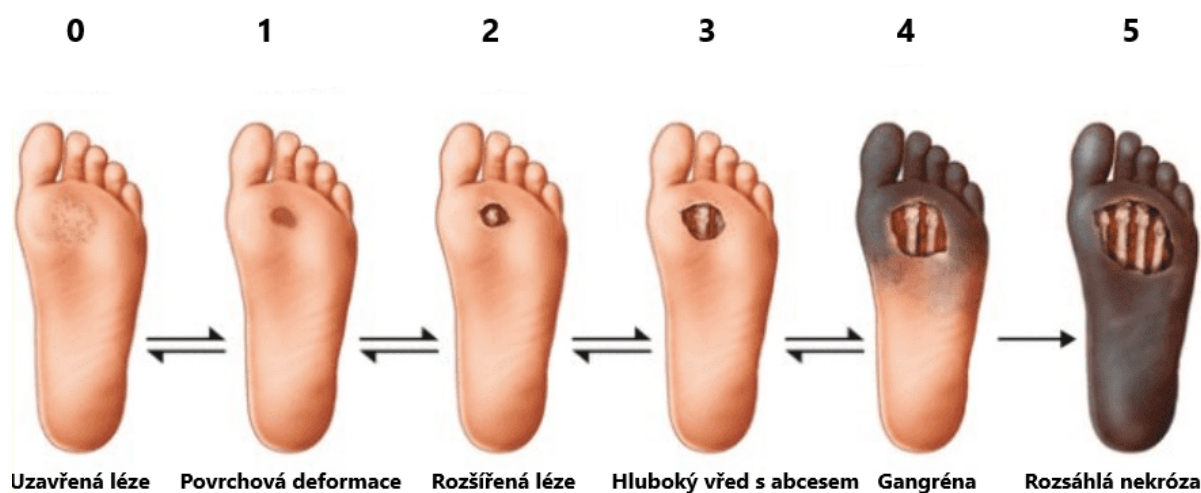
3.2.2 Metabolické změny organismu u pacientů s diabetem

Homeostáza metabolismu je porušována v důsledku začarovaného kruhu hyperglykémie. Osmotická diuréza je vyvolána v důsledku saturace glukózových transportérů v nefronu při vyšších koncentracích glukózy v krvi (Sapra et al., 2023).

Jedná se o stav inzulinové rezistence, který je spojen s dysfunkcí beta-buněk slinivky břišní. Zpočátku dochází k kompenzačnímu zvýšení sekrece inzulinu, které udržuje hladinu glukózy v normálním rozmezí. S postupujícím onemocněním dochází ke změnám v beta-buňkách, což vede k neschopnosti sekrece inzulinu udržet homeostázu glukózy, a tím k rozvoji hyperglykémie. U většiny pacientů s T2DM je pozorována obezita a vyšší procento tělesného tuku, přičemž tuková tkáň podporuje inzulinovou rezistenci prostřednictvím různých mechanismů, včetně zvýšeného uvolňování SAFA a dysregulace adipokinů (Goyal et al., 2023).

Diabetická noha je řazena mezi velmi závažné komplikace diabetu, která je spojována s významnou morbiditou a mortalitou. Mortalita spojená s rozvojem diabetické nohy je odhadována na 5 % během prvních 12 měsíců a pětiletá mortalita na 42 %. V několika zdrojích bylo uvedeno, že 19-34 % pacientů s diabetem bude pravděpodobně během svého života postiženo touto komplikací. Pacienti indikací diabetické nohy mají 2, 5krát vyšší riziko úmrtí ve srovnání se svými diabetickými protějšky bez poranění nohou. Nejčastěji je diabetická noha popisována v oblasti od kotníku až směrem k prstům dolní končetiny. Toto onemocnění je způsobováno tzv. senzorickou neuropatií. Po tomto stavu je u pacientů pozorováno onemocnění periferních cév a angiopatie. Díky zhoršené pohyblivosti, deformace prstů či chodidla, dekompenzaci T2DM, nevhodné obuvi či cizích těles dochází k progresi stavu diabetické nohy. Díky tomu je signifikantně zvyšováno riziko amputace a dalších život ohrožujících komplikací. Ke zhoršení stavu může přispět také nedostatečná edukace, nízký ekonomický status, nedostatečná prevence a hygiena.

Diagnostika a klasifikace vředu je následovná – léze blízko k 0 je téměř neotevřená s malou deformitou. Klasifikace 1 je povrchový vřed, do 2 stupně se zařazuje rozšíření onemocnění do vazů, kloubů nebo šlachy bez zánětu a stupeň 4 je již gangréna, která je lokalizovaná v přední části chodidla. Posledním stupněm s číslem 5 je gangrenózní postižení celé nohy a je nutná amputace (Everett et al., 2018).



Obrázek č. 2 Klasifikace ulcerózních vředů (upraveno dle webu <https://www.pacecvi.com/blog/diabetic-foot-sores>).

Léčba diabetické nohy antibiotiky je podmiňována závažností infekce, charakterem původců, přítomností komplikací a celkovou anamnézou pacienta. U mírných infekcí bývají jako nejčastější etiologičtí činitelé identifikovány gram-pozitivní bakterie, zejména beta-hemolytické streptokoky a *Staphylococcus aureus*, přičemž k terapii jsou indikována antibiotika, jako jsou peniciliny (např. amoxicilin), cefalosporiny (např. cefalexin), klindamycin, linezolid či tetracykliny. V případech těžších infekcí je doporučováno podání širokospektrých antibiotik, například piperacilinu, ertapenemu nebo fluorochinolonů (např. levofloxacinu či moxifloxacinu) (Peters et al., 2020).

3.2.3 Léčba diabetu a doporučené vědecké postupy

Základem léčby by měla být vedená a dlouhodobě udržitelná redukce hmotnosti na zdravou hmotnost. Nicméně současné důkazy naznačují, že neexistuje pro prevenci diabetu ideální procento kalorií ze sacharidů, bílkovin a tuků pro všechny pacienty – rozložení živin by vždy mělo vycházet z kombinace obecných principů a individuálního posouzení současných stravovacích návyků, preferencí a metabolických cílů. Je vhodné zařadit tzv. středomořskou dietu či DASH dietu (stravovací styl určený k prevenci hypertenze) v kombinaci s dostatkem celozrnných obilovin, zeleniny, luštěnin, ryb, ovoce, mléčných výrobků. Měl by být kladen důraz na výběr kvalitních nenasycených tuků a vhodný poměr mezi omega – 3 MK a omega 6 – MK. U pacientů by bylo vhodné dbát na dostatečný příjem

všech základních živin – složených sacharidů pro dostatek stabilní energie, kvalitních tuků pro správnou hormonální rovnováhu a dostatečné množství bílkovin. Dostatek bílkovin (v rozmezí 1,2 – 1,8 g/kg/den po zohlednění aktuálních stravovacích návyků a celkové anamnézy) je signifikantní k zachování svalové hmoty při redukci hmotnosti. Dále je důležitý pravidelný pohyb, který zohledňuje individualitu pacienta. Pravidelný pohyb je řazen mezi klíčové intervence, která mají pozitivní vliv na snížení krevního tlaku, zvýšení citlivosti na inzulin, zlepšení lipidového profilu, fyzické zdatnosti a má pozitivní podíl také na zvýšení sebevědomí a celkové nálady.

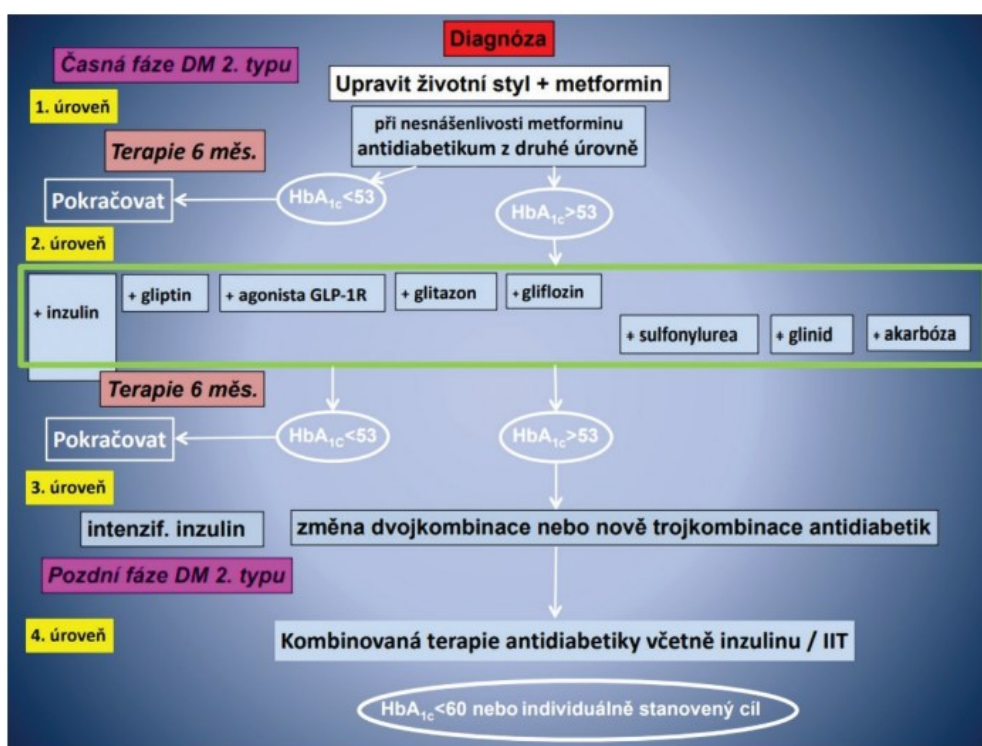
Dalším cílem by také mělo být se snažit zvýšit obyčejný pohyb během dne – např. jít o pár zastávek hromadné dopravy dříve nebo vyjít schody. Za je považováno vybírat druh pohybu, při němž nedochází k poškození kloubů ani pohybového aparátu. Vhodná pohybová aktivita je dalším dílem skládačky důležité intervence obézních pacientů. Je zásadní vybrat pohyb, který nebude příliš intenzivní a nebude docházet k přetěžování kloubů a pohybového aparátu. Vhodné je pro začátek zařazení chůze, nordic walkingu či v mírnější formě nadváhy jízdu na kole či plavání. U jízdy na kole je potřeba, aby si pacient dal pozor na změnu tlaku při sesedání z kola a vyvaroval se tak náhlému kolapsu. Není vhodné zařazovat pohyb v nadměrné míře, na jehož četnost pacienti nebyli zvyklí. Je potřeba nastavit dlouhodobě udržitelné pohybové návyky, které pomohou vytvořit kalorický deficit, což je zásadním předpokladem pro postupnou redukci hmotnosti. U pacientů s diabetem, kteří začínají se sportovní aktivitou je potřeba upozornět nejen při nastavení pohybového režimu, ale také stravovacího režimu. Pacient se nesmí dostat do stavu hypoglykémie, která se může prohloubit dlouhodobější pohybovou aktivitou po nevědomém zvýšení dávky inzulínu nebo při zvolení nevhodného a nedostatečného jídla bez dostatečného množství složených sacharidů.

Pacient může být ohrožen komplikacemi způsobenými nevhodnou obuví a vznikem dekubitů, které mohou být vyvolány přítomností malých kamínků či jiných předmětů v obuvi, případně zcela nevhodnou obuví. Za vhodné je rovněž považováno zařazení psychoterapeutické či psychiatrické podpory, protože u velkého množství pacientů bývají zaznamenávány obtíže spojené se zajiďáním emocí či traumat (Yumuk et al., 2015).

Farmakoterapie diabetu mellitus 2. typu je indikována v případech, kdy režimová opatření a modifikace životního stylu nevedou k adekvátní kompenzaci onemocnění. Za podmínku pro zahájení terapie neinzulinovými preparáty je považováno zachování funkční sekrece inzulínu. Výběr léčiva je determinován požadavky na celkovou bezpečnost s ohledem na kardiovaskulární a renální rizika, dále pak přítomností komorbidit, věkem, rizikem hypoglykémie a ekonomickou dostupností terapie. Perspektivní možností v rámci farmakologické intervence je využití léčiv s inkretinovým efektem (IBTs). K dosažení metabolické kompenzace se využívá široké spektrum farmakologických skupin. Metformin je považován za základní farmakum vzhledem ke schopnosti zvýšit inzulínovou senzitivitu, redukovat chuť k příjmu potravy a poskytnout kardioprotektivní účinky při příznivém ekonomickém profilu. Dalšími možnostmi jsou deriváty sulfonylurey a glinidy s primárním účinkem na postprandiální hyperglykémii, a glitazony, u nichž je nutné počítat s možným výskytem edémů. Mezi moderní terapeutické modalitty patří inkretinová léčba.

GLP-1 receptoroví agonisté (např. liraglutid, exenatid) jsou podávány parenterálně, což je spojeno s vyšší finanční zátěží. Alternativně jsou dostupné perorální DPP-4 inhibitory (např. gliptidy – sitaglipin), které vykazují příznivou kombinovatelnost s ostatními antidiabetickými farmaky (Škrha et al., 2020).

Nedávno byl jako novinka a trend v léčbě a kompenzaci obezity představen přípravek Ozempic. Tento léčivý přípravek, známý pod generickým názvem semaglutid, byl v roce 2017 schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro použití u dospělých s T2DM. Podávání je realizováno formou týdenní injekce. Hladina glukózy v krvi je snižována stimulací slinivky břišní k vyšší produkci inzulínu. Mechanismus účinku spočívá v napodobení přirozeně se vyskytujícího hormonu glukagon-like peptidu 1. Účinnost a bezpečnost přípravku Ozempic byla hodnocena ve studii STEP 1, publikované v roce 2021 v časopise *The New England Journal of Medicine*. Studie byla vedena jako placebem kontrolovaná, trvala 68 týdnů a probíhala na 129 pracovištích v 16 zemích. Ve skupině léčené přípravkem Ozempic byl zaznamenán průměrný úbytek hmotnosti o 14,9 %, zatímco ve skupině s placebem o 2,4 %. Nejčastějšími zaznamenanými nežádoucími účinky byly gastrointestinální potíže, konkrétně nevolnost, zvracení a průjem. Většina těchto příznaků byla hodnocena jako mírné až střední intenzity a v průběhu času došlo k jejich ústupu (Wilding et al., 2021).



Obrázek č. 3 Doporučení České diabetologické společnosti 2017 pro algoritmus léčby hyperglykémie u nemocných s DM 2. typu, převzato z článku Weber et al., 2021. Dostupné z : <https://www.solen.cz/pdfs/far/2021/04/05.pdf>.

3.3 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je definován současným výskytem několika komorbidit. Jedná se o narušený metabolismus glukózy a inzulínu (inzulinová rezistence), nadváhu a mírnou dyslipidémii s hypertenzí. Za zásadní abnormalitu tohoto syndromu je považována inzulínová rezistence. Nicméně faktory jako strava, životní styl, fyzická aktivita společně s dosud neznámými genetickými faktory se podílí na vzniku tohoto komplexního syndromu (Laaksonen et. al., 2002)

3.3.1 Definice metabolického syndromu

Metabolický syndrom je definován jako komplexní porucha metabolismu, jejíž vývoj je úzce spojen s inzulínovou rezistencí a nadbytkem mastných kyselin v organismu. V souvislosti s rostoucím výskytem obezity a inzulínové rezistence je zaznamenáván nárůst počtu případů tohoto syndromu. Inzulínová rezistence je charakterizována sníženou citlivostí buněk na inzulín, což vede ke zpomalené odpovědi na jeho působení. Tímto mechanismem je zvyšováno riziko rozvoje srdečně-cévních onemocnění, T2DM, cévních mozkových příhod a dalších onemocnění souvisejících se životním stylem. Stres, infekční onemocnění či psychogenní přejídání jsou spojovány se zvýšenou produkcí kortizolu, který brání efektivnímu využití glukózy svaly a játry. Výsledkem je opakovaný nárůst glykémie a opakované posílení inzulínové rezistence. Tento začarovaný kruh je podporován také zvýšenou hladinou volných mastných kyselin, které narušují glukózový metabolismus a inzulínovou citlivost, čímž je přispíváno k rozvoji T2DM. Ke vzniku metabolického syndromu je přispíváno kombinací různých faktorů. Mezi neovlivnitelné faktory jsou řazeny pohlaví, věk a etnický původ. Mezi ovlivnitelné složky je zahrnován především způsob života, celkový životní styl a ekonomicko-sociální situace. Preventivní opatření, jako je úprava jídelníčku (omezení jednoduchých cukrů a živočišných tuků, zvýšení příjmu vlákniny) a pravidelná pohybová aktivita, mohou výrazně snížit riziko rozvoje onemocnění. V případě, že změna životního stylu nevede ke zlepšení zdravotního stavu, je indikováno uvažování o farmakologické léčbě. Léčba metabolického syndromu je považována za náročnou, neboť dosud nebyla definována jednotná strategie, která by tento problém řešila komplexně. Terapeutický přístup je zaměřen především na snížení akutních i dlouhodobých zdravotních komplikací, neboť se odhaduje, že pacienti s metabolickým syndromem mají ve srovnání s běžnou populací dvojnásobně zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění a pětinasobně zvýšené riziko vzniku T2DM (Grundy et al., 2016; Grundy et al., 2005; Swarup et al., 2024).

Diagnostická kritéria metabolického syndromu požadují splnění 3 nebo více metabolických abnormalit:

1. Abdominální obezita (centrální obezita) – obvod pasu u mužů > 94 cm, u žen > 80 cm. Typické je ukládání tukové tkáně v oblasti břicha a vysoký poměr obvodu pasu a boků (tzv. WHR – waist hip ratio).
2. Zvýšená hladina triglyceridů > 1,7 mmol/l nebo léčba hypertriglyceridémie.
3. Nízký HDL cholesterol – u mužů < 1 mmol/l a u žen < 1,3 mmol/l nebo Dyslipidémie.
4. Zvýšený krevní tlak – hodnoty nad 130/85 mmHg nebo léčba hypertenze.
5. Glykémie nalačno > 5,6 mmol/l nebo dříve diagnostikovaný T2DM, případně inzulinová rezistence.

3.3.2 Prevence a léčba metabolického syndromu

Všechny složky metabolického syndromu jsou velmi úzce propojeny s životním stylem a prevence spočívá zejména ve snížení rizikových faktorů, snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění a krevního tlaku ve spojitosti s patřičnou nutriční intervencí. Zásadní je tvorba rovnováhy mezi potřebou kalorií a živin a reálným příjmem. Také je doporučováno změny zařazovat postupně, zařadit pohybovou aktivitu, vyhýbat se kouření a snížit množství alkoholu na minimum. Součástí je také správná spánková hygiena, výživa je pouze jedním dílkem ze skládačky. Současné pokyny podle profesních organizací doporučují snížení základní tělesné hmotnosti o 7 – 10 % během 12 měsíců se správně nastaveným kalorickým deficitem a dostatkem fyzické aktivity. American Heart Association a American College of Cardiology je doporučováno 150 minut středně intenzivní nebo 70 minut vysoce intenzivní fyzické aktivity týdně. Ke snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění je doporučována již výše zmíněná tzv. středomořská strava. Je vhodné velmi střídme nebo minimálně zařazovat potraviny bohaté na vysoký obsah soli, cukru a nekvalitního tuku. Je nezbytně nutné obecná doporučení plně individualizovat a ideálně kombinovat nutriční intervenci s psychologickou podporou. Pokud režimová opatření nefungují, je na místě zvážit farmakologickou léčbu (Swarup et al., 2024).

Léčba metabolického syndromu je vyžadována multidisciplinárním týmem, zahrnujícím spolupráci kardiologa, obezitologa, endokrinologa, nutričního terapeuta, fyzioterapeuta a psychologa či psychiatra. U pacientů s metabolickým syndromem je medikamentózní terapie běžně doporučována k léčbě dyslipidémie, hypertenze, inzulinové rezistence nebo T2DM. Současné doporučení stanovují přesné měření a pravidelnou dokumentaci krevního tlaku tlakoměrem. Je nezbytné diagnostikovat a léčit reverzibilní příčiny, včetně zhoršujících se faktorů hypertenze. Výběr antihypertenziv závisí na přidružených komorbidních stavech a dalších rizikových faktorech. Mezi léky doporučené pro léčbu inzulinové rezistence patří metformin, inhibitory dipeptidylpeptidázy-4 (DPP-4), agonisté glukagonu podobného peptidu-1 (GLP-1) a pioglitazon. Pacienti, u kterých selhává farmakologická léčba, mohou podstoupit chirurgický zákrok. Nejběžnějšími výkony jsou v současnosti laparoskopická nastavitelná bandáž žaludku, laparoskopický bypass žaludku a laparoskopická sleeve gastrektomie.

Bariatrická operace je doporučována u pacientů s BMI ≥ 40 kg/m² nebo u pacientů s BMI ≥ 35 kg/m² a dalších komorbidit. Po operaci by měli být pacienti dlouhodobě sledováni, aby se předešlo chirurgickým, nutričním a psychiatrickým komplikacím (Swarup et al., 2024).

3.3.3 Souvislost metabolického syndromu a složení mikrobiomu

V klinických studiích, které byly provedeny na obézních pacientech, byly potvrzeny specifické změny ve složení střevního mikrobiomu – například snížení kmene *Bacteroidetes* a proporcionálního zvýšení *Firmicutes*. Navíc bylo zjištěno u žen s nadváhou snížení rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. Oproti tomu došlo ke zvýšení rodů *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* a *Escherichia coli* ve srovnání s těhotnými ženami s normální hmotností. Ve studii zaměřené na obézní dvojčata byla zaznamenána snížená diverzita mikrobioty, zejména pokles *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*, ale bez výrazné změny *Firmicutes*.

Byla také popsána nízká bakteriální rozmanitost a pokles prospěšných bakterií (např. *Akkermansia muciniphila*) u pacientů s nadváhou, sníženou tvorbou ochranného butyrátu nebo zvýšeným rozkladem hlenu a vyšším oxidačním stresem (Festi et al., 2014).

3.4 Mikrobiom

Pod pojmem mikrobiota je označována celá populace mikroorganismů – zahrnuje nejen bakterie, ale také další mikroby jako houby, archea, viry a prvoky. V současnosti je o lidský mikrobiom velký zájem, nejen z důvodu spojení střevní mikrobioty s řadou onemocnění, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění, syndrom dráždivého tračníku, metabolická onemocnění a alergie. U neurologických onemocnění však není dostatečné množství důkazů pro potvrzení možného vzniku při dysbióze (Jandhyala et al., 2015; Rinninella et al., 2019).

Střevní mikrobiom je kódován více než 3 miliony genů produkujícími tisíce metabolitů, zatímco lidský genom je tvořen přibližně 23 000 geny. Na tvorbě mikrobioty je podílvena volba způsobu porodu (vaginální nebo císařský řez), strava v kojeneckém věku a v dospělosti, případně užívání antibiotik. Mikrobiom je ovlivňován rozdíly mezi jednotlivci, zejména v důsledku enterotypů, odlišnosti stravovacích návyků, frekvencí pohybu a celkově rozdílnosti v životním stylu. V souladu s tím není dosaženo stejného složení střevní mikrobioty, protože je každému jednotlivci vlastní. Je však nezbytné, aby byla respektována zdravá rovnováha mezi hostitelem a mikroorganismy, což umožňuje optimální plnění správných metabolických a imunitních funkcí a prevenci nerovnováhy střevních bakterií a souvisejících komplikací (Jandhyala et al., 2015; Rinninella et al., 2019).

V posledních letech bylo vědcům umožněno pomocí nových technologií fylogeneticky identifikovat nebo kvantifikovat složky střevní mikrobioty analýzou nukleových kyselin (DNA a RNA) získaných přímo ze stolice. Většina těchto technik je založena na extrakci DNA a amplifikaci genu 16S ribozomální RNA. Sekvenování 16S rRNA se stalo nejužitečnější technikou pro zvýraznění rozmanitosti a početnosti mikrobiomu. Sekvence genu 16S rRNA lze využít pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a metagenomického sekvenování k charakterizaci mikrobiálních kmenů (Rinninella et al., 2019).

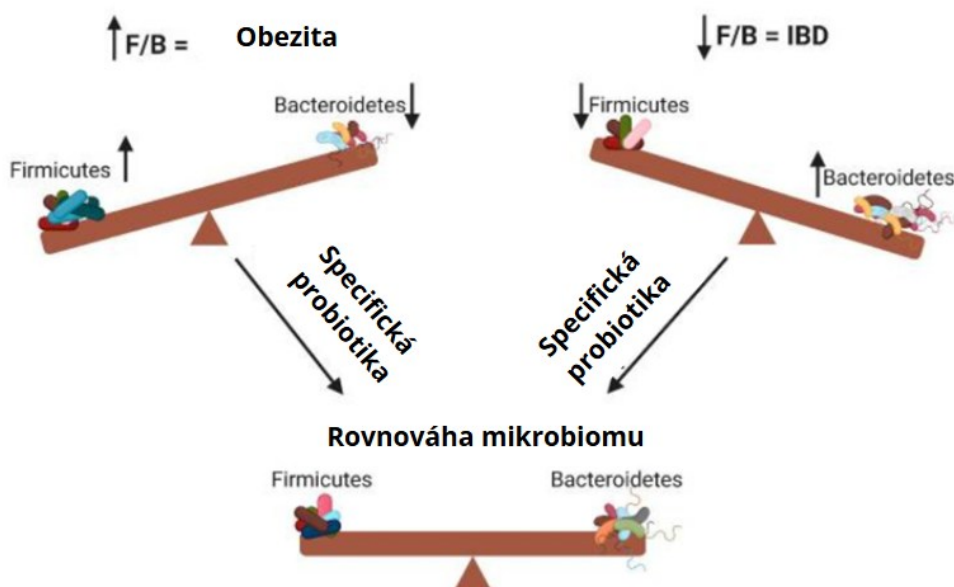
3.4.1 Složení střevního mikrobiomu a jeho funkce

Normální lidský mikrobiom je složen z kmenů *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*. Dva hlavní kmeny (tj. *Firmicutes* a *Bacteroidetes*) představují až 90 % střevní mikrobioty. Ve 3 letech věku dětí se střevní mikrobiota se začíná podobat mikrobiomu dospělých. Normální střevní mikrobiota má za úkol zajišťovat hostiteli specifickou funkci v metabolismu živin, xenobiotik a léčiv, udržovat strukturální integritu střevní slizniční bariéry a podílet se na imunomodulaci a ochraně před patogeny. Dysbióza střevní mikrobioty je totiž spojena nejen se střevními poruchami (Jandhyala et al., 2015; Rinninella et al., 2019).

Střevní mikrobiota je rozlišena nejen podle jednotlivých částí trávicího traktu – každá oblast má své odlišné fyziologické podmínky, pH, obsah kyslíku a je odlišována mezi sebou také rychlostí průchodu tráveniny (nejrychleji proudí od úst po slepé střevo, dále se její tok zpomaluje). Tenké střevo je považováno za náročnější prostředí pro mikrobiální kolonizaci, a to zejména kvůli vysoké koncentraci žluči a krátké době průchodu (v rozmezí od 3 do 5 hodin). Tlusté střevo hostí nejvyšší množství mikroorganismů, především obligátně anaerobních bakterií. S postupem do dalších částí trávicího traktu roste zastoupení striktně anaerobních druhů, zatímco počet fakultativně aerobních bakterií klesá (Rinninella et al., 2019).

Střevní bakterie jsou považovány za klíčové regulátory trávení podél gastrointestinálního traktu. Komenzální bakterie hrají zásadní roli při extrakci, syntéze a absorpci mnoha živin, jako jsou lipidy, aminokyseliny, vitamíny, mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SAFA) a metabolity, včetně žlučových kyselin. Střevní mikrobiota rovněž přispívá k prevenci nerovnováhy mezi jednotlivými kmeny tím, že udržuje integritu střevního epitelu. Mikroorganismy zabraňují patogenní kolonizaci prostřednictvím mnoha konkurenčních procesů, jako je metabolismus živin, modifikace pH, sekrece antimikrobiálních peptidů a ovlivňování signálních drah buněk. Nedávné studie navíc identifikovaly kritickou roli komenzálních bakterií a jejich produktů v regulaci vývoje, homeostázy a funkce buněk vrozené a adaptivní imunity (Rinninella et al., 2019).

Homeostáza mikrobiomu je považována za klíčovou pro udržení normální a zdravé funkce lidského těla, přičemž mnoho terapeutických strategií je navrženo s cílem dosažení vhodného poměru mezi kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Podávání prebiotik, probiotik, synbiotik, či transplantace stolice a bakteriálního konsorcia byly testovány jako metody modifikace střevní mikrobioty. Modifikací mikrobioty směrem k pozitivnímu efektu může být potenciálně dosaženo léčby řady onemocnění, pozitivního působení proti obezitě a zánětům.



Obrázek č. 4 Změny v poměru kmenů bakterií rodu *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. (syndrom dráždivého tračníku – IBD)
Upraveno dle Stojanov et al., 2020. Dostupné z : doi:10.3390/microorganisms8111715. Nevhodný poměr k jedné či druhé straně může způsobit predispozici k obezitě nebo ke střevním zánětům.

Nicméně touto problematikou se byla zabývána studie podle Magne et al. (2020). Souhrnně lze konstatovat, že velmi vysoká variabilita v relativním zastoupení rodů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* mezi jednotlivci v rámci stejné populace byla zjištěna. Tato variabilita je pravděpodobně ovlivňována řadou faktorů souvisejících s životním stylem, včetně stravy, fyzické aktivity, užívání antibiotik a dalších environmentálních vlivů, které modifikují složení střevní mikrobioty. Tento fakt může být využit k vysvětlení rozporů ve výsledcích studií porovnávajících mikrobiotu osob s normální hmotností a obézních. Přímá souvislost mezi změnami v poměru *Firmicutes/Bacteroidetes* a obezitou dosud nebyla dostatečně prokázána. Poměr *Firmicutes/Bacteroidetes* již není v současných doporučeních považován za aktuální. V budoucích studiích by měly být jednotlivé subjekty detailněji charakterizovány a konkrétní faktory ovlivňující složení mikrobioty jasně vymezeny. Namísto snahy o identifikaci univerzálního taxonomického markeru obezity by mělo být upřednostněno zaměření výzkumu střevní mikrobioty spojené s obezitou na identifikaci taxonomických markerů umožňujících diferenciaci pacientů do specifických podskupin. Zavedením diferenciací mikrobiomu pacientů by mohla být umožněna personalizace léčby obezity, což by vedlo k efektivnější a cílenější terapii.

3.4.2 Faktory, které ovlivňují střevní mikrobiom

Složení střevní mikrobioty je během života dynamicky měněno. Kolonizace střevního mikrobiomu je zahajována již při porodu, který je považován za první klíčový moment. U předčasně narozených dětí je často zaznamenávána nižší mikrobiální rozmanitost a vyšší zastoupení potenciálně patogenních druhů. Způsob porodu je rovněž považován za významný faktor – vaginálním porodem je podporována větší bakteriální diverzita, která přispívá k pozitivní modulaci imunitního systému. Podle studie Rinninella et al., 2019 je u kojenců živěných mateřským mlékem zjišťováno vyšší zastoupení bakterií rodu *Bifidobacterium* a nižší výskyt *Clostridium difficile* a *Escherichia coli* ve srovnání s kojenci krmenými umělou výživou.

Střevní mikrobiota je považována za zásadního činitele v procesu trávení potravy, neboť disponuje geny kódujícími trávicí enzymy, které lidskými buňkami produkovány nejsou. Těmito enzymy je umožněn metabolismus a fermentace různých složek potravy, čímž jsou hostiteli přinášeny nutriční benefity. Hlavními metabolickými produkty střevních bakterií jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SAFA), zejména acetát, propionát a butyrát, které jsou produkovány během anaerobní fermentace nestrávených sacharidů (Stojanov et al., 2020).

3.4.3 Mikrobiom a obezita

Vznik obezity je ovlivňován střevní mikrobiotou prostřednictvím přímých interakcí s proximálními orgány a nepřímých interakcí se vzdálenými orgány, zprostředkovaných metabolickými produkty, zejména mastnými kyselinami s krátkým řetězcem (SAFA), včetně komunikace s játry, tukovou tkání a mozkem. Zásadní role při rozvoji obezity je přisuzována SAFA, neboť jejich působením dochází k interakci s tukovou tkání prostřednictvím dvou receptorů spážených s G-proteiny exprimovaných v adipocytech (Gpr41 a Gpr43). Tímto je podporována tvorba adipocytů a inhibována lipolýza. Rovněž je zaznamenáváno snížení syntézy hormonů potlačujících hlad, jako je leptin, peptid YY a glukagon-like peptid. Chuť k jídlu a pocit sytosti jsou ovlivňovány střevní mikrobiotou prostřednictvím aktivace bloudivého nervu nebo imunitně–neuroendokrinních mechanismů. Metabolismus žlučových kyselin je střevní mikrobiotou podporován a jaterní homeostáza triacylglycerolů (TAG) a glukózy je jejím působením modifikována. Modulace střevní mikrobioty, společně se změnou stravovacích návyků a suplementací probiotiky, je považována za slibný přístup k prevenci i léčbě obezity (Stojanov et al., 2020).

Studie, které byly zaměřené na konkrétní bakteriální druhy ukázaly, že u jedinců s vyšší tělesnou hmotností jsou častěji pozorovány druhy jako *Blautia hydrogenotrophica*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium ventriosum*, *Ruminococcus bromii* a *Ruminococcus obeum*. Naproti tomu u štíhlých pacientů převažují druhy *Bacteroides faecichinchillae*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Blautia wexlerae*, *Clostridium bolteae* a *Flavonifractor plautii*. Tyto rozdíly lze částečně vysvětlit odlišnou schopností bakterií produkovat enzymy štěpící sacharidy. Například *Ruminococcus bromii*, z kmene Firmicutes, se výrazně podílí na odbourávání rezistentního škrobu, a to efektivněji než jiné druhy jako *Eubacterium rectale*, *B. thetaiotaomicron* nebo *Bifidobacterium adolescentis* (Stojanov et al., 2020).

Probiotika, která měla potenciál snížit poměr F/B a obezitu jsou většinou bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bacillus* a kvasinky z rodu *Saccharomyces* (Stojanov et al., 2020).

3.4.4 Mikrobiom a T2DM

Mikrobiom je považován za složku, která významně přispívá k posílení imunity jedince, usnadňuje trávení potravy, reguluje střední endokrinní funkce, nervovou signalizaci, modifikuje účinky léků a ovlivňuje metabolismus. Rovněž je připisována role v eliminaci toxinů. Střevní mikrobiální metabolity vstřebané hostitelem působí na receptory v orgánech (játra, střevo, hnědá tuková tkáň a centrální nervový systém) a podílejí se na syntéze mikronutrientů, regulaci střevní motility, vstřebávání minerálních látek a elektrolytů (Jiang et al., 2024).

Ve studii Le Chatelier et al., 2013 bylo potvrzeno, že jedinci s nízkým zastoupením střevního mikrobiomu jsou vystaveni vyšší náchylnosti k obezitě, inzulinové rezistenci a dyslipidemii. U pacientů s nízkým počtem genů (LGC) a vysokým počtem genů (HGC) bylo zjištěno, že početnost *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio* a *Oxalobacter spp.* ve střevní mikrobiotě klesá, přičemž tento pokles diverzity může podporovat rozvoj metabolických poruch. Funkční změny ve střevní mikrobiotě jedinců s LGC zahrnují především snížení počtu bakterií produkujících butyrát a zvýšení poměru *Akkermansia* k *R. torque/gnavus*. Tento stav je spojen se zvýšenou degradací hlenu, snížením potenciálu produkce vodíku a metanu, zvýšením počtu bakterií *Campylobacter/Shigella* a zvýšením aktivity peroxidázy. Nerovnováha mezi pro- a protizánětlivými bakteriálními druhy u jedinců s LGC je považována za faktor, který je vystavuje vyššímu riziku rozvoje metabolických onemocnění, jako je prediabetes a T2DM (Jiang et al., 2024; Le Chatelier et al., 2013; Ouchi et al., 2011).

Ceftezol (CTZ) je považován za širokospektré cefemové antibiotikum, které je účinné proti celé řadě gram pozitivních i gram negativních bakterií. Z farmakologického hlediska je jeho účinek zaměřen především na bakterie rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* a další enterobakterie. Ceftezol je využíván při léčbě infekcí dýchacích cest, močového ústrojí, kožních a měkkotkáňových infekcí, a také v rámci profylaxe chirurgických infekcí. Současně byla u ceftezolu prokázána inhibiční aktivita vůči enzymu alfa-glukosidáze, čímž byla dokumentována jeho antidiabetická účinnost in vivo. Při srovnání ekvivalentních molárních koncentrací bylo zjištěno, že solné i volné formy ceftezolu vykazují srovnatelnou biologickou aktivitu. Solná forma (ceftezol sodný) je charakterizována lepší rozpustností ve vodě a vyšší stabilitou, což přispívá k příznivějším farmakokinetickým vlastnostem. Ve studiích bylo dále prokázáno, že aktivita ceftezolu proti klinickým izolátům *Escherichia coli* a *Klebsiella spp.* je srovnatelná s účinností cefazolinu a vyšší než účinnost cefaloridinu a cefalothinu (Noto et al., 1976; Nishida et al., 1976).

Amoxicilin je definován jako polosyntetické antibiotikum ze skupiny aminopenicilinů, charakteristické rozšířeným spektrem účinku oproti původnímu penicilinu. Účinek amoxicilinu je založen na inhibici enzymatických procesů nutných pro tvorbu peptidoglykanové vrstvy bakteriální buněčné stěny, což následně vyústí v lýzu a smrt bakterie. V klinické praxi je amoxicilin předepisován k terapii infekcí vyvolaných beta-laktamázově negativními bakteriálními kmeny, včetně infekcí způsobených streptokoky a meningokoky. Významné uplatnění nachází také v léčbě diabetických ulcerací, kde přispívá k eliminaci patogenních mikroorganismů a zlepšení procesu hojení (Akhavan et al., 2023).

3.4.5 Mechanismy, kterými bakterie ovlivňují rozvoj T2DM a obezity

Pacienti s T2DM jsou běžně léčeni kombinací několika léků za účelem dosažení adekvátní kompenzace glykémie a prevence kardiovaskulárních komplikací. Léčba je obvykle spojena s ovlivněním střevního mikrobiomu. Bylo zjištěno, že ve střevním mikrobiomu neléčených pacientů s prediabetem převažují bakterie produkující butyrát, *Akkermansia muciniphila* a další druhy s prozánětlivým potenciálem (Zhong et al., 2019).

U pacientů léčených metforminem byl pozorován pokles bakterií rodu *Roseburia* a *Subdoligranulum*. Bylo prokázáno, že léčba metforminem modifikuje střevní mikrobiotu pacientů s diabetem, jak naznačuje zvýšené zastoupení mucin degradující bakterie *Akkermansia muciniphila* a bakterií produkujících SAFA, jako jsou *Bifidobacterium bifidum* a *Butyrivibrio*.

Dále bylo potvrzeno zvýšení počtu *Escherichia coli* a snížení počtu *Enterobacteriaceae* u pacientů léčených metforminem, přičemž bylo zaznamenáno přiblížení počtu některých rodů střevních mikrobů k hladinám pozorovaným u zdravých kontrol. Předpokládá se, že metformin ovlivňuje T2DM prostřednictvím modulace střevní mikrobioty a mikrobiální produkce SAFA. Bylo rovněž prokázáno, že probiotická terapie zaměřená na modulaci mikrobioty zvyšuje produkci SAFA a současně snižuje inzulinovou rezistenci (IR), což pravděpodobně představuje mechanismus podobný účinku metforminu. Některé studie dále ukázaly, že probiotika působí jako adjuvans k metforminu tím, že podporují produkci butyrátu a umožňují lepší regulaci hladiny glukózy (Jiang et al., 2024).

3.4.6 Složení mikrobiomu u obézních pacientů a pacientů s T2DM

Ve snaze rozlišit mikrobiální znaky typické pro obezitu a T2DM byla ve studii Thingholm et al., 2019 provedena analýza střevního mikrobiomu u tří skupin pacientů. Jednalo se o štíhlé pacienty bez T2DM (n = 633), obézní pacienty bez T2DM (n = 494) a obézní pacienty s T2DM (n = 153). Kromě taxonomických a funkčních profilů mikrobiomu byly zohledněny také anamnestické údaje, biochemické a biometrické parametry, jídelní zvyklosti a krevní testy. Výsledky studie ukázaly, že obezita je provázána výraznými změnami ve složení mikrobiomu (a to jak na úrovni jednotlivých taxonů, tak i v jejich funkčních schopnostech). Byla pozorována souvislost mezi změnami mikrobiomu a koncentrací některých sérových metabolitů. To naznačuje potenciální interakce mezi střevními mikroorganismy a celkovým metabolickým stavem jedince.

Mezi nejvýrazněji změněné rody patřily druhy *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter* a *Alistipes*. Na rozdíl od obezity byly asociace mezi střevním mikrobiomem a T2DM podstatně méně výrazné. U pacientů s T2DM byl zaznamenán pouze běžný nárůst zastoupení rodu *Escherichia/Shigella*. Dalším významným faktorem ovlivňujícím složení mikrobiomu byla farmakoterapie. Užívání antihypertenziv, antidiabetik a doplňků stravy – zejména přípravků s obsahem železa – vykazovalo významné asociace s variabilitou mikrobiálního složení (Thingholm et al., 2019).

Studie podle Wang et al., 2020 se zaměřovala na identifikaci rozdílů ve složení a funkčních vlastností střevní mikrobioty mezi pacienty s T2DM v kombinaci s obezitou a zdravými jedinci. Do studie bylo zařazeno šest obézních pacientů s T2DM a šest zdravých dobrovolníků. Výsledky ukázaly snížené zastoupení kmenů *Firmicutes*, rodů *Oribacterium* a *Paenibacillus*, což může poukazovat na potenciální patofyziologické mechanismy spojené s T2DM. Kromě toho byly identifikovány tři klíčové bakteriální taxony – *Bacteroides plebeius*, *Phascolarctobacterium* sp. CAG207 a zástupci řádu *Acidaminococcales* – které by mohly mít terapeutický potenciál v léčbě tohoto onemocnění (Wang et al., 2020).

3.4.7 Porovnání mikrobiomu pacientů T2DM se zdravými jedinci

U zdravých jedinců je vykazována vysoká taxonomická diverzita mikrobioty. Její složení však není stabilní – může být ovlivňováno věkem, životním stylem, užíváním léků nebo působením environmentálních faktorů. V tenkém střevě je zaznamenávána převaha proteobakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, zatímco v tlustém střevě jsou běžně identifikováni zástupci čeledí *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* a *Rikenellaceae*. Jak již bylo uvedeno, v dětském věku jsou dominujícími druhy *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium coccoides* spp. a *Clostridium botulinum* spp. Přibližně kolem třetího roku života dochází k ustálení složení mikrobioty na vzorec podobný dospělým jedincům, kde převládají tři hlavní bakteriální kmeny: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Ve vyšším věku (nad 70 let) je často pozorováno snížení zastoupení rodu *Bifidobacterium* a naopak zvýšení rodů *Clostridium* a *Proteobacterium*, což může být spojeno se zhoršenou funkcí imunitního systému a progresí zánětlivého stavu (Wang et al., 2020).

Ve studii Jiang et al., 2020 bylo u pacientů s T2DM bez obezity zaznamenáno snížené množství *Akkermansia muciniphila*, které pozitivně korelovalo s poklesem sekrece inzulinu. Další studie prokázaly, že bakterie rodů *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Listeria* a další představují hlavní střevní mikroorganismy, které ovlivňují tvorbu sekundárních žlučových kyselin (Jiang et al., 2024).

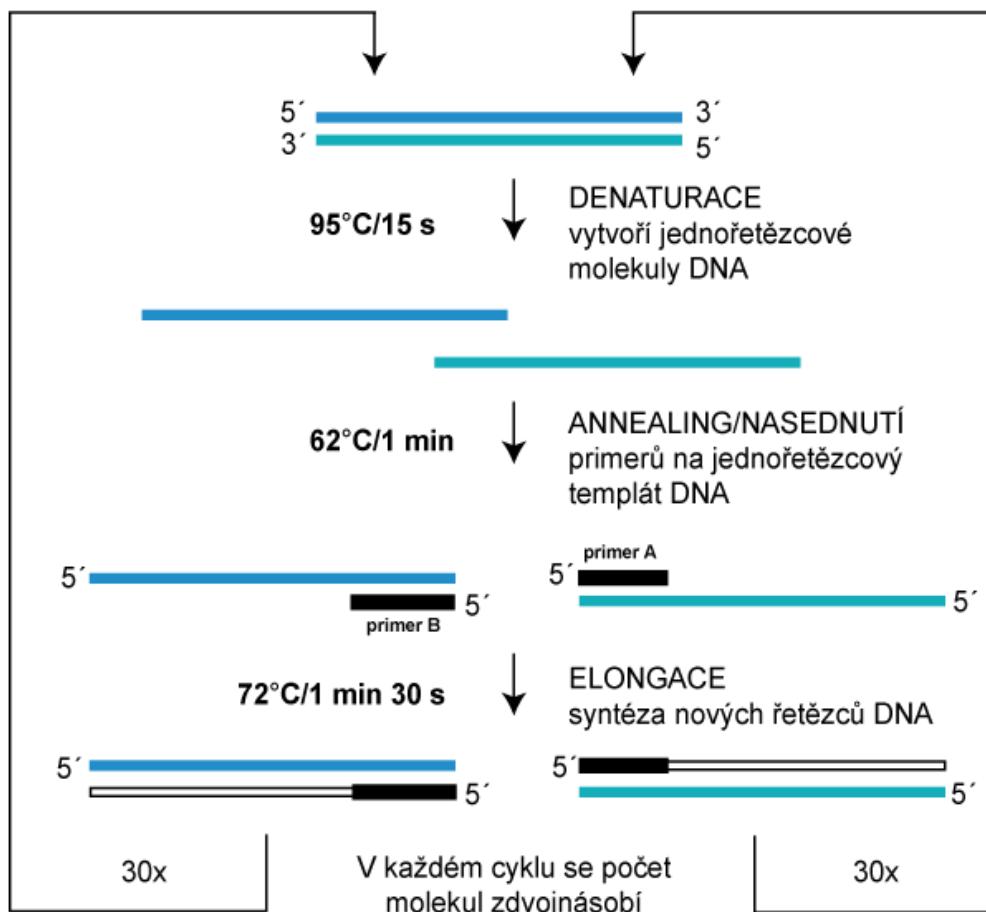
Studie transplantace stolice navíc ukázaly, že obézní jedinci s metabolickým syndromem mají po přenosu střevní mikrobioty od štíhlého dárce zvýšenou citlivost na inzulin. Nicméně se stále jedná pouze o teoretický základ pro propojení střevního mikrobiomu a energetického metabolismu celého těla. Nedávné studie naznačují, že lidsklidský mikrobiom je u obézních jedinců oproti štíhlým jedincům změněn, pravděpodobně především zvýšením počtu fylogenu *Ligustrum* spojených s obezitou a snížením počtu *Bacteroidetes* (Jiang et al., 2024).

3.5 Molekulárně genetické metody

Izolace biomolekul, včetně DNA, RNA a proteinů, je řazena k nejzákladnějším metodám v molekulární biologii. První úspěšnou extrakci DNA provedl v roce 1869 švýcarský fyzik Friedrich Miescher. Tyto biomolekuly lze získat z různých biologických materiálů – například z živých či konzervovaných tkání, buněk, virových částic a dalších vzorků. K izolaci chromozomální nebo genomové DNA se běžně v moderní mikrobiologii jsou využívány komerční kity, které se vyznačují svojí přesností, rychlostí a snadnou ovladatelností. Tyto kity pracují na principu tradičních metod, jako je guanidiniumthiokyanát-fenol-chloroformová extrakce, nebo využívají kolonovou technologii, která je široce rozšířená při extrakci DNA a RNA. Dále se uplatňují chromatografické metody pro purifikaci těchto biomolekul (Tan et al., 2009).

Objev polymerázové řetězové reakce diametrálně změnil vědu od momentu, kdy byla poprvé objevena v roce 1990 Kary Mullisem a poprvé umožnila specifickou detekci a produkci velkého množství DNA. V současnosti se jedná o metodu, která je často využívána lékaři a vědeckými pracovníky k diagnostice onemocnění, klonování a sekvenování genů rychlým, přesným a citlivým způsobem. Princip PCR metody spočívá v repetici denaturace dvoušroubovice DNA a následnou renaturací řetězců s oligonukleotidy. Tyto látky slouží zároveň jako primery při syntéze nového řetězce DNA. PCR metoda se sestává ze 3 hlavních kroků: 1. denaturace, která probíhá při vysokých teplotách (90 – 97 °C). Následuje hybridizace, kdy primery nasedají na templát DNA k prodloužení. V posledním kroku s názvem elongace dochází k prodloužení a vytvoření komplementární kopie řetězce DNA (viz obrázek č. 5) (Garibyan et al., 2013).

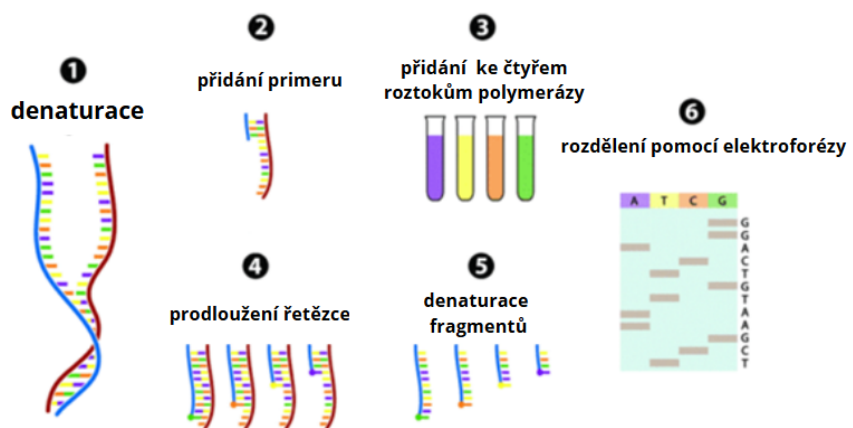
Schéma PCR



Obrázek č. 5 Schéma PCR (dostupné z internetového webu https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html)

Sangerovo sekvenování je široce využívaná metoda sekvenování DNA, především pro klonované plazmidy a klinické vzorky. K jejímu provedení je vyžadována kombinace řetězové terminační reakce, gelové elektroforézy a fluorescenční detekce. Tato metoda byla vyvinuta Frederickem Sangerem a jeho kolegy v roce 1977 a stala se základem pro další techniky v genetice a genomice. V této metodě jsou využívány specifické vlastnosti dideoxynukleotidů (ddNTPs), které slouží jako terminátory replikace DNA. Nejprve je k jednovláknové DNA (matrice) přidávána DNA polymeráza, oligonukleotidy a směs ddNTPs. Do každé ze čtyř paralelních reakcí je přidáno malé množství jednoho z těchto ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), čímž dochází k terminaci syntézy. Jakmile polymeráza inkorporuje ddNTP, syntéza je ukončena, protože tyto molekuly nemají hydroxylovou skupinu na 3' konci. Následně jsou produkty odděleny pomocí elektroforézy na kratší fragmenty, které jsou analyzovány. Z uspořádání těchto fragmentů může být zpětně rekonstruována původní sekvence DNA.

1. Dvouřetězcová DNA (dsDNA) se denaturuje na dvě jednořetězcové DNA (ssDNA).
2. Připojí se primer, který odpovídá jednomu konci sekvence.
3. Přidají se čtyři roztoky polymerázy se čtyřmi typy dNTP, ale pouze s jedním typem ddNTP.
4. Zahájí se reakce syntézy DNA a řetězec se prodlužuje, dokud není náhodně začleněn terminační nukleotid.
5. Vzniklé fragmenty DNA jsou denaturovány na ssDNA.
6. Denaturované fragmenty se rozdělí pomocí gelové elektroforézy a určí se sekvence.



Obrázek č. 6 Postup Sangerova sekvenování, převzato a upraveno dle Gauthier, 2008. Dostupné z : https://www.researchgate.net/publication/234248746_Simulation_of_polymer_translocation_through_small_channels_A_molecular_dynamics_study_and_a_new_Monte_Carlo_approach

Tato metoda byla klíčovou technologií pro rozklíčování lidského genomu a je stále pro svoji přesnost využívána, i když byla z velké části nahrazena novějšími technologiemi (například NGS) (Sanger et al., 1977).

Studie podle Sikkema-Raddatz et al., 2013 porovnávala NGS a Sangerovo sekvenování a jejím cílem bylo zjistit, zda NGS dokáže plně nahradit Sangerovo sekvenování v klinické genetice. Princip NGS je následující: Nejprve dojde k enzymatickému nebo mechanickému rozdělení genomové DNA a poté se ke koncům fragmentů připojí specifické sekvence (adaptéry), které umožní jejich navázání na sekvenční platformu. Fragmenty DNA se připojí například na skleněnou desku a jsou namnoženy pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tím vzniknou tisíce kopií každého fragmentu – tzv. clustery, které umožňují silnější signál při čtení sekvence. Každý fragment je sekvenován s použitím fluorescenčně značených nukleotidů a pořadí nové DNA se zaznamenává podle reverzibilní terminátorové metody. Po sekvenování se získaná data porovnají s referenčním genomem a dojde k vyhodnocení přítomnosti mutací, delecí, duplikací nebo jiných odchylek v analyzovaných genech. Výsledkem studie bylo, že NGS může odhalit další genetické varianty, které by mohly uniknout Sangerovu sekvenování,

je efektivnější a je doporučována jako primární metoda i díky nižším nákladům a lepší schopnosti detekce diagnostických možností (Sikkema-Raddatz et al., 2013).

3.5.1 Stanovení diverzity pomocí PCR - DGGE se sekvenováním bakteriálních kmenů pomocí 16S rRNA – detekce 16S rRNA genu

Tato metoda umožňuje vysoce přesnou identifikaci mikroorganismů. 16S rRNA je klíčovou strukturní součástí bakteriální a archeální ribozomální podjednotky 30S. Hraje zásadní roli při zahájení syntézy bílkovin a stabilizaci správného párování kodon-antikodon, včetně interakce mezi trojicí nukleotidů v mRNA a komplementární trojicí nukleotidů na tRNA. Tato vlastnost umožňuje specifické navázání na kodon během translace. Přímé sekvenování 16S rRNA genů ze vzorků se stalo standardní metodou pro analýzu početnosti, struktury a funkce mikrobiálních populací v různých prostředích. Pro určení sekvence 16S rRNA je nejprve nutné izolovat chromozomální DNA z bakteriální kultury, která je následně amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na celý gen nebo jeho specifickou část. Takto získaná DNA je následně použita jako templát pro další sekvenační analýzy (Jay et al., 2015).

3.5.2 NGS

Do spektra variací DNA v lidském genomu jsou zahrnuty malé změny bází (substituce), inserce a delece DNA, velké genomové delece exonů nebo celých genů a přestavby – inverze a translokace. Metoda sekvenování nové generace (NGS) se vyvinula velmi rychle během posledních 15 let. Tradiční Sangerovo sekvenování je omezeno na odhalování substitucí a malých insercí a delecí. Pro detekci zbývajících mutací jsou často prováděny specializované testy, jako je fluorescenční hybridizace in situ (FISH) pro konvenční karyotypizaci nebo mikročipy srovnávací genomové hybridizace (CGH) pro detekci submikroskopických změn počtu chromozomálních kopií, tzv. mikrolece. Tyto údaje mohou být však získány také přímo z dat sekvenování NGS, čímž je eliminována potřeba specializovaných testů a zároveň je získáno celé spektrum genomických změn v jediném experimentu (Slatko et al., 2018; Behjati et al., 2013).

Současně využívané metody NGS se odlišují od Sangerova sekvenování také v tom, že spoléhají na mnohem kratší čtení, aktuálně asi do 300 – 500 bází. Tato metoda je mnohem efektivnější, levnější a umožňuje výzkum genomu v populačním měřítku. Metody sekvenování nové generace totiž ke svému postupu nevyžadují bakteriální klonovací postup – sekvenování probíhá v bezbuněčném systému. Současně se zpracovává miliony sekvenčních reakcí paralelně a cyklicky.

3.5.3 Shannonův index

Základy Shannonova indexu byly formulovány Claudem Shannonem v roce 1963, přičemž byla zavedena jednotka známá jako Shannonova entropie. Byla koncepčně definována jako míra nejistoty či množství informace asociované s hodnotou náhodné proměnné. V rámci této studie byla proměnnou gen a nositelem informace soubor hodnot jeho exprese za různých experimentálních podmínek. Geny klasifikované jako geny s nízkou entropií vykazují stabilní expresní profily napříč hodnotami, čímž je indikována nízká informační variabilita. Naproti tomu geny s vysokou entropií vykazují výraznou divergenci v expresních hodnotách, což odráží zvýšenou míru informační rozmanitosti. Studie využívající tuto metodu byly provedeny u lidských buněčných linií, myší, rostlin, kvasinek, bakterií, fágů, ale zatím ne u vláknitých hub (Ameri et al., 2021).

4 Materiál a metody

4.1 PCR – DGGE metoda

Pro analýzu vzorků na přítomné bakterie metodou PCR – DGGE bylo nutné provést následující kroky. V praktické části byla použita metodika podle Muyzer a kol. 1993.

1 . příprava PCR produktů – bylo nezbytné připravit PCR reakci o následujícím složení: naizolovaná DNA, forward primer, reverzní primer (50 pmol každého), PCR OneTaq 2X Master Mix (New England Biolabs), PCR voda. V následující tabulce jsou uvedeny potřebné hodnoty.

DNA templát	1 µl
Forward primer 10x338GC	1 µl
Reverse primer 10x534RP	1 µl
PCR Mix	15 µl
dH ₂ O	12 µl
celkem	30 µl

Tabulka č . 2 – příprava PCR vzorků a potřebný materiál

Objem 200 µl byl smíchán v mikrozkuhavce a výsledná směs byla vložena do cykleru. Víčko mikrozkuhavky bylo pevně uzavřeno a zašroubováno, poté byl spuštěn program Chaharzed č . 86, zahrnující úvodní denaturaci při 95 °C po dobu 5 minut, následovanou 34 cykly (denaturace při 95 °C po dobu 30 sekund, annealing při 58 °C po dobu 20 sekund a extenze při 72 °C po dobu 40 sekund). Finální extenze byla provedena při 72 °C po dobu 5 minut. Primery použité v reakci byly předem naředěny v poměru 1 :10 na výslednou koncentraci 10 µl.

2 . příprava agarosového gelu – Byl připraven agarózový gel o koncentraci 1 ,5 % (např. 1 ,5 g agarózy ve 100 ml 0 ,5 × TBE pufru). Veškeré složky byly zahřívány na ohřívače až do varu a následně odstaveny. Do rozpuštěné směsi bylo přidáno 3 µl ethidium bromidu a směs byla důkladně promíchána. Po zchlazení gelu přibližně na 50 °C byl gel nalit do formy s hřebínkem a ponechán k zatuhnutí. Následně byla provedena elektroforéza s použitím 2 µl vzorku po dobu 20 minut při napětí 100 V .

3 . příprava DGGE gel – Pro analýzu celkových bakterií bylo potřeba připravit gel s denaturační silou v rozmezí 35 – 60 %. Tabulka níže ukazuje recept pro přípravu jednoho gelu. Tento roztok vydrží v lednici až 1 měsíc, bylo proto možné připravit větší objem.

Voda se používá deionizovaná.

DGGE	25 ml	
Denaturační síla	35 %	60 %
40 % Akrylamid (ml)	5 ,560	5 ,560
50x TAE (ml)	0 ,500	0 ,500
Formamide (ml)	3 ,500	6 ,000
Urea (g)	3 ,675	6 ,300
H ₂ O (ml)	12,250	9 ,500

Tabulka č . 3 – příprava DGGE vzorků a potřebný materiál

DGGE	25 ml	
Denaturační síla	35 %	60 %
40 % Akrylamid (ml)	22,24	22,24
50x TAE (ml)	2	2
Formamide (ml)	14	24
Urea (g)	14,7	25,2
H ₂ O (ml)	49	38

Tabulka č . 4 – příprava DGGE vzorků a potřebný materiál

Míchání gelu bylo provedeno následujícím způsobem ve spojených nádobách. Po uzavření spojnice byly do dvou nádob nality roztoky (každý zvlášť) a následně došlo k vytvoření gradientu. Gradient byl vytvořen tak, že blíže k výpusti byl umístěn roztok s vyšší denaturační silou (60 %) a do vzdálenější nádoby byl nalit roztok s nižší denaturační silou (35 %), který postupně ředil silnější roztok a umožnil tak vznik gradientu. Jehla výpustné míchačky byla vložena mezi skla DGGE aparatury, do obou roztoků byl přidán TEMED a APP a poté bylo spuštěno čerpadlo. Jakmile hladina gelu dosáhla přibližně 1 –5 mm pod okraj skel, byla výpust přesměrována do kádinky a gel byl ponechán k polymeraci po dobu 45 minut.

Elektroforéza DGGE byla prováděna v 7litrovém tanku naplněném TAE pufrem. Před použitím byl připraven naředěný roztok z 50× koncentrovaného zásobního roztoku. Pufr byl zahřát na teplotu 60 °C .

4 . spuštění DGGE – Gel byl vyjmut ze stojanu a nasazen na vnitřní část aparatury DGGE. Na zadní část aparatury bylo nasazeno sklo bez gelu, v horní části se vytvořila malá nádobka, do které se během elektroforézy přečerpává pufr. Pufr byl dolit tak, aby byl celý systém dobře ponořen. Celý systém byl vložen do tanku s pufrem, přičemž gel byl orientován směrem k pufru. Stříkačkou s jehlou byly propláchnuty jamky a vzorky byly nanášeny do každé jamky v celkovém objemu. Hřebínek měl 25 jamek, přičemž krajní jamky nebyly použity a do první jamky byl vložen standard. Napětí bylo nastaveno na 30 V a proces byl

spuštěn. Po ohřátí na 60 °C bylo napětí zvýšeno na 30 V a elektroforéza byla nechána probíhat po dobu 18 hodin.

5 . Ukončení DGGE bylo provedeno vypnutím zdroje a zahřívání. Do nízké hranaté misky bylo připraveno přibližně 50 ml TAE pufru, do kterého bylo přidáno asi 5 µl interkalační barvy (SYBR Green nebo GelGreen). Aparatura byla rozebrána a skla byla odstraněna. Gel byl přenesen do TAE pufru s barvou, kde byl míchán po dobu 30 minut. Po dokončení procesu byl gel vyfotografován. Skla byla pečlivě omyta jarem a etanolem.

6 . Sekvence DNA fragmentů z DGGE byla provedena následovně: Na obrázku gelu (vytištěném inverzně s bílým pozadím a černými bandy) byly vyznačeny zajímavé bandy a byl připraven odpovídající počet sterilních 1,5 ml mikrozkušavek. Bandy byly vyříznuty skalpelem pod UV světlem a do každé z nich bylo přidáno 100 µl sterilní vody. Směs byla krátce zvortexována a následně byla centrifugována po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Tento postup vedl k uvolnění malého množství DNA z gelových špalíků. Dalším krokem bylo namnožení DNA do větší koncentrace metodou PCR.

7 . PCR metoda – Přechystění PCR bylo provedeno pomocí purifikační sady a následná eluace byla provedena pomocí pufru. Koncentrace DNA byla změřena na přístroji NanoDrop. Sekvenční vzorek byl připraven smícháním 50 ng DNA, 2,5 µl 10× primeru a vody do konečného objemu 10 µl (použitím 200 µl mikrozkušavky).

4.1.1 DNA cleanup and concentration – protocol steps

1. Každý vzorek DNA byl zředěn pomocí DNA Cleanup Binding Buffer. Množství DNA o objemu 20 µl bylo přidáno do každé mikrozkušavky. S každým vzorkem byly provedeny následující kroky.

Typ vzorku	Poměr pufru:vzorku	Příklad
dsDNA > 2kb (plasmidy, gDNA)	2 :1	200 µl:100 µl
dsDNA < 2kb (amplicony, fragmenty)	5 :1	500 µl:100 µl
ssDNA > 200 kb	7 :1	700 µl:100 µl

Tabulka č. 5 – příprava DNA cleanup and concentration a potřebný materiál

2 . Kolona byla vložena do sběrné zkušavky a na 1 minutu umístěna do odstředivky. Průtok byl zlikvidován.

3 . Kolona byla opět vložena do zkušavky a přidáno 200 µl promývacího pufru DNA, přičemž vzorek byl protočen po dobu 1 minuty. Průtok roztoku byl zlikvidován a tento krok byl opakován.

4. Kolona byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Bylo zajištěno, že špička kolony nepřišla do kontaktu s průtokovou trubičkou. Vzorek byl opět protočen v přístroji po dobu asi 1 minuty.

6. Do středu matrice bylo přidáno ≥ 6 μl elučního pufru DNA. Po čekání asi 1 minuty byl vzorek protočen po dobu 1 minuty, aby došlo k eluci DNA. Typické eluční objemy jsou 6 – 20 μl . Pro eluci DNA byla také využita voda bez nukleáz o pH 7 – 8,5.
7. Výtěžnost byla mírně zvýšena použitím většího objemu DNA Elution Buffer (eluční pufr v balení), přičemž DNA mohla být méně koncentrovaná. V případě použití větších objemů bylo doporučeno zlepšit výtěžnost zahřátím elučního pufru na 50 °C před jeho použitím.

Číslo vzorku	Množství nukleové kyseliny [ng]	PrF [μl]	DNA [μl]	Množství vody [μl]
1	25,067	2,5	2	5,5
2	23,537	2,5	2	
3	26,792	2,5	2	
4	22,676	2,5	2	
5	27,328	2,5	2	
6	22,083	2,5	2	
7	24,769	2,5	2	
8	12,738	2,5	4	3,5
9	21,245	2,5	2	
10	22,924	2,5	2	
11	19,525	2,5	2,5	5
12	29,196	2,5	2	
13	28,234	2,5	2	
14	18,897	2,5	2,5	5
15	21,118	2,5	2	
16	24,841	2,5	2	
17	19,850	2,5	2,5	5
18	16,302	2,5	3	4,5
19	26,968	2,5	2	
20	24,692	2,5	2	
21	17,964	2,5	3	4,5
22	21,447	2,5	2	
23	16,617	2,5	3	4,5
24	32,191	2,5	1,5	6

Tabulka č. 6 – příprava DNA cleanup and concentration a potřebný materiál

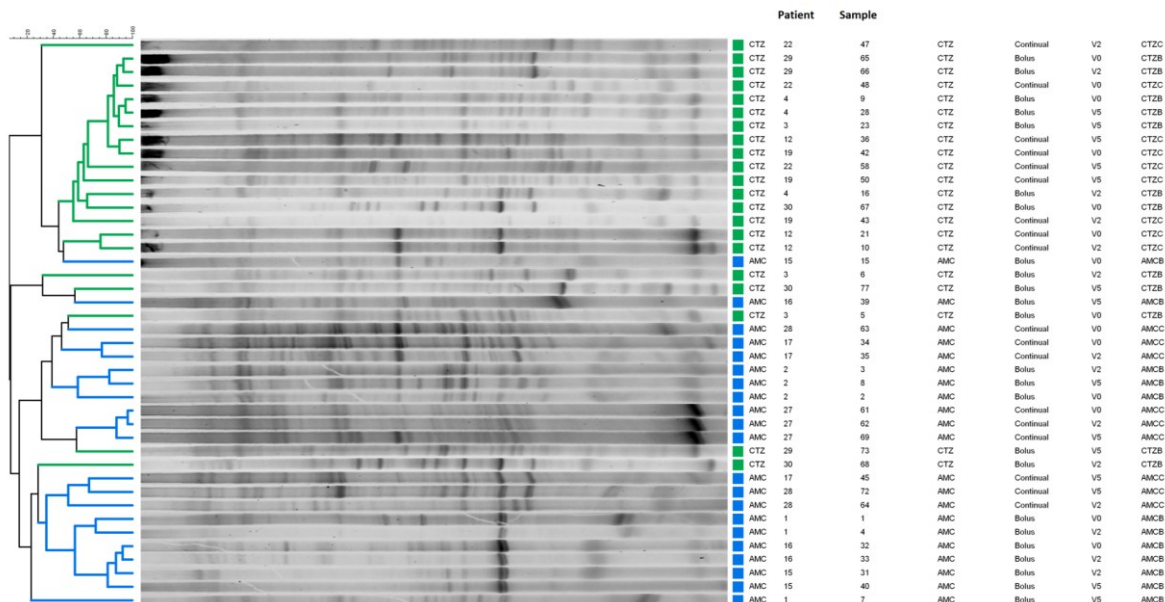
Následně proběhlo sekvenování ve firmě SEQme. Množství DNA bylo uvedeno v ng, celkový objem DNA 30 mikrolitrů, k tomu bylo přidáno ještě 15 mikrolitrů směsi.

5 Výsledky

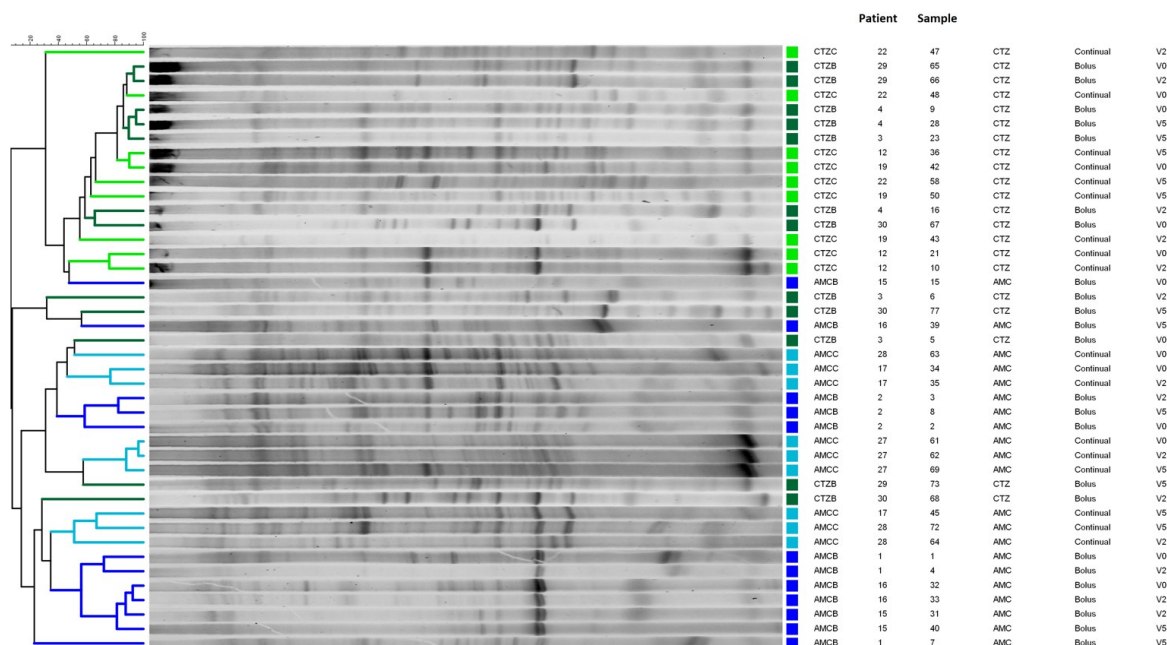
	Patient	V0	V2	V5
AMC BOLUS	1	1	4	7
	2	2	3	8
	7	24	25	20
	15	15	31	40
	16	32	33	39
AMC CONTINUAL	17	34	35	45
	27	61	62	69
	28	63	64	72
CTZ BOLUS	3	5	6	23
	4	9	16	28
	29	65	66	73
	30	67	68	77
CTZ CONTINUAL	12	21	10	36
	19	42	43	50
	22	48	47	58

Tabulka č. 7 Souhrnná tabulka pacientů – týdny před léčbou, po léčbě a po vysazení léčby a po dlouhodobém sledování.

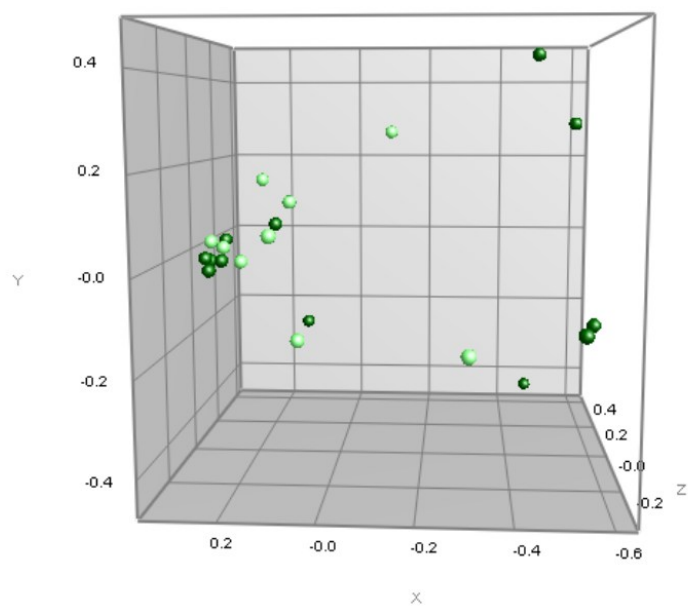
5.1 DGGE



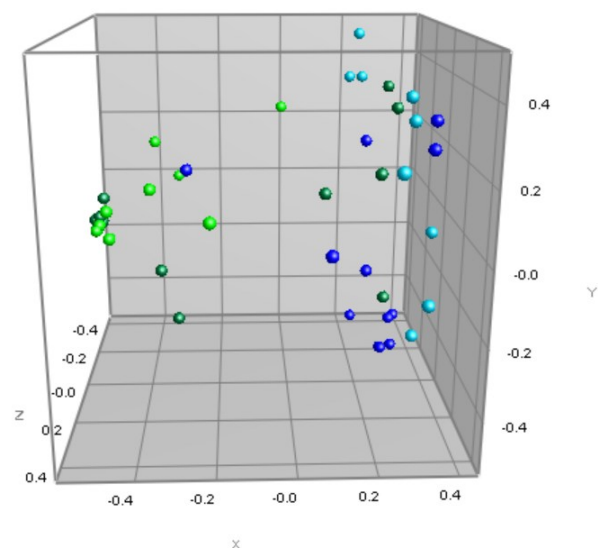
Obrázek č. 7 Výsledky DGGE - zobrazuje klastrování mikrobioty pacientů léčených cefotaximem (zeleně) a amoxicilinem (modře) na základě změn ve složení střevního mikrobiomu v průběhu kontinuální léčby. Obě skupiny vykazují podobné trendy, avšak jsou zřetelně odděleny do rozdílných klastrů.



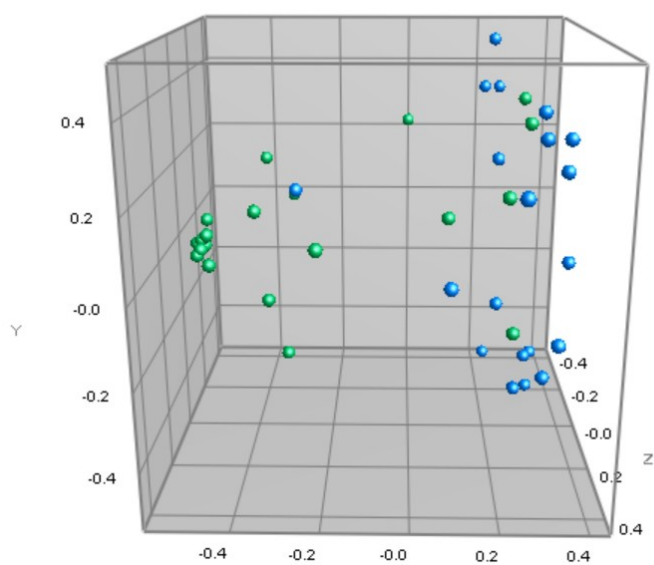
Obrázek č. 8 Výsledky DGGE - zobrazuje klastrování mikrobioty pacientů léčených cefotaximem (zeleně) a amoxicilinem (modře) na základě změn ve složení střevního mikrobiomu v průběhu kontinuální léčby. Obě skupiny vykazují podobné trendy, avšak jsou zřetelně odděleny do rozdílných klastrů.



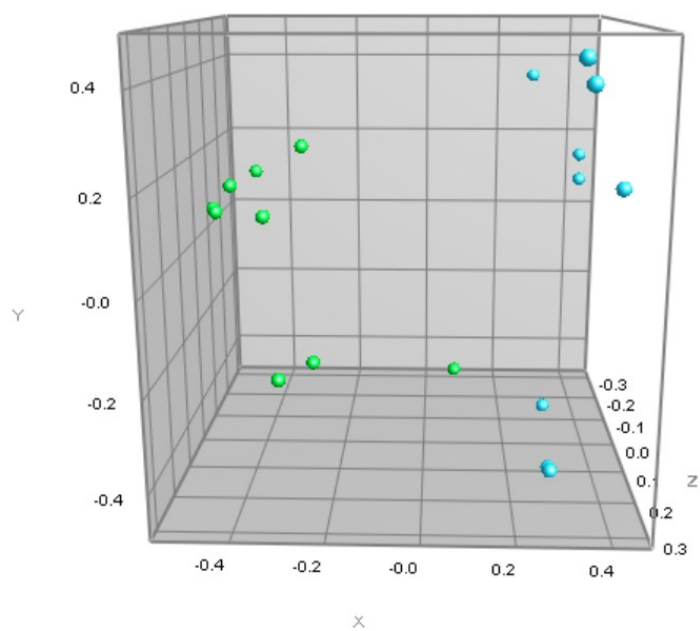
Obrázek č. 9 Výsledky DGGE – CTZ PCOA



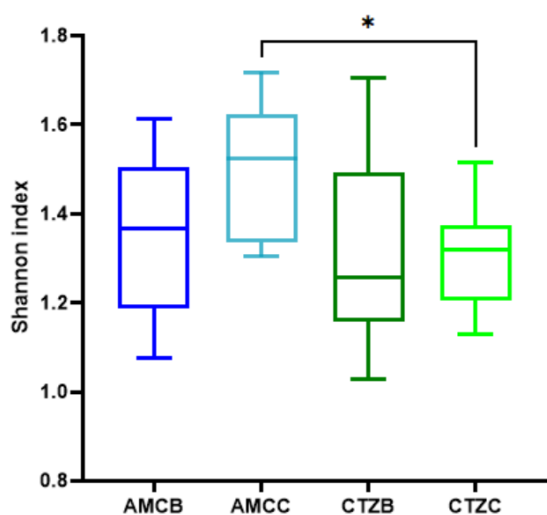
Obrázek č. 10 Výsledky DGGE – ATB PCOA ALL



Obrázek č. 11 Výsledky DGGE – CTZ PCOA2



Obrázek č. 12 Výsledky DGGE – PCOA Continual



Obrázek č. 13 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky stolice diabetických pacientů

Porovnání skupin	Souhrn	p hodnota	
AMCB vs. AMCC	ns	0 ,1444	
AMCB vs. CTZB	ns	0 ,7575	
CTZB vs. CTZC	ns	>0 .9999	
AMCC vs. CTZC	*	0 ,0415	
ns = nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl			
p hodnota u všech	0 ,06		

Tabulka č. 8 Statistické porovnání skupin pacientů

Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi diverzitou tímto testováním.

stud. číslo	typATB	věk	pohlaví	hmotnost	výška	BMI	
1	2	66	M	104	1,88	29,42508	Nadváha
2	2	56	M	96	1,84	28,35539	Nadváha
3	4	59	M	120	1,96	31,23698	Obezita 1 . stupně
4	4	58	Ž	120	1,8	37,03704	Obezita 2 . stupně
6	1	66	M	108	1,86	31,21748	Obezita 1 . stupně
7	2	59	M	100	1,82	30,18959	Obezita 1 . stupně
8	2	61	M	116	1,85	33,89335	Obezita 1 . stupně
9	3	72	M	106	1,8	32,71605	Obezita 1 . stupně
10	4	74	M	82	1,8	25,30864	Nadváha
11	3	79	Ž	86	1,76	27,76343	Nadváha
12	3	58	M	123	1,82	37,1332	Obezita 2 . stupně
13	2	58	M	90	1,75	29,38776	Nadváha
14	1	74	M	98	1,8	30,24691	Obezita 1 . stupně
15	2	67	M	90	1,77	28,72738	Nadváha
16	2	48	M	63	1,8	19,44444	Normální
17	1	74	M	110	1,76	35,51136	Obezita 2 . stupně
18	1	61	M	110	1,74	36,33241	Obezita 2 . stupně
19	3	71	M	92	1,8	28,39506	Nadváha
20	4	66	M	100	1,84	29,53686	Obezita 1 . stupně
21	4	62	M	140	1,98	35,71064	Obezita 2 . stupně
22	3	63	M	129	1,92	34,99349	Obezita 1 . stupně
23	4	69	M	110	1,78	34,71784	Obezita 1 . stupně

Tabulka č. 9 Hodnoty BMI, hmotnost a pohlaví pacientů. Pouze 1 pacient byl normální hmotnosti, nadváhu mělo 7 pacientů, obezitu 1 . stupně 9 z nich a 5 z nich byli klasifikováni do obezity 2 . stupně.

PACIENT	VZOREK	ATB	TYP	PERIODA	SHANNON
1	1	AMC	Bolus	V0	1 ,4977
2	2	AMC	Bolus	V0	1 ,4595
2	3	AMC	Bolus	V2	1 ,5152
1	4	AMC	Bolus	V2	1 ,0757
1	7	AMC	Bolus	V5	1 ,6139
2	8	AMC	Bolus	V5	1 ,5077
15	15	AMC	Bolus	V0	1 ,2355
15	31	AMC	Bolus	V2	1 ,1721
16	32	AMC	Bolus	V0	1 ,3275
16	33	AMC	Bolus	V2	1 ,3072
16	39	AMC	Bolus	V5	1 ,4067
15	40	AMC	Bolus	V5	1 ,166
17	34	AMC	Continual	V0	1 ,7173
17	35	AMC	Continual	V2	1 ,6214
17	45	AMC	Continual	V5	1 ,6263
27	61	AMC	Continual	V0	1 ,3037
27	62	AMC	Continual	V2	1 ,3293
28	63	AMC	Continual	V0	1 ,4336
28	64	AMC	Continual	V2	1 ,5901
27	69	AMC	Continual	V5	1 ,3443
28	72	AMC	Continual	V5	1 ,5243
3	5	CTZ	Bolus	V0	1 ,5614
3	6	CTZ	Bolus	V2	1 ,5199
4	9	CTZ	Bolus	V0	1 ,2559
4	16	CTZ	Bolus	V2	1 ,2477
3	23	CTZ	Bolus	V5	1 ,0278
4	28	CTZ	Bolus	V5	1 ,1725
29	65	CTZ	Bolus	V0	1 ,2563
29	66	CTZ	Bolus	V2	1 ,1523
30	67	CTZ	Bolus	V0	1 ,089
30	68	CTZ	Bolus	V2	1 ,4116
29	73	CTZ	Bolus	V5	1 ,7043
30	77	CTZ	Bolus	V5	1 ,3335
12	10	CTZ	Continual	V2	1 ,1301
12	21	CTZ	Continual	V0	1 ,3098
12	36	CTZ	Continual	V5	1 ,387
19	42	CTZ	Continual	V0	1 ,3602
19	43	CTZ	Continual	V2	1 ,2216
22	47	CTZ	Continual	V2	1 ,3553
22	48	CTZ	Continual	V0	1 ,1893
19	50	CTZ	Continual	V5	1 ,5146
22	58	CTZ	Continual	V5	1 ,3195

Tabulka č . 10 Shannonovy entropie pro vzorky stolice diabetických pacientů

Číslo	Druh bakterie	% identifikace	Označení
1	<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	95.00%	NR_036800.1
2	neidentifikováno	neidentifikováno	neidentifikováno
3	<i>Blautia faecicola</i>	97.06%	NR_170495.1
4	<i>Enterococcus faecium</i>	97.92%	NR_113904.1
5	<i>Enterococcus faecium</i>	94.67%	NR_113904.1
6	<i>Blautia faecis</i>	99.41%	NR_109014.1
7	neidentifikováno	neidentifikováno	neidentifikováno
8	<i>Enterococcus faecium</i>	87.37%	NR_113904.1
9	<i>Ructibacterium gallinarum</i>	81.14%	NR_180617.1
10	neidentifikováno	neidentifikováno	neidentifikováno
11	<i>Enterococcus pingfangensis</i>	88.59%	NR_174226.1
12	<i>Eubacterium ventriosum</i>	91.07%	NR_118670.1
13	<i>Blautia hominis</i>	93.98%	NR_163638.1
	[<i>Ruminococcus</i>] <i>gnavus</i> ATCC		
14	29149	96.47%	NR_036800.1
15	<i>Blautia hominis</i>	95.88%	NR_163638.1
16	<i>Blautia hominis</i>	98.24%	NR_163638.1
17	<i>Blautia hominis</i>	98.82%	NR_163638.1
18	<i>Enterococcus faecium</i>	96.91%	NR_113904.1
19	<i>Enterococcus faecium</i>	96.92%	NR_113904.1
20	<i>Enterococcus faecium</i>	98.97%	NR_113904.1
21	<i>Blautia intestinalis</i>	99.41%	NR_181402.1
22	<i>Blautia intestinalis</i>	99.41%	NR_181402.2
23	<i>Lactobacillus mulieris</i>	96.39%	NR_180521.1
24	<i>Pseudoruminococcus massiliensis</i>	95.38%	NR_179661.1

Tabulka č. 11 Obsah jednotlivých druhů bakterií v mikrobiomu pacientů. Vzorky s číslem 1 a 14 nebylo možné detekovat z důvodu zhoršené kvality sekvence a vzorek s číslem 2, 7 a 10 byl nedetekovatelný.

Z gelů DGGE bylo vybráno celkem 24 fragmentů, které byly poslány na sekvenování SequeMe z forward i reverse směru. Každý band byl sekvencován celkem 2x. 5 vzorků se z technických důvodů nepovedlo sekvencovat (pravděpodobně z důvodu nízké koncentrace a kvality PCR templátu). Z těchto 19 získaných sekvencí se jich povedlo identifikovat celkem 9 odlišných druhů. Ke stanovení druhu bakterie byl využíván program BLAST. Byla vždy vybrána bakterie s nejvyšším procentuálním počtem. Z celkem 24 analyzovaných fragmentů DNA bylo úspěšně sekvenováno 19, z nichž bylo identifikováno devět bakteriálních druhů: *Blautia faecicola*, *Enterococcus faecium*, *Blautia faecis*, *Ructibacterium gallinarum*, *Enterococcus pingfangensis*, *Blautia hominis*, *Blautia intestinalis*, *Lactobacillus mulieris* a *Pseudoruminococcus massiliensis*.

6 Diskuze

Cílem této práce bylo charakterizovat a porovnat střevní mikrobiotu pacientů léčených antibiotiky v rámci různých režimů podávání. Mikrobiální složení bylo sledováno u pacientů s metabolickými poruchami, zejména s diabetem 2. typu (T2DM) a obezitou, pomocí metody PCR-DGGE a následného sekvenování.

Z celkem 24 analyzovaných fragmentů DNA bylo úspěšně sekvenováno 19, z nichž bylo identifikováno devět bakteriálních druhů: *Blautia faecicola*, *Enterococcus faecium*, *Blautia faecis*, *Ructibacterium gallinarum*, *Enterococcus pingfangensis*, *Blautia hominis*, *Blautia intestinalis*, *Lactobacillus mulieris* a *Pseudoruminococcus massiliensis*.

Nejvíce zastoupeným rodem byl *Blautia*, což odpovídá literárním údajům o častém výskytu tohoto rodu u jedinců s metabolickými poruchami. *Blautia* je běžnou součástí mikrobioty zdravého střeva, ale její vyšší výskyt byl popsán i u pacientů s obezitou a inzulinovou rezistencí. Rody *Enterococcus* a *Lactobacillus* patří rovněž k běžným zástupcům, a jejich detekce může souviset jak s běžnou komensální přítomností, tak s antibiotickou expozicí, která zvýhodňuje některé druhy schopné rychlé adaptace na změněné prostředí.

Za zmínku stojí druh *Ructibacterium gallinarum*, který není běžně popisován jako součást lidské mikrobioty. Jeho přítomnost může být výsledkem kontaminace, zvířecí expozice, nebo doposud nedostatečně popsaného ekologického výskytu v lidském střevě. Ve studii Zenner et al., 2021 byl tento druh bakterie identifikován a vykultivován ze střevního mikrobiomu kuřat. Tato studie se zaměřovala na zrání imunitního systému kuřat prokázala, že kuřata, která byla vystavena po vylíhnutí mateřskému trusu vykazovala vyšší hladiny imunoglobulinu A (IgA) a imunoglobulinu Y (IgY) ve srovnání s kuřaty, které byly vychovány v přísných hygienických podmínkách.

Při srovnání vzorků z různých časových bodů (před antibiotickou terapií, po 2 týdnech a po 5 týdnech léčby) nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v diverzitě mikrobiomu. Shannonův index neprokázal žádné výrazné kolísání bohatosti ani rovnoměrnosti druhového zastoupení. Tento výsledek může být překvapivý vzhledem k obecně uznávanému narušení mikrobiomu po antibiotické terapii. Avšak krátkodobé narušení nemusí být vždy kvantitativně postižitelné metodami založenými na DGGE a mohlo by se více projevit ve funkčních změnách než ve změně složení. Výsledky naznačují, že mikrobiota některých pacientů může vykazovat vysokou rezilienci vůči antibiotické zátěži, což bylo popsáno i v jiných studiích – například ve studii podle Safarchi et al., 2025; Falony et al., 2016 a Palleja et al., 2018.

Studie podle Palleja et al., 2018 sledovala vliv krátkodobé expozice antibiotiky u 12 zdravých mužů. Účastníci podstoupili čtyřdenní léčbu kombinací tří širokospektrých antibiotik: meropenemu, gentamicinu a vankomycinu. Během a po léčbě došlo k pozitivní selekci druhů nesoucích geny rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům. Druhy s geny rezistence vůči

glykopeptidům nebo aminoglykosidům měly zvýšenou pravděpodobnost nového osídlení. Navzdory těmto změnám se celkové složení střevní mikrobioty většiny účastníků vrátilo k téměř výchozímu stavu do 1,5 měsíce po ukončení léčby. Nicméně, výše uvedené trvalé změny naznačují, že krátkodobá antibiotická terapie může mít dlouhodobý dopad na složení střevní mikrobioty a její funkční schopnosti.

Ve studii podle Falcony et al., 2016 byl analyzován střevní mikrobiom u více než 1000 zdravých jedinců z Belgie a Nizozemska. Cílem bylo identifikovat variabilitu mikrobiomu na populační úrovni a zjistit, jaké faktory tuto variabilitu ovlivňují. Bylo identifikováno 14 rodů bakterií, které tvoří jádrovou mikrobiotu přítomnou u většiny jedinců. Mezi tyto rody patří například *Faecalibacterium*, *Bacteroides* a *Ruminococcus*. Jedním ze zásadních vlivů na složení mikrobiomu bylo užívání léků, dále pak výživa a stravovací návyky, věk či životní styl. Byla pozorována značná variabilita ve složení mikrobiomu mezi jednotlivci, což naznačuje, že "normální" mikrobiom může mít velmi široké spektrum složení. Tato studie neuvádí konkrétní změny na úrovni jednotlivých druhů bakterií, ale spíše se zaměřuje na identifikaci rodů a faktorů ovlivňujících jejich zastoupení (Falcony et al, 2016).

Ačkoliv výsledky neprokázaly statisticky významný rozdíl v alfa diverzitě střevní mikrobioty mezi skupinami pacientů léčených různými antibiotiky (AMC vs. CTZ), je třeba zdůraznit, že každé antibiotikum působí na mikrobiotu odlišným způsobem. Rozdíly mezi skupinami se projeví zejména v kvalitativním složení mikrobiálních profilů, jak ukázaly odlišné vzorce na DGGE gelech a výsledky následné sekvence. Obě dvě léčiva spadají do skupiny beta-laktamových antibiotik. Jejich spektrum účinku se liší: zatímco AMC je účinnější vůči grampozitivním bakteriím a běžným střevním anaerobům, CTZ vykazuje širší účinek léčby včetně gramnegativních patogenů. Tyto rozdíly se pravděpodobně odrážejí ve změněném zastoupení bakteriálních rodů, například *Enterococcus* byl častější u pacientů léčených AMC, zatímco rod *Blautia* se vyskytoval napříč oběma skupinami. Zjištění tedy naznačují, že antibiotická terapie ovlivňuje mikrobiotu na úrovni konkrétních bakteriálních druhů, ale bez významného narušení celkové druhové diverzity. Navíc žádný zdroj neuvádí přesné složení tzv. „zdravého mikrobiomu“.

7 Závěr

Diplomová práce se zabývala problematikou střevní mikrobioty v kontextu metabolického syndromu, obezity a T2DM. Literární rešerše shrnula aktuální poznatky o složení střevního mikrobiomu a jeho vlivu na metabolické a imunitní procesy lidského organismu. Byla zdůrazněna skutečnost, že v současnosti není možné přesně definovat pojem „normální mikrobiota“, jelikož složení mikrobiálního společenství se významně liší mezi jednotlivci a je ovlivňováno širokým spektrem genetických, environmentálních a dietetických faktorů.

V experimentální části bylo analyzováno složení střevního mikrobiomu pacientů s T2DM ve třech časových bodech v průběhu antibiotické terapie. Mikrobiální profil byl sledován pomocí metody PCR-DGGE. Ze získaných dat bylo identifikováno devět různých bakteriálních druhů, přičemž nejčastěji zastoupenými byly *Blautia hominis* a *Enterococcus faecium*. Statistická analýza neprokázala významné změny v diverzitě ani v bohatosti mikrobiálního společenství mezi jednotlivými časovými body.

Interpretace výsledků byla však omezena několika faktory. Prvním z nich je poměrně nízký počet zahrnutých pacientů, což snižuje statistickou sílu a možnost zobecnění závěrů. Další limitací je neúplnost dat v důsledku technických komplikací při sekvenaci (neúspěšné sekvenování pěti vzorků), což mohlo ovlivnit konzistenci a reprezentativnost výsledků. Z metodologického hlediska představuje omezení použití metody PCR-DGGE, která umožňuje pouze orientační hodnocení mikrobiální diverzity a nezachycuje detailní taxonomickou a funkční strukturu mikrobiomu. Nepoužití moderních metod sekvenování nové generace (NGS) dále limitovalo schopnost identifikovat méně zastoupené druhy a analyzovat mikrobiální komunity na úrovni jednotlivých kmenů či jejich metabolických funkcí.

Pro budoucí výzkum by bylo vhodné zařadit větší a demograficky vyrovnanější soubor pacientů, standardizovat postupy odběru a analýzy vzorků pro zvýšení konzistence dat a využít pokročilé molekulárně-genetické metody, jako je například sekvenování 16S rRNA genů. Hypotéza, která byla stanovena na začátku, tj. forma (druh) a typ podání antibiotik zásadně ovlivní složení mikrobioty trávicího traktu pacientů z krátkodobého i dlouhodobého hlediska (5 týdnů), nebyla potvrzena.

Tato diplomová práce přispěla k lepšímu pochopení souvislostí mezi složením střevní mikrobioty, patofyziologií metabolických onemocnění a podpořila význam mikrobiálního výzkumu v kontextu vývoje nových preventivních a terapeutických přístupů u pacientů s T2DM.

8 Seznam literatury

- BARAKAT, Beatriz a Martha E . F ALMEIDA, 2021. Biochemical and immunological changes in obesity. Archives of Biochemistry and Biophysics [online]. 708(1), 1 - 10 [cit. 2023-05-25]. ISSN 00039861. Dostupné z : doi:10.1016/j .abb.2021.108951
- ENDALIFER, Melese Linger a Gedefaw DIRESS, 2020. Epidemiology, Predisposing Factors, Biomarkers, and Prevention Mechanism of Obesity: A Systematic Review. Journal of Obesity [online]. 2020(1), 1 -8 [cit. 2023-05-25]. ISSN 2090-0708. Dostupné z : doi:10.1155/2020/6134362
- BISCHOFF, Stephan C . a Anna SCHWEINLIN, 2020. Obesity therapy. Clinical Nutrition ESPEN [online]. 38(1), 9 -18 [cit. 2023-05-25]. ISSN 24054577. Dostupné z : doi:10.1016/j .clnesp.2020.04.013
- LIN, Xihua a Hong LI, 2021. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Frontiers in Endocrinology [online]. 12(1), 1 - 9 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1664-2392. Dostupné z : doi:10.3389/fendo.2021.706978
- IYEN, Barbara, Stephen WENG, Yana VINOGRADOVA, Ralph K . AKYEA, Nadeem QURESHI a Joe KAI, 2021. Long-term body mass index changes in overweight and obese adults and the risk of heart failure, cardiovascular disease and mortality: a cohort study of over 260,000 adults in the UK. BMC Public Health [online]. 21(1), 1 - 13 [cit. 2023-05-26]. ISSN 1471-2458. Dostupné z : doi:10.1186/s12889-021-10606-1
- BOGERS, Rik P ., 2007. Association of Overweight With Increased Risk of Coronary Heart Disease Partly Independent of Blood Pressure and Cholesterol Levels subtitle A Meta-analysis of 21 Cohort Studies Including More Than 300 000 Persons/ subtitle. Archives of Internal Medicine [online]. 167(16) [cit. 2023-05-26]. ISSN 0003-9926. Dostupné z : doi:10.1001/archinte.167.16.1720
- LIU, Bing-Nan, Xiao-Tong LIU, Zi-Han LIANG a Ji-Hui WANG, 2021. Gut microbiota in obesity. World Journal of Gastroenterology [online]. 27(25), 3837-3850 [cit. 2023-05-27]. ISSN 1007-9327. Dostupné z : doi:10.3748/wjg.v27.i25.3837
- MA, Zhanshan (Sam), Lianwei LI a Nicholas J . GOTELLI, 2019. Diversity-disease relationships and shared species analyses for human microbiome-associated diseases. The ISME Journal [online]. 13(8), 1911-1919 [cit. 2023-05-27]. ISSN 1751-7362. Dostupné z : doi:10.1038/s41396-019-0395-y
- SAPRA, Amit a Priyanka BHANDARI, 2023. Diabetes Mellitus [online]. 1 . StatPearls: StatPearls Publishing [cit. 2023-05-28]. ISBN 31855345. Dostupné z : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
- COLE, Joanne B . a Jose C . FLOREZ, 2020. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. Nature Reviews Nephrology [online]. 16(7), 377-390 [cit. 2023-05-28]. ISSN 1759-5061. Dostupné z : doi:10.1038/s41581-020-0278-5

- KLEIN, Barbara E K , Ronald KLEIN, Scot E MOSS a Karen J CRUICKSHANKS, 1996. Parental History of Diabetes in a Population-Based Study. *Diabetes Care* [online]. 19(8), 827-830 [cit. 2023-05-28]. ISSN 0149-5992. Dostupné z : doi:10.2337/diacare.19.8 .827
- FAJANS, Stefan S ., Graeme I. BELL a Kenneth S. POLONSKY, 2001. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *New England Journal of Medicine* [online]. 345(13), 971-980 [cit. 2023-05-28]. ISSN 0028-4793. Dostupné z : doi:10.1056/NEJMra002168
- SHIELDS, B. M ., S. HICKS, M. H. SHEPHERD, K. COLCLOUGH, A. T. HATTERSLEY a S. ELLARD, 2010. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing?. *Diabetologia* [online]. 53(12), 2504-2508 [cit. 2023-05-28]. ISSN 0012-186X. Dostupné z : doi:10.1007/s00125-010-1799-4
- ARON-WISNEWSKY, Judith, Karine CLÉMENT a Max NIEUWDORP, 2019. Fecal Microbiota Transplantation: a Future Therapeutic Option for Obesity/Diabetes?. *Current Diabetes Reports* [online]. 19(8), 1 -9 [cit. 2023-05-30]. ISSN 1534-4827. Dostupné z : doi:10.1007/s11892-019-1180-z
- GÉRARD, Céline a Hubert VIDAL, 2019. Impact of Gut Microbiota on Host Glycemic Control. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 10(1), 1 -13 [cit. 2023-05-30]. ISSN 1664-2392. Dostupné z : doi:10.3389/fendo.2019.00029
- LAAKSONEN, D. E ., 2002. Metabolic Syndrome and Development of Diabetes Mellitus: Application and Validation of Recently Suggested Definitions of the Metabolic Syndrome in a Prospective Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* [online]. 156(11), 1070-1077 [cit. 2023-06-11]. ISSN 00029262. Dostupné z : doi:10.1093/aje/kwf145
- LE CHATELIER, Emmanuelle, Trine NIELSEN, Junjie QIN, et al., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* [online]. 2013-08-29, **500**(7464), 541-546 [cit. 2025-01-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z : doi:10.1038/nature12506
- JIANG, Rongsheng, Zhengri CONG, Likun ZHENG, et al., 2024. Global research trends in regulating gut microbiome to improve type 2 diabetes mellitus: bibliometrics and visual analysis. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2024-6 -3 , **15** [cit. 2025-01-16]. ISSN 1664-2392. Dostupné z : doi:10.3389/fendo.2024.1401070
- OUCHI, Noriyuki, Jennifer L. PARKER, Jesse J. LUGUS a Kenneth WALSH, 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. **11**(2), 85-97 [cit. 2025-01-16]. ISSN 1474-1733. Dostupné z : doi:10.1038/nri2921
- ZHONG, Huanzi, Huahui REN, Yan LU, et al., 2019. Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine* [online]. **47**, 373-383 [cit. 2025-01-16]. ISSN 23523964. Dostupné z : doi:10.1016/j .ebiom.2019.08.048

SANGER, F ., S . NICKLEN a A . R . COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **74**(12), 5463-5467 [cit. 2025-04-01]. ISSN 0027-8424. Dostupné z : doi:10.1073/pnas.74.12.5463

SIKKEMA-RADDATZ, Birgit, Lennart F . JOHANSSON, Eddy N . DE BOER, et al., 2013. Targeted Next-Generation Sequencing can Replace Sanger Sequencing in Clinical Diagnostics. *Human Mutation* [online]. **34**(7), 1035-1042 [cit. 2025-04-01]. ISSN 10597794. Dostupné z : doi:10.1002/humu.22332

TAN, Siun Chee, Beow Chin YIAP a Joakim LUNDEBERG, 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *BioMed Research International* [online]. **2009**(1) [cit. 2025-04-03]. ISSN 2314-6133. Dostupné z : doi:10.1155/2009/574398

GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA, 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **133**(3), 1 -4 [cit. 2025-04-03]. ISSN 0022202X. Dostupné z : doi:10.1038/jid.2013.1

SLATKO, Barton E ., Andrew F . GARDNER a Frederick M . AUSUBEL, 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. **122**(1) [cit. 2025-04-03]. ISSN 1934-3639. Dostupné z : doi:10.1002/cpmb.59

BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY, 2013. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* [online]. 2013-11-11, **98**(6), 236-238 [cit. 2025-04-03]. ISSN 1743-0585. Dostupné z : doi:10.1136/archdischild-2013-304340

JAY, Zackary J . a William P . INSKEEP, 2015. The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales. *Biology Direct* [online]. **10**(1) [cit. 2025-04-03]. ISSN 1745-6150. Dostupné z : doi:10.1186/s13062-015-0065-6

RINNINELLA, Emanuele, Pauline RAOUL, Marco CINTONI, Francesco FRANCESCHI, Giacinto Abele Donato MIGGIANO, Antonio GASBARRINI a Maria Cristina MELE, 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* [online]. **7** (1) [cit. 2025-04-07]. ISSN 2076-2607. Dostupné z : doi:10.3390/microorganisms7010014

JANDHYALA, Sai Manasa, 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* [online]. **21**(29), 29 [cit. 2025-04-07]. ISSN 1007-9327. Dostupné z : doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787

STOJANOV, Spase, Aleš BERLEC a Borut ŠTRUKELJ, 2020. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory

Bowel disease. *Microorganisms* [online]. **8** (11), 8 [cit. 2025-04-07]. ISSN 2076-2607. Dostupné z : doi:10.3390/microorganisms8111715

GRUNDY, Scott M., 2016. Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine* [online]. **26**(4), 364-373 [cit. 2025-04-07]. ISSN 10501738. Dostupné z : doi:10.1016/j.tcm.2015.10.004

GRUNDY, Scott M., James I. CLEEMAN, Stephen R. DANIELS, et al., 2005. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation* [online]. 2005-10-25, **112**(17), 2735-2752 [cit. 2025-04-07]. ISSN 0009-7322. Dostupné z : doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404

SWARUP, Supreya, Intisar AHMED, Yulia GRIGOROVA a Roman ZELTSER, 2024. Metabolic Syndrome. In: *Metabolic Syndrome*. StatPearls, -. ISBN NBK459248.

FESTI, Davide, Ramona SCHIUMERINI, Leonardo Henry EUSEBI, Giovanni MARASCO, Martina TADDIA a Antonio COLECCHIA, 2014. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology* [online]. **20**(43), 1 -17 [cit. 2025-04-08]. ISSN 1007-9327. Dostupné z : doi:10.3748/wjg.v20.i43.16079

YUMUK, Volkan, Constantine TSIGOS, Martin FRIED, Karin SCHINDLER, Luca Busetto, Dragan MICIC a Hermann TOPLAK, 2015. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obesity Facts* [online]. 2015-12-1, **8** (6), 402-424 [cit. 2025-04-14]. ISSN 1662-4025. Dostupné z : doi:10.1159/000442721

Type 2 diabetes, Rajeev Goyal, Mayank Singhal a Ishwarlal Jialal, 2023. Type 2 Diabetes. *StatPearls* [online]. StatPearls Publishing, **1** (30020625), 4 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>

Doporučený postup péče o diabetes mellitus 2. typu; J. Škrha, T. Pelikánová, M. Prázný, M. Kvapil, 2020. Doporučený postup péče o diabetes mellitus 2. typu. *Standardy péče o diabetes mellitus 2. typu* [online]. **1** (1), 18 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z : https://www.diab.cz/wp-content/uploads/2025/03/2020-1-standardy_DM_aktual_2020.pdf

THINGHOLM, Louise B., Malte C. RÜHLEMANN, Manja KOCH, et al., 2019. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host & Microbe* [online]. **26**(2), 252-264.e10 [cit. 2025-04-16]. ISSN 19313128. Dostupné z : doi:10.1016/j.chom.2019.07.004

WANG, Ting-Ye, Xin-Qing ZHANG, Ai-Ling CHEN, et al., 2020. A comparative study of microbial community and functions of type 2 diabetes mellitus patients with obesity and healthy people. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **104**(16), 7143-7153 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0175-7598. Dostupné z : doi:10.1007/s00253-020-10689-7

ZENNER, Christian, Thomas C. A. HITCH, Thomas RIEDEL, et al., 2021. Early-Life Immune System Maturation in Chickens Using a Synthetic Community of Cultured Gut Bacteria. *MSystems* [online]. 2021-06-29, **6** (3), e01300-20 [cit. 2025-04-16]. ISSN 2379-5077. Dostupné z : doi:10.1128/mSystems.01300-20

SAFARCHI, Azadeh, Ghanyah AL-QADAMI, Cuong D . TRAN a Michael CONLON, 2025. Understanding dysbiosis and resilience in the human gut microbiome: biomarkers, interventions, and challenges. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2025-3 -4 , **16** [cit. 2025-04-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z : doi:10.3389/fmicb.2025.1559521

FALONY, Gwen, Marie JOOSSENS, Sara VIEIRA-SILVA, et al., 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* [online]. 2016-04-29, **352**(6285), 560-564 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0036-8075. Dostupné z : doi:10.1126/science.aad3503

EVERETT, Estelle a Nestoras MATHIOUDAKIS, 2018. Update on management of diabetic foot ulcers. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **1411**(1), 153-165 [cit. 2025-04-16]. ISSN 0077-8923. Dostupné z : doi:10.1111/nyas.13569

PETERS, Edgar J . G ., Benjamin A . LIPSKY, Éric SENNEVILLE, et al., 2020. Interventions in the management of infection in the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* [online]. **36**(S1) [cit. 2025-04-16]. ISSN 1520-7552. Dostupné z : doi:10.1002/dmrr.3282

WILDING, John P .H ., Rachel L . BATTERHAM, Salvatore CALANNA, et al., 2021. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *New England Journal of Medicine* [online]. 2021-03-18, **384**(11), 989-1002 [cit. 2025-04-18]. ISSN 0028-4793. Dostupné z : doi:10.1056/NEJMoa2032183

MAGNE, Fabien, Martin GOTTELAND, Lea GAUTHIER, Alejandra ZAZUETA, Susana PESOA, Paola NAVARRETE a Ramadass BALAMURUGAN, 2020. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* [online]. **12**(5) [cit. 2025-04-18]. ISSN 2072-6643. Dostupné z : doi:10.3390/nu12051474

AMERI, Abigail J , Zachary A LEWIS a J C DUNLAP, 2021. Shannon entropy as a metric for conditional gene expression in *Neurospora crassa*. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [online]. 2021-04-01, **11**(4), 10 [cit. 2025-04-19]. ISSN 2160-1836. Dostupné z : doi:10.1093/g3journal/jkab055

NISHIDA, Minoru, Takeo MURAKAWA, Toshiaki KAMIMURA, et al., 1976. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ceftezole, a New Cephalosporin Derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **10**(1), 1 -13 [cit. 2025-04-19]. ISSN 0066-4804. Dostupné z : doi:10.1128/AAC.10.1 .1

NOTO, TAKAO, TOSHIYUKI NEHASHI, HISAO ENDO, et al., 1976. Ceftezole, a new cephalosporin C derivative. I . In vitro and in vivo antimicrobial activity. *The Journal of*

Antibiotics [online]. **29**(10), 1058-1070 [cit. 2025-04-19]. ISSN 0021-8820. Dostupné z : doi:10.7164/antibiotics.29.1058

Akhavan BJ, Khanna NR a Vijhani P , 2023. *Amoxicillin* [online]. 3 . StatsPearls [cit. 2025-04-19]. Dostupné z : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/>

GAUTHIER, Michel, 2008. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach. Canada. 10.20381/RUOR-19878. Dizertační práce. University of Ottawa.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

T2DM – diabetes 2 . typu

IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny

DNA – deoxyribonukleová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

WHO – World Health Organisation

BMI – Body Mass Index

TRAIL – ligand indukující apoptózu z rodiny TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand)

GDF-15 – růstový a diferenciací faktor 15

OGT – O -linked N -acetylglukosamin transferáza

JNK – c -Jun NH₂ terminální kináza

NF- κ B – signální dráha nukleárního faktoru

TNF- α – Tumor Nekrosis Faktor α

IL-1 – interleukin – 1

IL-6 – interleukin – 6

LDL - lipoproteiny s nízkou hustotou (Low-Density Lipoprotein)

HDL - lipoproteiny s vysokou hustotou (High-Density Lipoprotein)

KVO – kardiovaskulární onemocnění

MSH2 – MutS homolog 2

BRCA1 - BReast CAncer gene 1

MK – mastné kyseliny

IGF-1 – inzulin like growth factor

IL-17 – interleukin 17

RANKL – receptorový aktivátor jaderného faktoru- κ B ligandu

TGF- β – Tumor growth factor beta

BMP - kostní morfogenetické proteiny

IFN γ – Interferon γ

FMT – fekální transplantace

SAFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem

CD – clostridiová infekce

IBD – nespecifické střevní záněty

T1DM – diabetes 1 . typu

MODY – maturity-onset diabetes of the young

HNF1A – Hepatic Nuclear Factor 1 α

GCK – glukokináza

HLA - Human Leucocyte Antigene

OGTT – orální glukózový toleranční test

DASH – Dietary Approaches to Stop Hypertension

IBTs – léky s inkretinovým efektem

WHR – waist hip ratio

DPP-4 - inhibitory dipeptidylpeptidázy-4

GLP-1 – glutathion like peptide

rRNA – ribonukleová kyselina
Gpr41 a Gpr43 - G -proteiny exprimovaných v adipocytech
TAG – triacylglyceroly
LGC - Pacienti s nízkým počtem genů
HGC - Pacienti s vysokým počtem genů
ddNTPs - dideoxynukleotidy
NGS – Next generation sequencing
FISH - fluorescenční hybridizace in situ
CGH - genomová hybridizace

11 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek č.1 : Změny v metabolismu u pacientů s obezitou.....	13
Tabulka č. 1 : Hlavní biochemické a imunologické změny a jejich následky.....	15
Obrázek č. 2 : Klasifikace ulcerózních vředů.....	19
Obrázek č. 3 : Doporučení České diabetologické společnosti 2017 pro algoritmus léčby hyperglykemie u nemocných s DM 2	21
Obrázek č. 4 : Změny v poměru kmenů bakterií rodu Bacteroidetes a Firmicutes.....	26
Obrázek č. 5 : Schéma PCR.....	32
Obrázek č. 6 : Postup Sangerova sekvenování.....	33
Tabulka č. 2 : Příprava PCR vzorků a potřebný materiál.....	36
Tabulka č. 3 : Příprava DGGE vzorků a potřebný materiál.....	37
Tabulka č. 4 : Příprava DGGE vzorků a potřebný materiál.....	37
Tabulka č. 5 : Příprava DNA cleanup and concentration a potřebný materiál.....	38
Tabulka č. 6 : Příprava DNA cleanup and concentration a potřebný materiál.....	39
Tabulka č. 7 : Souhrnná tabulka pacientů – týdny před léčbou, po léčbě a po vysazení léčby a po dlouhodobém sledování.....	41
Obrázek č. 7 : Výsledky DGGE – Klastrování mikrobioty pacientů léčených ceftazidimem (zeleně) a amoxicilinem (modře) na základě změn ve složení střevního mikrobiomu v průběhu kontinuální léčby.....	42
Obrázek č.8 : Výsledky DGGE – Klastrování mikrobioty pacientů léčených ceftazidimem (zeleně) a amoxicilinem (modře) na základě změn ve složení střevního mikrobiomu v průběhu kontinuální léčby.....	42
Obrázek č. 9 : Výsledky DGGE – CTZ PCOA.....	43
Obrázek č. 10: Výsledky DGGE – ATB PCOA ALL.....	43
Obrázek č. 11: Výsledky DGGE – CTZ PCOA2.....	44
Obrázek č. 12: Výsledky DGGE – PCOA Continual.....	44
Obrázek č. 13: Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky stolice diabetických pacientů.....	45
Tabulka č. 8 : Statistické porovnání skupin pacientů.....	45
Tabulka č. 9 : Hodnoty BMI, hmotnost a pohlaví pacientů.....	46
Tabulka č. 10: Shannonovy entropie pro vzorky stolice diabetických pacientů.....	47
Tabulka č. 11: Obsah jednotlivých druhů bakterií v mikrobiomu pacientů.....	48

