

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Modulace střevní mikrobioty dětí s Crohnovou chorobou

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Halbrštátová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Modulace střevní mikrobioty dětí s Crohnovou chorobou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, poskytnutí cenných rad a připomínek a za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala ostatním členům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za jejich trpělivost a rady při práci v laboratoři. Dále děkuji za spolupráci na pracích v laboratoři Ing. Nikol Modráčkové a Ing. Jakubovi Mrázkovi, Ph.D. a ostatním členům Akademie věd České republiky (AV), Ústavu živočišné fyziologie a genetiky za spolupráci na analýze a jejich rady.

Modulace střevní mikrobioty dětí s Crohnovou chorobou

Souhrn

Crohnova choroba je řazena společně s ulcerózní kolitidou a indeterminovanou kolitidou do skupiny idiopatických střevních zánětů označovaných jako IBD (inflammatory bowel diseases). Počet případů celosvětově roste, a to především ve vyspělých zemích z důvodu pokročilé industrializace. Jedná se o imunologicky podmíněná multifaktoriální onemocnění, u nichž se střídají fáze relapsu (akutního ataku) a remise (polevení), a která postihují gastrointestinální trakt a narušují jeho funkčnost. Ačkoli je známo mnoho faktorů, jež přispívají ke vzniku onemocnění, přesné příčiny dosud známy nejsou. IBD postihují především mladé pacienty a podstatně mění kvalitu jejich života.

Modulace je realizována několika metodami, mezi něž řadíme léčbu enterální výživou. Cílem této práce je posoudit vliv enterální výživy na střevní mikrobiotu dětí s Crohnovou chorobou pomocí sekvenování nové generace. Byly hodnoceny kvantitativní a kvalitativní změny složení mikrobioty, které byly srovnány s dostupnými údaji literatury, a na jejich základě byla zhodnocena účinnost léčby. Vzhledem ke komplikovanosti výsledků je třeba budoucí klinická interpretace a konečné závěry studie budou uveřejněny v připravovaném článku.

Na počátku pokusu bylo do studie zařazeno 50 dětských pacientů Fakultní nemocnice v Motole, kteří byli podrobena léčbě enterální výživou po dobu 6 týdnů. Z důvodu náročnosti léčby se některým pacientům nepodařilo léčbu dokončit. Čerstvé vzorky stolice byly analyzovány kultivačními a biochemickými testy, kterými jsem se zabývala v mé bakalářské práci s názvem Vliv enterální výživy na mikrobiotu dětí s Crohnovou nemocí vzniklou roku 2016. Navazující diplomová práce využívá k analýze mikrobioty metodu sekvenování. K izolaci DNA se podařilo zamrazit 3 vzorky od každého z 18 pacientů, a to před zahájením léčby 0. týden, při ukočování léčby 6. týden a s odstupem času 12. týden od zahájení. Pro analýzu bakteriální diverzity byla využita platforma sekvenování nové generace Ion TorrentTM neboli polovodičové sekvenování. Samotné sekvenování bylo z časových a ekonomických důvodů provedeno v Akademii věd České republiky, Ústavu živočišné fyziologie a genetiky.

Z důvodu velkého objemu dat byl vysloven obecný závěr, a to že v průběhu léčby enterální výživou byly zaznamenány vesměs pozitivní změny složení mikrobioty. Po ukončení léčby ve většině případů ale došlo k navrácení do stavu původního před zahájením léčebného procesu. Často sledované bakterie se v rámci mikrobioty jedince velmi lišily. V mnoha

případech tak došlo ke zkreslení celkového výsledku, například u rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus*, u nichž bylo zvýšení počtu způsobeno pravděpodobně infekcí. Výsledky byly ovlivněny řadou dalších faktorů.

Byl potvrzen základní předpoklad účinnosti léčby, a to změna poměru kmenů Firmicutes: Bacteroidetes ve prospěch kmene Firmicutes. Slibné výsledky byly zaznamenány u rodů *Blautia* a *Ruminococcus*, které se jeví jako potenciální probiotické mikroorganismy. Došlo k žádoucímu znásobení počtu rodu *Faecalibacterium*, do něhož spadá jedna z nejdiskutovanějších bakterií *Faecalibacterium prausnitzii*. Druhou charakteristickou bakterií v souvislosti s IBD je *Bacteroides fragilis*, u rodu *Bacteroides* byla zaznamenána žádoucí redukce taktéž potvrzující účinnost léčby enterální výživou.

Účinnost léčby vyvrací výsledky málo prokazatelného charakteru týkající se rodů *Lactobacillus* a *Prevotella*, či kmene Proteobacteria.

Došlo k charakteristické změně počtu některých méně diskutovaných bakterií, a to například rodu *Suterella* či rodu *Collinsella*, u nichž není přesná souvislost s IBD dosud známá.

Srovnáme-li tyto výsledky s výsledky podobných studií, lze potvrdit hypotézu práce, tedy že enterální výživa výrazně moduluje mikrobiotu, ačkoli by bylo třeba dalších dlouhodobějších ekonomicky a časově náročných studií k definitivnímu verdiktu.

Klíčová slova: Crohnova choroba, dieta, mikrobiota, sekvenování

Modulation of intestinal microbiota of children with Crohn's disease

Summary

Crohn's disease is associated with Ulcerative colitis and Indeterminate colitis in a group of idiopathic intestinal inflammations known as IBD (inflammatory bowel diseases). The number of cases is growing worldwide, especially in developed countries due to advanced industrialization. They are immunologically-mediated multifactorial disease in which the relapse phase (acute attack) and remission (let-up phase) alternate and which affect the gastrointestinal tract and disrupt its function. Although there are known many factors that contribute to the disease, exact causes are not yet known. IBD primarily affects young patients and significantly alters the quality of their lives.

Modulation is implemented through several methods, including enteral nutrition. The aim of this thesis is to evaluate the effect of enteral nutrition on the gut microbiota of children with Crohn's disease by next-generation sequencing. Quantitative and qualitative changes in the microbiota composition were assessed, which were compared with available literature data, and evaluated the efficacy of the treatment. Due to the complexity of the results, future clinical interpretations and the final findings of the study will be published in the forthcoming article.

At the beginning of the experiment, 50 pediatric patients at the Motol University Hospital, who had undergone enteral nutrition for 6 weeks, were included in the study. Due to the difficulty of treatment, some patients failed to complete the treatment. Fresh stool samples were analyzed by culture and biochemistry tests, which I dealt with in my bachelor thesis titled Influence of Enteral Nutrition on Microbiotics of Children with Crohn's Disease in 2016. The following thesis uses the sequencing method for microbiological analysis. To isolate the DNA, 3 samples from each of 18 patients were frozen, before the start of the treatment week 0, at the end of treatment week 6 and after a period of time, on week 12 from the start of treatment. For bacterial diversity analysis was used a next-generation sequencing platform Ion TorrentTM was used, or semiconductor sequencing. The sequencing itself was done for time-saving and economic reasons at the Czech Academy of Sciences, the Institute of Animal Physiology and Genetics.

Due to the large volume of data, a general conclusion was reached, and that was that positive changes in the composition of the microbiota were recorded during enteral nutrition. However, in the majority of cases, the condition has returned to the original state prior to the start of the treatment process.

Frequently observed bacteria highly varied in the microbiota of the individual. In many cases, the overall result has been distorted, for example in the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus*, where the increase in number has been caused by infection. The results were influenced by a number of other factors.

The baseline assumption of treatment efficacy, the ratio of Firmicutes: Bacteroidetes in behalf of Firmicutes was confirmed. Promising results were recorded in the genera of *Blautia* and *Ruminococcus*, which are potential probiotic micro-organisms. There was a desirable multiplication of the number of *Faecalibacterium* genera, which contains one of the most discussed bacteria named *Faecalibacterium prausnitzii*. The second characteristic bacterium associated with IBD is *Bacteroides fragilis*. In the genus *Bacteroides* the required reduction was also found to confirm the efficacy of enteral nutrition.

The efficacy of the treatment disproves the results of little demonstrable character regarding the *Lactobacillus* and *Prevotella* genera, or the Proteobacteria phylum.

There has been a characteristic change in the number of some less discussed bacteria, for example, the *Suterella* genus or the *Collinsella* genus, where the exact relationship with IBD is not yet known.

In comparison with the results of similar studies, the hypothesis of this thesis can be confirmed, ie that enteral nutrition significantly modulates the microbiota; although further longer-term economics and time-consuming studies are required for the final verdict.

Keywords: Crohn's disease, diet, microbiota, sequencing

Obsah

1	Úvod	1
2	Hypotéza.....	2
3	Cíl práce	3
4	Seznam použitých zkratk a symbolů	4
5	Literární přehled současného stavu problematiky.....	5
5.1	Zánětlivá střevní onemocnění	5
5.2	Crohnova choroba.....	5
5.2.1	Rozdíl mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou	5
5.2.2	Etiologie	6
5.2.2.1	Genetické faktory	7
5.2.2.2	Environmentální faktory	8
5.2.3	Příznaky a komplikace	10
5.2.4	Hodnocení onemocnění	11
5.2.5	Způsoby léčby	11
5.2.5.1	Medikamentózní léčba.....	11
5.2.5.2	Biologická léčba.....	13
5.2.5.3	Chirurgická léčba	14
5.2.5.4	Probiotika a prebiotika	14
5.2.5.5	Fekální mikrobiální transplantace	16
5.2.5.6	Alternativní léčba	17
5.2.5.7	Dietetická opatření	18
5.3	Mikrobiota.....	24
5.3.1	Zdravá střevní mikrobiota	24
5.3.1.1	Funkce mikrobioty	28
5.3.1.2	Faktory ovlivňující složení mikrobioty	29
5.3.2	Dysbiosis střevní mikrobioty při IBD	30
5.3.2.1	Dysbiosis bakterií.....	31
5.3.2.2	Dysbiosis hub.....	34
5.3.2.3	Dysbiosis virů	34
5.3.3	Modulace mikrobioty jako léčebná strategie IBD	35
5.3.4	Metody analýzy střevní mikrobioty	35
5.4	Sekvenování nové generace.....	36
5.4.1	Princip sekvenování	36
5.4.2	Rozdíly mezi NGS a konvenčními metodami	37

5.4.3	Konvenční sekvenování (první generace)	37
5.4.4	Sekvenování nové generace (druhá generace).....	38
5.4.4.1	Roche 454	40
5.4.4.2	Illumina/Solexa	41
5.4.4.3	Life Technologies/SOLiD	41
5.4.4.4	Life Technologies/Ion torrent	41
5.4.5	Single-molecule sekvenování (třetí generace).....	41
6	Metody a materiál	43
6.1	Charakterizace vzorků.....	43
6.2	Metoda NGS	46
6.2.1	Izolace DNA	46
6.2.2	Příprava amplikonů PCR.....	47
6.2.3	Příprava knihovny	49
6.2.3.1	Ošetření konců DNA	49
6.2.3.2	Ligace adaptorů.....	50
6.2.3.3	První purifikace kuličkami Ampure Beads	50
6.2.3.4	Amplifikace	51
6.2.3.5	Druhá purifikace kuličkami AmpureBeads	51
6.2.3.6	Ředění a kvantifikace knihoven	52
6.2.4	Příprava templátu	52
6.2.5	Sekvenování.....	52
6.2.6	Analýza dat	52
7	Výsledky	53
7.1.1	Faktory ovlivňující výsledky	54
7.1.2	Distribuce taxonomických skupin dle odběrů	54
7.1.3	Rozdělení taxonomických skupin dle pacientů	59
7.1.4	Rozdělení taxonomických skupin dle jednotlivých odběrů.....	62
7.1.5	Celkové zhodnocení	65
8	Diskuse	67
9	Závěr	76
10	Seznam literatury	78
11	Samostatné přílohy	85

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá sledováním změn střevní mikrobioty u dětských pacientů s Crohnovou chorobou vlivem enterální výživy.

Lidské střevo je kolonizováno velkým počtem mikroorganismů, kolektivně nazývaných jako střevní mikrobiota. Komplexní ekosystém střevní mikrobioty obsahuje 10^{13-14} bakterií, což zahrnuje více než 35 000 bakteriálních druhů se vzrůstající rozmanitostí a počtem směrem od žaludku po tlusté střevo. Tyto mikroorganismy žijí v komenzálním vztahu s naším tělem a zajišťují řadu významných funkcí. Složení mikrobioty je velmi individuální a je označováno jako mikrobiální fingerprint, neboli otisk prstu, který je využíván i ve forenzních analýzách a kriminalistice. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících složení mikrobioty. K udržení homeostáze a prevence před abnormální imunitní odpovědí jsou využívány nejrůznější mechanismy. Často se ale stane, že tyto mechanismy selžou a dojde k narušení rovnováhy vnitřního prostředí mikrobioty, k tzv. dysbiose. V závislosti na míře dysbiosy může tato nerovnováha vyústit v řadu onemocnění a poruch trávicí soustavy.

Zánětlivá střevní onemocnění zahrnující ulcerózní kolitidu, Crohnovu chorobu a indeterminovanou kolitidu jsou právě skupinou onemocnění vyvolaných dysbiosou mikrobioty. Jedná se o chronická, imunitně podmíněná onemocnění gastrointestinálního traktu narušující jeho funkčnost. Charakteristickým znakem pro průběh onemocnění je střídání fáze relapsu (akutního ataku) a remise (polevení). Přestože je známo mnoho faktorů, jež přispívají ke vzniku těchto onemocnění, přesné příčiny nejsou dosud známy. Zánětlivá střevní onemocnění postihují především mladé pacienty a podstatně zhoršují kvalitu jejich života.

Jelikož na Crohnovu chorobu nebyl doposud nalezen účinný lék, je cílem léčby pouze potlačení zánětu, zkrácení akutní fáze onemocnění a dosažení dlouhodobě bezpříznakového období. Slibnou léčebnou strategií budoucnosti se jeví modulace střevní mikrobioty. Léčebných metod modulace mikrobioty je více, patří mezi ně právě léčba enterální výživou.

V této práci bude využita metoda sekvenování nové generace ke kvantitativní a kvalitativní analýze střevní mikrobioty. Vzhledem k tomu, že 70% střevních bakterií je považováno za nekultivovatelné, jsou sekvenační techniky ohromným přínosem a umožňují doplnit kultivační metody, které byly využity v mé bakalářské práci s názvem Vliv enterální výživy na mikrobiotu dětí s Crohnovou nemocí vzniklou roku 2016 a na níž navazuje právě tato diplomová práce. Výsledky sekvenace budou zhodnoceny a srovnány s výsledky jiných studií zabývajících se touto problematikou a následně prodiskutovány.

2 Hypotéza

Crohnova nemoc (CN) je řazena do skupiny zánětlivých střevních onemocnění. Jelikož na Crohnovu chorobu nebyl doposud nalezen účinný lék, je cílem léčby pouze potlačení zánětu, zkrácení akutní fáze onemocnění a dosažení dlouhodobě bezpříznakového období. Jednou z možností léčby je enterální výživa řazena mezi metody modulace střevní mikrobioty.

Předpokladem diplomové práce je, že dieta ve formě enterální výživy bude mít vliv na kvantitativní a kvalitativní složení střevní mikrobioty pacientů s Crohnovou nemocí.

3 Cíl práce

Cílem této práce je posoudit vliv enterální výživy na střevní mikrobiotu dětí s Crohnovou chorobou pomocí sekvenování nové generace. Budou hodnoceny kvantitativní a kvalitativní změny složení mikrobioty, které budou srovnány s dostupnými údaji literatury.

4 Seznam použitých zkratk a symbolů

UC (Ulcerative colitis) = ulcerózní kolitida

CD (Crohn's disease) = Crohnova choroba

ACCESS (The Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology study)

FMT (fecal Microbiota Transplantation) = fekální transplantace mikrobioty

GIT = gastrointestinální trakt

GM (gut microbiota) = střevní mikrobiota

IBD (Inflammatory bowel diseases) = zánětlivá střevní onemocnění

IC (Indeterminate colitis) = indeterminovaná kolitida

NGS (Next Generation Sequencing) = sekvenování nové generace

SCFA (short-chain fatty acids) = mastné kyseliny s krátkým řetězcem

EN (enteral nutrition) = enterální výživa

PN (parenteral nutrition) = parenterální výživa

PEN (partial enteral nutrition) = doplňková enterální výživa

EEN (exclusive enteral nutrition) = výhradní enterální výživa

NG (nasogastric tube) = nasogastrická trubice

5 Literární přehled současného stavu problematiky

5.1 Zánětlivá střevní onemocnění

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) zahrnující ulcerózní kolitidu (UC), Crohnovu chorobu (CD) a indeterminovanou kolitidu (IC) jsou chronická, imunitně podmíněná onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) narušující jeho funkčnost. Jedná se o onemocnění, u nichž se střídají fáze relapsu (akutního ataku) a remise (polevení). Cílem léčby je v současné době navození dlouhotrvající remise a zabránění relapsu (Derikx et al., 2016; Mitrová, 2012).

Sokol et al. (2017) zmiňuje, že IBD postihují především mladé pacienty a podstatně mění kvalitu jejich života.

Miyoshi a Chang (2016) uvádějí, že v Evropě je zánětlivými střevními onemocněními postiženo 2,5 milionu lidí a že počet případů celosvětově roste, a to především v Asii, Jižní Americe a na Středním východě z důvodu rostoucí industrializace.

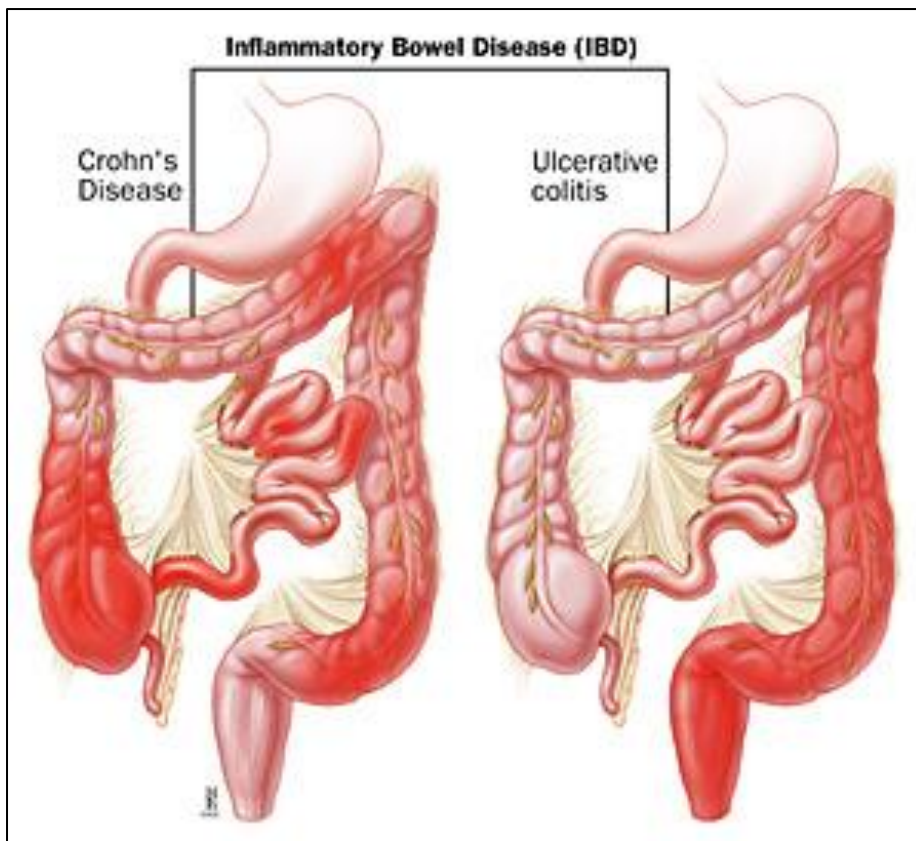
5.2 Crohnova choroba

5.2.1 Rozdíl mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou

Hlavním rozdílem CD a UC je lokalizace. Zatímco CD postihuje nejčastěji terminální ileum, ale může postihnout jakoukoli část gastrointestinálního traktu, UC postihuje pouze tlusté střevo (Vermeire, et al., 2015). Rozdíl v lokalizaci je patrný na obrázku (Obr. 1) níže.

Karášková et al. (2008) doplňuje, že v případě UC je maximum změn patrných v oblasti konečníku, kde dochází často ke vzniku vředů, z jejichž latinského názvu je odvozen název onemocnění.

Škrabálková (2013) uvádí další rozdíl v lokalizaci, a to poškození různých vrstev střevní stěny. CD může být lokalizována v jakékoli vrstvě, zatímco UC je vymezena výhradně v oblasti submukosy.



Obr. 1: Rozdíl v lokalizaci Crohnovy choroby a Ulcerózní kolitidy (Johns Hopkins Gastroenterology and Hepatology, 2017).

5.2.2 Etiologie

I přestože je známo mnoho faktorů, jež přispívají ke vzniku onemocnění IBD, přesné příčiny nejsou dosud známy.

Základní předpoklad je založen na identifikaci příčiny IBD jako přehnané imunitní reakce střevní sliznice vůči komenzálním bakteriím střevní mikrobioty, což vede k zánětlivému procesu u geneticky citlivých jedinců. Tento předpoklad je podpořen souvislostí lokalizace onemocnění v GIT a vysokým počtem mikroorganismů v těchto částech GIT (Derikx et al., 2016). Kaskáda imunitních prozánětlivých odpovědí zahrnuje především pomocné T-lymfocyty (zejména T_H1 a T_H17). Pomocné T-lymfocyty produkují v odpovědi na expozici bakteriálním produktům různé skupiny cytokinů; faktor nádorové nekrózy α (TNF- α), interferon γ a interleukiny IL-12, IL-23 (Levine and Wine, 2013).

Předpoklad abnormální imunitní reakce podporuje i Pickard et al. (2017), který uvádí, že u pacientů s IBD byla zaznamenána rapidně zvýšená sekrece protilátek IgG v mukose protichůdně k fyziologické IgA odpovědi proti komenzálním bakteriím. Reaktivita séra k mikrobiálním antigenům byla také zvýšená. Navíc byly lymfocyty izolované z mukosy

pacientů s Crohnovou chorobou hyperreaktivní ke stimulům antigenů od komenzálů (například k flagellinu, dominantním antigenu v případě Crohnovy choroby).

Fenotyp onemocnění je různý, což se projevuje variabilním rizikem operace, výživovým stavem a průběhem onemocnění. Sheehan et al. (2015) například uvádí významné rozdíly v lokalizaci onemocnění mezi asijskou a australskou skupinou.

Společné působení rizikových faktorů určuje, kdo onemocní, zatímco infekce onemocnění IBD spouští (Sheehan et al., 2015).

Základní faktory vzniku onemocnění IBD se dělí na faktory genetické a faktory environmentální.

5.2.2.1 Genetické faktory

Ne všechny formy IBD jsou ovlivněny změnami střevní mikrobioty stejně. Existují případy velmi časných ataků IBD, které se objevily velmi brzy po porodu, čili v době, kdy ještě nebyla vytvořena střevní mikrobiota. Tyto případy jsou pravděpodobně způsobené dominantními genetickými defekty, jako například nedostatkem genu IL-10 a jeho receptoru, který působí protizánětlivě (Miyoshi and Chang, 2016).

Významným objevem byla v oblasti genetických faktorů identifikace genu NOD2, který přispívá konkrétně ke vzniku Crohnovy choroby (Derikx et al., 2016). Griffiths (2005) uvádí jako druhý gen přispívající primárně k CD, gen CARD15. Pochopení polymorfismu v těchto dvou genech pomohlo pochopit vztah mezi vrozenou imunitou a bakteriemi střevní mikrobioty. Miyoshi a Chang (2016) uvádějí další příklady genů ATG16L1, IRGM, IL23R či CARD9. Sheehan et al. (2015) doplňuje příklady dále o geny XBP1 a ORMDL3 a jako společný důvod vyššího genetického rizika obecně uvádí autofagii (mechanismus, pomocí kterého buňky rozkládají samy sebe a zajišťují tak homeostázu), která vede k nevhodné vrozené imunitní odpovědi.

Byla identifikována spousta lokusů genů pro IBD, které jsou dávány do souvislosti s vrozenou imunitou, zodpovědnou za primární obranný systém proti komenzálním střevním bakteriím. Tento fakt podtrhuje význam interakce střevního zánětu a střevní mikrobioty (Derikx et al., 2016). V současné době se jedná přibližně o 200 lokusů (Sommer et al., 2017).

Mutace a polymorfismus v těchto genech způsobuje abnormální funkci Panethových buněk, což jsou specializované epiteliální buňky nacházející se ve střevních kryptách, které produkují peptidy k redukci bakterií ve střevní mukose. Mimo narušení procesu redukce bakterií dochází dále k narušení autofágie (Levine and Wine, 2013).

Z důvodu vysokých nákladů pro analýzu genomu jsou preferovány případy s rodinnou historií onemocnění či případy s extrémními projevy znaků onemocnění (Christodoulou et al., 2012).

Genetické faktory hrají vyšší roli u onemocnění diagnostikovaných v nízkém věku z důvodu vyšší genetické zátěže způsobující mutaci genomu. Předpokládá se, že u takových pacientů má nemoc agresivnější fenotyp, speciálně častěji diagnostikovaná Crohnova choroba je spojována s vyšší potřebou chirurgického zákroku a nižším poklesem zánětlivosti (Christodoulou et al., 2012).

5.2.2.2 Environmentální faktory

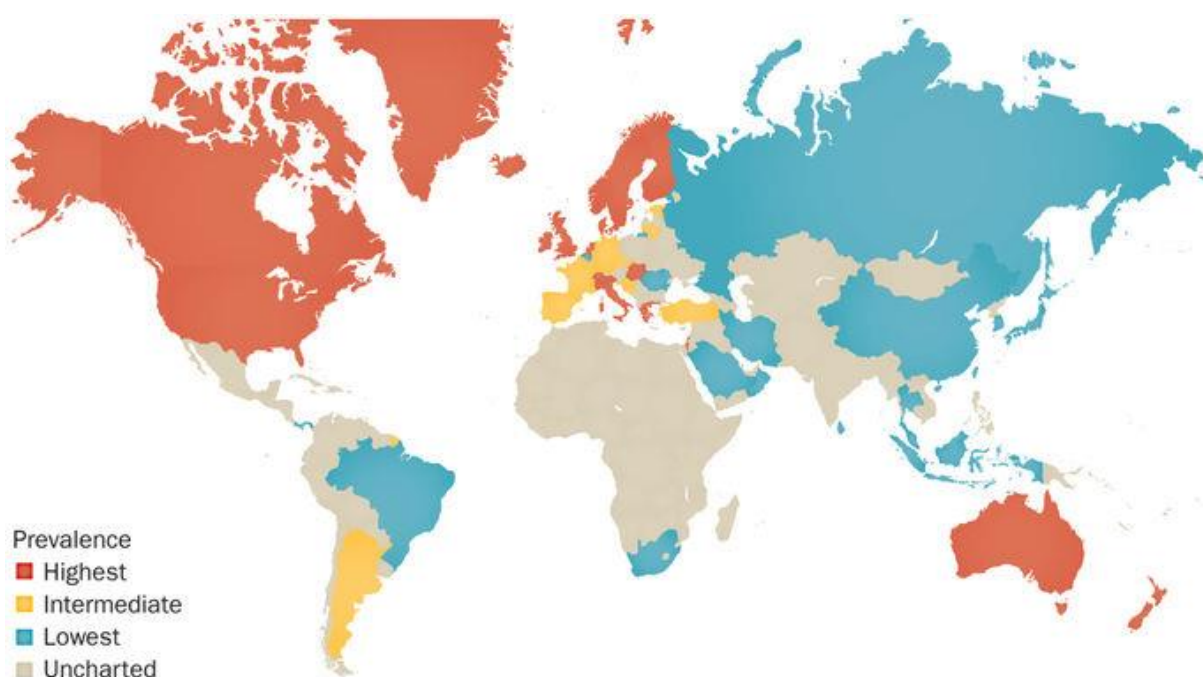
Environmentální faktory úzce souvisí s moderním životním stylem a více ovlivňují UC než CD (Sheehan et al., 2015).

Význam environmentálních faktorů zdůrazňuje rapidní nárůst incidence IBD (Ng et al., 2015).

Ng et al. (2015) provedl studii ACCESS (Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology study), která je jako jedna z mála lokalizovaná na území Asie a Austrálie ve srovnání s dřívějšími studiemi z oblasti Evropy či Ameriky, a tak umožňuje potvrzení fenoménu „westernizace“. Tento pojem zahrnuje změny v dietě, industriální vývoj, expozici k antibiotikům v dětství, vakcinaci, zvýšenou sanitaci a další změny charakteristické pro západní civilizaci. Jedná se o rizikové faktory jak pro IBD, tak i pro další onemocnění. Obrázek 2 (Obr. 2) představuje celosvětovou geografickou distribuci Crohnovy choroby. Červeně označeny jsou oblasti s nejvyšší incidencí, modře pak s nejnižší. Distribuce onemocnění potvrzuje zmiňovaný fenomén westernizace.

Kouření úzce souvisí se změnami v expresi a funkci genu NOD2. U CD je prokázáno kouření jako rizikový faktor, zatímco u UC má protektivní vliv (Sheehan et al., 2015).

Nárůst spotřeby antibiotik je spojen se zvýšeným rizikem vzniku CD, a to speciálně u dětí. Užívání antibiotik v těhotenství může indukovat změny střevní mikrobioty dítěte. Na druhou stranu je využívána antibiotická léčba podávána v nízkých dávkách, která prokazatelně zvyšuje množství SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem) ve střevě (Tlaskalová-Hogenová, 6.12.2017, pers. comm.). Expozice antibiotikům v prvních letech života je spojena s obezitou v těchto letech a rozvoji IBD (Sheehan et al., 2015).



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Obr. 2: Celosvětová geografická distribuce Crohnovy choroby. Nejvyšší distribuce je označena červeně, střední žlutě, nízká modře a šedivě jsou označeny oblasti s neznámou distribucí (Kaplan, 2015).

Z environmentálních faktorů lze dále jmenovat výživu a výživové zvyklosti. Současné změny stravovacích zvyklostí zahrnující preferenci zpracovaných, často vysoce tučných potravin s vysokým obsahem cukru, úzce souvisí se socioekonomickým rozvojem a na IBD mají prokazatelně vliv (Sheehan et al., 2015).

Ng et al. (2015) přidává k výživovým rizikovým faktorům chléb a redukci zeleniny, ovoce a vlákniny.

Je prokázáno, že emulzifikátory a běžně používaná aditiva mění střevní mikrobiotu myší a následně mohou indukovat zánět či metabolický syndrom. Diskutovaným výživovým faktorem je obezita, u níž se studie značně rozcházejí. Některé stylizují obezitu jako rizikový faktor rozvoje IBD, a to především u CD, u žen či dětí, zatímco jiné studie vliv obezity na rozvoj IBD popírají. Jak u obézních dětí s CD, tak i u dospělých pacientů existuje vyšší riziko, že v budoucnosti podstoupí chirurgický zákrok. Obezita může dále ovlivňovat účinnost medikamentózní léčby (Sheehan et al., 2015).

Ng et al. (2015) uvádí jako rizikový dietní faktor CD častou konzumaci džusu a u UC denní konzumaci pražených kukuřičných vloček (cornflakes). Protektivní vliv má naopak čaj a káva, které obsahují antioxidanty a v případě zeleného čaje navíc polyfenoly.

Dalším rizikovým faktorem je dle Levina a Winea (2013) gliadin obsažený v glutenu.

Kojení po dobu 12 měsíců a déle má silný protektivní efekt u CD. Fyzická aktivita může indukovat autofagii a působit tak protektivně. Vyrůstání dětí v domácnosti s mazlíčky, především se psi, umožňuje dětem expozici ke zvířecím mikroorganismům a tím lepší rozvoj imunity (Ng et al., 2015).

Pokročilé modely odhalují, že 60 % variability mikrobiálních druhů je dáno výživou. Změny ve výživě se odehrávají jak na úrovni složení střevní mikrobioty, tak na úrovni její funkce (Levine and Wine, 2013).

5.2.3 Příznaky a komplikace

Mezi příznaky patří krvavý průjem, často doprovázený břišními křečemi, či anorexie (Vermeire, et al., 2015). Derikx et al. (2016) doplňuje mezi příznaky ztrátu váhy a únavu. U některých pacientů se mohou objevit extraintestinální příznaky, a to například kožní léze, onemocnění kloubů či primární sklerotizující cholangitida, kterou vysvětluje Karásková et al. (2008) jako chronické progresivně fibrotizující zánětlivé onemocnění žlučovodů.

Nevyléčený zánět může vést k nejrůznějším komplikacím, například k zúžení střeva, fistulám či abscesům (Vermeire et al., 2015) či změnám váhy zacházejících do extrémů obezity nebo naopak malnutricie (Sheehan et al., 2015).

Malnutricie je způsobená několika faktory, a to malabsorpcí, narůstajícími ztrátami živin, vyššími potřebami energie, interakcí léků s živinami a sníženým denním příjmem živin. Snížený denní příjem živin bývá způsoben nejčastěji anorexií, nevolností, zvracením, porušeným sensorickým vnímáním a dietními omezeními. Sensorické vnímání může být narušeno léčbou metronidazolem. Často dochází k deficienci mikroprvků, především zinku, železa a niklu. U více než 85 % dětských pacientů s CD a 65 % dětských pacientů s UC došlo v době diagnózy k úbytku váhy. Malnutricie u dětí dále ústí v 15 – 40 % v poruchy růstu, zejména u dětí s CD (Shamir, 2009). Poruchy růstu se objevují u více než 46 % dětí s CD (Critch et al., 2012). Vlivem malnutricie může docházet až k zastavení růstu, které se častěji objevuje u dětí s CD než UC (Hartman et al., 2009).

Mohou se přidružit kampylobakteriové či klostridiové infekce (Pickard et al., 2017).

5.2.4 Hodnocení onemocnění

K hodnocení Crohnovy choroby se využívá v případě dětských pacientů Pediatric Crohn Disease Activity Index (PCDAI), u dospělých pak Crohn Disease Activity Index (CDAI). U nemocných ve fázi relapsu dosahuje PCDAI hodnoty více než 20 (Shamir, 2009), ve fázi remise hodnoty $\leq 7,5$. K hodnocení onemocnění se dále používá hodnota CRP (C-reaktivní protein) a další (Levine and Wine, 2013).

5.2.5 Způsoby léčby

Jelikož na Crohnovu chorobu nebyl doposud nalezen účinný lék, je cílem léčby pouze potlačení zánětu, zkrácení akutní fáze onemocnění a dosažení dlouhodobě bezpříznakového období. Jednou z možností léčby je enterální či parenterální výživa, dále je to medikamentózní léčba, biologická léčba, chirurgická léčba, léčba probiotiky a prebiotiky, fekální mikrobiální transplantace a alternativní terapie.

5.2.5.1 Medikamentózní léčba

Medikamentózní léčba je v současné době výrazně orientovaná na následky IBD, než na jejich příčiny. Principem léčby je blokáce zánětlivé imunitní odpovědi (Frič, 2010).

Existují dva typy medikamentózní terapie, a to léčba indukční a léčba udržovací. Indukční léčba vede k potlačení akutně vzniklého zánětu a je založena na vysokých dávkách léků. Cílem udržovací léčby je pak dlouhodobé udržení remise a je snižován počet i dávky léků (Bajerová et al., 2013).

Aminosalicyláty, antibiotika, kortikoidy a biologickou léčbu volíme pro indukční fázi léčby, pro dlouhodobou terapii (udržovací fázi) k udržení remise jsou vhodné aminosalicyláty, imunosupresiva a biologická léčba (Lukáš, 2011).

5.2.5.1.1 Aminosalicyláty

Lukáš (2011) uvádí, že význam aminosalicylátů v terapii CD klesá. Dnes se využívají především k prevenci recidivy CD po provedené chirurgické resekci (tj. odstranění části nebo celého střeva) ve formě čípků nebo rektálních nálevů. Lze je využít i pro mírné formy terminální ileitidy a CD lokalizované na tračníku.

Nejvýznamnějšími léky jsou mesalazin a sulfasalazin (Lukáš, 2011).

Derikx et al. (2016) uvádí aminosalicyláty, a to konkrétně 5-aminosalicylovou kyselinu jako první volbu léčby UC.

5.2.5.1.2 Glukokortikoidy a kortikosteroidy

Čierna (2011) charakterizuje glukokortikoidy (např. prednison, medrol) jako léky hormonálního charakteru, které mají silné protizánětlivé účinky, ale jsou využitelné i pro potlačení imunitních reakcí. Lukáš (2011) glukokortikoidy rozděluje do dvou skupin, a to na glukokortikoidy se systémovým účinkem a topicky působící glukokortikoidy.

Glukokortikoidy se systémovým účinkem (např. kortizol) jsou podávány především v perorální nebo parenterální léčbě, mají mocný protizánětlivý efekt a jsou využívány u nemocných s těžším průběhem CD. Jejich dlouhodobé podávání je však zatíženo vysokým rizikem závažných nežádoucích účinků, jejichž intenzita narůstá s dávkou a délkou podávání (Lukáš, 2011).

Lukáš (2011) uvádí, že topicky působící glukokortikoidy (např. budesonid) jsou alternativou pro omezený počet nemocných, a to s mírnou a střední aktivitou CD. Jejich hlavní význam spočívá v minimalizaci systémových projevů.

Terapie kortikosteroidy indukuje remisi u 70 – 80 % dospělých pacientů s akutním stadiem Crohnovy choroby (Heuschkel et al., 2000).

V případě, že pacienti na léčbu nereagují nebo vyžadují trvale vysoké dávky kortikoidů, přistupuje se k podávání imunosupresiv (Čierna, 2011).

5.2.5.1.3 Imunosupresiva

Imunosupresiva jsou indikována v terapii chronicky aktivních forem IBD, u některých recidivujících mimostřevních projevů, v léčbě fistulující CD a v případě ztráty účinnosti terapie kortikosteroidy. V praxi jsou využívána především pro svůj tzv. kortikosteroidy šetřící efekt, který umožňuje snížit riziko vedlejších účinků podávání kortikoidů (Lukáš, 2011).

Dle Lukáše (2011) mezi významná imunosupresiva patří thiopuriny (např. azathioprin a 6-merkaptopurin), dále metotrexát a kalcineurinové inhibitory (např. cyklosporin A a tacrolimus).

Imunomodulátory bývají po aminosalicylátech druhou volbou léčby v případě UC, ovšem jsou spojeny s vyšším rizikem zánětlivých komplikací (Derikx et al., 2016).

5.2.5.1.4 Antibiotika a chemoterapeutika

Antibiotika a chemoterapeutika (např. chinoliny a makrolidy) se používají především v léčbě lumenální a penetrující formy nemoci a při léčení některých hnisavých komplikací (Lukáš, 2011). Malý (2004) uvádí, že antibiotika brání přerůstání patologické střevní

mikroflóry u aktivní formy nemoci. U chemoterapeutik je značná možnost nežádoucích účinků při dlouhodobém podávání.

Antibiotika mohou redukovat pravděpodobnost pozdějšího návratu CD po operaci (Sheehan et al., 2015).

Lukáš (2011) uvádí, že výhodou antibiotik a chemoterapeutik je rychlý nástup účinku. Jejich nevýhodou je pak krátkodobost příznivého účinku léčby a nutnost mnohatýdenního podávání.

Dle Marchesio et al. (2016) je použití antibiotik v léčbě účinné u určitých skupin pacientů, zejména u pacientů po resekci střeva, u nichž byla podávána antibiotika metronidazol a ornidazol.

5.2.5.1.5 Symptomatická terapie

Symptomatická terapie představuje škálu léků používaných ke snížení frekvence stolice, zmírnění bolesti břicha, předcházení nežádoucím vedlejším účinkům systémových kortikoidů a imunosupresivních léků a léky doplňující nedostatek železa, stopových prvků, vitaminů a podobně. Terapie neovlivňuje vlastní zánětlivý proces, pouze má za cíl ulevit pacientovi od největších obtíží (Bajerová et al., 2013).

5.2.5.2 *Biologická léčba*

Biologická léčba je v kontrastu s medikamentózní terapií založena na využití přírodních produktů namísto synteticky vyrobených léčiv (Škrabálková, 2013).

Lukáš (2011) uvádí jako příklady biologické léčby léky adalimumab a infliximab, namířené proti tumor nekrotizujícímu faktoru alfa (TNF), který je uvolňován do tkání a tělesných tekutin z aktivovaných leukocytů v průběhu zánětlivé reakce. Tyto léky mají dle Gabalce (2009) celou řadu účinků, kromě blokády TNF i ovlivnění apoptosy buněk. Biologická léčba je aplikována především parenterálně a účinek přetrvá několik týdnů.

Lukáš (2011) uvádí další léky, jako certolizumab pegol, založen na podobném mechanismu účinku jako adalimumab nebo infliximab, dále natalizumab, zabraňující migraci leukocytů do tkáně a nejnovější testy léku vedolizumabu se selektivním účinkem na trávicí trakt.

Účinná je dle Bajerové et al. (2013) tzv. konkomitantní terapie spočívající v šestiměsíčním současném podávání biologické léčby spolu s imunosupresivou a následném ukončení terapie imunosupresivou. Je prokázáno, že v prvních šesti měsících se účinek infliximabu zvyšuje

a v dalším průběhu efekt mizí. Výhoda konkomitantní terapie musí být zvážena v kontrastu se zvýšením rizika infekce a rizika zhoubných nádorů (Baumgart and Sandborn, 2012).

Nevýhodou biologické léčby je nemožnost aplikace v případě alergie, infekce, nádorového onemocnění, poruchy průchodnosti TT nebo nevyprázdněných abscesů (Bajerová a et al., 2013). Další nevýhodou je zvýšené riziko infekčních komplikací jako v případě imunosupresiv a také vysoké výdaje biologické léčby (Derikx et al., 2016).

Obecně může být biologická léčba účinná k udržení remise (Akobeng and Thomas, 2007).

5.2.5.3 Chirurgická léčba

Selže-li medikamentózní léčba a objeví-li se komplikace, je využita chirurgická léčba. U pacientů s CD je odstraňována jen postižená část střeva, v případě onemocnění UC celé tlusté střevo (Čierna, 2011).

Chirurgické výkony u CD neslouží k příčinné léčbě, ale pouze snižují nemocnost pacienta (Bajerová et al., 2013). Po zákroku často dochází k recidivě zánětu (Vermiere et al., 2015). Bajerová et al. (2013) však dokládá existenci případů, kdy došlo k dlouhodobému odstranění obtíží a významnému snížení, případně i přerušení medikamentózní léčby.

Existuje několik typů chirurgických výkonů u CD. V případě ileocekálního postižení, tj. postižení přechodu mezi tenkým a tlustým střevem, se provádí odstranění této části střeva (tzv. ileocekální resekce) a opětovné spojení zbylých konců zpět (tzv. anastomóza). Samotné resekce se provádí i v příslušném úseku střeva v případě mezikličkových střevních píštělí. Dalším typem zákroku je tzv. strikturoplastika, kdy se provádí rozšíření zjizvených úseků střeva vlivem CD podélným protětim a příčným sešitím jizevnatého zúžení. Pokud je postiženo celé tlusté střevo, což bývá u CD často, provádí se jeho odstranění, tzv. kolektomie. Proktokolektomie se provádí při postižení jak tlustého střeva, tak konečníku s cílem jejich odstranění. Ileostomie je zákrok, při němž se zavede střevní vývod (Bajerová et al., 2013).

5.2.5.4 Probiotika a prebiotika

Marchesi et al. (2016) definuje probiotikum jako živý organismus, který v určitém množství přináší zdravotní benefit svému hostiteli. Příkladem mohou být komerčně využívané rody *Bifidobacterium* či *Lactobacillus*.

Cahová (9.12.2017, pers.comm.) rozděluje probiotika na a) probiotika jednosložková/vícesložková, b) probiotické kmeny na míru, c) fekální mikrobiální transplantace, d) bakteriofágy.

Existují různé interakce probiotik s hostitelem zahrnující například kompetitivní inhibici ostatních mikrobů, účinek na funkci střevní bariéry nebo interakce s antigenem (Marchesi et al., 2016).

Tyto interakce jsou realizovány blokací adhezivních míst, kompeticí o živiny a antimikrobiálními účinky. Probiotické bakterie produkují SCFA, které snižují pH střev a inhibují růst patogenních bakterií. Jak již bylo zmíněno, butyrát také poskytuje výživu enterocytům a pozitivně ovlivňuje střevní bariéru zvýšenou sekrecí mucinu a ucelením její struktury na základě utěsnění spojů mezi epitelovými buňkami. Dále působí protizánětlivě tlumením imunomodulačních drah, jako například signální kaskády NFκB (Derikx et al., 2016). Miyoshi a Chang (2016) uvádí vysokou účinnost probiotik v případě klostridiových infekcí.

Prebiotika jsou definována jako selektivně podávané složky, které ústí ve specifické změny ve složení a/nebo v aktivitě střevní mikrobioty, což přináší výhody pro zdraví hostitele. Většinou se jedná o nestravitelné sacharidy, oligosacharidy nebo krátké polysacharidy jako inulin, oligofruktosa, galaktofruktosa, xylo-oligosacharidy, které jsou v současnosti intenzivně zkoumány (Marchesi et al., 2016).

V případě UC jsou výsledky smíšené (Colman and Rubin, 2014).

Marchesi et al. (2016) uvádí, že v případě využití *E. coli* jako probiotika dochází u pacientů s UC k remisi, *E. coli* je tak alternativou 5-aminosalicylátu.

Derikx et al. (2016) dělí využití probiotik do dvou skupin, a to na probiotika navozující remisi v aktivní fázi onemocnění a na probiotika remisi udržující. Jako účinná probiotika k navození remise shledává VSL#3, což je komplex 8 druhů bakterií, k udržení remise pak již zmiňovanou *E. coli*. Dále diskutuje využití samostatných organismů, jako *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus carei*, *Lactobacillus reuteri* nebo jejich kombinací, a to například v produktech Bifido-fermented milk, BIO-THREE a Bifid Triple Viable. Složení těchto tří probiotik naleznete v příloze 1.

Nicméně, účinnost probiotik a prebiotik při léčbě CD není prokázána (Derikx et al., 2016; Marchesi et al., 2016).

Cahová (9.12.2017, pers. comm.) uvádí problémy probiotik, které je třeba vyřešit, aby byla léčba zefektivněna, a to a) konkretizace druhů, b) zajištění přežití mikroorganismů v GIT, c) manipulace s anaerobními druhy, d) interakce mezi mikroorganismy a dietou.

Výhodou probiotik a prebiotik jako léčby IBD je nízká cena a současná kombinovatelnost s ostatními terapeutickými metodami. Studie probiotik jsou velmi různorodé z hlediska

zkoumaných bakteriálních rodů a měřených výstupů, což vede ke složitosti porovnatelnosti výsledků a složitosti celkového zhodnocení účinnosti probiotik jako možnosti léčby. Studie prebiotik jsou obecně méně rozsáhlé než v případě studií probiotik. Do budoucna se předpokládá, že budou probiotika a prebiotika hrát klíčovou roli v dietních opatřeních, a budou určena každému pacientovi na míru dle typu, stadia onemocnění IBD a podobně (Derikx et al., 2016).

Bureš (2009) diskutuje využití červů k léčbě IBD. Využívá principu, že helminty indukovaná imunitní odpověď může zmírnit poškození způsobená zánětlivou odpovědí člověka. K těmto účelům byl využit tenkohlavec prasečí (*Trichuris suis*), kdy došlo ke zlepšení symptomů u většiny nemocných CD. Extrakty z helmintů byly stejně účinné jako živí červi. K využití těchto poznatků v léčbě je třeba hlubšího pochopení komplexního vztahu mezi lidským hostitelem a parazitickými červy.

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) přikládá možnosti léčby probiotiky u chronických onemocnění velký význam a uvádí, že jelikož je většina probiotických prospěšných bakterií nekultivatelných, měl by se výzkum zaměřit na možnosti zlepšení kultivace těchto bakterií.

Kombinace probiotik a prebiotik se nazývá synbiotikum. Honzák (9.12.2017, pers. comm.) i Cahová (9.12.2017, pers. comm.) vidí perspektivu právě v synbiotikách, fungujících na principu dodání probiotických organismů společně s živinami pro tyto organismy, což zvyšuje účinnost klasických probiotik.

5.2.5.5 Fekální mikrobiální transplantace

V poslední době je velkým předmětem zájmu v oblasti léčby IBD fekální transplantace mikrobioty (FMT). Je definována jako přenesení střevní mikrobioty zdravého dárce za účelem obnovení přirozené stabilní mikrobioty příjemce (Vermiere et al., 2015).

V České Republice je FMT zatím na úrovni experimentální, zatímco k léčebným účelům je využívána v cizině, například v USA (Honzák, 9.12.2017, pers. comm.).

Pro FMT existují banky lidských stolic od zdravých dárců, kteří jsou selektováni na základě vylučovacích faktorů jako například nedávno zařazená obezita dárců, z důvodu případu transplantace, kdy pacient po terapii výrazně přibral (Tlaskalová-Hogenová, 6.12.2017, pers. comm.).

FMT je léčebná metoda účinná hlavně u pacientů trpících klostridiovými infekcemi, a to až v 95 % (Tlaskalová-Hogenová, 6.12.2017, pers. comm.).

Účinnost FMT jako léčby IBD hodnotil systémový přehled, který byl proveden celosvětově na základě 817 studií, z nichž bylo selektivně vybráno 18 studií. Zajímavým zjištěním zde byl fakt, že FMT byla účinnější u mladších jedinců. Výsledkem systémového přehledu byla klinická remise 22 % pacientů s UC oproti 60,5 % pacientů s CD, u nichž byla remise téměř trojnásobně úspěšnější. Dále byla potvrzena bezpečnost FMT. Nicméně výsledky byly značně různorodé, jelikož se jednalo o různé typy studie a současně byla léčba aplikována heterogenní skupině pacientů (Colman and Rubin, 2014).

Sheehan et al. (2015) diskutuje bezpečnost FMT a uvádí možnost přenosu infekce, neprozkoumaných patogenů či fenotypu, jež může vést k mutacím a následně působit karcinogenně. Jako bezpečnou a vhodnou formu vnímá FMT definovaného mikrobiálního ekosystému o minimálním počtu bakterií.

Po FMT byla zaznamenána redukce kmene Proteobacteria a naopak nárůst kmene Bacteroidetes, což značí účinnost FMT, jelikož tak došlo k částečnému vyrovnání dysbiosy. Dále byly zaznamenány změny v metabolismu bakterií po FMT, a to konkrétně například nárůst rodů produkujících butyrát (*Ruminococcus*, *Blautia*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia* a *Faecalibacterium*), dále změny v biosyntéze, degradaci sekundárních metabolitů a toxinů (Colman and Rubin, 2014).

Sekvenování 16S a metagenomické sekvenování mikrobioty pacientů po FMT provedl Vaughn et al. (2014), jehož výsledky také potvrzují účinnost FMT, ovšem pouze u 10 % pacientů toto zastoupení mikroorganismů vydrželo delší dobu.

V jiné studii, kde byla opět sekvenována mikrobiota metodou sekvenace 16S, Vermiere et al. (2015) shledává FMT účinnější pro pacienty s UC než s CD.

Vermiere et al. (2012) specifikuje, že léčba FMT je účinná v případě CD po dobu 8 týdnů. Poté se mikrobiota vrátí zpět do dysbiotického stavu.

5.2.5.6 Alternativní léčba

Bajerová et al. (2013) uvádí, že alternativní léčba dosud nevedla k dosažení remise onemocnění. Při nevhodném použití by mohla situaci naopak zkomplikovat. Mezi alternativní metody léčby se řadí úprava stravy, používání bylinných odvarů, léčba energií, hypnoterapie, užívání doplňků stravy, enzymatická terapie, homeopatika a výplachy střev.

Byla publikována řada případů, kdy po užití přípravků alternativní léčby došlo k vážnému poškození zdraví, nejčastěji se jednalo o poškození jater (Pracovní skupina pro dětskou gastroenterologii a výživu České pediatrické společnosti, 2015).

5.2.5.7 *Dietetická opatření*

Výživa má důležitou roli v léčbě IBD, a to jak z hlediska prevence a korekce malnutrice, prevence osteoporózy a podpory optimálního růstu a vývoje (O'Sullivan and O'Morain, 2006), tak z hlediska léčebného v případě enterální a parenterální výživy.

Derikx et al. (2016) se ve své studii zmiňuje o budoucí roli probiotik a prebiotik jako dietetického opatření IBD, které bude každému pacientovi určeno dle stadia onemocnění, jeho typu a podobně.

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) uvádí, že při IBD je třeba zvýšit podíl vlákniny ve stravě, jelikož se jedná o energetický substrát pro probiotické bakterie ve střevech a vede k produkci SCFA, které mají protektivní funkce vůči IBD. V současné době je vláknina přijímána v nedostatečném množství. WHO doporučuje 30 g vlákniny na den, reálně je však průměrně konzumováno 15 g denně. V určitých lokalitách v USA dokonce existuje korelace mezi zvýšenou prevalencí chronických onemocnění GIT a sníženou konzumací vlákniny.

5.2.5.7.1 Enterální výživa

Griffiths (2005) charakterizuje enterální výživu (EN) jako výživu o přesně definovaném složení v tekuté formě. Levine a Wine (2013) rozdělují enterální výživu na různé formule, a to elementární, semi-elementární a polymerní. Elementární formule obsahuje protein ve formě aminokyselin, polymerní formule potom jako neporušené bílkoviny (Hartman et al., 2009). Semi-elementární formule kombinují aminokyseliny s oligopeptidy (Dziechciarz et al., 2007).

Polymerní formule jsou většinou méně nákladné a mají lepší sensorické vlastnosti, což je výhodné pro orální terapie u dětí. Polymerní formule dále přispívají k nárůstu váhy žádoucím u dětských pacientů. Průměrná délka enterální výživy se pohybuje mezi 6 a 12 týdny, léčba však může být i v dlouhodobém horizontu. K posouzení efektivity EN je třeba minimálního trvání výživy 3 až 4 týdny. Výživa může být podávána orálně či nasogastrickou trubicí (NG). Podávání ústy je výhodnější z hlediska nákladů, jednoduchosti a psychologického vlivu na pacienta, ačkoli NG je preferována z důvodu nechuti orálního podávání. NG tak může být výhodná zejména při dlouhodobém podávání. Orálně je EN podávána ve 3 až 4 porcích denně, nasogastricky konstantně po dobu 24 hodin. Enterální výživa je dvojího typu, a to doplňková (PEN) a výhradní (EEN). PEN je kombinována s konvenční výživou a využívá se ke zlepšení výživového stavu a udržení remise, zatímco EEN je podávána jako jediný zdroj živin a je využívána jako primární terapie k navození

remise. Enterální výživa může být kombinována také s medikamentózní terapií, především s mesalaminem, 6-erkaptopurinem/azathioprinem, metotrexátem či infliximabem (Critch et al., 2012).

Ideální složení enterální výživy a způsob podání jsou předmětem mnoha studií (Rubio et al., 2011).

Zvláště u dětí s malnutricií a dětí s narušením růstu v důsledku nedostatečné výživy je enterální výživa volena jako primární léčba. U dospělých je účinnější variantou pro indukci remise léčba kortikoidy (O'Sullivan and O'Morain, 2006), v některých případech je však vhodnější léčba EN z důvodu minimalizace vedlejších účinků (Hartman et al., 2009). Mezi mnoha studiemi srovnávající účinnost EN a kortikoidů, Seidman et al. (1993) shledává jako jediný autor léčbu kortikoidy u dětí účinnější než léčbu enterální výživou.

Významným benefitem enterální výživy je zhojení mukosy střeva, ke kterému při léčbě kortikoidy nedochází (Rubio et al., 2011). Dalším důvodem preference enterální výživy u dětí je minimalizace vedlejších účinků léčby v kontrastu s léčbou kortikoidy, u níž dochází k opožděnému růstu a pubertálnímu vývoji a poruchám mineralizace kostí. (Heuschkel et al., 2000). S pubertálním vývojem úzce souvisí vedlejší účinek léčby kortikoidy akné, které se při léčbě EN neobjevuje (Rubio et al., 2011).

Spontánně se remise objeví u 18 – 42 % případů během 3-4 měsíců. U léčby enterální výživou se remise objeví mezi 53 – 80 % případů onemocnění CD (Heuschkel, 2000).

V léčbě UC není enterální výživa volena jako primární strategie (O'Sullivan and O'Morain, 2006).

Mechanismus, jakým může EN ovlivňovat zánětlivý proces, dosud není znám a je předmětem mnoha studií (Akobeng and Thomas, 2007).

Studie Johnsona et al. (2006) sledovala, zda je suplementární terapie (PEN) stejně účinná jako výhradní EN v indukci remise u dětských pacientů s aktivní fází CD. Autoři dospěli k závěru, že k remisi došlo u 42 % pacientů s výhradní EN, zatímco při terapii PEN pouze 15%, léčba výhradní EN tak byla shledána účinnější.

Dosavadní studie pátrají, zda remise indukovaná enterální výživou souvisí s modulací střevní mikrobioty. Studie Lionettiho et al. (2005) využívající 16S sekvenování tento předpoklad potvrdila. Za možné účinné složky jsou považovány probiotické a bezsezbytkové komponenty enterální výživy.

Leach et al. (2008) provedl studii se šesti dětskými pacienty s CD léčenými polymerní EEN a následnou PEN kombinovanou s medikamentózní léčbou. Jako kontrola posloužilo

7 zdravých, nepříbuzných dětí. Byl potvrzen předpoklad modulace mikrobioty pomocí EN. V průběhu EN došlo ke snížení počtu u všech sledovaných bakterií. Významná pozitivní korelace mezi PCDAI a *Bacteroidetes-Prevotella*, kdy je nárůst počtu bakterií dáván do souvislosti s CD, potvrzuje předpoklad, že je účinnost EN založena právě na modulaci střevní mikrobioty. Změny v markeru S100A12, jehož obsah rapidně narůstá při zánětu, korelovaly s PCDAI a to tak, že v průběhu léčby EN došlo k jejich poklesu, což potvrzuje účinnost léčby EN. Zastoupení *Clostridium leptum* vykazovalo jak s PCDAI, tak s S100A12 korelaci negativní, což vede k domněnce, že by mohla být tato bakterie prospěšná v probiotické terapii po ukončení výhradní EN. Léčba EN je okamžitá a velmi účinná, na což poukázal dále fakt, že s odstupem 18 týdnů se složení mikrobioty opět navrátilo do stavu před zahájením léčby.

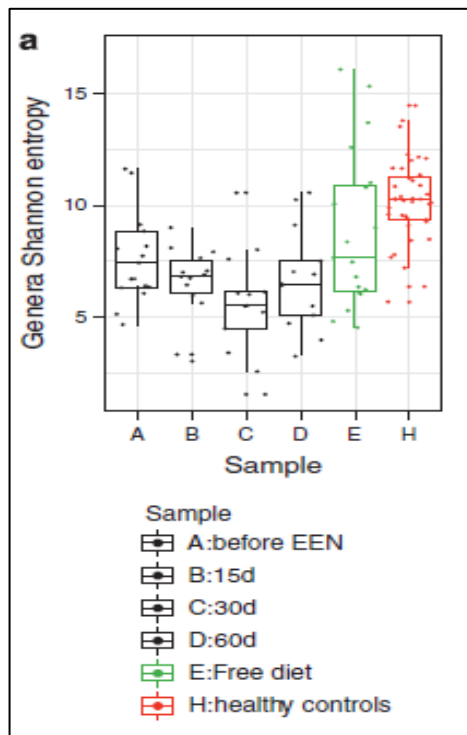
Studie Rubia et al. (2011) zkoumala, zda existuje rozdíl v navození remise v efektivitě výhradní enterální výživy podávané orálně či nasogastricky. Enterální výživa podávaná 106 dětským pacientům po dobu 8 týdnů prokázala, že méně agresivní orální podávání enterální výživy je stejně účinné v navození remise jako podávání nasogastrickou trubicí.

Studie Grovera et al. (2014) prokázala, že EN indukuje remisi u dětských pacientů s CD. Výsledky endoskopie byly v průběhu jednoho roku výrazně příznivější v případě šestitýdenní enterální výživy u 26 dětských pacientů.

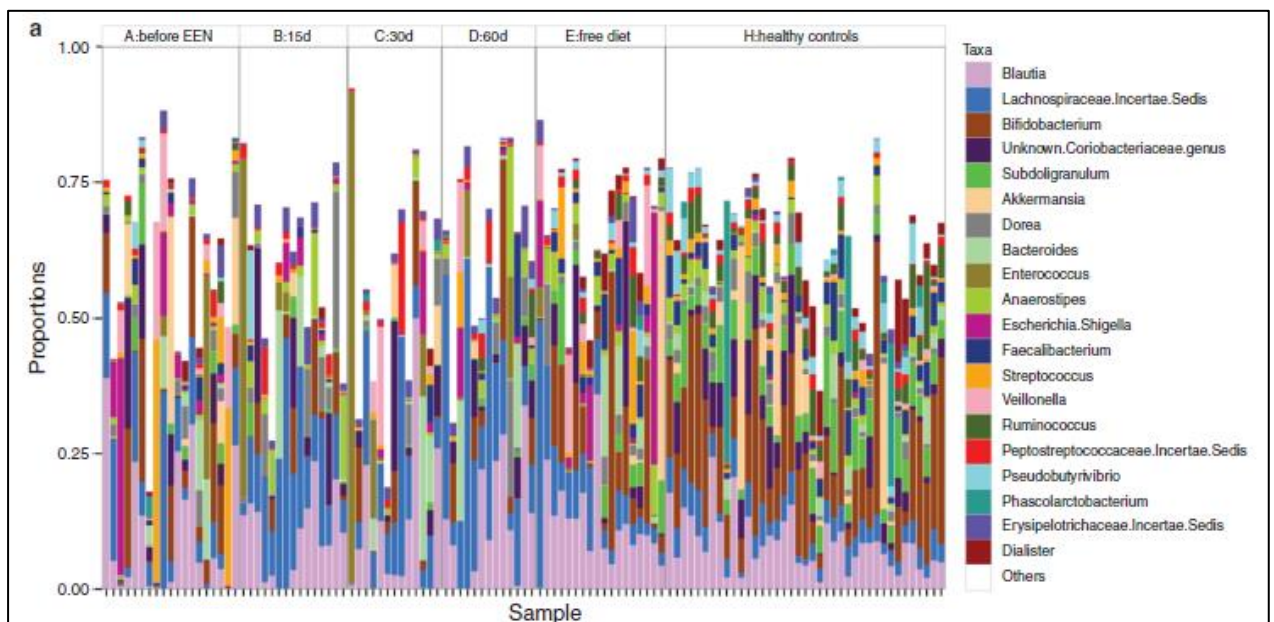
Studie Yamamota et al. (2007) sledovala efektivitu udržení remise u pacientů s 50% podílem enterální výživy ve stravě a u kontrolní skupiny pacientů s běžnou dietou po dobu jednoho roku. Relaps se objevil u 25 % pacientů léčených enterální výživou a u 65% pacientů konzumující běžnou stravu.

Studie Quince et al. (2015) sledovala, zda enterální výživa moduluje mikrobiotu pomocí sekvenace 16S na přístroji MiSeq, využívající reversibilní terminátorovou sekvenaci Illumina. Byly analyzovány vzorky stolice od 23 dětských pacientů s CD, kteří byli léčeni enterální výživou po dobu 8 týdnů a od kontrolní skupiny 21 zdravých dětí bez rodinné historie výskytu IBD (vzorek H). Vzorky byly odebírány během prvních šesti dnů po zahájení EN (vzorek A), po 16 dnech (vzorek B), po 32 dnech (vzorek C), po 54 dnech (vzorek D), tedy ke konci EN, a poslední vzorek byl odebrán po 63 dnech, kdy už se pacienti vrátili ke konvenční stravě. Byla prokázána snížená diverzita mikrobioty pacientů s CD v kontrastu s kontrolní skupinou. Bylo shledáno, že během EN byl pokles diverzity ještě prohlouben a došlo k větší diferenciaci složení mikrobioty vzhledem ke kontrolní skupině. Po navrácení

k obvyklé stravě došlo k nárůstu diverzity (Obr. 3). Zastoupení jednotlivých zástupců mikrobioty lze vidět na obrázku 4 (Obr. 4).



(Obr. 3): Výsledky modulace mikrobioty pomocí EN hodnocením Shanonovy entropie rodů (Quince et al., 2015).



Obr. 4: Výsledky sekvenace mikrobioty (Quince et al., 2015).

Mimo prohloubení dysbiosy bylo během EN pozorováno narušení biosyntézy thiaminu a biotinu, dvou vitaminů B-komplexu a změny syntézy SCFA. Tato zjištění vysvětlují pokles počtu téměř všech bakterií v průběhu EN a prohloubení dysbiosy. Paradoxem je, že během EN dochází k redukcí druhů, které jsou považovány za protektivní u CD, ale zároveň je enterální výživa vysoce účinná. Předpoklad modulace mikrobioty vlivem EN tak byl potvrzen.

Studie Ashtona et al. (2017) testovala 6 dětských pacientů s různými formami IBD a různou léčbou (3 pacienti léčení kortikosteroidy a 3 léčení EEN). Kontrolní skupinu tvořili sourozenci 3 pacientů, kteří byli vyšetřeni a sledováni zdraví. Vzorky byly odebírány před nasazením léčby, po dvou týdnech léčby a po 6 týdnech léčby. Jednalo se o fekální vzorky, které byly analyzovány 16S sekvenováním. Před nasazením léčby bylo u pacientů sledováno narušení metabolických cest (celkem 31 změněných metabolických cest). Byla redukována schopnost metabolismu aminokyselin a sacharidů. Po šesti týdnech léčby byla však metabolická aktivita u pacientů srovnatelná s metabolickou aktivitou zdravé kontrolní skupiny. V průběhu léčby byl zaznamenán nárůst diverzity. Vyšší diverzitu vykazovala mikrobiota pacientů léčených kortikosteroidy než léčených EN. U těchto pacientů byla diverzita dokonce vyšší než u kontrolní skupiny. Byl sledován obsah SCFA a jejich poměrného zastoupení. Koncentrace jednotlivých SCFA i jejich celkový obsah nevykazovaly konzistentní vzorec, u některých pacientů klesaly, u jiných narůstaly. Během remise se zvyšuje absorpce epitelu střeva pro SCFA, což vysvětluje, že nebyl detekován nárůst obsahu SCFA, bakteriální fermentace však mohla být léčbou přesto změněna.

Studie Levina a Winea (2013) spatřuje účinnost léčby k indukci remise spíše ve vyřazení složek výživy, které mohou být rizikové pro Crohnovu chorobu.

Dalšími hypotézami účinnosti EN jsou: normalizace střevní permeability, celkové naplnění výživových potřeb, snížení syntézy zánětlivých mediátorů prostřednictvím redukce tuku ve stravě a poskytnutí důležitých mikronutrientů (Critch et al., 2012).

Sledována je také účinnost EN v závislosti na lokalizaci onemocnění. Hartman et al. (2009) uvádí, že nebylo provedeno dostatek studií a data jsou nedostatečná k vytvoření závěru (Hartman et al., 2009). Studie Afzala et al. (2005) však potvrzuje předpoklad doktorů, a to že je EN účinnější u pacientů s onemocněním lokalizovaným v kyčelníku či v kyčelníku a tračnίκu zároveň, v porovnání s onemocněním lokalizovaným samostatně v tračnίκu.

Většina studií sledující účinnost EN probíhá na nově diagnostikovaných pacientech (Rubio et al., 2011).

Při posuzování účinnosti EN k léčbě dětí je třeba brát v úvahu, zda se jedná o studie krátkodobé či dlouhodobé. Studie Knighta et al. (2005) sledovala účinnost EN dlouhodobě u 44 dětských pacientů. EN byla podávána jako výhradní strava po dobu 1 - 7 let a u většiny dětí nedošlo po nástupu remise k relapsu. Téměř polovina pacientů nepotřebovala kortikoidy k udržení remise. Pokud ano, tak byla doba terapie zkrácena téměř na polovinu.

Enterální výživa je bezpečná a většinou dobře tolerována. Vedlejší účinky jsou minimální (23,5 %). Jedná se o nevolnost, bolesti břicha, plynatost či zvracení. Je zaznamenán ojedinělý vážný vedlejší efekt, a to realimentační syndrom (Hartman et al., 2009), ke kterému dochází v případě nasazení EN podvyživenému pacientovi (Critch et al., 2012).

Nevýhody enterální výživy jsou reprezentovány vysokými náklady, sníženou chutností výživy, obavami z vyloučení konvenční stravy a strachem z podávání výživy v trubici (Critch et al., 2012). Léčba je náročná jak pro lékaře, tak pro pacienta a jeho okolí (Dziechciarz et al., 2007), které je třeba poučit (Critch et al., 2012).

5.2.5.7.2 Parenterální výživa

Parenterální výživa (PN) se od enterální různí tím, že se potřebné živiny tělu dodávají formou infuzních roztoků přímo do krevního oběhu (Bajerová et al., 2013).

Dříve byla PN primární volbou k indukci remise u pacientů s CD, u nichž docházelo ke zlepšení ve 40 až 90 %. U UC se jako primární terapie nevyžívala, jelikož nebyla shledána účinnou (Shamir, 2009).

Používá se především k navození remise v případech, kdy není zaživací ústrojí v důsledku probíhajícího zánětu schopno zpracovat EN, nebo jako kombinace s EN. Samotná PN je nasazena pacientů s fistulující formou CD a v průběhu předoperační péče (Šachlová, 2011). Účinnost PN k léčbě fistulí se pohybuje v rozmezí 43 - 63 % (Hartman et al., 2009).

Více než 20 % dospělých pacientů využívá domácí parenterální výživu, která zlepšuje výživový stav, kvalitu života, ale je také spojována se zvýšenou mortalitou a potenciálními komplikacemi ohrožujícími život. Jednu či více komplikací spojených s PN má 58,5 % pacientů. K úmrtí může dojít v důsledku sepse způsobenou katetrem (Hartman et al., 2009).

Délka PV je 2 – 3 týdny, během nichž lze nastolit remisi u 60 % těžce nemocných, avšak mnohdy za cenu značného úbytku na váze. Pokud léčba přesahuje 1 týden, je nutno zavést centrální žilní katétr pro pokrytí všech potřeb organismu (Bajerová et al., 2013).

Léčebné metody enterální a parenterální výživy, doplněné dietními opatřeními se navzájem nevyklučují, nýbrž častokrát kombinují a vhodně doplňují u nemocných s poruchami výživy u IBD (Vrzalová et al., 2011).

5.3 Mikrobiota

Lidské střevo je kolonizováno komplexem velkého množství mikroorganismů, kolektivně nazývaných jako střevní mikrobiota. Tyto mikroorganismy žijí v komenzálním vztahu s naším tělem. K udržení homeostáze a prevence před abnormální imunitní odpovědí ke komenzálním bakteriím jsou využívány různé mechanismy. Nejdůležitějším z nich ve vztahu k mikrobiotě je produkce mukózní vrstvy v pohárkových buňkách (goblet cells), která pokrývá epiteliální buňky střeva. Funkce mukózní vrstvy jsou: a) ochrana střevního epitelu před poškozením potravou či trávicími sekrety, b) podpora bakteriální kolonizace epitelu na základě poskytnutí adhezivních míst k epitelu a dodáním uhlíku, c) prevence před uchycením patogenů a jejich setrvání ve střevě, čímž je mukózní vrstva hlavní složkou vrozené imunity (Sicard et al., 2017).

5.3.1 Zdravá střevní mikrobiota

Komplexní ekosystém střevní mikrobioty obsahuje 10^{13-14} bakterií, což zahrnuje více než 35 000 bakteriálních druhů se vzrůstající rozmanitostí a počtem směrem od žaludku po tlusté střevo (Derikx et al., 2016).

Zdravá střevní mikrobiota se skládá z mutualistů, komenzálů i pathobiontů, kteří žijí v symbiose s hostitelem a formují stabilní komunitu, odolávající invazi cizích bakterií a rozšiřování pathobiontů. Tento stav shrnuje pojem koloniální rezistence. K jejímu udržení slouží přímé a nepřímé mechanismy.

Přímé mechanismy lze rozdělit na dvě základní skupiny, a to kompetici o zdroje a usmrcování bakterií. Oba mechanismy mají tendenci uplatňovat se mezi blízkými příbuznými druhy. Usmrcování či inhibice růstu je realizována a) bakteriálními polypeptidovými molekulami bakteriociny, b) bakteriofágy, kteří se mohou vlivem zánětu přeměnit z pasivní formy profága na aktivní formu, c) metabolickými inhibitory, jako SCFA či žlučovými kyselinami. Kompetice o zdroje zahrnuje jednak kompetici o živiny jako sukcinát, sialovou kyselinu, fukosu či železo, čehož bývá využíváno k léčbě, a zadruhé kompetici o prostor, čili o adhezivní místa na střevní sliznici.

Nepřímé mechanismy zahrnují stimulaci vrozené či adaptivní imunity a dále neimunitní mechanismy. Z neimunitních mechanismů lze uvést změnu struktury či složení mukosy, z imunitních mechanismů pak a) regulaci myeloidních buněk jako neutrofilů, eozinofilů či regulace makrofágů, b) regulaci lymfocytů (Th17 buněk, přirozených lymfoidních buněk

ILC3 a regulačních lymfocytů), c) regulaci B-lymfocytů (imunoglobulinů IgA, IgE, IgG), (Pickard et al., 2017).

Mikroorganismy střevní mikrobioty (GM) mají důležité metabolické, ochranné a trofické funkce. Celkový profil GM a přítomnost či absence jednotlivých druhů mikroorganismů jsou důležité v udržení homeostáze a správných funkcí imunitního systému (Marchesi et al., 2016). Marchesi et al. (2016) uvádí, že za posledních 10-15 let naše znalosti o GM vzrostly exponenciálně. Pokud lépe porozumíme mechanismu a složení GM, budeme moci vyvinout nové léčebné metody či strategie modulace GM k léčbě nebo prevenci onemocnění. V některých případech bude možné použít mikrobiotu k detekci střevních onemocnění dříve, než ji umožní konvenční diagnostika.

Rozvoj vysoce výkonných sekvenačních technologií usnadnil metagenomický výzkum složitosti a vysoké diverzity lidské mikrobioty a prokázal významné rozdíly v jejím složení u jednotlivců. Individuální rozdíly jsou dle některých autorů děleny do 3 typů, označovaných jako tzv. enterotypy, což jsou shluky významných bakterií (Vermiere et al., 2015). Derikx et al. (2016) identifikuje 3 enterotypy dle rodů, jejichž počet je u jedince nadprůměrný, a to enterotyp 1, kdy je ve střevní mikrobiotě vyšší počet rodu *Bacteroides*, enterotyp 2 pro rod *Prevotella* a enterotyp 3 pro rod *Ruminococcus*.

Jiné studie označují individualitu mikrobioty jedinců jako mikrobiální fingerprint, neboli otisk prstu (Sommer et al., 2017). Ten je již využíván i ve forenzních analýzách v kriminalistice (Honzák, 9.12.2017, pers. comm.).

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) dodává, že 70% střevních bakterií je nekultivovatelných, a proto byly sekvenační techniky ohromným přínosem.

Marchesi et al. (2016) píše o střevní mikrobiotě jako o lidském orgánu, porovnatelném s imunitním systémem, složeném ze souboru buněk, které obsahují 100 krát více genů, než samotný hostitel. Mikrobiota je hostitelsky specifická, dědičná, je možné jí modulovat pomocí diety, operativně či antibiotiky a v případě jejího narušení je ovlivněna fyziologie hostitele.

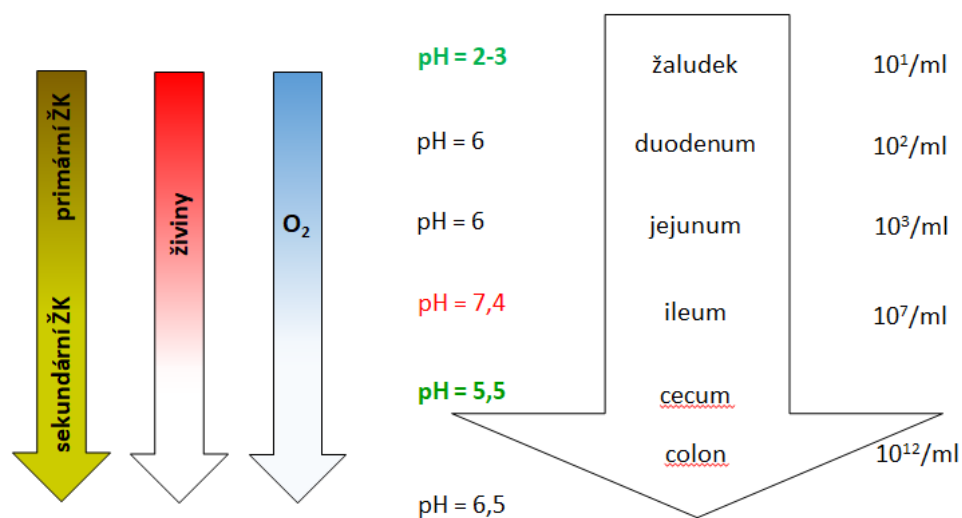
K analýze GM jsou zkoumány vzorky stolice, které ovšem přesně nerepresentují její kompletní složení.

U savců probíhá kolonizace mikroorganismy ihned po narození. V neonatálním období je mikrobiota méně rozmanitá než u dospělých jedinců. Rozvíjí se, jakmile dítě začne přecházet z diety zahrnující výhradně mateřské mléko k potravinám bohatých na vlákninu.

V tomto období dojde k významné kolonizaci trávicího traktu dominantními taxony dospělých, kmeny Clostridiales a Bacteroidales (Pickard et al., 2017).

Derikx et al. (2016) uvádí, že v dospělosti je mikrobiota relativně stabilní. Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) toto tvrzení konkretizuje. Ke stabilizaci mikrobioty dochází po druhém roce života.

Různé části GIT mají různé funkce, strukturu a fyzikálně-chemické parametry jako obsah živin, kyslíku či změny pH (Sommer et al., 2017). Střevo je osídleno mikroorganismy s nejrůznějšími nároky na tyto parametry. Mění se zastoupení jednotlivých žlučových kyselin, pH, množství živin a zásobené kyslíkem (Obr. 5). Do počátku tenkého střeva převládají primární žlučové kyseliny, dále pak sekundární žlučové kyseliny, k jejichž tvorbě přispívají právě střevní mikroorganismy. V žaludku je pH velmi nízké a přežívají proto zde mikroorganismy zvyklé na extrémní podmínky. V tenkém střevě se poté pH zvyšuje až po ileum, kde klesne a v tlustém střevě opět narůstá. Množství živin stejně jako zásobené kyslíkem klesá od počátku trávicího traktu po konec traktu. Jak již bylo zmíněno, počet organismů narůstá od počátku GIT směrem k jeho konci. Organismy jsou navíc distribuovány v jednotlivých vrstvách střevní stěny. Cahová (9.12.2017, pers.comm.) proto podporuje tvrzení, že vzorky stolice jen málo reprezentují složení střevní mikrobioty.



Obr. 5: Změna podmínek pro mikroorganismy v trávicím traktu (Cahová, 9.12.2017, pers.comm.).

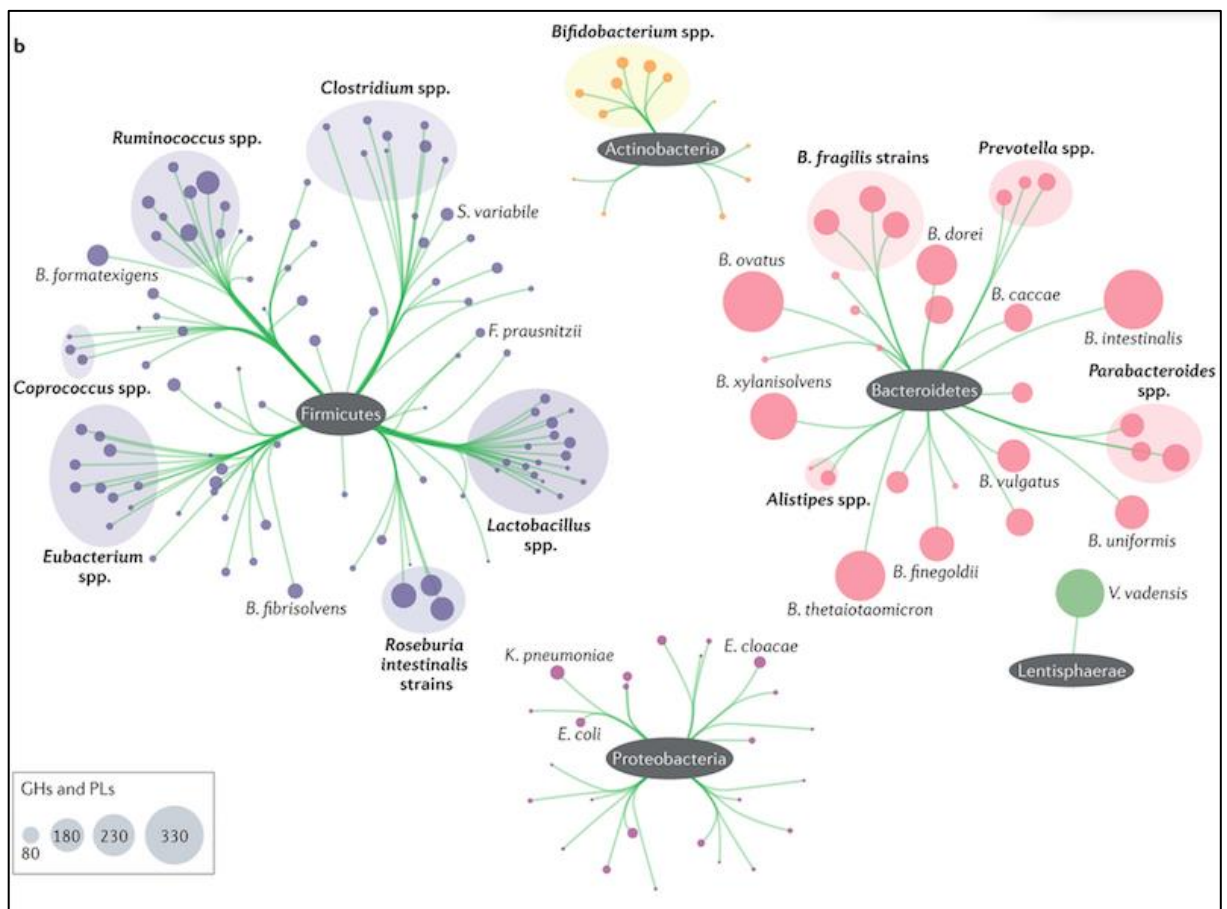
V tenkém střevě převládá kmen Proteobacteria a řád *Lactobacillales*, a to z důvodu vysoké obsahu živin preferovaných těmito bakteriemi, mono- a di-sacharidů a aminokyselin. V tlustém střevě dominují bakterie schopné svými enzymy štěpit komplexní polysacharidy

jako vlákninu či muciny a využívat je jako energetický zdroj. Jedná se o bakterie kmenu Bacteroidales a řád Clostridiales (Pickard et al., 2017).

Marchesi et al. (2016) uvádí, že je střevní mikrobiota často vnímána jako dvoukmenový systém. Poměr kmenů Firmicutes a Bacteroidetes však není shodný mezi všemi jedinci. Kromě těchto dvou kmenů má významné funkce dalších 10 kmenů.

Honzák (9.12.2017, pers. comm.) doplňuje, že poměr Firmicutes a Bacteroidetes je variabilní zhruba z 10%.

Cahová (9.12.2017, pers.comm.) rozděluje střevní bakterie do 5 hlavních skupin (Obr. 6).



Obr. 6: Hlavní zástupci střevní mikrobioty (Cahová, 9.12.2017, pers.comm.).

Často může být některá bakterie současně komenzálem a potencionálním patogenem, jako například *E. coli*, využívána jako probiotikum při léčbě UC (Marchesi et al., 2016). Takové bakterie jsou nazývány pathobionti a z komenzálů se mohou změnit v patogeny za určitých okolností (Pickard et al., 2017).

5.3.1.1 Funkce mikrobioty

Mikrobiota zastává funkce absorpce živin a vitaminů, syntézu vitaminů a aminokyselin, produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, udržení funkce střevní slizniční bariéry, imunomodulace a ochranu před patogeny. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) jsou významnými protizánětlivými faktory, energetickými zdroji pro buňky epitelu a udržují slizniční bariéru. Jedná se především o butyrát a propionát, které tak mají klíčovou roli v imunitní odpovědi a rozlišení zánětu. Bakteriemi produkujícími SCFA jsou například rod *Clostridium* a kmen Bacteroidetes, u nichž jsou zaznamenány při IBD poklesy počtů, což často vyústí v nedostatečné energetické zásobení střevní sliznice a změny imunitní odpovědi, v podstatu etiologie IBD (Derikx et al., 2016).

Narušení slizniční bariéry je mnoha autory vnímáno jako základní předpoklad k rozvoji onemocnění. Byla provedena studie srovnávající míru narušení střevní bariéry mezi kontrolní skupinou zdravých jedinců, pacientů s CD a jejich zdravými příbuznými prvního stupně. U kontrolní skupiny byla bariéra narušena v 5 % případů, u pacientů s CD ve 48 % a u jejich příbuzných ve 40 %, což poukazuje na souvislost s mutací genu NOD2. Soudržnost buněk epitelu zajišťují apikální komplexy, což jsou multiproteinové struktury regulované cytoskeletem, a to na základě signálů od proteinů putujících skrz membrány (Levine and Wine, 2013).

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) uvádí, střevo obsahuje 70 % imunitních buněk a poměr počtu bakterií v lidském organismu ku počtu tělních buněk je zhruba v poměru 1:1. Sommer et al. (2017) tento poměr potvrzuje a upřesňuje, že dřívější často citovaný poměr počtu bakterií k počtu tělních buněk 10:1 byl přeceňován.

Schopnost symbiotických bakterií inhibovat kolonizaci patogeny je zprostředkována různými mechanismy (Pickard et al., 2017). Tyto mechanismy budou popsány v kapitole dysbiosy při IBD.

Honzák (9.12.2017, pers. comm.) diskutoval souvislost mikrobioty s psychosomatickou, která je podpořena hojným počtem nervových buněk ve střevech, kde dochází k obousměrné komunikaci mezi centrální nervovou soustavou a střevem, existuje tedy pravděpodobně spojitost i mezi mikrobiotou a naším chováním. Jako příklad uvedl rozvinutí mánie po aplikaci antibiotik. Další funkcí mikrobioty je přeměna sekundárních metabolitů rostlin, a to například polyfenolů na biologicky aktivní látky, které mohou působit pozitivně na lidské zdraví jako antioxidanty (Marchesi et al., 2016).

Derikx et al. (2016) doplňuje, že funkce jednotlivých kmenů mezi sebou interagují. Existují bakterie zajišťující více funkcí (bifidobakterie) i specifické bakterie (sulfát-redukující bakterie), (Marchesi et al., 2016).

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) uvádí, že zmíněné funkce mikrobioty ovlivňují a narušují metabolické děje, čímž může docházet k onemocněním jako IBD, obezita, kolorektálnímu karcinomu či inzulinová rezistence.

5.3.1.2 Faktory ovlivňující složení mikrobioty

Složení mikrobioty v časném stádiu života ovlivňuje způsob porodu či kojení. V případě porodu císařským řezem je mikrobiota novorozenců prokazatelně inhibována. Existují postupy, kterými lze po porodu císařským řezem částečně docílit potlačení inhibice mikrobioty, jako například aplikací vaginálního stěru matky na pokožku novorozence. Také časná expozice k mikrobům má prospěšný vliv na rozvoj mikrobioty, a tím na imunitní systém, proto přehnaná hygiena v dětství mnohdy spíše škodí (Honzák, 9.12.2017, pers. comm; Tlaskalová-Hogenová, 6.12.2017, pers. comm).

Dalším faktorem ovlivňující složení GM je životní prostředí. Dle studie diverzity mikrobioty kmenů z Tanzánie a Brazílie, byla u domorodých kmenů prokázána vyšší diverzita a s ní související vysoce funkční imunitní systém (Mendes et al., 2012).

Ošetření antibiotiky výrazně redukuje mikrobiotu a zároveň zvyšuje citlivost k patogenům (Cahová, 9.12.2017, pers. comm.).

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) uvádí jako další faktor ovlivňující složení mikrobioty výživu.

Nedávné studie přepokládají, že změna mikrobioty byla indukována již změnami ve výživě v průběhu vývoje lidstva (Sommer et al., 2017).

Vláknina je energetickým substrátem pro probiotické bakterie ve střevech a vede k produkci SCFA, které mají protektivní funkce v případě IBD (6.12.2017, pers. comm.).

Mimo příjem vlákniny ovlivňují složení mikrobioty typy tuků ve výživě. Výživa bohatá na nasycené tuky obsažené v mléku, zvýhodňuje kmen Proteobacteria, speciálně bakterii *Biophila wadsworthia*. Převládající živočišná strava zvyšuje počty bakterií tolerantních ke žluči jako *Bilophila* sp. (opět zejména *Biophila wadsworthia*) *Bacteroidetes* a *Alistipes* a naopak redukuje Firmicutes (Miyoshi and Chang, 2016).

Studie De Filippo et al. (2010) sledovala, jak rozdíly ve výživě ovlivňují mikrobiotu. Byly porovnávány dvě skupiny 12letých dětí, a to dětí z Burkina Faso a děti z Florencie. Tato studie prokázala významné rozdíly ve složení mikrobioty, kde u dětí z Burkina Faso převládala skupina

bakterií *Prevotella*, patřící mezi Bacteroidetes a u dětí z Florencie naopak převládal druhý dominantní kmen mikrobioty, kmen Firmicutes. U dětí z Burkina Faso s pestrým jídelníčkem zahrnující termity, proso, čirok, kuře a pálivé kaše z místní zeleniny, byla prokázána vyšší produkce SCFA, zatímco u dětí z Florencie, reprezentující typickou západní dietu, bylo nalezeno více potenciálně patogenních bakterií.

The American Gut Project je celosvětově největší lidmi financovaný vědecký projekt v historii. Umožňuje účastníkům studie identifikovat mikroorganismy obsažené ve střevní mikrobiotě, což přispívá k záměru vědců poznat, jak jsou lidské mikroorganismy asociovány s různými aspekty našeho života, jako výživou, konzumací alkoholu či některými onemocněními jako je autismus nebo IBD (The American Gut Project, 2017).

5.3.2 Dysbiosis střevní mikrobioty při IBD

Již Hippokrates tvrdil, že všechny nemoci začínají ve střevech (Honzák, 9.12.2017, pers. comm.).

Ačkoli dosud nebyla nalezena příčinná souvislost mezi patogenitou IBD a změnami mikrobioty, příkládá se dysbiose při IBD významná role (Vermiere et al., 2015).

Marchesi et al. (2016) dysbiosu definuje jako narušení či nevyrovnanost biologického systému, což může vést k rozvoji různých onemocnění, kupříkladu IBD či kolorektálnímu karcinomu. Sommer et al. (2017) k těmto nemocem doplňuje astma, obezitu, diabetes či atopický ekzém.

Při dysbiose je tak narušeno společné soužití patogenních a komenzálních mikroorganismů, které ve zdravé mikrobiotě udržuje homeostázu (Derikx et al., 2016).

Je prokázáno, že při IBD dochází v mikrobiotě k významné redukci počtu a biodiverzity některých mikroorganismů (Colman and Rubin, 2014). Derikx et al, (2016) dodává, že současně však celkový počet mikroorganismů narůstá.

Pickard et al. (2017) uvádí, že střevní dysbiosis silně koreluje se stavem choroby.

Výsledky studií zkoumající rozdíly ve změnách složení mikrobioty u UC a CD jsou různorodé. U některých studií vyplývají specifika pro UC a CD, zatímco jiné rozdíly nepotvrdily (Derikx et al., 2016).

Pro studie mechanismu patogeneze jsou nejvhodnějšími subjekty zvířecí modely, zvláště pak gnotobionti, což jsou bezmikrobní organismy (Miyoshi and Chang, 2016). U gnotobiontů jsou zaznamenány nejruznější změny v porovnání se zvířetem osídleným mikrobiotou, a to změny ve stavbě střeva, v imunitním systému, změny ve stavbě a funkci centrální

nervové soustavy a změny v délce života, kdy se gnotobionti prokazatelně dožívají vyššího věku (Cahová, 9.12.2017, pers. comm.).

Při dysbiose jsou zaznamenány změny mukózní vrstvy u UC, a to její ztenčení, zatímco u CD je vrstva podobná jako u zdravých jedinců, ale je zde abnormální exprese a glykosylace mucinu. Komenzální bakterie střevní mikrobioty se adaptovaly ke kolonizaci mukózní vrstvy střeva díky schopnosti přilnout ke komponentům mukózy, schopnosti využít živiny mukózy, modulovat složení mukózy a vnímání chemických podnětů. Častokrát tyto strategie využívají i patogeny (Sicard et al., 2017).

Cahová (9.12.2017., pers.comm.) zmiňuje fenomén Quorum sensing, což je forma mezibuněčné komunikace, která umožňuje bakteriím monitorovat okolí a měnit své „chování“, tj. expresi určitých genů, v závislosti na signálech produkovaných buď příslušníky stejného druhu, jiných druhů nebo hostitele. Bakterie tak pozná, kdy je člověk oslabený, a tedy je vhodná doba k jeho napadení. Dalším mechanismem, který zvyšuje účinnost patogenním bakterií, je jejich schopnost vytvářet biofilm. Biofilm je charakterizován jako organizovaná bakteriální struktura s koordinovaným chováním jednotlivých členů.

Sicard et al. (2017) doplňuje, že se mikroorganismy v biofilmu vzájemně spojují a jsou připojovány k povrchu mukózní vrstvy. Hlavními bakteriemi tvořící film a současně dávány do souvislosti s IBD jsou bakterie čeledi Enterobacteriaceae, především adherentní invazivní druh *Escherichia coli* (AIEC) a bakterie *Bacillus fragilis*. Tvorba biofilmu AIEC je charakteristická při Crohnově chorobě, v kontrastu s jinými typy *E. coli*, které biofilm netvoří. Další strategií AIEC mimo tvorbu biofilmu je degradace mucinu pomocí proteasy Vat-AIEC, což v důsledku vede k poklesu mukózní viskozity.

Rozsah dysbiosy v rámci jednotlivých mikroorganismů dosud není prozkoumán. Probíhají rozsáhlé studie bakteriální dysbiosy, avšak pro dysbiosu hub a virů jsou dostupná data vzácná (Sokol et al., 2017).

Velmi málo studií se zabývalo změnami mikrobioty na úrovni *Archea*. V jedné studii byla zaznamenána redukce methanogenů, zatímco v další nebyly prokázány významné rozdíly (Miyoshi and Chang, 2016).

5.3.2.1 Dysbiosis bakterií

Jedny z prvních studií zabývajících se dysbiosou při IBD hledaly potenciálního viníka zánětlivého procesu. Byly zkoumány bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Helicobacter* sp., *Campylobacter non-jejuni/coli* a adherentní invazivní *E. coli*. Později

se studie zaměřily na fakt, že je změněna celá mikrobiota, což je pravděpodobně nejvýznamnější objev ve výzkumu IBD v minulém desetiletí (Marchesi et al., 2016).

Metagenom dysbiotické mikrobioty při IBD obsahuje o 25 % genů méně, než metagenom mikrobioty zdravé. Současně je zaznamenán pokles proteinů a metabolických drah. Dysbiosis při CD je charakteristická změnami v metabolismu bakterií zpracovávajících sacharidy, změnami v interakcích mezi bakteriemi a hostitelem a změnami v sekreci enzymů hostitele. Při IBD dochází také ke zvýšení účinnosti mikrobiálních cest pro toleranci na oxidativní stres, dochází k poruchám imunity, zvyšuje se absorpce metabolitů hostitelem, snižuje se biosyntéza SCFA a je narušena biosyntéza aminokyselin. Byl zaznamenán nárůst metabolitu T2D, který je dáván do souvislosti s jinými chronickými záněty a autoimunitními onemocněními (Marchesi et al., 2016).

Vermiere et al. (2015) zaznamenal snížení počtu protizánětlivých bakterií v porovnání se znásobením bakterií indukujících zánět.

Typickým znakem dysbiosy při IBD je dle Marchesiho et al. (2016) změna poměru dvou základních kmenů střevní mikrobioty Firmicutes: Bacteroidetes ve prospěch kmene Bacteroidetes, který je spojen s nárůstem kmene Proteobacteria. Některé studie kromě redukce Firmicutes uvádějí i pokles jejich diverzity.

Jedním z redukováných rodů při IBD, je *Faecalibacterium*, řazen do kmene Firmicutes, čeledi Clostridia. Dochází zde k významné redukci druhu *Faecalibacterium prausnitzii* (Colman and Rubin, 2014). Tato bakterie má významný protizánětlivý a imunomodulační účinek prokázáný jak *in vitro*, tak *in vivo* (Vermiere et al., 2015). Někteří autoři vědecké literatury však souvislost redukce těchto bakterií ve vztahu k IBD popírají (Marchesi et al., 2016).

Redukce je prokázána i na úrovni rodů *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Blautia*, *Eubacterium* a *Dorea* (Sokol et al., 2017). Myoshi a Chang (2016) doplňují redukované bakterie o čeleď Lachnospiraceae a rod *Roseburia*, např. *Roseburia hominis*, produkující butyrát u pacientů s UC. Dále uvádějí redukci třídy Erysipelotrichales.

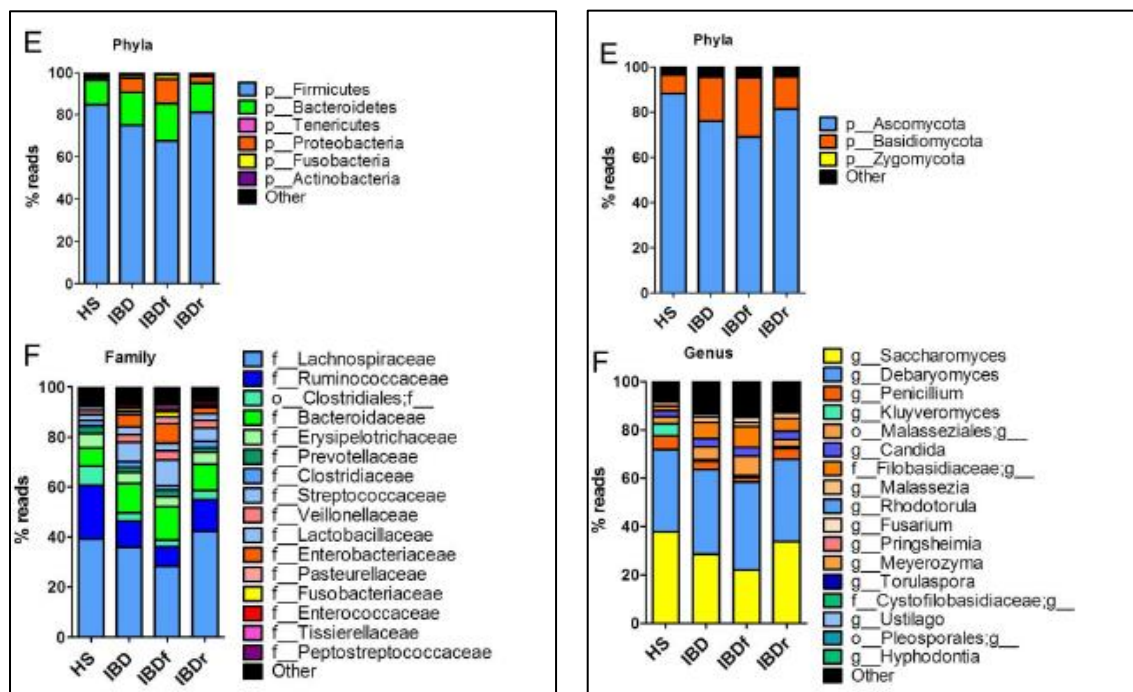
Sommer et al. (2017) redukované rody rozšiřuje o rod *Prevotella*, Sheehan et al. (2015) o rod *Bifidobacterium*, který je redukován zejména u CD, dále druh *Odoribacter* sp. produkující SCFA a rod *Anaerostipes* produkující butyrát.

Z bakterií, u nichž dochází ke znásobením, lze uvést adherentní invazivní *Escherichia coli* (AIEC), patřící do kmene Proteobacteria, která může zánět podpořit, a to indukovanými

mutacemi FimH (Vermiere et al., 2015). Derikx et al. (2016) doplňuje, že u kmene Proteobacteria narůstá počet zástupců čeledi Enterobacteriaceae, do něhož je řazena i *E. coli*. Počet *Bacteroides fragilis* při IBD rovněž narůstá a způsobuje celkově vyšší hmotnost bakterií mikrobioty v porovnání se zdravými jedinci (Marchesi et al., 2016). K nárůstu dochází také u druhů *Streptococcus anginosus*, *Aggregatibacter segnis* a rodu *Actinobacillus*, oba patřící do čeledi Pasteurellaceae (Sokol et al., 2017), což potvrzují také Miyoshi a Chang (2016), kteří doplňují bakterie, u nichž dochází k nárůstu, o bakterie Veillonellaceae a Fusobacteriaceae. Sheehan et al. (2015) doplňuje skupinu o bakterii *Rothia mucilaginosa*, *Clostridium difficile*, způsobující sekundární klostridiální infekce a rod *Shigella*. Dle Quince et al. (2015) narůstají také počty rodu *Atopobium*.

Sommer et al. (2017) uvádí 8 skupin charakteristických bakterií u pacientů s CD. Jedná se o rody *Peptostreptococcaceae* (z kmene Bacteroidetes), *Anaerostipes* (z čeledi Lachnospiraceae), *Methanobrevibacter* (čeleď Methanobacteriaceae), *Christensenellaceae* (řád Clostridiales), *Collinsella* (čeleď Coriobacteriaceae), které jsou u CD redukovány a *Fusobacterium* a *Escherichia*, jejichž počty jsou naopak znásobené.

Změny v mikrobiotě bakterií při IBD jsou znázorněny na obrázku 7 (Obr. 7) vlevo v grafech E a F.



Obr. 7: Změny v mikrobiotě při IBD oproti zdravým jedincům a při IBD relapsech (IBDf) a IBS remisích (IBDr) u bakterií (vlevo), u hub (vpravo), (Sokol et al., 2017).

Je třeba dodat, že je nutno při hodnocení změn složení mikrobioty při IBD brát v úvahu typ vzorku (stolice či vzorek odebraný chirurgicky), místo, odkud byl vzorek získán a fázi onemocnění pacientů, kteří poskytli vzorek (Miyoshi and Chang, 2016).

5.3.2.2 *Dysbiosis hub*

Houby a bakterie koexistují ve střevní mikrobiotě a mohou se přímo ovlivňovat (Sokola et al., 2017).

Simultánní analýza dysbiosy bakterií a hub Sokola et al. (2017) umožnila objasnit změny rovnováhy mezi říšemi u pacientů s IBD v porovnání se zdravou kontrolní skupinou. Studie předpokládá existenci vztahů mezi říšemi mikrobioty a jejich změny v důsledku IBD.

Byla pozorována redukce mikrobioty hub, a to jak na úrovni její biodiverzity, tak i složení.

Při onemocnění dochází ke změně poměru basidiomycét a askomycet ve prospěch basidiomycét. Na druhové úrovni je zaznamenána pomocí q-PCR a sekvenace redukce *Saccharomyces cerevisiae* a naopak nárůst *Candida albicans*. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je předpokládán protizánětlivý efekt na základě zvýšené produkce protizánětlivého cytokinu IL 10. Dochází tak k interakci s AIEC, u níž dochází k redukci vlivem kvasinky a tím k redukci zánětu. Přítomnost této kvasinky je ovlivněna genem CARD9, který stimuluje imunitní odpověď, a v případě IBD dochází k vadné odpovědi, což vede k redukci druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Podobná asociace genu s houbou je zaznamenána u genu DECTIN1, kdy však dochází ke znásobení druhu *Malassezia sympodialis*, který vylučuje potenciální alergeny, a může dojít ke zvýšení lokální zánětlivosti.

Miyoshi a Chang (2016) upřesňují, že u pacientů s CD dochází k nárůstu *Candida albicans*, *Aspergillus clavatus* a *Candida neoformans*.

Nárůst *Candida albicans* v případě IBD pravděpodobně neovlivňuje onemocnění (Sokol et al., 2017).

Změny v mikrobiotě hub při IBD jsou znázorněny na obrázku 7 (Obr. 7) vpravo v grafech E a F.

5.3.2.3 *Dysbiosis virů*

Funkce virů ve zdravém střevě a při dysbiose není téměř vymezena, ačkoli jí mnoho studií přikládá významnou roli. Podobně jako bakterie mohou hrát viry roli v udržení homeostáze. Bakteriofágové formují střevní mikrobiální populaci a její diverzitu pomocí mechanismu

napadání bakterií a jejich redukce. Tuto činnost vykonávají na základě vnějších stimulů (Sheehan et al., 2015).

Marchesi et al. (2016) uvádí, že byl zaznamenán významný nárůst bakteriofágů *Claudovirales*.

V případě CD byla prokázána vyšší četnost i diverzita bakteriofágů než u zdravých jedinců. Bakteriofágové jsou důležitou formou přenosu genů na horizontální úrovni mezi bakteriemi (Miyoshi and Chang, 2016).

5.3.3 Modulace mikrobioty jako léčebná strategie IBD

Modulace mikrobioty je využívána k terapeutickým účelům při léčbě IBD. Léčebných strategií využívající modulaci mikrobioty je více, a to; fekální transplanatce, probiotika, prebiotika, úprava diety či podávání antibiotik. Účinnost modulace mikrobioty však omezuje různorodost fenotypů či genotypů onemocnění a jejich fází (Marchesi et al., 2016).

Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) doplňuje dva další způsoby modulace, a to rekombinantní buňky (TGF-beta u CD) a postbiotika (metabolické sloučeniny produkované probiotickými mikroby ovlivňující různé biologické funkce hostitele).

Cahová (9.12.2017, pers. comm.) vidí přínos modulace mikrobioty spíše v posílení určitých vlastností, než radikální změny ve složení, a to například produkcí určitých metabolitů, jako protizánětlivých SCFA.

Spousta autorů včetně Sheehana et al. (2015) pokládá modulaci mikrobioty za slibnou léčebnou strategii budoucnosti.

5.3.4 Metody analýzy střevní mikrobioty

Metody analýzy střevní mikrobioty se rozdělují na kultivačně-závislé metody a na kultivačně-nezávislé metody. Kultivačně-závislé metody jsou založeny na kultivaci, která je limitujícím faktorem těchto technik. Principem kultivačně-nezávislých metod je izolace DNA a její následná analýza, například sekvenací.

Kultivačně-nezávislé metody přináší řadu výhod oproti kultivačním metodám, a to možnost identifikace nekultivovatelných či obtížně kultivovatelných mikroorganismů, časovou úsporu a další (Motro a Moran-Gilad, 2017). Nevýhodou je finanční náročnost (Brdička, 2011).

5.4 Sekvenování nové generace

Koubková et al. (2014) uvádí, že rozluštění DNA sekvence je nezbytné v podstatě pro všechna odvětví biologického výzkumu.

Sekvenování nové generace umožňuje diferenciaci mikroorganismů, objevování nových mikroorganismů, objasnění virulentních faktorů a markerů rezistence, charakterizaci odpovědi hostitele na mikroorganismy a další (Motro a Moran-Gilad, 2017).

Mardis (2008) rozděluje sekvenační techniky na sekvenování nové generace a konvenční metody.

Konvenční metody jsou také označovány jako technologie první generace. Část NGS technologií je označovány jako technologie druhé generace, v současné době existují i technologie generace třetí a čtvrté, které jsou však velmi nákladné (Brdička, 2011).

Sekvenační přístroje se stávají předmětem konkurenčního boje. Dochází k jejich nepřetržitému zdokonalování; je zvyšován výkon přístrojů a jejich použitelnost v nejrůznějších aplikacích. Narůstá i použitelnost jejich výsledků v praktické lékařské diagnostice, která začíná nabízet nebývalé množství dat.

Sekvenátory jsou uváděny na trh již na úrovni funkčních prototypů a během prvních let jejich výroby dochází k mnoha úpravám a vylepšením. Stroje tak zastarávají takovou rychlostí, že je nutné je maximálně využívat (Brdička, 2011).

Vzniká celá řada počítačových programů, které umožňují nejen interpretaci analytickou, ale také klinickou, bez níž by šlo sice o biologicky zajímavé výsledky, avšak bez lékařského využití (Brdička, 2011).

NGS technologie Koubková et al. (2014) rozděluje do dvou základních kategorií, a to na a) technologie založené na PCR amplifikaci templátu, které zahrnují komerčně dostupné platformy Roche 454 System, Illumina sequencers, AB SOLiD System a Ion Personal Genome Machine (technologie druhé generace) a b) technologie využívající tzv. „single molecule sequencing“, kdy nedochází k amplifikačnímu kroku před vlastní sekvenací a jsou zde zahrnuty platformy jako HeliScope, PacBio RS SMRT System a Oxford Nanopore (technologie třetí generace).

5.4.1 Princip sekvenování

Principem sekvenace je rozbití nativních molekul DNA na fragmenty, čímž vznikají tzv. knihovny fragmentů. Jelikož fragmenty vznikají z velkého počtu výchozích

DNA molekul, tak se v různé míře navzájem překrývají a tyto překryvy umožňují jejich vzájemné pospojování a sestavení nukleotidové sekvence značné délky, která je osekvenována a následně zpracována bioinformatickými technologiemi (Brdička, 2011).

5.4.2 Rozdíly mezi NGS a konvenčními metodami

Zásadním rozdílem NGS a konvenčních metod, které detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé, je možnost paralelní sekvenace, která zpracuje současně až tisíc molekul současně (Koubková et al., 2014). V jejím důsledku je rapidně zkrácena doba potřebná k přečtení dlouhých DNA sekvencí, k celému procesu je třeba pouze jeden či dva přístroje a k vytvoření knihovny stačí pouze malé množství DNA (Mardis, 2008).

Koubková et al. (2014) uvádí, že k určení sekvence prvního lidského genomu bylo potřeba 10 let, zatímco NGS umožňují určit sekvenci lidského genomu nebo jen jeho vybraných částí za zlomek času (několik týdnů) a za mnohem nižší cenu.

I přes veškeré výhody oproti konvenčním metodám je však analýza zatížena vysokými náklady na přístrojové vybavení a samotný provoz (Mardis, 2008).

V případě klasických metod může být kvalita výsledku a celý proces prakticky ovládnut technikem, zatímco pro správnou funkci přístrojů nové generace je nezbytné odpovídající počítačové i personální vybavení. V týmech používajících stroje NGS se proto objevují bioinformatičtí jako jejich neodmyslitelná a nedílná součást (Brdička, 2011).

Principiálně se nové metody odlišují od konvenčních ve způsobu detekce narůstajících řetězců. U konvenčního sekvenování je využívána elektroforetická separace, zatímco NGS je založena na chemických dějích odehrávajících se během vstupu nového nukleotidu do syntetizovaného řetězce. Dalším významným rozdílem je délka fragmentů DNA, které jsou čteny sekvenátorem. U NGS dosahují fragmenty v závislosti na použité technice délky 35 – 250 bp, u konvenčních metod se jedná o 650 – 800 bp, což velmi ovlivňuje využitelnost získaných dat k dalším aplikacím (Mardis, 2008).

5.4.3 Konvenční sekvenování (první generace)

Nejvýznamnější konvenční metodou je Sangerova sekvenace, jinak nazývaná enzymatická metoda sekvenace, využívající specifických vlastností DNA polymerázy při syntéze nového řetězce. Navzdory její pracnosti i časové náročnosti se Sangerovo sekvenování stalo velmi rozšířeným v laboratořích po celém světě, zvláště po její automatizaci. Automatický

sekvenátor využívá kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých úseků DNA (Koubková et al., 2014).

Principem metody je separace oligonukleotidů vzniklých elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a jejich detekce stříbřením či později nahrazenou kapilární elektroforézou a fluorescenčním značením (Brdička, 2011).

Sekvenační technologie první generace se v rámci projektu HGP (Human Genome Project) účastnily analýzy sekvence lidského genomu v ohromném nasazení (Brdička, 2011), nicméně projekt HGP poukázal na limitace Sangerova sekvenování a potřebu nových technologií s vyšší výkonností a přesností, nižšími náklady a menší pracností. Sangerovo sekvenování se v současnosti stále využívá a hodí se například pro sekvenování PCR produktů nebo pro malé sekvenační projekty (Koubková et al., 2014).

5.4.4 Sekvenování nové generace (druhá generace)

Trhu sekvenační techniky nové generace dnes dominují tři platformy, a to a) pyrosekvenace (454/Roche), b) reversibilní terminátorová sekvenace (Illumina/Solexa) a c) sekvenace ligací (Life technologies/SOLiD). Výhodou technologie 454 Roche je největší délka čtení, Illuminy/Solexy nejvíce dat za nejnižší cenu a SOLiD systému nejvyšší přesnost (Koubková et al., 2014).

Tyto techniky se odlišují způsobem přípravy DNA fragmentů k sekvenaci, u všech tří technik je však příprava založena na ligaci specifických adaptorů k oběma koncům každého DNA fragmentu (Mardis, 2008)

Sekvenování lze obecně rozdělit na celogenomové sekvenování, exomové sekvenování, sekvenování transkriptomu a cílené sekvenování vybraných oblastí. Celogenomové sekvenování zahrnuje *de novo* sekvenování a resekvenování, u něhož se sekvenují stejné genomy jako u *de novo* přístupu, s tím rozdílem, že je k dispozici referenční sekvence, na kterou se nová sekvence zpětně mapuje. U exomového sekvenování jsou sekvenovány pouze exomy, tedy kódující oblasti sloužící pro transkripci bílkovin. Lidský exom představuje cca 1% velikosti lidského genomu, z čehož plyne nižší cenová náročnost a jednoduchost. Transkriptomové sekvenování využívá sekvenování transkriptomu. Transkriptom představuje soubor všech molekul RNA, kódujících i nekódujících. Cílené sekvenování vybraných oblastí je inovativní technika, jež umožňuje sekvenovat pouze vybrané geny nebo definované oblasti genomu, čímž je šetřen čas, peníze i prostor pro skladování dat. Cílené

sekvenování se proto využívá pro velký počet screenovaných vzorků či validaci genetických variant v populaci (Koubková et al., 2014).

Typický pracovní postup NGS dle Motry a Moran-Gilada (2017) zahrnuje: shromáždění vzorků a jejich příprava, extrakce nukleové kyseliny, příprava knihovny NGS, sekvenování, analýza dat a uchování dat. NGS vyžaduje izolaci bakteriálních druhů z čisté kultury. Extrakce nukleové kyseliny může být provedena různými metodami, avšak některé z nich jsou závislé na NGS metodě, která bude použita. Správný výběr metody je zásadní pro úspěšnou analýzu. Před samotné sekvenování jsou zařazeny kroky fragmentace nukleové kyseliny, ligace adaptorů, která umožňuje vytvoření knihovny a amplifikace. Fragmentaci zajišťují buď sonikace, či nebulizace (rozprašování) nebo enzymatické štěpení. Amplifikace je většinou provedena emulzní PCR či bridge amplifikací. Přípravu knihovny a amplifikaci ovšem nevyžadují všechny platformy NGS, tudíž jsou tyto kroky v některých metodách přeskočeny.

Genetickou informaci plasmidů lze osekvenovat za méně než hodinu, bakteriální genom za několik hodin a lidský genom za několik dní (Brdička, 2011).

Některé údaje o přístrojích NGS jsou uvedeny v tabulce 1 (Tab. 1). Nejedná se o kompletní sadu údajů, neboť byly jen částečně dostupné a mimo to někdy obtížně srovnatelné. Údaje v tabulce neodkazují na kvalitu přístrojů, například nároky na kvalifikaci obsluhy, robustnost, odolnost proti prostředí a špatnému zacházení a další důležité parametry jako například chybovost, pro kterou obecně platí, že čím jsou kratší odečítané fragmenty, tím je chybovost nižší. Dalším důležitým parametrem je také počet přečtení daného úseku (Brdička, 2011).

Výrobce přístroje	Minimální množství DNA ve vzorku	Velikost DNA fragmentů	Doba analýzy včetně zpracování dat ^{\$}	Cena přístroje (Kč)	Cena jedné sekvenace (Kč)
Ion Torrent, Life Technologies	1 µg	100 - 200	* 100 MB 2-3h	1,9 milionu	14 500,-
GS Junior, Roche 454	500 ng	400	*	3,7 milionu	35 000,-
MiSeq, Illumina	50 ng	35 - 150	*	2,2 milionu	7 200 – 13 500,-
PACBIO RSPacific Biosciences	500 ng - 1µg	1500	* <100 GB 24 h	17,4 milionu	7 000,-
HeliScope Helicos	10 ng	25 - 55	* \$\$ 30 GB 8 dní	14,4 milionu	^{\$\$} 324 000,-
<p>\$ v závislosti na velikosti analyzovaného genomu</p> <p>\$\$ přibližně desetinásobně pokrytí kompletního lidského genomu</p> <p>* plasmidy obvykle méně než jednu hodinu, bakteriální genom několik hodin, lidský genom několik dní</p>					

Tab. 1: Srovnání jednotlivých technik (převzato od Brdička, 2011).

Všichni výrobci poskytují odhad přesnosti a kvality jednotlivých čtení, avšak neexistuje důkaz, že kvalita čtení z jedné platformy je ekvivalentní kvalitě čtení z platformy druhé (Koubková et al., 2014).

5.4.4.1 Roche 454

Roche 454 pracuje na principu pyrosekvenování, které lze zjednodušeně popsat jako sled enzymatických reakcí, během kterých se začleňují jednotlivé báze do nově vznikajícího řetězce DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla. Množství uvolněného světla je úměrné počtu začleněných nukleotidů.

Nevýhodou platformy jsou problémy v detekci homopolymerních úseků DNA (např. AAA a GGG), čili větší chyby v určení počtu začleněných nukleotidů. Tyto chybové sekvence lze rozlišit a vyfiltrovat speciálními programy. Další nevýhodou je vysoká cena reagensů. Na druhou stranu poskytuje Roche 454 velmi dlouhá čtení a metoda je velmi rychlá (Koubková et al., 2014).

5.4.4.2 *Illumina/Solexa*

Sekvenátor Illumina/Solexa je založen na principu sekvenace syntézou ve spojení s tzv. bridge amplifikací. Existuje několik přístrojů různé výkonnosti: MiSeq, MiSeqDx, NextGen 500, HiSeq2500 a HiSeq Ten.

Výhodou Illumina sekvenátorů je schopnost produkovat více dat za méně času a peněz, avšak s vyšší chybovostí (Koubková et al., 2014).

5.4.4.3 *Life Technologies/SOLiD*

SOLiD platforma je založena dle Koubkové et al. (2014) na sekvenování ligací. DNA knihovna je připravována emulzní PCR a k fragmentům DNA se připojí krátké adaptory komplementární k adaptorům imobilizovaným na povrchu kuliček. Po amplifikaci se kuličky kovalentně naváží na sklíčko se speciálně upraveným povrchem, které se vloží do kazety umožňující fluidní průtok. Systém využívá osm nukleotidů dlouhé sondy se známou sekvencí prvních dvou bází označených fluorescenčními barvami.

Výhodou je vyšší přesnost, jelikož je každý nukleotid přečten dvakrát.

5.4.4.4 *Life Technologies/Ion torrent*

Přístroj Ion Personal Genome Machine (PGM) je založen na schopnosti přímo převádět chemický signál do digitální podoby. Optický způsob zaznamenávání jednotlivých nukleotidů byl nahrazen detekcí vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce. Proces probíhá na polovodičovém čipu hustě pokrytém mikrojamkami, pod nimiž je umístěna na ionty citlivá vrstva. K přípravě knihovny je využita emulzní PCR. Kuličky s templátem jsou ukládány na čip tak, že v každé jamce je pouze jedna molekula DNA. Čip je poté postupně zaplavován jednotlivými druhy nukleotidů a dochází k syntéze DNA.

Včlenění nukleotidů způsobí uvolnění H^+ , čímž dojde ke změně pH zaznamenané detektorem. Pokud nukleotid není komplementární, detektor zaznamená nulový signál. Dojde-li k začlenění dvou nukleotidů, signál je dvojnásobný.

Technologie je velice jednoduchá, rychlá a levná (Koubková et al., 2014).

5.4.5 *Single-molecule sekvenování (třetí generace)*

Koubková et al. (2014) uvádí výhody technologie single-molecule, a to že nevyužívá žádný amplifikační krok před vlastním sekvenováním, což zkracuje dobu přípravy DNA,

redukuje cenu a snižuje chybovost, která pramení z amplifikace, umožňuje vyšší flexibilitu v délce čtení a přesnou kvantifikaci DNA molekul, jelikož je signál zaznamenáván v reálném čase.

Příkladem platformy třetí generace je Helicos Genetic Analysis System, single-molecule real-time (SMRT) či nanopore sequencing, což je technologie založená na biologických vlastnostech nanopóru. Sekvenování stejné molekuly DNA může být v případě nanopore sequencing neustále opakováno.

6 Metody a materiál

Tato práce vznikla v návaznosti na mou bakalářskou práci s názvem Vliv enterální výživy na mikrobiotu dětí s Crohnovou nemocí vzniklou z roku 2016.

Na studii spolupracovala jak Fakultní nemocnice v Motole, tak Akademie věd České republiky.

V dnešní době funguje spousta laboratoří na principu služeb, kdy jsou vyizolované vzorky DNA posílány firmě, která samotnou NGS provádí. Sekvenování vzorků bylo z časových a ekonomických důvodů proto provedeno na Akademii věd České republiky (AV), Ústavu živočišné fyziologie a genetiky sídlící v ulici Vídeňská, kde probíhala celá analýza od fáze přípravy knihovny a dále včetně.

Jelikož se jedná o rozsáhlou analýzu, v případě prací na AV jsem se spolupodílela pouze na přípravě knihovny, zbylé kroky NGS byly provedeny docentkou Ing. Věrou Neužil Bunešovou, Ph.D a doktorem Ing. Jakubem Mrázkem.

Na pracích na ČZU navíc spolupracovala Ing. Nikol Modráčková. V rámci prací na ČZU jsem se podílela na izolaci DNA a přípravě amplikonů PCR.

6.1 Charakterizace vzorků

Na počátku pokusu bylo do studie zařazeno 50 dětských pacientů Fakultní nemocnice v Motole. Jednalo se o děti, u nichž byla stanovena diagnóza Crohnovy choroby, a v této nemocnici byly podrobeny léčbě enterální výživou po dobu 6 týdnů. Enterální výživa podávaná pacientům nebyla jednodruhovává, jednalo se o kombinace různých značek, a to Modulen, Ensure a Nutridrink. Vzorky stolice těchto pacientů byly odebírány na začátku léčby a v jejím průběhu, kdy se jednalo o vzorky před kolonoskopií, po kolonoskopii, ve 3. týdnu léčby a v 6. týdnu léčby. Nicméně, všem dětem se pokus nepodařilo dokončit a jen vzorky některých pacientů byly vybrány pro další laboratorní analýzy a testování. Za dostačující výsledek se považovalo získání vzorků před zahájením léčby a 6. týden, ostatní odběry byly získány pouze u některých pacientů. U některých pacientů se také podařilo získat vzorky stolice z období po ukončení léčby, a to i v 8. nebo 12. týdnu, kdy už byli zpět na normální konvenční dietě. Čerstvé vzorky stolice pacientů byly použity pro kultivaci a biochemický test, jejichž výsledky byly zpracovány v mé bakalářské práci s názvem Vliv enterální výživy na mikrobiotu dětí s Crohnovou nemocí vzniklé v roce 2016. Část vzorků byla uložena pro další testování, kdy byla izolována DNA ze vzorků stolice potřebná

pro molekulárně-genetické analýzy, mezi něž patří námi sledované sekvenování nové generace (NGS).

Seznam vzorků selektovaných pacientů použitých k NGS s informacemi o věku, provedených odběrech a označení jednotlivých vzorků je uveden v tabulce 2 výše (Tab. 2). U dvou vzorků (11C a 23B) byla koncentrace po stanovení koncentrace DNA spektrofotometrem příliš vysoká, proto bylo třeba DNA před PCR více naředit (až 100krát). U jednoho vzorku (38 C) chybí PCR produkt. V průběhu analýzy dále bohužel došlo k selhání sekvenace tří vzorků, a to konkrétně vzorků 10B, 12A a 15C.

		Věk k prvnímu odběru	0. odběr	K	po kolon.	3.	6.týden	8.	12. týden	DNA	SAMPLE ID
1	MP10	12	•	•	–	–	•	–	•	A, B, C	10A
											10B
											10C
2	MP11	13	•	•	•	–	•	–	•	A, B, C, D	11A
											11C
											11D
3	MP15	10	•	•	•	–	•	–	•	A, B, C, D	15A
											15C
											15D
4	MP23	18	•	•	–	–	–	–	•	A, B, C	23A
											23B
											23C
5	MP27	17	•	–	–	–	•	–	–	A, B, C	27A
											27B
											27C
6	MP37	7	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	37A
											37C
											37D
7	MP38	8	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	38A
											38C
											38D
8	MP39	13	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	39A
											39C
											39D
9	MP40	16	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	40A
											40C
											40D
10	MP41	15	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	41A
											41C
											41D
11	MP49	17	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	49A
											49C
											49D
12	MP52	12	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	52A
											52C
											52D
13	MP54	14	•	–	–	–	•	–	•	A, B, C	54A
											54B
											54C
14	MP55	13	•	–	–	–	•	–	•	A, B, C	55A
											55B
											55C
15	MP60	11	•	•	•	–	•	–	•	A, B, C, D	60A
											60C
											60D
16	MP67	16	•	–	–	–	•	–	•	A, B, C	67A
											67B
											67C
17	MP69	17	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D, E	69A
											69D
											69E
18	MP71	10	•	–	•	–	•	–	•	A, B, C, D	71A
											71C
											71D

Tabulka 2. Seznam selektovaných pacientů (MP – motol pokus, K – provedená kolonoskopie, • odebráno, – neodebráno, A, B, C, D, E - pořadí vzorků od jednoho pacienta použitých k rozboru, sample ID – identifikační číslo vzorku).

6.2 Metoda NGS

Cílem metody NGS byl odhad mikrobiální diverzity v gastrointestinálním traktu (GIT) dětských pacientů s Crohnovou chorobou léčených pomocí enterální výživy.

Z několika existujících platform NGS, byla pro naše účely vybrána platforma Ion Torrent™ neboli polovodičové sekvenování.

Platforma Ion Torrent™ sestává ze šesti základních kroků, a to; izolace DNA, přípravy ampliconů PCR, přípravy knihovny, přípravy templátu, sekvenování a analýzy dat.

6.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA je základním krokem k provedení molekulárně-genetických metod. Metodika izolace DNA závisí na druhu vzorku, z něhož chceme DNA získat.

V této studii se jednalo o izolaci totální bakteriální DNA ze stolice pacienta pomocí kitu FastDNA™ Spin Kit for Feces (MP Biomedicals).

Pro izolaci DNA bylo nejprve naváženo 250 mg vzorku stolice do lyzační zkumavky Lysing Matrix E tube, ke kterému bylo přidáno 927 µl pufru fosforečnanu sodného a dále 122 µl MT pufru. Vzorky byly homogenizovány v přístroji FastPrep®24 rychlostí 5 m/s po dobu 40 sekund a následně odstředovány na 14 tisíc otáček po dobu 10 minut. Dále byl využit pouze supernatant převedený do odstředovací zkumavky o objemu 2 ml, ke kterému bylo přidáno 250 µl PPS roztoku srážejícího bílkoviny. Supernatant byl spolu s PPS roztokem promíchán desetinásobným otočením tuby a dále odstředován na 14 tisíc otáček po dobu 2 minut. Odstředěný supernatant byl přelit do zkumavky o objemu 15 ml obsahující 1 ml suspenze Binding Matrix a promíchán otáčením zkumavky po dobu 3 až 5 minut. Vzorek byl opět odstředěn na 8 tisíc otáček po dobu 2 minut. Supernatant byl slit a peleta resuspendována s 1 ml přípravku Wash Buffer #1. 600 µl resuspendované pelety bylo převedeno do zkumavky SPIN Filter a odstředěno na 14 tisíc otáček po dobu 1 minuty. Zkumavka SPIN Filter se skládá ze dvou částí, přičemž spodní část byla po odstředění vyprázdněna a horní část ponechána a opět odstředována na stejný počet otáček po stejnou dobu. Spodní část zkumavky byla opět vyprázdněna a do horní části je přidáno 500 µl předem připraveného přípravku Wash Buffer #2 smíchaného s etanolem. Vzorek byl resuspendován a odstředován na 14 tisíc otáček po dobu 2 minut. Spodní část zkumavky byla vylita a vzorek byl znovu odstředován na stejný počet otáček po dobu 2 minut, aby bylo docíleno odstranění zbývajících etanolu. Horní část zkumavky byla převedena do zkumavky Catch Tube o objemu

1,9 ml a bylo přidáno 60 – 100 μ l přípravku TES. Po promíchání byl vzorek odstředěn na 14 tisíc otáček po dobu 2 minut a převeden do čisté zkumavky Catch tube za účelem získání výluhu očištěné DNA, která byla tímto postupem připravena pro PCR a další využití.

Koncentrace DNA byla zjištěna pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

6.2.2 Příprava amplikonů PCR

Po stanovení koncentrace DNA spektrofotometrem byla většina vyizolované DNA naředěna 10krát, u některých vzorků byla stanovená koncentrace příliš vysoká, proto bylo třeba DNA před PCR více naředit (až 100krát). Po proběhlé PCR, pomocí které jsme DNA amplifikovali, byla provedena gelová elektroforéza ke kontrole správnosti amplifikace DNA.

Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny. Pomocí gelové elektroforézy lze separovat molekuly DNA na základě odlišných rychlostí pohybu molekul DNA v gelu. Rychlosti pohybu molekul jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA.

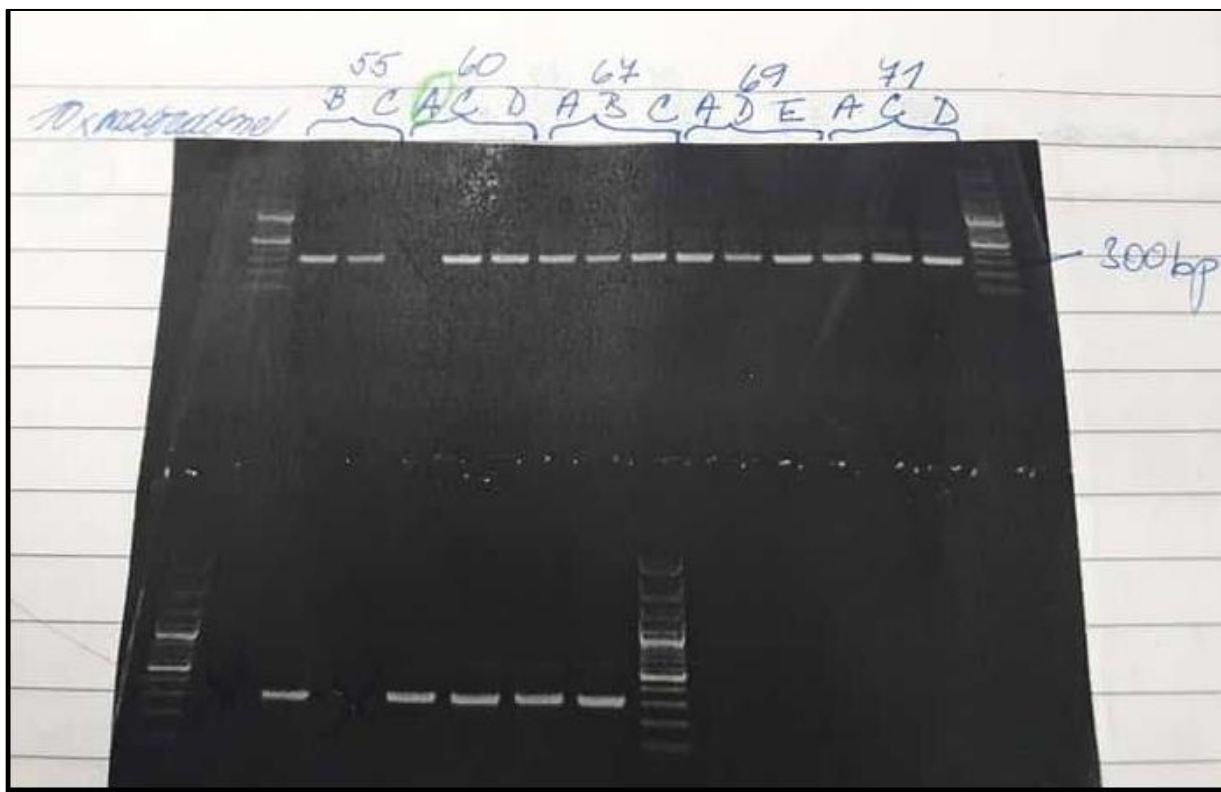
Postup elektroforézy byl následující: Nejdříve bylo připraveno 100 ml 1% agarosového gelu (Serva), a to z práškové agarosy (1 g) a 50x naředěného TAE pufru (Serva; 100 ml). Směs byla promíchána a zahřáta. Po rozpuštění byla směs ochlazená na 60 °C pod tekoucí vodou za stálého míchání, poté byla do směsi přidána barvička GelRed (Biothum) pro vizualizaci PCR produktů. Byla sestavena elektroforetická vanička, do které byl nalit agarosový gel. Do gelu byly vylisovány jamky pomocí tzv. hřebínku. Byla připravena směs PCR smícháním 15 μ l koncentrovaného DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), (Thermo Fisher Scientific), 1 μ l primeru 1 BacBF o koncentraci 5 pmol, 1 μ l primeru 2 BacBF o koncentraci 5 pmol, 1 μ l naředěné DNA a 12 μ l vody (Tab. 3). Složení Master Mixu je uvedeno v příloze 2 (Příl. 2). Celkový objem PCR směsi tak činil 30 μ l.

DreamTag Green PCR Master Mix (2x)	15 μ l
Primer 1 BacBF	1 μ l
Primer 2 BacBF	1 μ l
DNA	1 μ l
voda	12 μ l
celkový objem	30 μ l

Tab. 3: Složení PCR směsi.

Směs byla napipetována do jamek gelu po 5 μ l do jedné jamky. Do první a poslední jamky byl přidán velikostní marker (tzv. DNA ladder neboli žebřík) o definované velikosti jednotlivých fragmentů, v našem případě o velikosti 100 bp. DNA ladder slouží k odhadu velikosti pozorovaných DNA fragmentů. Samotná elektroforéza probíhala při konstantním napětí (120 V) po dobu přibližně jedné hodiny, kdy se barevné čelo začalo blížit ke konci agarosového gelu. Následovalo zviditelnění separovaných fragmentů pomocí UV-transluminátoru (GelDoc, Biorad).

Pokud byl PCR produkt vizualizován, nebylo třeba ho dále ředit. Vizualizované PCR produkty byly dlouhé 300 bp.



Obr. 8: Vizualizace PCR produktu.

Příklad vizualizace PCR je uveden na obrázku 8 (Obr. 8), kde je patrné, že vzorek 60 A nebyl vizualizován, tudíž ho bylo nutno více naředit a znovu amplifikovat.

Pro purifikaci amplifikované PCR byl použit purifikační kit QIAquick® PCR Purification Kit.

Postup purifikace byl následující: Do 25 µl PCR produktu bylo přidáno 125 µl bufru Buffer PB (požadovaný poměr 1:5). Směs byla převedena na kolonku QIAquick, která byla umístěna do 2ml plastové zkumavky a následně umístěna do centrifugy na 45 sekund. Po proběhlém odstředění byl vypuštěn průtok a kolonka byla umístěna zpět do zkumavky. K promytí bylo do kolonky přidáno 750 µl bufru (Buffer PE) a kolonka byla následně opětovně centrifugována na 45s. Po proběhlém odstředění byl opět vypuštěn průtok a kolonka byla umístěna zpět do zkumavky. K odstranění zbytkového bufru byla kolonka opět centrifugována po dobu 1 minuty. Kolonka byla vložena do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. V závislosti na barvě tekutiny po poslední minutové centrifugaci bylo přidáno různé množství bufru doprostřed QIAquick membrány (pokud byl vzorek oranžový, bylo k němu přidáno 35 µl bufru, pokud žlutý, pak bylo přidáno 25 µl). Tekutina v koloně byla dále centrifugována po dobu 1 minuty. Pro zvýšení koncentrace bylo doprostřed QIAquick membrány přidáno ještě 30 µl bufru, kolona byla ponechána v klidu po dobu 1 minuty a následně byla centrifugována. U purifikovaného PCR produktu byla změřena koncentrace.

6.2.3 Příprava knihovny

V procesu přípravy knihovny jsou k amplifikovaným PCR produktům napojovány krátké oligonukleotidy zvané sekvenační adaptory. Příprava knihovny dále sestává ze šesti kroků, a to; ošetření konců DNA (End repair), samotného přidání adaptorů (ligace adaptorů), prvního čištění kuličkami AmpureBeads (purifikace), amplifikace, druhého čištění kuličkami AmpureBeads a ředění a kvantifikace knihoven.

K přípravě knihovny byly použity následující kity: NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™, Agencourt AMPure XP Kit, Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit a Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit.

6.2.3.1 Ošetření konců DNA

Ošetření konců DNA je zajištěno přidáním DNA do směsi End repair (ER) pufru, ER enzymu a destilované vody. Názvy a množství složek směsi je uvedeno v tabulce 4 (Tab. 4). Originální reakce probíhá v objemu 60 µl, z důvodu úspory byl proces proveden

v polovičním objemu. Směs byla rozpipetována do jamek po 25 μ l. Do každé jamky bylo ke směsi přidáno 5 μ l DNA. Destička se vzorky byla inkubována v termocykleru 20 minut při 25°C, dále 10 minut při 70°C a poté ochlazena.

	μ l/ 1 vzorek
NEBNext End Repair Reaction Buffer	3
NEBNext End Repair Enzyme Mix	1,5
destilovaná voda	20,5
celkový objem	25

Tab. 4: Množství a názvy chemikálií pipetovaných do směsi pro ošetření konců DNA.

6.2.3.2 Ligace adaptorů

K DNA s ošetřenými konci byla přidána směs enzymů, pufru, adaptoru P1 a destilované vody a pipetována po 19 μ l do každé jamky. Názvy a množství složek směsi jsou uvedeny v tabulce 5 (Tab. 5). Ke směsi a DNA s ošetřenými konci byl přidán do každé jamky 1 μ l naředěného Barcode v poměru 1:1 s destilovanou vodou. Následně byla destička inkubována v termocykleru 15 minut při 25°C, dále 5 minut při 65°C a poté ochlazena.

	μ l/ 1 vzorek
T4 DNA Ligase Buffer for Ion Torrent	5
NEBNext DNA Library Adaptors for Ion Torrent	0,5
Bst2.0 WarmStart DNA Polymerase	0,5
T4 DNA Ligase	3
destilovaná voda	10
celkový objem	19

Tab. 5: Množství a názvy chemikálií pipetovaných do směsi k ligaci adaptorů.

6.2.3.3 První purifikace kuličkami Ampure Beads

Před sekvenačními reakcemi je k odstranění veškerých chemikálií, a to včetně primerů a neinkorporovaných nukleotidů zbylých po PCR, využito přečištění pomocí kuliček Ampure Beads (AMPure XP Beads). Principem purifikace je navázání DNA na magnetické kuličky obsažené v roztoku Ampure, ke kterému dojde po vložení destičky do magnetického stojanu.

Do každé jamky obsahující 50 μ l DNA s ligovanými adaptory byl přidán 1,2násobný objem roztoku Ampure, tedy 60 μ l. Destička byla vložena do magnetického stojanu na 2 minuty, dokud nebyla tekutina čirá a veškerá DNA nebyla zachycena na kuličkách na stěnách jamky. Následně byla odpipetována tekutina a bylo provedeno promytí ve 180 μ l 70% etanolu s jedním opakováním. Po odpipetování etanolu po opakovaném promývání, byly kuličky s DNA eluovány do 50 μ l destilované vody.

6.2.3.4 Amplifikace

V procesu amplifikace byla připravena směs primerů a PCR mastermixu, která byla rozpipetována do destičky po 27 μ l. Množství a názvy složek směsi jsou uvedeny v tabulce 6 (Tab. 6). Do každé jamky bylo následně přidáno 23 μ l přečištěných vzorků z předchozího kroku a byla provedena PCR. Průběh PCR je v tabulce 7 (Tab. 7).

	μ l/ 1 vzorek
Primery	2
NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25
celkový objem	27

Tab. 6: Množství a názvy chemikálií pipetovaných do směsi k amplifikaci.

krok	teplota	čas
denaturace	98°C	30 sekund
12 cyklů	98°C	10 sekund
	58°C	30 sekund
	65°C	30 sekund
1 cykl	65°C	5 minut
ukončení	4°C	∞

Tab. 7: Průběh PCR.

6.2.3.5 Druhá purifikace kuličkami AmpureBeads

Postup včetně objemů druhé purifikace je shodný s postupem první purifikace.

6.2.3.6 Ředění a kvantifikace knihoven

Vzorek po druhé purifikaci byl zředěn v poměru 1: 20, a to tak, že bylo smícháno 5 μ l eluátu spolu s 95 μ l destilované vody. Následně bylo provedeno druhé ředění v poměru 1: 50, smícháním 2 μ l DNA z předchozího ředění spolu s 98 μ l destilované vody, čímž vzniklo ředění 1:1000 původní DNA.

Následně byla provedena kvantifikace pomocí qPCR, pomocí kitu Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit, což je komplexní sada obsahující TaqMan® qPCR mix a standard knihovny pro detekci a kvantifikaci fentomolárních množství knihoven intových fragmentů. K analýze dat z qPCR byl využit Mixpro software. Dle stanovené koncentrace byla každá knihovna nařaděna na koncentraci 26 pM.

6.2.4 Příprava templátu

Amplifikované knihovny jsou využity k přípravě sekvenovacího templátu pomocí přístroje Ion OneTouch™ 2 System a následujících kitů: Ion PGM Enrichment Beads a Ion PGM Template OT2 400 Kit. Tento proces vyžaduje asi 1 hodinu práce v laboratoři a poté probíhá dalších 8 hodin. Výstupní materiál musí být zpracován během 16 hodin od přípravy templátu. Jelikož byla příprava templátu provedena specialisty na AV ČR, podrobný návod je uveden v příloze 3.

6.2.5 Sekvenování

Templát z předchozího kroku byl sekvenován na platformě Ion Torrent PGM využívající následující následující kity: Ion PGM Sequencing 400 Kit a Ion 316 Chip Kit v2. Laboratorní práce obvykle vyžaduje 3-4 hodiny a sekvenování poté běží 6 hodin. Výstupem sekvenace byly sekvence v počítači s příponami *.fastq, které kombinují kvalitativní informace (q) se sekvencemi (fasta). Takový soubor byl převeden do počítače pomocí příkazu ‘convert_fastaqual_fastq.py‘.

6.2.6 Analýza dat

V procesu analýzy dat jsou sekvence v počítači s příponami *.fastq, *.bam nebo *.sff exportovány a zpracovány bioinformačními nástroji jako je QIIME nebo Mothur, aby odhalily rozdíly alfa a beta. V naší analýze byla data zpracována softwarem Quiime.

7 Výsledky

Studii mikrobioty započalo 50 dětských pacientů Fakultní nemocnice v Motole se stanovenou diagnosou Crohnovy Choroby. Vzhledem k náročnosti léčby formou enterální výživy, a to zvláště pro námi sledované děti, se podařilo udržet na dietě jen část pacientů. U 18 z nich byla provedena sekvenace mikrobioty. Věkový průměr selektovaných pacientů k NGS byl 13 let.

Velmi důležitá byla spolupráce Fakultní nemocnice v Motole, jednotlivých pacientů a Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, která vznikla již datem prvního odběru vzorku a trvala do ukončení léčby, u některých pacientů i déle. U takových pacientů se podařilo získat i vzorky z 12. týdne po zahájení léčby EV, tedy v době, kdy už byla léčba ukončena, a pacient byl na běžné konvenční dietě.

Výstupní osekvenovaná DNA byla exportována a zpracována bioinformatiky pomocí softwaru Quiime za účelem odhalení rozdílů alfa a beta. Výstupem softwaru je množství grafů, které jsou řazeny do různých kategorií. Každá kategorie je znázorněna sloupcovými grafy vyjadřující počty bakterií. Z mnoha kategorií výstupů softwaru byly vybrány tři kategorie, a to kategorie vztahující se ke třem odebraným vzorkům v 0., 6. a 12. týdnu po zahájení enterální výživy, kategorie vztahující se k jednotlivým pacientům průměrně za všechny 3 odběry a kategorie znázorňující jednotlivé odběry. Grafy v každé kategorii jsou řazeny dle taxonomické hierarchie, nejvýše položené jsou grafy znázorňující kmenovou diverzitu, rolováním níže se lze dostat až na úroveň rodovou. Druhovou úroveň vyhodnotit nelze.

Vzhledem k obrovskému množství dat a mnoha způsobům jejich interpretace zde budou diskutovány výsledky zaměřené na bakterie zmiňované v literárním přehledu dané problematiky. Data budou dále podrobně rozebrána v publikaci připravovaného výstupu studie.

Obecně byly v průběhu léčby enterální výživou zaznamenány vesměs pozitivní změny počtů bakterií, po ukončení léčby ale málokterá pozitivní změna zůstala zachována a ve většině případů došlo k navrácení počtu bakterií do stavu původního. Pro další studium účinnosti enterální výživy by tedy bylo třeba podrobit pacienty delšímu trvání léčby, což je pro pacienty ale velmi náročné.

7.1.1 Faktory ovlivňující výsledky

K odhadu střevní bakteriální diverzity pacientů slouží rozsáhlý řetězec postupu, jehož kroky mohou významně ovlivnit výsledky. Z důvodu velkého počtu jednotlivých kroků analýzy tak může dojít ke snížení přesnosti analýzy a zanesení chyb do výsledků.

Problémem studie bylo podávání enterální výživy ve vícedruhové formě od různých výrobců (Modulen, Ensure a Nutridrink), což může výrazně ovlivnit výsledky z důvodu rozdílného složení těchto výrobků.

Dalším významným faktorem ovlivňujícím výsledky byl počet zkoumaných vzorků a s ním související počet pacientů, kteří se zapojili do studie. Dále je třeba zdůraznit individualitu střevní mikrobioty jednotlivých pacientů, označovanou jako mikrobiální fingerprint, neboli otisk prstu.

Mimo faktory ovlivňující výsledky sekvenování a výstupy softwaru Quiime existují faktory ovlivňující interpretaci výsledků. Takovým faktorem je například taxonomické zařazení bakterie, které je pro interpretaci nesmírně důležité a velmi ovlivňuje její správnost (v případě špatného určení taxonomického zařazení). Kromě správnosti ovlivňuje taxonomie také přesnost výsledku. V grafech bylo nutné dohledávat taxonomickou jednotku bakterie zmiňované v literárním přehledu a dle tohoto grafu výsledek hodnotit. Hodnocení dle grafu zaměřeného na vyšší taxonomickou jednotku by tak bylo méně přesné.

7.1.2 Distribuce taxonomických skupin dle odběrů

Níže budou rozebrány výsledky vztahující se ke třem odebraným vzorkům v 0., 6. a 12. týdnu po zahájení enterální výživy.

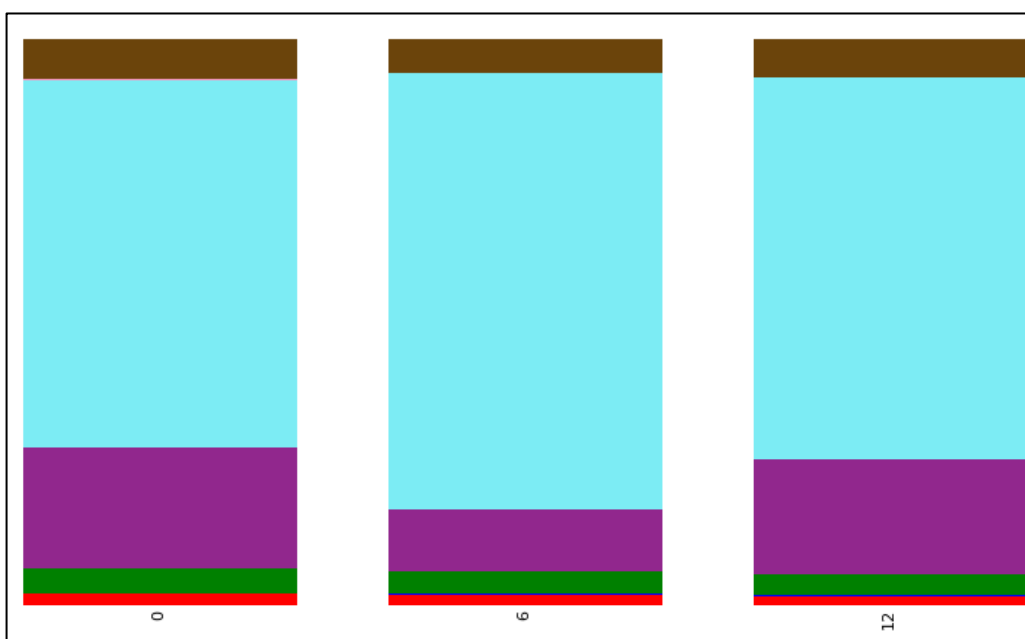
Na grafu 1 níže (Graf 1) vidíme jeden z nejdůležitějších výstupů celé analýzy, a to distribuci kmenů bakterií dle jednotlivých odběrů zprůměrovaných u všech pacientů (0 - odběr před zahájením léčby enterální výživou, 6 – odběr 6. týden po zahájení EN, 12 – odběr 12. týden po zahájení EN, tedy 6 týdnů po ukončení léčby v době návratu k běžné stravě).

V průběhu léčby EN došlo k nárůstu počtu bakterií kmene Firmicutes zhruba o 12 % (6. týden v porovnání s 0. týdnem). Firmicutes jsou jedním z redukovaných kmenů při IBD a jejich znásobení v průběhu léčby enterální výživou tak může značit účinnost terapie. Ve 12. týdnu došlo k poklesu Firmicutes, avšak jejich počet byl o necelá 3 % vyšší, než na počátku léčebné kúry.

V průběhu léčby došlo dále k redukci kmene Bacteroidetes, jehož zvýšené počty jsou pro IBD charakteristické. Rozdíl mezi 0. a 6. týdnem byl 10 %. Po ukončení léčby (12. týden) došlo k nárůstu počtu a kmene tak bylo pouze o 1 % méně v porovnání s počátečním stavem.

V 6. týdnu došlo dále k velmi nepatrnému snížení počtu kmene Actinobacteria v řádu detesin procent (ze 4,4 % na 3,9 %). Snížení pokračovalo i 12. týden (3,6 %).

Do kmene Proteobacteria patří další často diskutovaná bakterie, jejíž počty se při IBD zvyšují. Jedná se o adherentní invazivní *Escherichii coli*. Marchesi et al. (2016) uvádí, že je pro IBD charakteristické zvýšení počtu kmene Proteobacteria obecně. U pacientů byl zaznamenán pokles kmene Proteobacteria o 1,1 % v 6. týdnu. Velmi nepatrná redukce počtu setrvávala i po ukončení léčby (o 0,3 %).



Legend	Taxonomy	Total %	0 %	6 %	12 %
	Unassigned;Other	1.9%	2.1%	1.9%	1.7%
	k_Bacteria;Other	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria	4.0%	4.4%	3.9%	3.6%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes	17.6%	21.3%	11.0%	20.4%
	k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes	69.8%	64.8%	77.1%	67.6%
	k_Bacteria;p_Fusobacteria	0.1%	0.4%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Planctomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria	6.5%	7.0%	5.9%	6.6%
	k_Bacteria;p_TM7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Graf 1: Zastoupení kmenů bakterií v jednotlivých odběrech.

Před zahájením léčby byl pozorován výskyt bakterií kmene Fusobacteriaceae, u IBD ve zvýšeném počtu, 6. týden a 12. týden dle grafu 1 tato bakterie zcela vymizela.

Pro hlubší analýzu zastoupení nižších taxonomických skupin bakterií byly využity další grafy uvedené v příloze. Jelikož se jedná o velmi rozsáhlý soubor dat, nebylo možné do příloh vložit data v plném rozsahu. V případě zájmu jsou data k dispozici na vyžádání u doc. Ing. Věry Neužil Bunešové, Ph.D.

Dle grafu 2 (uveden v příloze), zaměřujícího se na distribuci jednotlivých tříd bakterií, došlo v průběhu léčby k nárůstu počtu třídy Clostridia, kmene Firmicutes. Nárůst byl významný (z 55 % na 72 %), ve 12. týdnu ale došlo podobně jako u většiny bakterií ve 12. týdnu k návratu do stavu podobnému jako před zahájením léčby (55,4 %). Leach et al. (2008) ve své studii zaznamenal redukci bakterie *Clostridium leptum* řazené do rodu *Clostridium*. Na této úrovni nebyla zaznamenána změna počtu vlivem EN.

Na rodové úrovni *Roseburia* vlivem enterální léčby nedošlo k žádoucímu znásobení bakterií, počet 0,2% zůstal konstatní (Graf 5).

Redukce je dále prokázána i na úrovni rodu *Ruminococcus* (Sokol et al., 2017). Graf 5 uvádí výrazný nárůst rodu v průběhu EN o 5 % (z 10,5 % 0. týden na 15,3 % 6. týden), ale po ukočení léčby došlo k velmi výraznému snížení pod hodnotu původního počtu (až na 3,5 % ve 12. týdnu).

Daleko slibnější výsledky přináší graf 5 ohledně rodu *Blautia*. Během léčby enterální výživou došlo k nárůstu rodu z 5,5 % (0. týden) na 8,9 % (6. týden) a markantnímu nárůstu na 15,7 % po ukončení léčby (12. týden).

Redukce je dále zaznamenána při IBD u rodu *Faecalibacterium*, zvláště druhu *Faecalibacteria prausnitzii* (Colman and Rubin, 2014). Graf 5 očekávanou gradaci vlivem EN nepodporuje (došlo naopak k redukci z 3,1 % na 1,8 %), došlo k ní však po ukončení léčby a celkově tak počet *Faecalibacterium* vzrostl o 0,8 % (na 3,9 %).

Sommer et al. (2017) uvádí ve své studii redukci rodu *Peptostreptococcaceae* při IBD. Graf 4 (uveden v příloze) potvrzuje nárůst vlivem EN (z 0,8% 0. týden na 1,3 % 6. týden). Po ukončení EN ale došlo k poklesu na počet nižší než před EN (na 0,4 %).

U třídy Bacilli, taktéž z kmene Firmicutes, došlo k redukci z 9,3 % na 4,3 % v průběhu EN. Po navrácení k běžné stravě se situace radikálně změnila a počet *Bacilli* gradoval na 12 %. Do této třídy spadají významné čeledi původců onemocnění, a to zejména do řádu Bacillales, například čeledi Staphylococcaceae, Listeriaceae či Bacillaceae, jejichž počty jsou při IBD často znásobené. Graf 3 (uveden v příloze) uvádí počáteční podíl bakterií Bacillales

6,2 % v 0. týdnu, v 6. týdnu významnou redukci na 0,5 % a ve 12. týdnu došlo k téměř k vymizení řádu (0,2 %), což by opět mohlo značit účinnost léčby.

Graf 5 dále upřesňuje, že během EN došlo téměř k vymizení rodu *Staphylococcus*, a to z 5 % na počátku léčby na 0,1% ve 12. týdnu.

Druhý diskutovaný řád třídy Bacilli, řád Lactobacillales, zahrnuje jak probiotické, tak patogenní druhy (druh *Weissella*, rod *Streptococcus*). V průběhu EN došlo k nárůstu počtu o 1,5 % (z 2,1 % 0. týden na 3,6 % 6. týden), ve 12. týdnu se počty znásobily vzhledem k výchozímu stavu téměř šestkrát (z 2,1% na 11,3 % 12. týden), (Graf 3). Jelikož je dle Pickarda et al. (2017) řád Lactobacillales jednou z dominantních skupin bakterií zdravé mikrobioty, je považováno toto významné zvýšení počtu za velmi prospěšné pro pacienty s IBD a dokládá účinnost léčby EN.

Jedním z druhů streptokoka, který při IBD narůstá je dle Sokola et al. (2017) druh *Streptococcus anginosus*. Zhodnocení účinnosti léčby EN poklesem tohoto druhu je nepřesné, jelikož druhová úroveň není softwarem vyhodnocována. Bakterii lze vyhodnotit pouze dle rodového zařazení *Streptococcus*, kde došlo k nepatrné redukci během EN (z 1,7 % na 0,4%), po ní ale k významnému nárůstu nad počet před zahájením léčby EN (5,8 %).

Počet probiotického rodu *Lactobacillus* byl na grafu 5 indentifikován v počátečním stavu 0,1%, v průběhu a po ukočení léčby 0,0%.

U třídy kmene Firmicutes, Erysipelotrichales, literatura zaznamenává redukci při IBD (Myioshi a Chang, 2016). V průběhu léčby EN ke znásobení ale nedošlo, z 0,5% zastoupení kleslo v průběhu EN na 0,4 % a dále po ukončení EN na 0,2 %. Změny počtu jsou uvedeny v grafu 2 (uveden v příloze). Sokol et al. (2017) zmiňuje konkrétně redukci rodu *Eubacterium* při IBD. K nárůstu počtu bakterií rodu *Eubacterium* vlivem EN v průběhu léčby došlo, ale jelikož byl nárůst nepatrný (z 0,1 % na 0,2%) a po ukončení léčby došlo k navrácení na původní počet (0,1 %), nelze nárůst pokládat za uspokojivý výsledek potvrzující účinnost léčby.

Graf 2 (uveden v příloze) uvádí redukci třídy Bacteroidia, kmene Bacteroidetes. Účinnost léčby lze jak potvrdit předpokladem, že počty druhu *Bacteroides fragilis* při IBD narůstají a redukce je žádoucí, tak vyvrátit předpokladem, že u rodu *Prevotella* dochází naopak k nechtěné redukci.

Změna počtu bakterií rodu *Prevotella* je upřesněna v grafu 5, ze kterého vyplývá, že během EN došlo k úplné redukci rodu, ačkoli by měl počet naopak narůst.

U čeledi Porphyromonadaceae byl zaznamenán nárůst počtu o 0,2% po ukončení léčby EN (v průběhu léčby však došlo k poklesu).

Upřesnění změn počtu druhu *Bacteroides fragilis* je uvedeno v grafu 5, kde došlo k výrazné redukci rodu *Bacteroides* z 19 % na 9 % v průběhu EN. Po ukončení léčby se ale počet opět blížil k 19 %. Podobně jako u ostatních bakterií byla zaznamenána významná změna k lepšímu důsledkem EN, po ukončení výživy ale došlo k navrácení k původnímu stavu.

Z kmene Actinobacteria je pro výzkum IBD nejvýznamnějším rodem rod *Bifidobacterium*. Vývoj počtu tohoto rodu je znázorněn na grafu 5, kde došlo v průběhu EN k redukci o 1 % (z 2,4 % 0. týden na 1,4 % 6. týden), po ukončení EN ve 12. týdnu byl ale celkový počet vyšší než před zahájením léčby o 0,2 % (2,6 % celkem). Toto zvýšení počtu je však velmi nepatrné k vyslovení verdiktu o účinnosti EN.

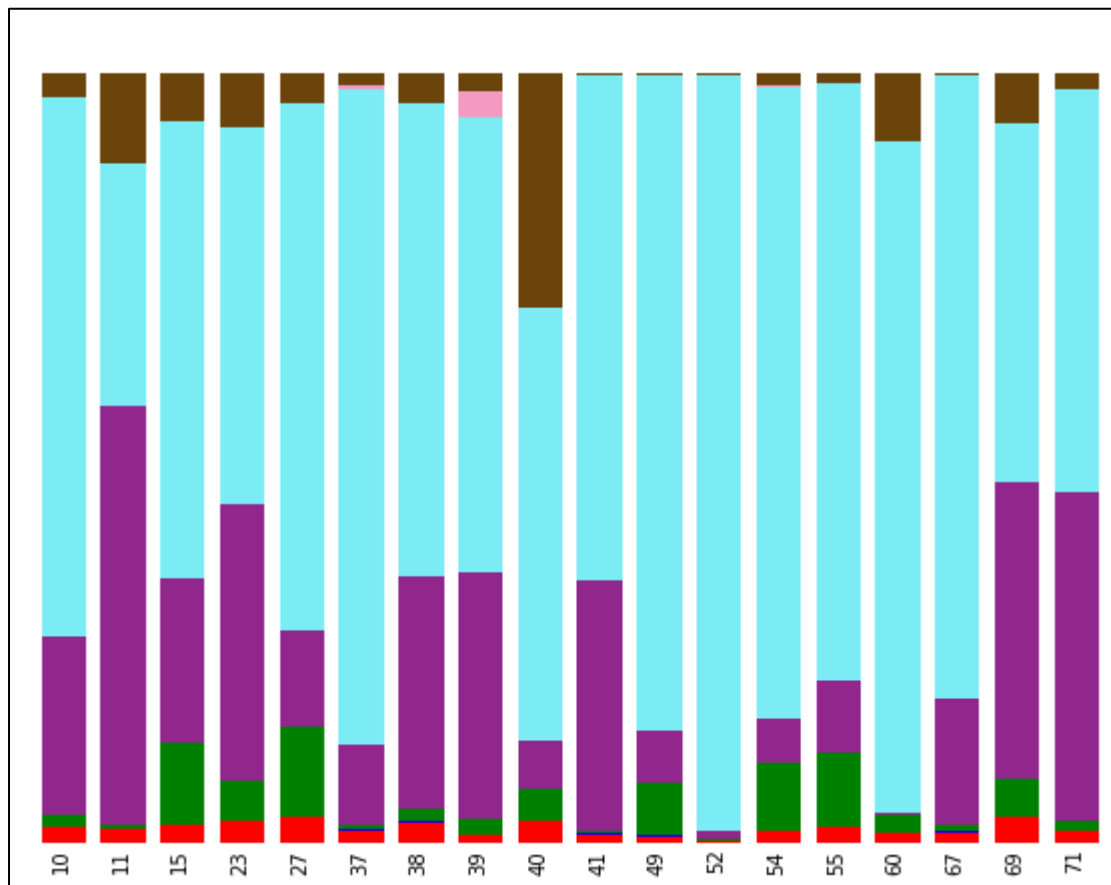
Mimo rod *Bifidobacterium* je v souvislosti s IBD diskutován rod *Collinsella*, u něhož došlo ke snížení v průběhu léčby EN (z 1,2% na 0,7%) a také celkově po skončení léčby EN byl počet bakterií nižší než na počátku léčebného procesu (0,8%).

U bakterie druhu *Escherichia coli* a obecně u rodu *Escherichia* je uváděn nárůst počtu při IBD, předpokladem účinnosti je tedy pokles počtu tohoto rodu. U kmene Proteobacteria bylo výše diskutováno snížení počtu během EN (Graf 1), pro potvrzení byl dále využit graf 5. Graf 5 (uveden v příloze) je zaměřen na jednotlivé rody a uvádí, že rod *Escherichia* nebyl ani před léčbou, ani po ní zastoupen vůbec, o účinnosti léčby na základě tohoto předpokladu lze tedy pouze spekulovat. Počet bakterií čeledi Enterobacteriaceae se vlivem EN příliš nemění a zůstává konstatní v hodnotách mezi 4-6 % (Graf 4).

U rodu *Suterella* byl zaznamenán významný pokles počtu v průběhu EN i po jejím ukončení, a to z 0,9 % na 0,2 % během léčby i po ní. Interakce rodu *Suterella* s hostitelem jsou dodnes neznámé, ačkoli je rod často spojován právě s IBD. Hiippala et al. (2016) mu přisuzuje imunomodulační úlohu, avšak zda je pokles počtu *Suterella* známkou účinnosti léčby či nikoli zůstává otázkou budoucnosti.

7.1.3 Rozdělení taxonomických skupin dle pacientů

V následující kapitole budou rozebrány výsledky vztažené k jednotlivým pacientům průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.



Legend	Taxonomy	Total	10	11	15	23	27	37	38	39	40	41	49	52	54	55	60	67	69	71
	Unassigned:Other	1.9%	2.1%	1.7%	2.4%	2.9%	3.5%	1.5%	2.6%	1.0%	2.7%	1.2%	0.9%	0.3%	1.6%	2.1%	1.2%	1.4%	3.3%	1.5%
	k_Bacteria:Other	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	0.1%
	k_Bacteria:p_	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Actinobacteria	4.0%	1.7%	0.6%	10.5%	5.2%	11.6%	0.7%	1.7%	1.9%	4.2%	0.3%	6.9%	0.2%	8.6%	9.5%	2.5%	0.6%	4.9%	1.1%
	k_Bacteria:p_Bacteroidetes	21.1%	23.0%	54.4%	21.4%	35.9%	12.5%	10.3%	30.0%	32.1%	6.2%	32.6%	6.7%	1.1%	5.9%	9.3%	0.3%	16.5%	38.4%	42.8%
	k_Bacteria:p_Cyanobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Firmicutes	67.6%	70.2%	31.5%	59.2%	48.9%	68.4%	85.4%	61.6%	59.2%	56.3%	65.6%	85.2%	98.2%	81.9%	77.7%	87.3%	81.0%	46.7%	52.5%
	k_Bacteria:p_Fusobacteria	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.3%	0.0%	3.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Planctomycetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Proteobacteria	5.1%	3.1%	11.7%	6.3%	7.0%	4.0%	1.7%	3.9%	2.3%	30.4%	0.2%	0.1%	0.1%	1.7%	1.3%	8.7%	0.3%	6.4%	2.0%
	k_Bacteria:p_TM7	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Verrucomicrobia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Graf 6: Zastoupení kmenů bakterií u jednotlivých pacientů průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.

Na grafu 6 (Graf 6) lze pozorovat individuální složení mikrobioty u jednotlivých pacientů průměrně ze všech tří odběrů vzorků. Tato individuální variabilita velmi komplikuje zhodnocení výsledků, ať už v případě, že mikrobiota jednoho pacienta obsahuje velké

množství bakterií jedné taxonomické skupiny, která u ostatních přítomna třeba ani není (rod *Streptococcus*), či je přítomna v menším množství (kmen *Fusobacteria*, kmen *Proteobacteria*). Předchozí vyhodnocování dle jednotlivých odběrů tak může být velmi zkresleno právě touto individuální variabilitou ve složení mikrobioty jednotlivých pacientů.

Na Grafu 6 lze spatřit významně vyšší zastoupení kmene *Proteobacteria* u pacienta 40 (30,4 %), které je téměř trojnásobně vyšší v porovnání se zastoupením kmene u pacienta 11 (11,7 %), jehož mikrobiota obsahovala druhé nejvyšší množství kmene. Za zmínku stojí dále třetí nejvyšší zastoupení *Proteobacteria* u pacienta 60 (8,7 %). U ostatních pacientů průměrně kmen *Proteobacteria* zaujímal od 0,1 do 6,4 %.

Výrazné rozdíly mezi pacienty byly dále v počtu bakterií kmene *Fusobacterium*, kde je z grafu 6 patrné, že u pacienta 39 tento kmen tvořil 3,4 % mikrobioty. Kmen je na grafu 6 patrný dále u dvou pacientů, u nichž byl ale zastoupený ve výrazně nižší míře, jedná se o pacienta 37 (0,3 %) a u pacienta 54 (0,2 %). U ostatních pacientů není kmen zastoupen vůbec nebo v množství 0,1 %. Kmen *Fusobacterium* je přirozenou součástí mikrobioty, jeho výskyt ale také může znamenat infekce chirurgických a traumatických ran, pneumonii, intraabdominální infekci či abscesy mandlí (Brook, 2016).

U všech pacientů kromě pacienta 52 (1,1 %) a pacienta 60 (0,3 %) se množství kmene *Bacteroidetes* pohybovalo v rozmezí od 5,9 % až do 54,4 % (Graf 6). S ohledem na přítomnost *Bacteroidetes* u většiny pacientů ve vyšších počtech se zdá být potvrzení předchozí redukce kmene během EN správné a mohlo by tak dokládat účinnost léčby EN, ačkoli po ukončení léčby došlo k nárůstu.

U rodu *Bacteroides* byla zaznamenána tendence snížení vlivem EN, ale opětovný návrat k původnímu stavu po ukončení EN.

Kmen *Firmicutes* byl hojně zastoupen u všech pacientů, a to od 31,5 % (pacient 11) do 98,2 % (pacient 52). Rozdíly v zastoupení jsou tedy obrovské a velmi individuální, proto budou rozebrány u nižších taxonomických úrovní níže.

Procentuální zastoupení kmene *Actinobacteria* se pohybovalo v rozmezí od 0,2 (pacient 52) do 11,6 % (pacient 27). Graf 10 (uveden v příloze) dále specifikuje zastoupení rodu *Bifidobacterium*. Nejzastoupenější byl rod *Bifidobacterium* u pacienta 15 (9,1 %) a pacienta 27 (7,1 %), u dvou pacientů nebyl zaznamenán výskyt žádný.

Zajímavé je zastoupení kmene *Tenericutes* pouze u jediného pacienta (pacient 49) v poměru 0,1 %. Tento kmen zahrnuje především bakterie způsobující onemocnění rostlin,

méně onemocnění živočichů, a to například nádory dýchacího traktu (Hansen and Nielsen, 2014).

Jelikož třída Bacilli kmene Firmicutes zahrnuje mnoho čeledí původců onemocnění a na grafu 7 je vidět výrazné znásobení počtů pouze u tří pacientů, a to pacientů 27 (44,7 %), 40 (22,5 %) a 54 (36, 6%), počty bakterií třídy Bacilli těchto tří pacientů výrazně ovlivnily počty Bacilli u všech pacientů. Tento jev je možné přisoudit některému z onemocnění, kterým pacient 27, 40 a 54 trpěl. Z Grafu 9 (uveden v příloze) je patrné, že pacient 27 trpěl stafylokokovou infekcí, jelikož jeho mikrobiota obsahovala 31,7% čeledi Staphylococcaceae. V Grafu 9 lze přiřadit streptokokové onemocnění pacientovi 54, jelikož zastoupení čeledi Streptococcaceae tvořilo 35,6%.

Převládající čeledí třídy Bacilli u pacienta 40 byla čeleď Enterococcaceae tvořící 14,3 % mikrobioty (Graf 9). Z 14,2 % se jednalo o rod *Enterococcus* (Graf 10), kam lze řadit druhy podmíněných patogenů způsobující například infekce močových a žlučových cest, gynekologické záněty a pooperační komplikace u operací dutiny břišní (Bednář et al., 1996), což by mohl být hlavní důvod výskytu této bakterie pouze u jednoho pacienta v takové míře. Z důvodu výskytu těchto onemocnění je výrazně navýšeno množství bakterií kmene Firmicutes u všech pacientů.

Mimo kmen Firmicutes je u pacienta 40 také zvýšen počet bakterií kmene Proteobacteria, čeledi Enterobacteriaceae (26,4 %), působící enterokoková onemocnění, což může opět ovlivnit celkový počet Proteobacteria u všech pacientů.

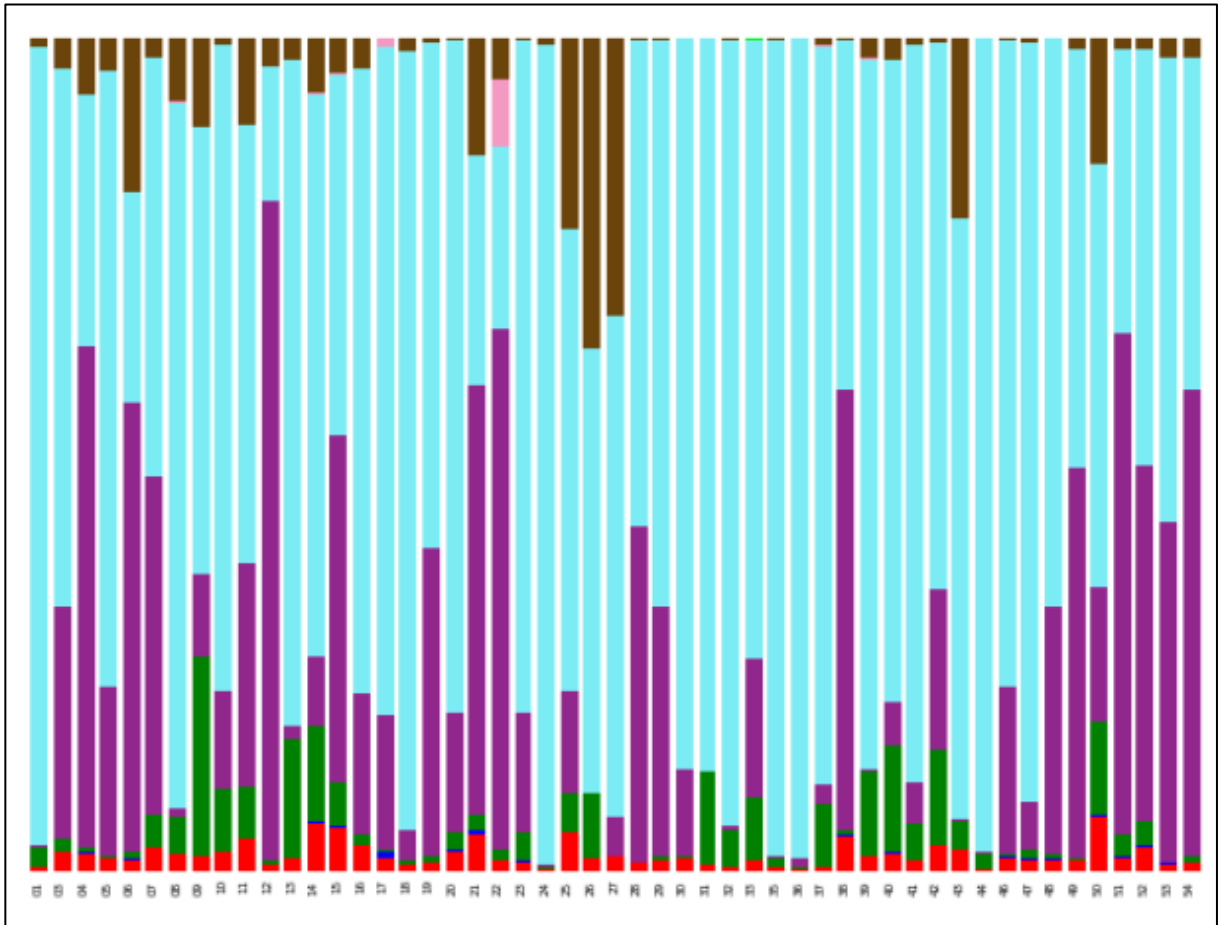
Na Grafu 7 (uveden v příloze) je patrná žlutě označená třída Coriobacteria, jejíž množství je zvýšené u pacientů 54 (5,5 %) a 55 (4,9 %). Po detailnějším prozkoumání třídy lze na Grafu 10 vidět, že dominantním rodem je rod *Collinsella*.

Další charakteristickou skupinou bakterií vyskytující se ve zvýšené míře jen u některých pacientů je čeleď Porphyromonadaceae z řádu Bacteroidales. Graf 9 (uveden v příloze) uvádí zvýšené množství u pacienta 10 (3,4 %), 55 (1,8 %) a 71 (2,6 %).

Na Grafu 10 je u pacienta 52 velmi výrazné zastoupení rodu *Blautia* z třídy klostridií, které dosahuje 44,5 %, u osmi pacientů potom dosahuje okolo 10 %, u zbytku kolem 5 %.

Rozdíly jsou dále zaznamenány u řádu Burkholderiales, spadajícího do kmene Proteobacteria. Graf 8 uvádí zvýšené počty u pacientů 71 a 39, u obou v množství 1,8 %. U rodu *Suterella*, řádu Burkholderiales bylo výše diskutováno snížení počtu v průběhu EN i po ní.

7.1.4 Rozdělení taxonomických skupin dle jednotlivých odběrů



Legend	Taxonomy	Total	01	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Unassigned;Other		1.9%	0.4%	2.4%	2.0%	1.6%	1.4%	2.8%	2.1%	1.9%	2.3%	3.9%	0.8%	1.5%	5.8%	5.3%	3.1%	1.6%	0.7%	1.1%	2.5%	4.5%	1.2%
k_Bacteria;Other		0.1%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.1%	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.7%	0.0%	0.1%	0.2%	0.4%	0.2%
k_Bacteria;p_		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Actinobacteria		4.0%	2.6%	1.5%	0.5%	0.1%	0.7%	3.8%	4.3%	23.8%	7.6%	6.2%	0.5%	14.4%	11.5%	5.3%	1.3%	0.3%	0.6%	0.7%	2.2%	2.0%	1.2%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes		21.9%	0.0%	27.8%	60.3%	20.3%	54.0%	40.6%	1.0%	9.9%	11.7%	26.8%	79.1%	1.4%	8.4%	41.7%	16.8%	16.1%	3.8%	37.1%	14.1%	51.4%	62.5%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Firmicutes		66.8%	96.0%	64.7%	30.3%	74.1%	25.4%	50.2%	84.6%	53.6%	77.6%	52.7%	16.2%	80.1%	67.4%	43.3%	75.2%	80.2%	93.4%	60.5%	80.7%	27.8%	22.0%
k_Bacteria;p_Fusobacteria		0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.0%
k_Bacteria;p_Planctomycetes		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_TM7		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Tenericutes		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	46	47	48	49	50	51	52	53	54
1.1%	0.2%	4.6%	1.4%	1.7%	1.0%	1.3%	1.5%	0.7%	0.6%	1.3%	0.4%	0.3%	0.5%	4.1%	1.7%	2.2%	1.2%	3.1%	2.5%	0.4%	1.6%	1.2%	1.4%	1.2%	6.5%	1.6%	2.8%	0.9%	0.9%
0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.2%	0.3%	0.2%	0.2%	0.1%	0.2%	0.2%	0.1%	0.1%	
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
3.5%	0.4%	4.8%	7.9%	0.2%	0.1%	0.5%	0.2%	11.3%	4.3%	7.4%	1.2%	0.1%	7.6%	0.5%	10.4%	12.9%	4.5%	11.4%	3.5%	1.7%	0.3%	1.2%	0.4%	0.2%	11.3%	2.6%	2.9%	0.1%	0.8%
14.4%	0.2%	12.2%	0.0%	4.6%	40.4%	29.9%	10.6%	0.1%	0.4%	16.8%	0.2%	1.2%	2.2%	53.1%	0.2%	5.0%	5.1%	19.3%	0.2%	0.3%	20.1%	5.5%	29.9%	46.7%	16.3%	60.1%	42.7%	40.9%	55.9%
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
80.6%	98.5%	55.3%	53.3%	60.1%	58.2%	67.9%	87.7%	88.0%	94.3%	74.2%	97.9%	98.3%	88.7%	41.8%	85.2%	77.3%	88.4%	65.5%	72.0%	97.5%	77.6%	91.3%	68.0%	50.4%	50.8%	34.2%	49.9%	55.8%	39.9%
0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
0.3%	0.7%	23.0%	37.2%	33.3%	0.3%	0.3%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.4%	0.1%	0.9%	0.2%	2.2%	2.5%	0.8%	0.5%	21.6%	0.1%	0.2%	0.5%	0.1%	1.3%	15.0%	1.3%	1.4%	2.2%	2.4%
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Graf 11: Zastoupení kmenů bakterií v jednotlivých odběrech.

Kapitola diskutuje třetí kategorii výstupů softwaru QIIME, a to distribuci taxonomických skupin dle všech uskutečněných odběrů vzorků. Jedná se o nejpodrobnější výstupy, u nichž je třeba porovnávat tři za sebou jdoucí vzorky jednotlivých pacientů, přičemž u tří pacientů je třeba brát v potaz pouze dva vzorky, jelikož u tří vzorků se nepodařilo sekvenaci provést (vzorky 02, 34, 45). Přiřazení vzorků jednotlivým pacientům je uvedeno v Tabulce 8 (Tab. 8).

vzorek	01, 03	04,05,06	07,08,09	10,11,12	13,14,15	16,17,18	19,20,21	22,23,24	25,26,27
pacient	10	11	15	23	27	37	38	39	40
25,26,27	28,29,30	31,32,33	35,36	37,38,39	40,41,42	43,44	46,47,48	49,50,51	52,53,54
40	41	49	52	54	55	60	67	69	71

Tab. 8: Přiřazení jednotlivých odebraných vzorků pacientům.

Po bližší analýze Grafu 11 níže lze ve vzorcích spatřit tendenci snižování obsahu kmene Bacteroidetes v 6. týdnu v porovnání s počátečními počty bakterií před zahájením léčby enterální výživou (u 10 pacientů snížení, u 6 pacientů zvýšení), což by potvrdzovalo předpoklad účinnosti léčby. Zároveň ale po ukončení léčby často dochází k navrácení počtů bakterií kmene Bacteroidetes k počtům před zahájením léčby (u 12 pacientů navrácení, u 4 nedošlo k navrácení).

U 12 pacientů došlo ke zvýšení počtů kmene bakterií kmene Firmicutes během léčby EN (u 4 naopak došlo ke snížení), u 9 pacientů však po ukončení EN a přechodu na běžnou stravu došlo ke snížení počtů (u 7 došlo ke zvýšení počtů). Zvýšení počtů kmene Firmicutes by opět potvrdzoval účinnost léčby, stejně jako u Bacteroidetes ale ve většině případů došlo po ukončení EN k návratu do původního stavu.

V Grafu 12 (uveden v příloze) je pozorovatelná výrazná tendence výskytu rodu *Lactobacillus* v průběhu léčby EN (6. týden), ačkoli před dietou či po jejím ukončení nejsou žádné bakterie pozorovatelné. Tato tendence je zcela opačná než u rodu *Bifidobacterium* (bude diskutováno níže) a mohla by značit účinnost léčby.

U 5 pacientů je u rodu *Blautia* zaznamenán velmi výrazný nárůst ve vztahu počtů rodu před léčbou a po jejím ukončení 12. týden (Graf 12). Rod *Blautia* je jedním z redukováných

rodů při IBD se slibným probiotickým využitím v budoucnosti léčby těchto onemocnění a jeho nárůst je tedy velmi žádoucí.

U rodu *Roseburia* je zaznamenán mírný nárůst výskytu v průběhu i po ukončení léčby, což by opět mohlo dokládat účinnost léčby (Graf 12).

Rodu *Ruminococcus* podobně jako rodu *Lactobacillus* svědčí enterální výživa, jelikož je zde častá tendence ke zvyšování počtu v průběhu léčby. Jedná se o další redukováný rod při IBD (Graf 12).

Na grafu 12 je patrné, že se u jednoho z pacientů (pacient 54) objevila ve 12. týdnu streptokoková infekce, která tak zkreslila celkové počty bakterie rodu *Streptococcus*.

Podobně je na grafu 12 patrná stafylokoková infekce způsobená rodem *Staphylococcus* před zahájením léčby u pacienta 27.

Rod *Faecalibacterium* z Grafu 12 nelze vyhodnotit, není zde žádná tendence.

U kmene Proteobacteria také nelze v distribuci dle jednotlivých odběrů vypořádat žádnou tendenci.

Podobně je tomu u kmene Actinobacteria, kde lze ovšem jednu tendenci vypořádat, a to snížení počtu kmene po ukončení léčby. V grafu 12 byl vyhodnocen rod *Bifidobacterium*, u něhož byl léčbou očekáván nárůst, ale k nárůstu došlo paradoxně po ukončení léčby, existuje tak možnost, že je rod *Bifidobacterium* jedním z rodů, který zvláště špatně snáší enterální výživu nebo tento výsledek jednoduše popírá účinnost léčby.

7.1.5 Celkové zhodnocení

S využitím tří hlavních kategorií výstupů softwaru QIIME byla diskutována účinnost léčby enterální výživou na základě změn počtů bakterií a srovnání výsledků s literaturou.

Díky zaměření grafů na jednotlivé pacienty, jednotlivé odběry a na průměrné zhodnocení v 0., 6. a 12. týdnu, bylo možné tyto tři kategorie výstupů porovnat mezi sebou a detailně zhodnotit situaci změny počtů bakterií vlivem enterální výživy. Při zhodnocení bylo třeba zvláště dbát na přesné taxonomické řazení bakterií, aby bylo docíleno co nejpřesnějšího výsledku.

U některých skupin bakterií se zdál počáteční výsledek slibný, ačkoli ho další kategorie vyvrátila. Příkladem je kmen *Proteobacteria*, u něhož byl zaznamenán během porovnání tří zprůměrovaných vzorků žádoucí pokles, který setrval i po ukončení léčby. Pokles byl pravděpodobně způsoben eliminací enterokokového onemocnění v průběhu EN u jednoho z pacientů, jehož mikrobiota obsahovala výrazně více bakterií kmene *Proteobacteria* než mikrobiota ostatních pacientů. Kategorie distribuce dle jednotlivých odběrů nevykázala žádnou tendenci, čímž byl původní předpoklad na základě zprůměrovaných vzorků vyvrácen.

Základním předpokladem účinnosti léčby je změna poměru kmenů *Bacteroides*:*Firmicutes* ve prospěch kmene *Firmicutes*. Ve dvou kategoriích byla potvrzena redukce *Bacteroides* a naopak znásobení počtu *Firmicutes*, ale ve většině případů došlo po ukončení EN k návratu do původního stavu. Tři pacienti vykazovali vyšší zastoupení třídy *Bacilli* spadající pod kmen *Firmicutes*, a to pravděpodobně v důsledku onemocnění vyvolaného streptokokem, stafylokokem a enterokokem, která se povedla díky sekvenaci mikrobioty objasnit. Tato tři onemocnění sice ovlivnila celkové počty kmene *Firmicutes*, ale v důsledku vypořádané tendence v jednotlivých vzorcích by mohla být změna poměru *Bacteroides*: *Firmicutes* ve prospěch *Firmicutes* důkazem efektivity léčby.

Často diskutovanou redukovanou bakterií ve vztahu k IBD je druh *Faecalibacterium prausnitzii*, třídy *Clostridia*, kmene *Firmicutes*. U rodu *Faecalibacterium* došlo k nepatrnému nárůstu, ale až po ukončení léčby. Účinnost léčby popírá zhodnocení kategorie dle distribuce v jednotlivých vzorcích, kde nebyla vypořádaná žádná tendence.

U další diskutované bakterie *Bacteroides fragilis* byla prokázána žádoucí redukce rodu *Bacteroides*, (kmen *Bacteroidetes*) vlivem enterální výživy ve dvou kategoriích výstupů. Obě kategorie se dále shodly na následném navrácení k původnímu stavu po ukončení léčby.

Kategorie distribuce dle jednotlivých odběrů objasnila vztah již využívaných a potenciálních probiotických mikroorganismů k léčbě enterální výživou. Pozitivně na léčbu

reagovaly rody *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Roseburia* a *Blautia*, negativně pak rod *Bifidobacterium*. Reakce byla vyhodnocována na základě změn počtu mikroorganismů v 0. a 6. týdnu. Ve 12. týdnu ale došlo u poloviny pozitivně reagujících rodů (*Lactobacillus*, *Ruminococcus*) mimo rod *Blautia* a *Roseburia*, k navrácení k počtům podobným původnímu stavu před zahájením léčby.

Na rodové úrovni výstupů bylo častým problémem nízké zastoupení zkoumaných rodů, proto výsledky u některých rodů nešlo zhodnotit nebo jsou nepřesné. Příkladem je rod *Roseburia*, *Lactobacillus* a *Escherichia*.

Problémem hodnocení střevní mikrobioty je obrovská individualita zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů označovaná jako mikrobiální fingerprint. Tu lze doložit v kategorii výstupů dle jednotlivých pacientů, kde byly často zaznamenány skupiny bakterií vyskytující se pouze u jednoho či dvou pacientů. Jedná se například o kmen *Fusobacterium*, kmen *Tenericutes*, třída *Coriobacteria* s dominantním rodem *Collinsella aerofaciens* nebo řád *Burkholderiales* s rodem *Suterella*.

Obecně byly v průběhu léčby enterální výživou zaznamenány vesměs pozitivní změny počtů bakterií, po ukončení léčby ale málokterá pozitivní změna zůstala zachována a ve většině případů došlo k navrácení počtu bakterií do stavu původního. Pro další studium účinnosti enterální výživy by bylo třeba odebrat vzorky od stejných pacientů s delším časovým odstupem.

8 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo posouzení vlivu enterální výživy na střevní mikrobiotu u dětí s Crohnovou chorobou. Posouzení tohoto vlivu bylo provedeno na základě odhadu mikrobiální diverzity v gastrointestinálním traktu pomocí sekvenování nové generace. Tato práce vznikla v návaznosti na mou bakalářskou práci s názvem Vliv enterální výživy na mikrobiotu dětí s Crohnovou nemocí vzniklou roku 2016, kde byl vliv enterální výživy posuzován na základě kultivačních metod.

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) zahrnující ulcerózní kolitidu (UC), Crohnovu chorobu (CD) a indeterminovanou kolitidu (IC) jsou chronická, imunitně podmíněná onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT) narušující jeho funkčnost. Jedná se o onemocnění, u nichž se střídají fáze relapsu (akutního ataku) a remise (polevení). Cílem léčby je v současné době navození dlouhotrvající remise a zabránění relapsu (Derikx et al., 2016; Mitrová, 2012).

Přes mnoho známých faktorů, jež přispívají ke vzniku onemocnění IBD, nejsou přesné příčiny dosud známy. Základní předpoklad je založen na identifikaci příčiny IBD jako přehnané imunitní reakce střevní sliznice vůči komenzálním bakteriím střevní mikrobioty, což vede k zánětlivému procesu u geneticky citlivých jedinců (Derikx et al., 2016). Základní faktory vzniku onemocnění IBD se dělí na faktory genetické a faktory environmentální.

Jelikož na Crohnovu chorobu nebyl doposud nalezen účinný lék, je cílem léčby pouze potlačení zánětu, zkrácení akutní fáze onemocnění a dosažení dlouhodobě bezpříznakového období. Jednou z možností léčby je enterální či parenterální výživa, dále je to medikamentózní léčba, biologická léčba, chirurgická léčba, léčba probiotiky a prebiotiky, fekální mikrobiální transplantace a alternativní terapie.

Medikamentózní léčba je v současné době výrazně orientovaná na následky IBD, než na jejich příčiny. Principem léčby je blokáce zánětlivé imunitní odpovědi (Frič, 2010).

Existují dva typy medikamentózní terapie, a to léčba indukční a léčba udržovací. Indukční léčba vede k potlačení akutně vzniklého zánětu a je založena na vysokých dávkách léků. Cílem udržovací léčby je pak dlouhodobé udržení remise a je snižován počet i dávky léků (Bajerová et al., 2013).

Aminosalicyláty, antibiotika, kortikoidy a biologickou léčbu volíme pro indukční fázi léčby, pro dlouhodobou terapii (udržovací fázi) k udržení remise jsou vhodné aminosalicyláty, imunosupresiva a biologická léčba (Lukáš, 2011).

Biologická léčba je v kontrastu s medikamentózní terapií založena na využití přírodních produktů namísto synteticky vyrobených léčiv (Škrabálková, 2013). Přináší mnoho výhod, ale

i řadu nevýhod jako zvýšení rizika infekce a rizika zhoubných nádorů (Baumgart and Sandborn, 2012), nemožnost aplikace v případě alergie, infekce, poruchy průchodnosti TT nebo nevyprázdňených abscesů (Bajerová a et al., 2013) či zvýšené riziko infekčních komplikací a také vysoké výdaje biologické léčby (Derikx et al., 2016).

Selže-li medikamentózní léčba a objeví-li se komplikace, je využita chirurgická léčba (Čierna, 2011).

Spousta autorů včetně Sheehana et al. (2015) pokládá za slibnou léčebnou strategii budoucnosti léčbu pomocí modulace mikrobioty. Léčebných metod využívající modulaci mikrobioty je více, a to; fekální transplanatce, probiotika, prebiotika, úprava diety či podávání antibiotik. Tlaskalová-Hogenová (6.12.2017, pers. comm.) doplňuje dva další způsoby modulace, a to rekombinantní buňky (TGF-beta u CD) a postbiotika (metabolické sloučeniny produkované probiotickými mikroby ovlivňující různé biologické funkce hostitele).

Derikx et al. (2016) se ve své studii zmiňuje o budoucí roli probiotik a prebiotik jako dietetického opatření IBD, které bude každému pacientovi určeno dle stadia onemocnění, jeho typu a podobně.

Cahová (9.12.2017, pers. comm.) vidí přínos modulace mikrobioty spíše v posílení určitých vlastností, než radikální změny ve složení, a to například produkcí určitých metabolitů, jako protizánětlivých SCFA.

Výživa má důležitou roli v léčbě IBD, a to jak z hlediska prevence a korekce malnutricie, prevence osteoporózy a podpory optimálního růstu a vývoje (O'Sullivan and O'Morain, 2006), tak z hlediska léčebného v případě enterální a parenterální výživy.

Griffiths (2005) charakterizuje enterální výživu (EN) jako výživu o přesně definovaném složení v tekuté formě.

Průměrná délka enterální výživy se pohybuje mezi 6 a 12 týdny, léčba však může být i v dlouhodobém horizontu. K posouzení efektivity EN je třeba minimálního trvání výživy 3 až 4 týdny. Výživa může být podávána orálně či nasogastrickou trubicí (NG). Enterální výživa je dvojího typu, a to doplňková (PEN) a výhradní (EEN), (Critch et al., 2012).

Ideální složení enterální výživy a způsob podání jsou předmětem mnoha studií (Rubio et al., 2011).

Významným benefitem enterální výživy je zhojení mukosy střeva, ke kterému při léčbě kortikoidy nedochází (Rubio et al., 2011). Dalším důvodem preference enterální výživy u dětí je minimalizace vedlejších účinků léčby v kontrastu s léčbou kortikoidy, u níž dochází k opožděnému růstu a pubertálnímu vývoji a poruchám mineralizace kostí. (Heuschkel et al.,

2000). S pubertálním vývojem úzce souvisí vedlejší účinek léčby kortikoidy akné, které se při léčbě EN neobjevuje (Rubio et al., 2011).

Enterální výživa je bezpečná a většinou dobře tolerována. Vedlejší účinky jsou minimální (Hartman et al., 2009).

Nevýhody enterální výživy jsou reprezentovány vysokými náklady, sníženou chutností výživy, obavami z vyloučení konvenční stravy a strachem z podávání výživy v trubici (Critch et al., 2012). Léčba je náročná jak pro lékaře, tak pro pacienta a jeho okolí (Dziechciarz et al., 2007), které je třeba poučit (Critch et al., 2012). Spontánně se remise objeví u 18 – 42 % případů během 3-4 měsíců. U léčby enterální výživou se remise objeví mezi 53 – 80 % případů onemocnění CD (Heuschkel, 2000).

Mechanismus, jakým může EN ovlivňovat zánětlivý proces dosud není znám a je předmětem mnoha studií (Akobeng and Thomas, 2007), včetně této.

Na této studii spolupracovala jak Fakultní nemocnice v Motole, která poskytla vzorky od dětských pacientů, tak Akademie věd České republiky (AV), Ústav živočišné fyziologie a genetiky, kde bylo z časových a ekonomických důvodů provedeno samotné sekvenování vzorků. Studii mikrobioty započalo 50 dětských pacientů Fakultní nemocnice v Motole se stanovenou diagnosou Crohnovy Choroby. Vzhledem k náročnosti léčby formou enterální výživy, a to zvláště pro námi sledované děti, se podařilo udržet na dietě jen část pacientů. U 18 z nich byla provedena sekvenace mikrobioty. Vzorky stolice těchto pacientů byly odebrány na začátku léčby a v jejím průběhu, kdy se jednalo o vzorky před kolonoskopií, po kolonoskopii, a to ve 3. týdnu léčby a v 6. týdnu léčby. K hodnocení vlivu enterální výživy po ukončení léčby byl odebrán vzorek ve 12. týdnu od zahájení léčby, tedy šest týdnů po jejím ukončení.

Metody analýzy střevní mikrobioty se rozdělují na kultivačně-závislé metody a na kultivačně-nezávislé metody. Principem kultivačně-nezávislých metod je izolace DNA a její následná analýza, například sekvenací. Tyto metody přináší řadu výhod v porovnání s kultivačními metodami, a to možnost identifikace nekultivovatelných či obtížně kultivovatelných mikroorganismů, časovou úsporu a další (Motro a Moran-Gilad, 2017). Nevýhodou je finanční náročnost (Brdička, 2011).

Sekvenování nové generace umožňuje diferenciaci mikroorganismů, objevování nových mikroorganismů, objasnění virulentních faktorů a markerů rezistence, charakterizaci odpovědi hostitele na mikroorganismy a další (Motro a Moran-Gilad, 2017). Z několika existujících

platformou NGS, byla pro naše účely vybrána platforma Ion TorrentTM neboli polovodičové sekvenování.

V dnešní době vzniká celá řada počítačových programů, které umožňují nejen interpretaci analytickou, ale také klinickou, bez níž by šlo sice o biologicky zajímavé výsledky, avšak bez lékařského využití (Brdička, 2011). Námí využitý program QIIME je čistě analytického rázu, klinické zpracování dat bude podrobně rozebráno v publikaci připravovaného výstupu studie. Vzhledem k obrovskému množství dat a mnoha způsobům jejich interpretace byly v diplomové práci diskutovány výsledky zaměřené na bakterie zmiňované v literárním přehledu problematiky.

Lidské střevo je kolonizováno komplexem velkého množství mikroorganismů, kolektivně nazývaných jako střevní mikrobiota. Tyto mikroorganismy žijí v komenzálním vztahu s naším tělem (Sicard et al., 2017). Komenzální vztah je ale často narušen a dojde tak k dysbiose, kterou Marchesi et al. (2016) definuje jako narušení či nevyrovnanost biologického systému (homeostáze), což může vést k rozvoji různých onemocnění, například IBD či kolorektálnímu karcinomu. Sommer et al. (2017) k těmto nemocem doplňuje astma, obezitu, diabetes či atopický ekzém. Vztah mikrobioty a zdraví je tedy velmi úzce spjatý a do budoucna by mu měla být věnována velká pozornost.

V diplomové práci byl diskutován vliv enterální výživy na mikrobiotu pouze na bakteriální úrovni, jelikož rozsah dysbiosy v rámci ostatních mikroorganismů dosud není zcela prozkoumán (Sokol et al., 2017). Důležitým poznatkem je koexistence hub a bakterií ve střevní mikrobiotě a jejich přímé ovlivnění (Sokola et al., 2017). Velmi málo studií se zabývalo změnami mikrobioty na úrovni *Archea* (Miyoshi and Chang, 2016). Pro studii dysbiosy virů jsou dostupná data vzácná (Sokol et al., 2017).

Základním předpokladem účinnosti léčby je redukce bakterií kmene Bacteroidetes a znásobení bakterií kmene Firmicutes. Marchesi et al. (2016) uvádí, že změna poměru dvou základních kmenů střevní mikrobioty Firmicutes: Bacteroidetes, ve prospěch kmene Bacteroidetes, je jedním z charakteristických znaků IBD. Jelikož došlo v průběhu léčebného procesu k výrazné změně tohoto poměru ve prospěch Firmicutes, jeví se léčba EN jako účinná, ačkoli se po jejím ukončení poměr navrátil téměř do původního stavu.

Slibné výsledky byly dále zaznamenány u rodu *Blautia*, který dle Sokola et al. (2017) patří k rodům redukovaným při IBD a jeví se jako potencionální prebiotikum při léčbě IBD.

Redukce je při IBD zaznamenána u rodu *Faecalibacterium*, zvláště druhu *Faecalibacterium prausnitzii* (Colman and Rubin, 2014). Po ukončení léčby došlo k očekávané gradaci vlivem EN.

Do řádu Bacillales spadá množství původců onemocnění, například čeledi Staphylococcaceae, Listeriaceae či Bacillaceae. Významnou bakterií vytvářející dle Sicarda et al. (2017) biofilm a dávanou do souvislosti s IBD, je bakterie *Bacillus fragilis*. U čeledi Bacillaceae byla zaznamenána redukce vlivem EN a ve 12. týdnu došlo téměř k vymizení této bakterie.

Počet *Bacteroides fragilis* při IBD narůstá a způsobuje celkově vyšší hmotnost bakterií mikrobioty v porovnání se zdravými jedinci (Marchesi et al., 2016). Během EN došlo k výrazné redukci rodu *Bacteroides*, po ukončení léčby ale podobně jako u většiny bakterií, došlo k navrácení do původního stavu.

Účinnost léčby vyvrací pokles rodu *Lactobacillus*, který je dle Marchesiho et al. (2016) významným probiotickým rodem a jeho počet by měl vlivem EN narůstat. Jelikož se jedná o počty v řádu desetiných míst procent, může být výsledek ovlivněn značným počtem druhů v grafu a rod se tak mohl pohybovat pod mezí detekce, každopádně však došlo k poklesu počtu namísto znásobení v důsledku EN.

Leach et al. (2008) a Sommer et al. (2017) uvádí, že je při IBD významným redukováným rodem rod *Prevotella*. Během EN došlo k úplné redukci rodu, ačkoli by měl dle předchozích tvrzení počet naopak narůst.

Mezi málo prokazatelné výsledky účinnosti léčby EN spadá například nepatrné zvýšení počtu rodu *Bifidobacterium*, který je při IBD často redukováný (Sheehan et al, 2015), nebo mírný pokles počtu kmene Proteobacteria na základě tvrzení Marchesiho et al. (2016), že je pro IBD charakteristické naopak jeho zvýšení.

Na úrovni rodu *Ruminococcus*, který je při IBD dle Sokola et al. (2017) redukován a jeví se jako potencionální probiotikum, byl zaznamenán výrazný nárůst v průběhu EN, po ukončení léčby došlo k velmi výraznému snížení pod hodnotu původního počtu.

Sommer et al. (2017) uvádí ve své studii redukci rodu *Peptostreptococcaceae* při IBD. Výsledky potvrzují nárůst vlivem EN, po ukončení EN ale došlo k poklesu na počet nižší než před EN.

U třídy Erysipelotrichales, literatura zaznamenává redukci při IBD (Myioshi a Chang, 2016). V průběhu léčby EN ke znásobení nedošlo, třída ale byla zastoupena v řádu desetin procent, proto je výsledek opět obtížně prokazatelný. Sokol et al. (2017) zmiňuje konkrétně

redukci rodu *Eubacterium* při IBD. K nárůstu počtu bakterií rodu *Eubacterium* vlivem EN v průběhu léčby došlo, ale jelikož byl nárůst nepatrný a po ukončení léčby došlo k navrácení na původní počet, nelze nárůst pokládat za uspokojivý výsledek potvrzující účinnost léčby.

U čeledi Porphyromonadaceae byl zaznamenán nárůst počtu po ukončení léčby EN (v průběhu léčby však došlo k poklesu), což Zackular et al. (2013) vidí jako pozitivní v ochraně před chronickými záněty.

Rod *Escherichia*, do něhož spadá významný producent biofilmu tvořeného při IBD, a to bakterie *Escherichia coli* (Sicard et al., 2017), nebyl dle grafů ani před léčbou, ani po ní zastoupen vůbec, o účinnosti léčby na základě tohoto předpokladu lze tedy pouze spekulovat.

Často došlo v průběhu hodnocení výsledků k poznání, které zcela přehodnotilo předchozí výsledek. Příkladem může být rod *Streptococcus*. Jedním z druhů streptokoka, který při IBD narůstá je dle Sokola et al. (2017) druh *Streptococcus anginosus*. Zhodnocení účinnosti léčby poklesem tohoto druhu je nepřesné, jelikož druhová úroveň není softwarem vyhodnocována. Bakterii lze vyhodnotit pouze dle rodového zařazení *Streptococcus*, kde došlo k nepatrné redukci během EN, po ní ale k významnému nárůstu nad počet před zahájením léčby EN. Toto zjištění by vypovídalo o neúčinnosti léčby, později se ale dle kategorie zahrnující všechny vzorky ukázalo, že se jednalo o velmi významné zvýšení pouze u jednoho pacienta ve 12. týdnu, které tak ovlivnilo celkový počet u všech ostatních pacientů.

Z výstupů sekvenace by bylo možné mimo vliv enterální výživy na mikrobiotu hodnotit také jiné aspekty. Tři pacienti vykazovali vyšší zastoupení třídy Bacilli spadající pod kmen Firmicutes, a to pravděpodobně v důsledku onemocnění vyvolaného streptokokem, stafylokokem a enterokokem, která byla pacientům přiřazena právě na základě sekvenace. Z důvodu výskytu těchto onemocnění je výrazně navýšeno množství bakterií kmene Firmicutes u všech pacientů.

Dále je zde množství tvrzení, která nebyla prokázána ani vyvrácena. Například Leach et al. (2008) ve své studii zaznamenal redukci bakterie *Clostridium leptum* řazené do rodu *Clostridium*. Na této úrovni však nebyla zaznamenána žádná změna počtu vlivem EN. Stejně tomu bylo u rodu *Roseburia*, který Myioshi a Chang (2016) uvádí rovněž jako redukovaný při IBD.

U některých taxonomických jednotek se názory na prospěšnost či škodlivost bakterií v souvislosti s IBD značně rozcházejí. Účinnost léčby by mohl naznačovat nárůst třídy Clostridia, a to na základě tvrzení Derikxe et al. (2016), že do třídy Clostridia spadají bakterie produkující SCFA a počty jsou v případě IBD redukovány. Pickard et al. (2017) na druhou

stranu uvádí, že jsou při IBD často přidružené klostridiové infekce. Z tohoto důvodu je na pováženo, zda je nárůst počtu třídy Clostridium přínosný.

U rodu *Suterella* byl zaznamenán významný pokles počtu v průběhu EN i po jejím ukončení. Interakce rodu *Suterella* s hostitelem jsou dodnes neznámé, ačkoli je rod často spojován právě s IBD. Hiippala et al. (2016) mu přisuzuje imunomodulační úlohu, avšak zda je pokles počtu *Suterella* známkou účinnosti léčby či nikoli zůstává otázkou budoucnosti.

Výsledky a jejich interpretace jsou ovlivňovány mnoha faktory (kapitola 7.1.1), které jsou zásadní při hodnocení účinnosti léčby. Na příkladu bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bude demonstrována důležitost hodnocení změny počtu bakterií dle grafu zaměřeného na taxonomickou jednotku, do níž bakterie spadá. Bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* byla zkoumána zejména na počátku analýz mikrobioty IBD a její zvýšené počty byly dávány do souvislosti s onemocněním (Marchesi et al., 2016). Zjištěná nepatrná redukce by tak dle grafu 1 zaměřeného na jednotlivé kmeny naznačovala účinnost léčby. Podíváme-li se ale na graf 5 upřesňující výsledky na rodové úrovni, rod *Corynebacterium* nebyl zastoupen vůbec či v nedetekovatelném množství. Nejpřesnější výsledek bychom však dostaly, pokud by software poskytoval grafy na druhové úrovni.

Zhodnocení výsledků dále komplikuje individuální variabilita, ať už v případě, že mikrobiota jednoho pacienta obsahuje velké množství bakterií jedné taxonomické skupiny, která u ostatních přítomna třeba ani není (rod *Streptococcus*, kmen Tenericutes, rod *Collinsella*, čeleď Porphyromonadaceae), či je přítomna v menším množství (kmen Fusobacteria, kmen Proteobacteria, rod *Blautia*).

Rod *Collinsella*, jehož počet byl zvýšen u některých pacientů, je běžně se vyskytující rod střevní mikrobioty a jeho redukce, zvláště druhu *Collinsella Caerofaciens* je spojena s několika zdravotními poruchami jako například se syndromem dráždivého tračníku. Je diskutována souvislost s IBD. Rod *Collinsella* může dále údajně ovlivnit hladinu cholesterolu v krvi hostitele či společně s rodem *Bifidobacterium* pomocí modifikace žlučových kyselin hostitele modulovat virulenci a patogenitu enterálních patogenů (Bag et al., 2017).

Další charakteristickou skupinou bakterií vyskytující se ve zvýšené míře jen u některých pacientů je čeleď Porphyromonadaceae. Zackular et al. (2013) uvádí, že se jedná o bakterie běžně se vyskytující ve střevech zdravých jedinců, mající protektivní efekt vůči chronickým zánětům a tumorigenezí založenou na principu produkce SCFA či modulace protizánětlivých signálů.

Kmen *Fusobacterium* je přirozenou součástí mikrobioty, jeho výskyt ale také může znamenat infekce chirurgických a traumatických ran, pneumonii, intraabdominální infekci či abscesy mandlí (Brook, 2016). U jednoho z pacientů byl počet kmene *Fusobacterium* zvýšený, proto lze usuzovat právě na infekci, která se mohla vyskytnout po chirurgickém zákroku, u IBD často prováděného.

Celkem bylo metodou NGS analyzováno 51 odebraných vzorků od 18 dětských pacientů s Crohnovou chorobou, kterým byla aplikována léčba enterální výživou po dobu 6 týdnů. Původním záměrem byla analýza tří vzorků od každého pacienta, a to vzorku před zahájením enterální výživy (0. týden), vzorku odebraného v šestém týdnu (6. týden) a vzorku odebraném šest týdnů po ukončení EN (12. týden). Jelikož analýza NGS nevyšla u tří vzorků (vzorky 02, 34, 45), u tří pacientů byla změna mikrobiálního profilu mikrobioty hodnocena obtížně.

K odhadu střevní bakteriální diverzity pacientů slouží rozsáhlý řetězec postupů, jehož kroky mohou významně ovlivnit výsledky. Sekvenace každého vzorku byla provedena pouze jednou, analýza je tak zatížena velkou mírou chybovosti. Pro zpřesnění by bylo třeba provést opakování celé analýzy, které je ale velmi zdlouhavé a finančně náročné.

Obecně byly v průběhu léčby enterální výživou zaznamenány vesměs pozitivní změny počtů bakterií, po ukončení léčby ale málokterá pozitivní změna zůstala zachována a ve většině případů došlo k navrácení počtu bakterií do stavu původního. Byla zhodnocena reakce již využívaných a potenciálních probiotických mikroorganismů na léčbu enterální výživou. Pozitivně na léčbu reagovaly rody *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Roseburia* a *Blautia*, negativně pak rod *Bifidobacterium*.

Dosavadní studie pátrají, zda remise indukovaná enterální výživou souvisí s modulací střevní mikrobioty. Studie Lionettiho et al. (2005), (a další studie) využívající 16S sekvenování tento předpoklad potvrdila. Za možné účinné složky jsou považovány probiotické a bezsezbytkové komponenty enterální výživy.

Léčba EN je okamžitá a velmi účinná, na což poukázal dále fakt, že s odstupem 18 týdnů se složení mikrobioty opět navrátilo do stavu před zahájením léčby (Leach et al., 2008).

Paradoxem je, že během EN dochází k redukci druhů, které jsou považovány za protektivní u CD, ale zároveň je enterální výživa vysoce účinná (Quince et al., 2015).

Velmi podobnou studii s využitím sekvenace provedl Quince et al. (2015), který prokázal sníženou diverzitu mikrobioty pacientů s CD v kontrastu s kontrolní skupinou. Bylo shledáno, že během EN byl pokles diverzity ještě prohlouben a došlo k větší diferenciaci složení

mikrobioty vzhledem ke kontrolní skupině. Po navrácení k obvyklé stravě došlo k nárůstu diverzity.

Při posuzování účinnosti EN k léčbě dětí je třeba brát v úvahu, zda se jedná o studie krátkodobé či dlouhodobé. Studie Knighta et al. (2005) sledovala účinnost EN dlouhodobě u 44 dětských pacientů. EN byla podávána jako výhradní strava po dobu 1 - 7 let a u většiny dětí nedošlo po nástupu remise k relapsu. Téměř polovina pacientů nepotřebovala kortikoidy k udržení remise. Pokud ano, tak byla doba terapie zkrácena téměř na polovinu.

Srovnáme-li výsledky této studie s výsledky studií podobných, dojdeme tak často ke stejným závěrům a lze potvrdit hypotézu práce, že enterální výživa výrazně moduluje mikrobiotu. K posouzení účinnosti léčby jsou však nejdůležitější studie dlouhodobé, které jsou finančně i časově náročné, a proto jich není mnoho. K lepšímu zhodnocení by bylo třeba odebrat vzorky od stejných pacientů s větším časovým odstupem než je 12 týdnů od zahájení léčby.

9 Závěr

Cílem diplomové práce bylo posouzení vlivu enterální výživy na střevní mikrobiotu u dětí s Crohnovou chorobou na základě odhadu mikrobiální diverzity v gastrointestinálním traktu pomocí sekvenování nové generace.

Vzhledem k obrovskému množství dat a mnoha způsobům jejich interpretace byly v diplomové práci diskutovány výsledky zaměřené na bakterie zmiňované v literárním přehledu problematiky.

V průběhu léčby enterální výživou byly zaznamenány vesměs pozitivní změny počtu bakterií, po ukončení léčby ale málokterá pozitivní změna zůstala zachována a ve většině případů došlo k navrácení počtu bakterií do stavu původního před zahájením léčebného procesu. Často sledované bakterie se v rámci mikrobioty jedince velmi lišily.

Byl potvrzen základní předpoklad účinnosti léčby, a to změna poměru kmenů Firmicutes: Bacteroidetes ve prospěch kmene Firmicutes. Slibné výsledky byly zaznamenány u rodů *Blautia* a *Ruminococcus*, které se jeví jako potenciální probiotické mikroorganismy. Došlo k žádoucímu znásobení počtu rodu *Faecalibacterium*, do něhož spadá jedna z nejdiskutovanějších bakterií *Faecalibacterium prausnitzii*. Druhou charakteristickou bakterií v souvislosti s IBD je *Bacteroides fragilis*, u rodu *Bacteroides* byla zaznamenána žádoucí redukce taktéž potvrzující účinnost léčby enterální výživou.

Účinnost léčby vyvrací výsledky málo prokazatelného charakteru týkající se rodů *Lactobacillus* a *Prevotella*, či kmene Proteobacteria.

Výstupem studie byla řada dalších málo prokazatelných výsledků, u nichž byla očekávána vyšší míra intenzity modulace mikrobioty. Příkladem může být rod *Bifidobacterium*, již využívané probiotikum či bakterie *Escherichia coli*, tvořící biofilm při IBD.

Došlo k charakteristické změně počtu některých méně diskutovaných bakterií například rodu *Suterella* či rodu *Collinsella*, u nichž není přesná souvislost s IBD dosud známa.

Výsledky byly ovlivněny řadou faktorů, a to především individualitou mikrobioty, malým množstvím pacientů, složitostí procesu sekvenování a přípravy vzorků a podáním vícedruhové enterální výživy namísto jednodruhové.

V důsledku individuality mikrobioty byl velmi zkreslen celkový výsledek například u rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus*, u nichž bylo zvýšení počtu způsobeno pravděpodobně infekcí. Zajímavostí je, že mikrobiota pacienta často obsahovala bakterii specifickou, u jiných pacientů se nevyskytující (kmen *Fusobacterium* a Tenericutes či čeleď Porphyromonadaceae).

Srovnáním výsledků této studie s výsledky studií podobných dojdeme často ke stejným závěrům, a to že je léčba enterální výživou výrazně moduluje mikrobiotu a hypotézu práce lze tedy potvrdit. K posouzení účinnosti léčby jsou ale nejdůležitější studie dlouhodobé, které jsou finančně i časově náročné, a proto jich není mnoho. K definitivnímu potvrzení by tak bylo třeba odebrat vzorky od stejných pacientů s větším časovým odstupem než je 12 týdnů od zahájení léčby.

Jelikož byly výsledky ovlivněny řadou faktorů a proces sekvenování zahrnuje mnoho kroků, pro potvrzení závěrů by bylo vhodné provést opakování studie. Jedním z nejdůležitějších faktorů je omezenost hodnocené skupiny a sní spojená individualita složení střevní mikrobioty jednotlivých pacientů, která ovlivňuje celkové výsledky a je otázkou, co lze přisoudit léčbě enterální výživou a co nikoli. V důsledku individuality je nezbytná konzultace výsledků s lékaři, kteří tuto otázku pomohou objasnit.

V diplomové práci byl diskutován vliv enterální výživy na mikrobiotu pouze na bakteriální úrovni, jelikož rozsah dysbiosy v rámci ostatních mikroorganismů dosud není zcela prozkoumán. Tato oblast však skýtá zajímavé předpoklady vhodné pro budoucí výzkum.

Z důvodu neznámé příčiny vzniku IBD a zvyšující se tendence výskytu onemocnění Crohnovy choroby v ČR, je vhodné nadále se věnovat této problematice a slibné strategie budoucnosti na principu modulace střevní mikrobioty jako fekální transplantaci, léčbu probiotiky a prebiotiky a léčbu pomocí dietetických opatření včetně enterální či parenterální výživy, detailněji prozkoumat.

10 Seznam literatury

Afzal, N.A., Davies, S., Paintin, M., Arnaud-Battandier, F., Walker-Schmit, J.A., Murch, S., Heuschkel, R., Fell, J. 2005. Colonic Crohn's Disease in children does not respond well to treatment with enteral nutrition if the ileum is not involved. *Digestive Diseases and Sciences*. 50 (8). 1471-1475.

Akobeng, A.K., Thomas, A.G. 2007. Enteral nutrition for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 18 (3).

Ashton, J.J., Colquhoun, C.M., Cleary, D.W., Coelho, T., Haggarty, R., Mulder, I., Barta, A., Afzal, N.A., Beattie, M., Scott, K.P., Ennis, S. 2017. 16S sequencing and functional analysis of the fecal microbiome during treatment of newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 96 (26). 1-10.

Bag, S., Ghosh, T.S., Das, B. 2017. Complete Genome Sequence of *Collinsella aerofaciens* Isolated from the Gut of a Healthy Indian Subject. *Genome Announcements*. 5 (47). e01361-17.

Bajerová, K., Frühauf, P., Sýkora, J., Nevorál, J., Bronský, J., Kotalová, R., Adamcová, M., Škába, R., Szitányi, P., Schneiberg, F., Virčíková, J., Blažková, M., Pfeiferová, M. Crohnova choroba a ulcerózní kolitida [online]. *Crohn.cz*. 2013. [cit. 2017-12-02]. Dostupné z <<http://www.crohn.cz/informace-o-onemocnenich/ulcerozni-kolitida/informacni-brozury-o-ibd-u-dospelych-a-detskych-pacientu/>>.

Baumgart, D. C., Sandborn, W. J. 2012. Crohn's disease. *The Lancet*. 38. 1590-1605.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček A., Vávra, J. 1996. Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6. 558.

Brdička, R. 2011. Kam směřuje molekulárně-genetická analýza. *Klinická biochemie a metabolismus*. 19 (40). 143-148.

Brook, I. 2016. 184 – Anaerobic Bacteria. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Vol. 2. p. 1628–1644.

- Bureš, J. 2009. Červi – dávný přítel nebo skrytý nepřítel? Nová „hypotéza starých přátel“. *Folia Gastroenterol Hepatol.* 7(2). 50-53.
- Cahová, M. 9.12.2017. Probiotika a střevní mikrobiom. Přednáška na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze v rámci projektu Bezpečná výživa.
- Christodoulou, K., Wiskin, A.E., Gibson, J., Tapper, W., Willis, C., Afzal, N.A., Upstill-Goddard, R., Holloway, J.W., Simpson, M.A., Beattie, R.M., Collins, A., Ennis, S. 2012. Next generation exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes. *Gut.* 62. 977-984.
- Colman, J.R., Rubin T.D. 2014. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis.* 8. 1569-1581.
- Critch, J., Day, A.S., Otley, A., King-Moore, C., Teitelbaum, J.E., Shashidhar, H. 2012. Use of enteral nutrition for the control of intestinal inflammation in pediatric Crohn disease. *The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 54 (2). 298-305.
- Čierna, I. Crohnova choroba a ulcerózná kolitída u detí [online]. 2. Detská klinika LF UK a DFNSP, Bratislava. Únor 2011. [cit. 2017-12-02]. Dostupné z <http://www.crohncub.sk/index.php?option=com_content&task=view&id=109&Itemid=1>.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107 (33). 14691–14696.
- Derikx, L.A.A.P, Dieleman, L.A., Hoentjen, F. 2016. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology.* 30. 55 – 71.
- Dziechciarz, P., Horvath, A., Shamir, R., Szajewska, H. 2007. Meta-analysis: enteral nutrition in active Crohn's disease in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 26. 795-806.
- Frič, P. 2010. Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probatika. *Medicína pro praxi.* 7 (11). 408 – 414.

Gabalec, L. 2009. Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. Interní medicína pro praxi. 11(1). 16-20.

Griffiths, A.M. 2005. Enteral nutrition in the management of Crohn's disease. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 29 (4). 108-117.

Grover, Z. Muir, R., Lewindon, P. 2014. Exclusive enteral nutrition induces early clinical, mucosal and transmural remission in paediatric Crohn's disease. Journal of Gastroenterology. 49 (4). 638-645.

Hansen, A.K., Nielsen, D.S. 2014. Handbook of Laboratory Animal Bacteriology, Second Edition. Chapter Thirteen – Tenericutes. CRC Press. Boca Raton – Florida. ISBN: 978-1-4822-1545-8. 233 – 236.

Hartman, C., Eliakim, R., Shamir, R. 2009. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. World Journal of Gastroenterology. 15 (21). 2570-2578.

Heuschkel, R.B., Menache, C.C., Megerian, T.J. Baird, A.E. 2000. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 31 (1). 8-15.

Hiippala, K., Kainulainen, V., Kalliomäki, M., Arkkila, P., Satokari, R. 2016. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. Frontiers in Microbiology. 7. 1706.

Honzák, R. 9.12.2017. Duše a střevo – střevní mikrobiom a psychika. Přednáška na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze v rámci projektu Bezpečná výživa.

Johns Hopkins Gastroenterology and Hepatology. Crohn's disease: Introduction. [online]. 2017. cit. [07-12-2017]. Dostupné z <https://www.jhmicall.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Disease_ID=291F2209-F8A9-4011-8094-11EC9BF3100E&GDL_DC_ID=D03119D7-57A3-4890-A717-CF1E7426C8BA>.

Johnson, T. Macdonald, S. Hill, S.M., Thomas, A., Murphy, M.S. 2006. Treatment of active Crohn's disease in children using partial enteral nutrition with liquid formula: a randomised controlled trial. Gut. 55. 356-361.

- Kaplan, G.G. 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 12. 720-727.
- Karášková, E., Tenora, J., Smolka, V., Vospělová, J., Konečný, M., Lančová, I., Musilová, K., Mihál, V. 2008. Čtyři gastroenterologické diagnózy a jeden pacient. *Pediatric pro praxi*. 9 (3). 196 – 198.
- Knight, C., El-Matary, W., Spray, C., Sandhu, B.K. 2005. Long-term outcome of nutritional therapy in paediatric Crohn's disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 24. 775-779.
- Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. 2014. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická Onkologie*. 27 (1). 61-68.
- Leach, S.T., Mitchell, H.M., Eng, W.R., Zhang, L., Day, A.S. 2008. Sustained modulation of intestinal bacteria by exclusive enteral nutrition used to treat children with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 28. 724-733.
- Levine, A., Wine, E. 2013. Effects of enteral nutrition on Crohn's disease: clues to the impact of diet on disease pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19 (6). 1322-1329.
- Lionetti, P., Callegari, M.L., Ferrari, S. 2005. Enteral nutrition and microflora in pediatric Crohn's disease. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 29 (4). 173-178.
- Lukáš, M. 2011. Možnosti medikamentózní léčby u Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy. *Medicína pro praxi*. 8 (9). 360-363.
- Malý, J. 2004. Diagnostika a následná péče o děti s nespecifickými střevními záněty. *Pediatric pro praxi*. 4(1). 1-3.
- Mardis, E.R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 24 (3). 133-141.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuhoy, K.M., Thomas, L., V., Zoetendal, E.G., Hart, A. 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 65. 330-339.

- Mendes, L.W., Taketani, R.G., Navarrete, A.A., Tsai, S.M. 2012. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Research in Microbiology*. 163 (5). 366-377.
- Motro, Y., Moran-Gilad, J. 2017. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomolecular Detection and Quantification*. 14. 1-6.
- Mitrová, K. 2012. Zánětlivá střevní onemocnění u dětí. *Pediatric pro praxi*. 13(6). 388-390.
- Ng, S.C., Tang, W., Leong, R.W., Chen, M., Ko, Y., Studd, C., Niewiadomski, O., Bell, S., Kamm, M.A., De Silva, H.J., Kasturiratne, A., Senanayake, Y.U., Ooi, Ch.J., Ling, K.-L., Ong, D., Goh, K.L., Hilmi, I., Ouyang, Q., Wang, Y.-F., Hu, P., Zhu, Z., Zeng, Z., Wu, K., Wang, X., Xia, B., Li, J., Pisesongsa, P., Manatsathit, S., Aniwani, S., Simadibrata, M., Abdullah, M., Tsang, S.W.C., Wong, T.Ch., Hui, A.J., Chow, Ch.M., Yu, H.H., Li, M.F., Ng, K.K., Ching, J., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y. 2015. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut*. 64. 1063-1071.
- O'Sullivan, M., O'Morain, C. 2006. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Best Practise and Research Clinical Gastroenterology*. 20 (3). 561-573.
- Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., Núñez, G. 2017. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*. 279. 70-89.
- Pracovní skupina pro dětskou gastroenterologii a výživu České pediatrické společnosti. Dieta a režimová opatření u pacientů se zánětlivými střevními onemocněními (IBD) 2017. [online]. *Gastroped.cz*. [cit. 2015-10-17]. Dostupné z <<http://www.gastroped.cz/pro-pacienty/>>.
- Quince, Ch., Ijaz, U.Z., Loman, N., Eren, M., Saulnier, D. Russell, J., Haig, S.J., Calus, S.T., Quick, J., Barclay, A., Bertz, M., Blaut, M., Hansen, R. McGrogan, P., Russell, R.K., Edwards, Ch.A., Gerasimidis, K. 2015. Extensive modulation of the fecal metagenome in children with Crohn's disease during exclusive enteral nutrition. *The American Journal of Gastroenterology*. 110. 1718-1729.
- Rubio, A. Pigneur, B., Garnier-Lengline, H., Talbotec, C., Schmitz, J., Canioni, D. Goulet, O., Ruemmele, F. M. 2011. The efficacy of exclusive nutritional therapy in paediatric Crohn's

disease, comparing fractionated oral vs. Continuous enteral feeding. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 33. 1332-1339.

Šachlová, M. 2011. Jakou volit stravu u pacientů s Crohnovou chorobou? *Interní medicína pro praxi*. 13(10). 403–405.

Seidman, E.G., Griffiths, A., Jones, A. Issenman, R. 1993. Semi-elemental (S-E) diet versus prednisone in pediatric Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 104. A.778.

Shamir, R. 2009. nutritional aspects in inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*.48. 86-88.

Sheehan, D., Moran, C., Shanahan, F. 2015. The microbiota in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*. 50. 495-507.

Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleeer, P., Jacques, M., Harel, J. 2017. Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7. 387. 1-12.

Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M.L., Beaugerie, L. 2017. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 66. 1039-1048.

Sommer, F., Rühlemann, M. Ch., Bang, C., Höppner, M., Rehman, A., Kaleta, Ch., Schmitt-Kopplin, P., Dempfle, A., Weidinger, S., Ellinghaus, E., Krauss-Etschmann, S., Schmidt-Arras, D., Aden, K., Schulte, D., Ellinghaus, D., Schreiber, S., Tholey, A., Rupp, J., Laudes, M., Baines, J. F., Rosenstiel P., Franke, A. 2017. Microbiomarkers in inflammatory bowel diseases: caveats come with caviar. *Gut*. 66 (10). 1734-1738.

Škrabálková, M. 2013. Crohnova choroba a ulcerózná kolitida, závažný celoživotný problém. *Humanita*. 13(4). 1-12.

The American Gut Project. 2017. [online]. [Americangut.org](http://americangut.org). [cit. 2017-12-10]. Dostupné z <<http://americangut.org/>>.

Tlaskalová-Hogenová, H. 6.12.2017. Mikrobiom, slizniční imunita a chronické onemocnění. Přednáška na 3.lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Vaughn, B.P., Gevers, D., Ting A., Korzenik, J.R., Robson S.C., Moss, A.C. 2014. Fecal microbiota transplantation induces early improvement in symptoms in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 146. 591-592.

Vermeire, S., Joossens, M., Verbeke, K., Wang, J., Machiels, K., Sabino, J., Ferrante, M., Van Assche, G., Rutgeerts, P., Raes, J. 2015. Donor species richness determines faecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 10 (4). 387-394.

Vermiere, S., Joossens, M., Verbeke, K., Hildebrand, F., Kathleen, M., Van den Broeck, K. 2012. Pilot study on the safety and efficacy of faecal microbiota transplantation in refractory Crohn's disease. *Gastroenterology*. 142. 360.

Vrzalová, D., Konečný, M., Ehrmann, J. 2011. Enterální a parenterální výživa u pacientů s nespecifickými střevními záněty. *Medicína pro praxi*. 8(7 a 8). 337-338.

Yamamoto, T., Nakahigashi, M., Saniabadi, A.R., Iwata, T., Maruyama, Y. Umegae, S. Matsumoto, K. 2007. Impact on long-term enteral nutrition on clinical and endoscopic disease activities and mucosal cytokines during remission on patients with Crohn's disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 13. 1493-1501.

Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F. Chen, G.Y., Schloss, P.D. 2013. The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBIO*. 4 (6). e00692-13.

11 Samostatné přílohy

NÁZEV	SLOŽENÍ
VSL#3	<i>Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Streptococcus thermophiles, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantus, Bifidobacterium longum)</i> <i>Bifido-fermented milk (Bifidobacterium breve, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus</i>
BIO-THREE	<i>Streptococcus faecalis, Clostridium butyricum, Bacillus mesentericus</i>
Bifid Triple Viable	<i>Bacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Fecal streptococci</i>

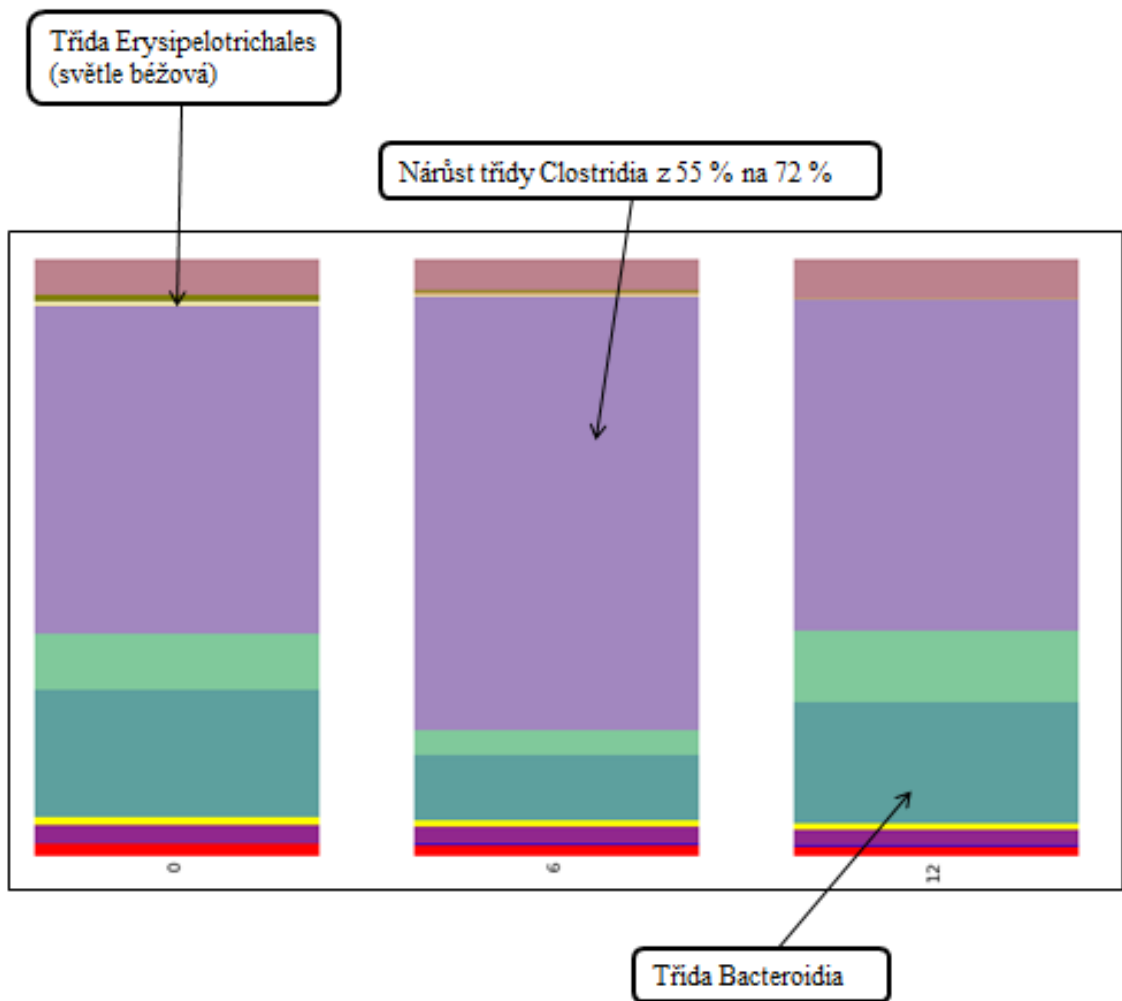
Příl. 1: Složení kombinací probiotik (Derikx et al., 2016).

<i>DreamTag Green PCR Master Mix (2x)</i>	
DreamTaq DNA polymerase	1 µl
2x DreamTaq Green Buffer	1 µl
dATP	0,4mM
dCTP	0,4mM
dGTP	0,4mM
dTTP	0,4mM
dCTP	0,4mM
MgCl ₂	4 mM

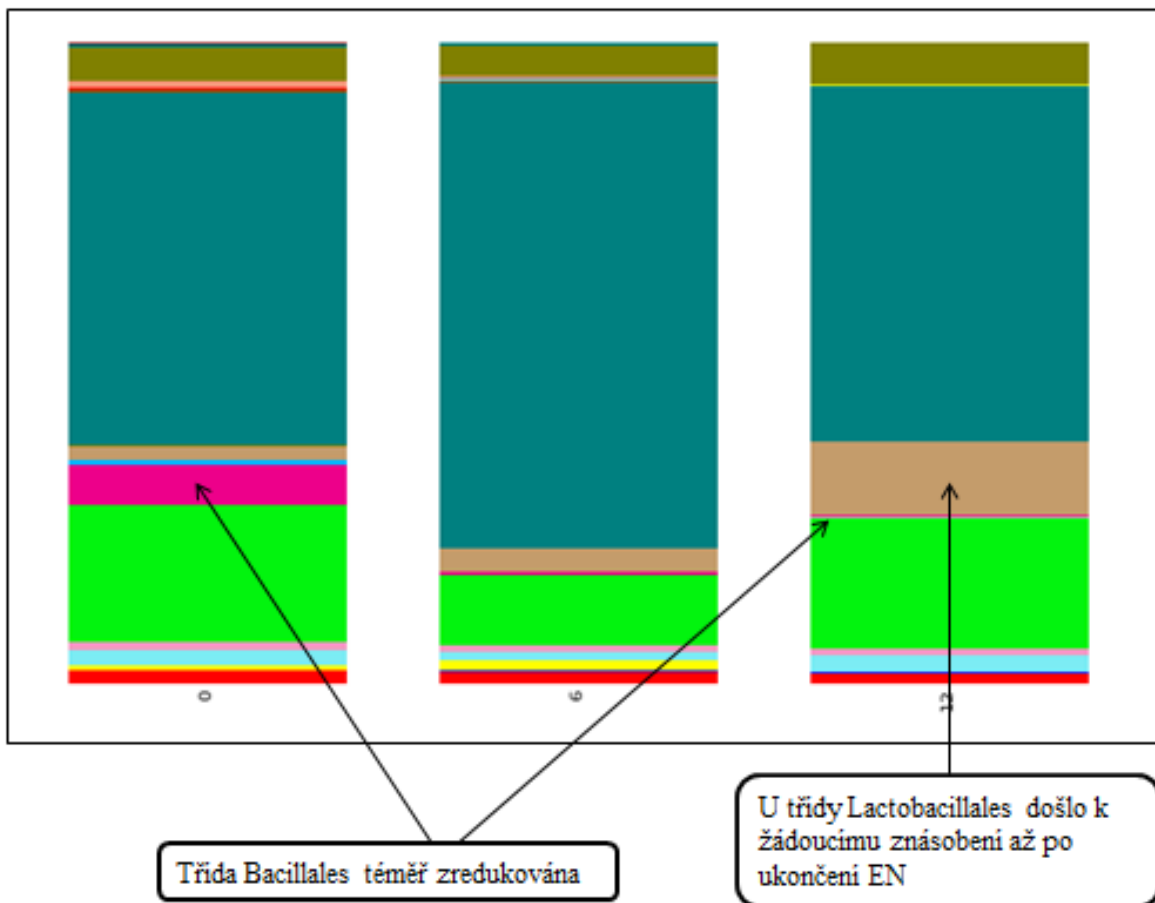
Příl. 2: Složení DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0007220_Ion_PGM_Template_OT2_200_Kit_UG.pdf

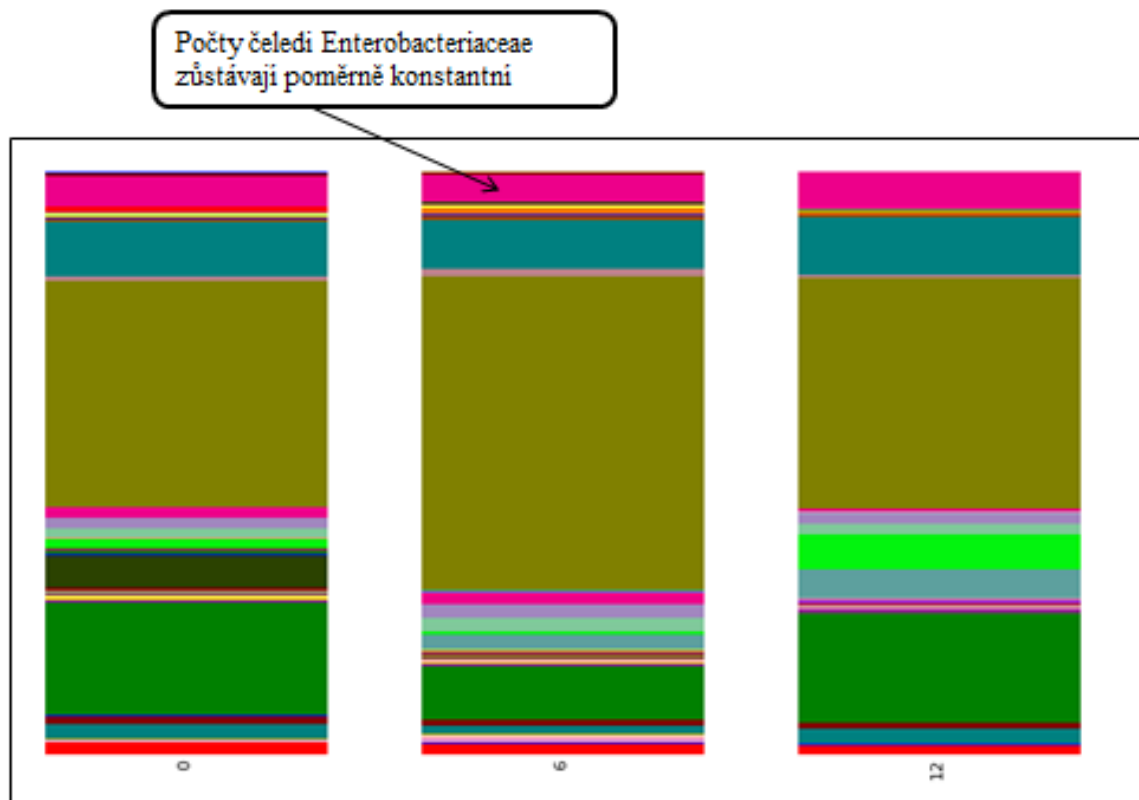
Příl. 3: Odkaz na podrobný návod přípravy templátu ve formátu pdf.



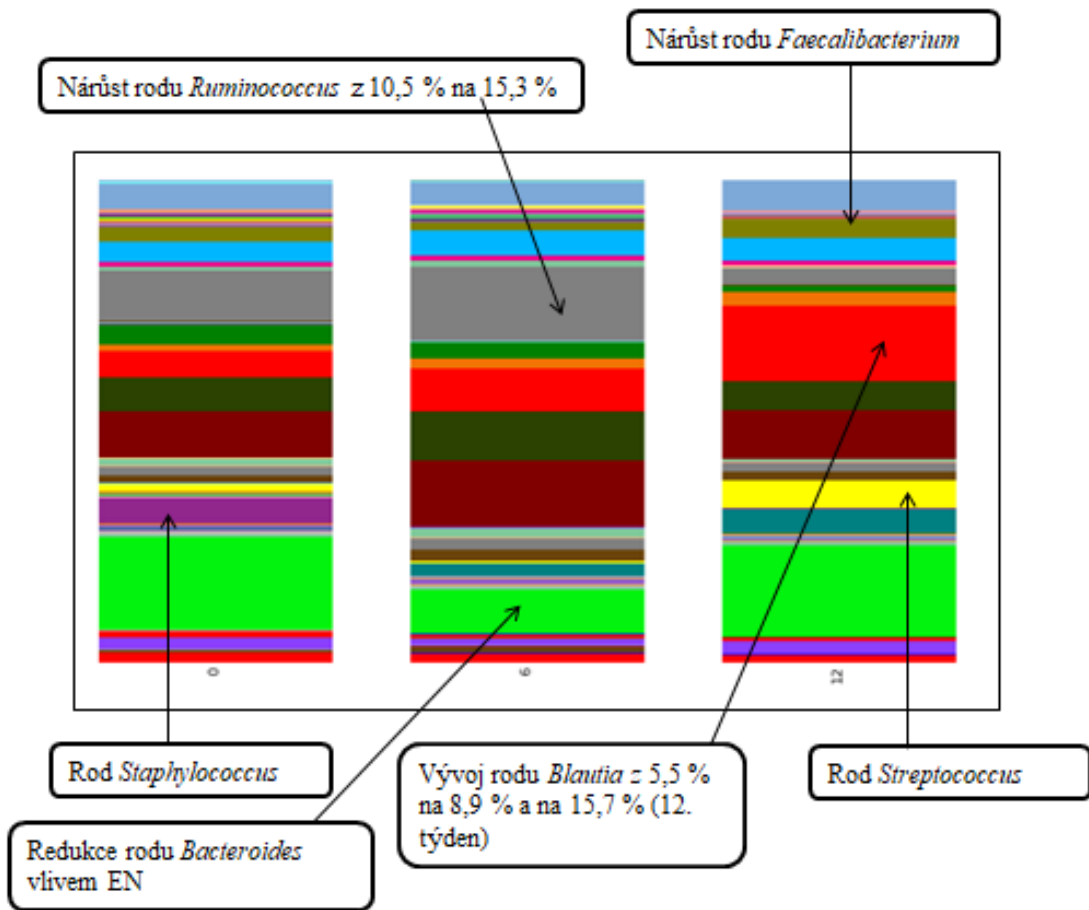
Graf 2: Zastoupení tříd bakterií v jednotlivých odběrech.



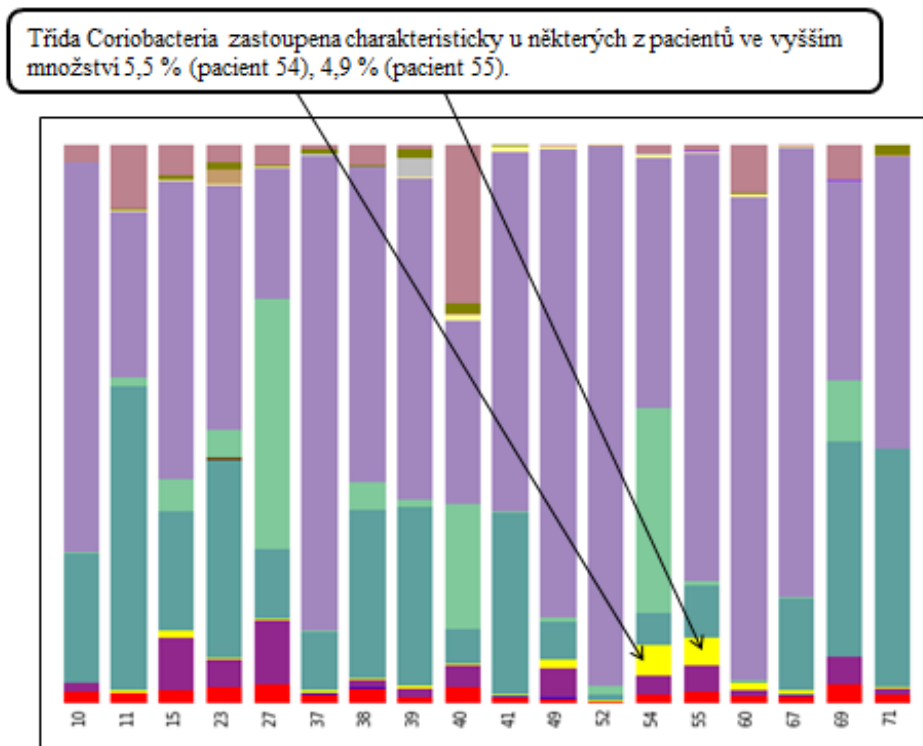
Graf 3: Zastoupení řádů bakterií v jednotlivých odběrech.



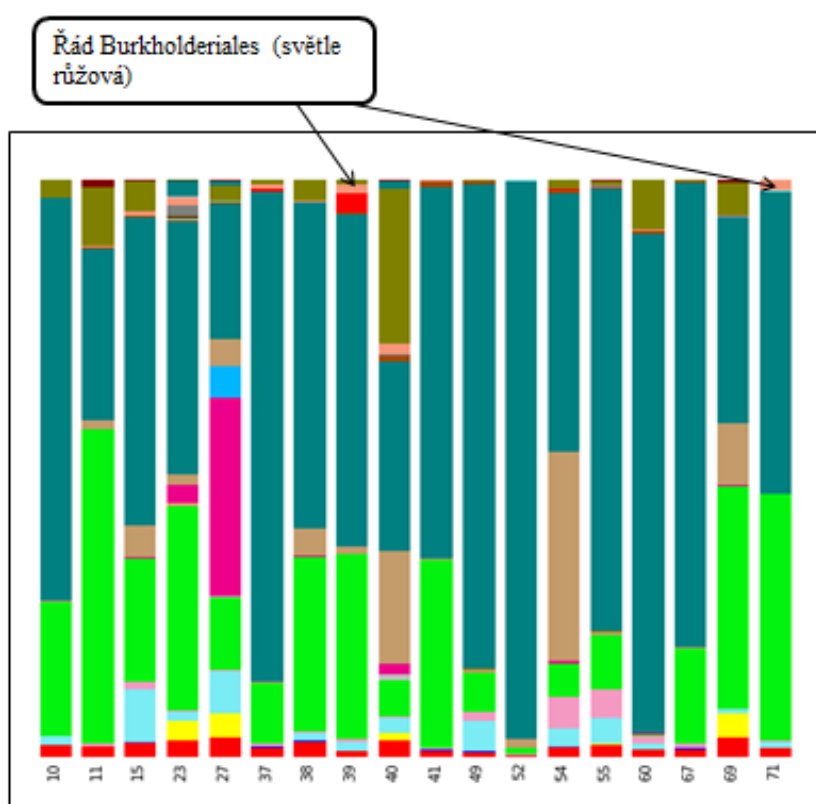
Graf 4: Zastoupení čeledí bakterií v jednotlivých odběrech.



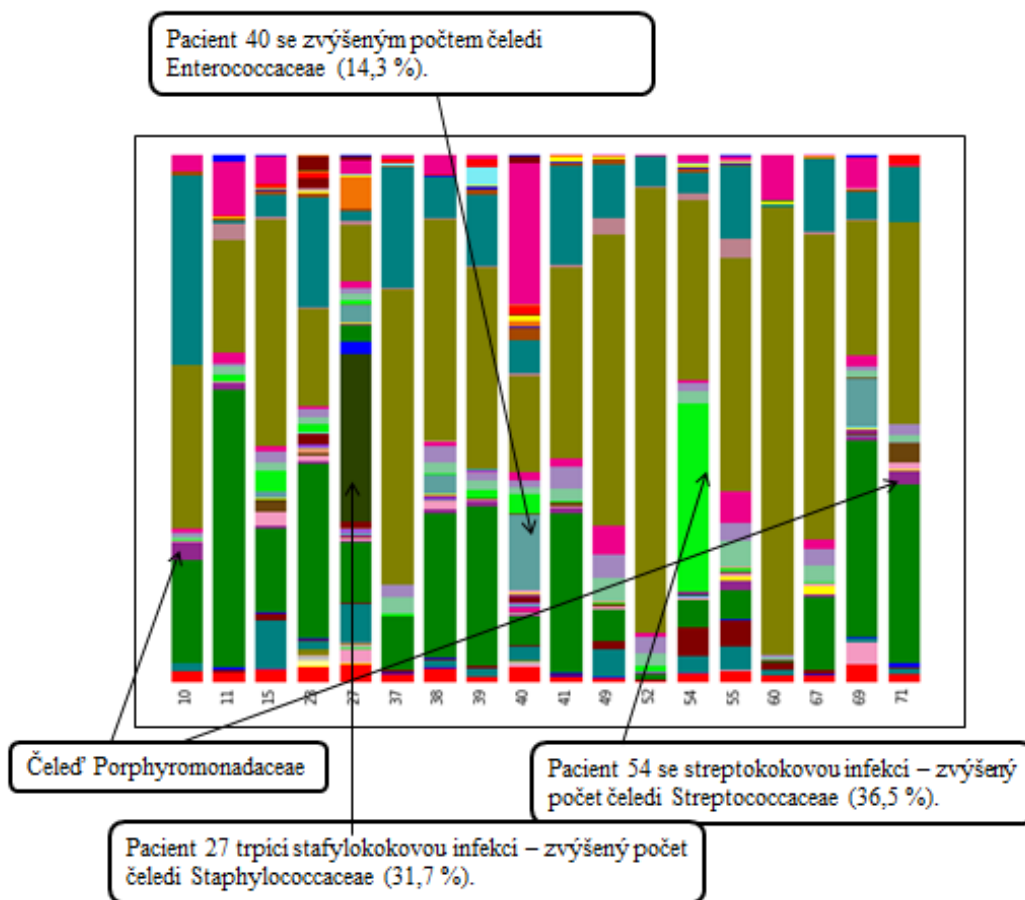
Graf 5: Zastoupení rodů bakterií v jednotlivých odběrech.



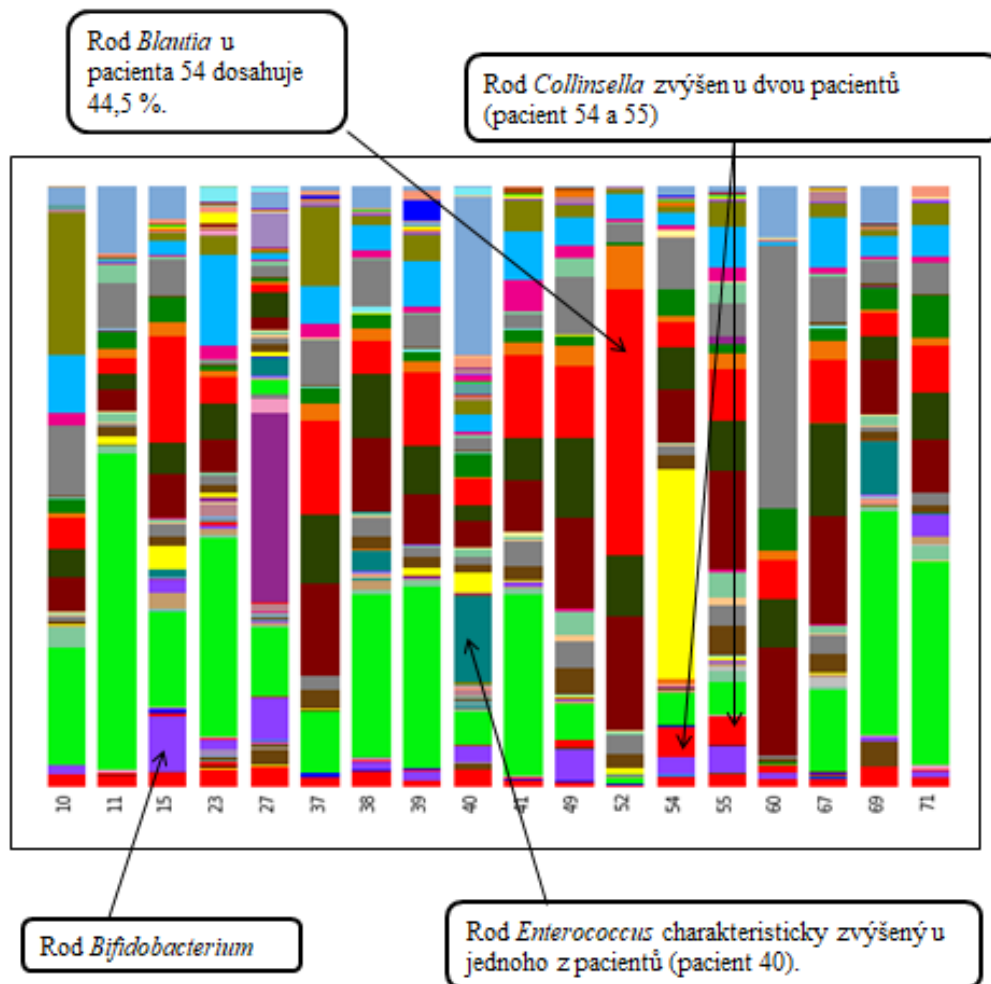
Graf 7: Zastoupení tříd bakterií u jednotlivých pacientů průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.



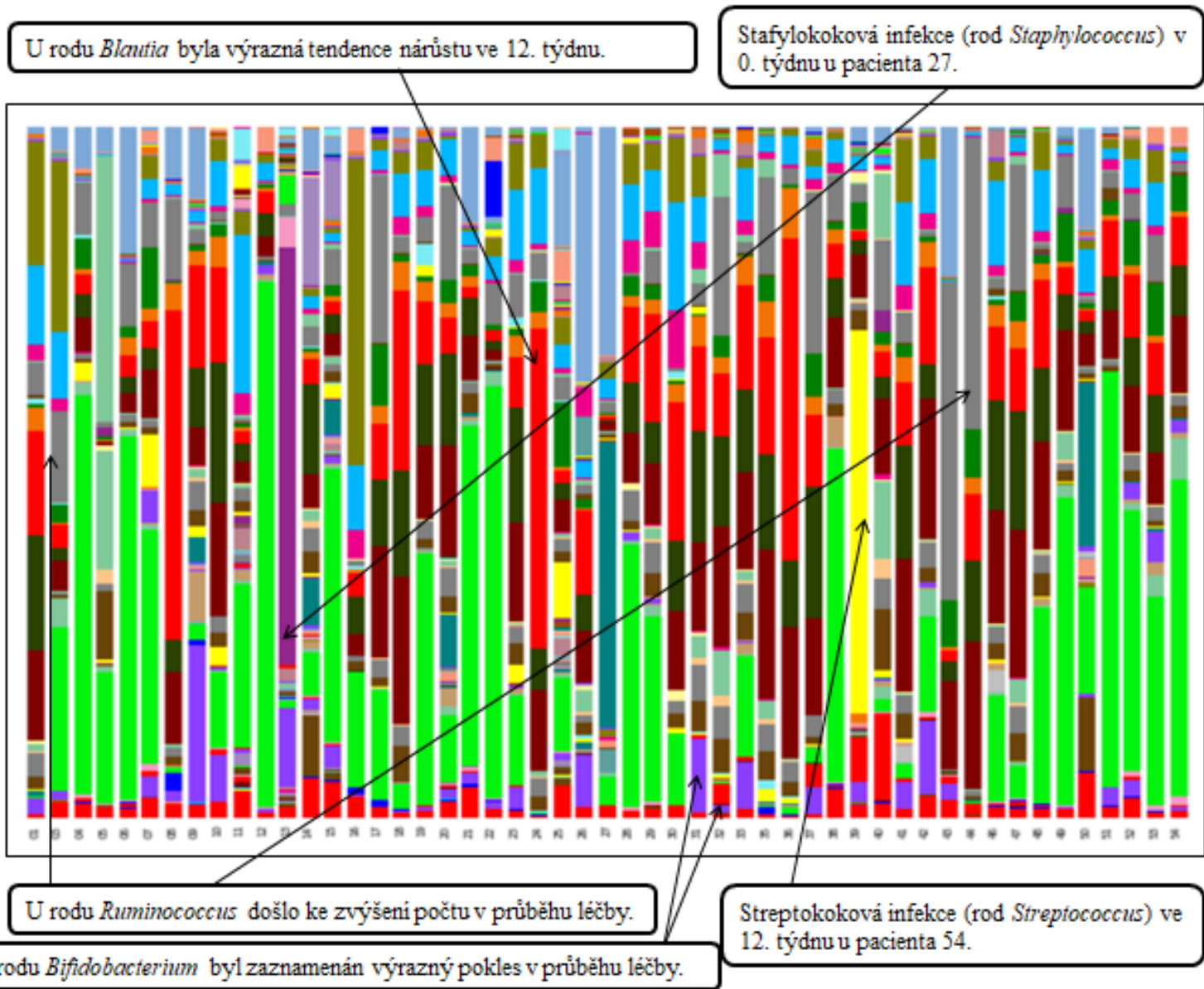
Graf 8: Zastoupení řádů bakterií u jednotlivých pacientů průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.



Graf 9: Zastoupení tříd bakterií u jednotlivých pacientů průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.



Graf 10: Zastoupení rodů bakterií u jednotlivých pacientů průměrně ve všech třech odebraných vzorcích.



Graf 12: Zastoupení rodů bakterií v jednotlivých odběrech.