

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Změny metabolomu stolice u lidí po konzumaci jablek**

**Diplomová práce**

**Mgr. Šárka Knížková**

**Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny metabolomu stolice u lidí po konzumaci jablek" 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. V teoretické části této práce byly pro překlad a shrnutí některých odborných textů využity technologie umělé inteligence (AI). Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a veškerý čas strávený na mé diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat paní Elišce Jeníčkové, MSc. za její nadstandardní přístup při konzultaci práce a za všestrannou pomoc, ochotu a trpělivost při řešení nejrůznějších problémů. Poděkování patří i Chandramě Roy Chowdhury, MSc. za pomoc při laboratorním zpracování vzorků a statistické analýze, velmi si vážím její práce a času, který mi věnovala. Zmínit bych chtěla i Bc. Davida Šklíbu, jemuž bych chtěla poděkovat za konzultaci statistických výsledků. A samozřejmě bych chtěla vyjádřit nekonečnou vděčnost všem svým přátelům a rodině, kteří mě po celou dobu podporovali, motivovali a nabídli pomocnou ruku, když bylo třeba. Jsem přesvědčena, že bez nich by nebylo možné práci dokončit.

# Změny metabolomu stolice u lidí po konzumaci jablek

## Souhrn

Střevní mikrobiota je úzce spojena se zdravím člověka. Současný výzkum poukazuje na významnou roli mikrobioty v patogenezi různých onemocnění, ale i ve funkci vzdálených orgánů, sliznic a imunitní funkce. Tyto vztahy jsou částečně zprostředkované metabolickou aktivitou mikrobioty, zejména produkcí malých molekul v lumen trávicího traktu, z nichž některé mají významnou biologickou aktivitu a vstupují do krevního oběhu. Lidská stolice představuje cenný biologický vzorek, který je otiskem metabolické funkce mikrobioty, stravy, životního stylu a případného onemocnění. Významným faktorem ovlivňujícím mikrobiotu je vláknina, jejíž zvýšený příjem vede ke změnám. Tyto změny jsou obvykle pozorovány u populací s dlouhodobě odlišným stravováním, není však jasné, nakolik jsou ovlivňovány prostřednictvím krátkodobé intervence. Cílem této práce bylo prozkoumat změny ve střevních metabolitech spojené se zvýšeným příjmem jablek. Na základě stávajícího výzkumu jsme předpokládali zvýšení mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFAs) a metabolických produktů polyfenolů, jako jsou deriváty kyseliny fenylacetové.

Do pilotní intervenční studie bylo vybráno 15 dobrovolníků ( $n = 15$ ) ve věku 18–30 let. Dobrovolníci konzumovali 3 ks středně velkých jablek kultivaru Gala po dobu 3 dní. Účastníci odebraly první vzorek stolice den před začátkem intervence a druhý vzorek následující den po skončení intervence. Vzorky byly analyzovány za účelem identifikace a kvantifikace změn v koncentraci střevních metabolitů. Pro analýzu byla použita protonová nukleární magnetická rezonance ( $^1\text{H}$  NMR) 500 MHz. Spektra byla po manuálním fázování a referenci kvantifikována v programu Chenomx v. 9.0. Rozdíly v metabolomu byly vyhodnoceny s pomocí párového Wilcoxonova testu.

V NMR spektrech bylo kvantifikováno celkem 22 metabolitů. Univariační analýza dat po normalizaci metodou PQN ukázala, že žádný ze sledovaných metabolitů nebyl po intervenci signifikantně rozdílný. Vliv akutního příjmu zvýšeného množství jablek po dobu 3 dní neměl vliv na profil sledovaných metabolitů, variabilita mezi jedinci byla vyšší než variabilita způsobená intervencí. Výsledky pilotní studie mohou sloužit pro power analýzu studované populace a plánování většího experimentu.

**Klíčová slova:** NMR, výživová intervence, metabolom stolice, metabolomika, jablka

# Changes in metabolome in subjects after apple consumption

## Summary

The gut microbiota is closely linked to human health. Current research highlights the significant role of the microbiota in the pathogenesis of various diseases, as well as in the function of distant organs, mucous membranes, and immune function. These relationships are partially mediated by the metabolic activity of the microbiota, particularly through the production of small molecules in the lumen of the digestive tract, some of which have significant biological activity and enter the bloodstream. Human stool represents a valuable biological sample that reflects the metabolic function of the microbiota, diet, lifestyle, and potential disease. A significant factor affecting the microbiota is dietary fibre, whose increased intake leads to changes usually observed in populations with long-term different diets, but it is not clear to what extent these are influenced through short-term interventions. The aim of this study was to explore changes in intestinal metabolites associated with increased apple intake. Based on existing research, we hypothesized an increase in short-chain fatty acids (SCFAs) and metabolic products of polyphenols, such as phenylacetic acid derivatives.

For the pilot intervention study, 15 volunteers ( $n = 15$ ) aged 18–30 years were selected. The volunteers consumed three medium-sized Gala apples daily for three days. Participants provided the first stool sample the day before the intervention began and a second sample the following day after the intervention ended. The samples were analyzed for the identification and quantification of changes in the concentration of intestinal metabolites. Analysis was conducted using 500 MHz proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR). The spectra were manually phased and referenced, then quantified using the Chenomx software version 9.0. Differences in the metabolome were assessed using the Wilcoxon signed-rank test.

A total of 22 metabolites were quantified in the NMR spectra. Univariate data analysis after normalization by the PQN method showed that none of the monitored metabolites were significantly different post-intervention. The influence of the acute intake of an increased amount of apples over three days did not affect the profile of the monitored metabolites, with individual variability being higher than the variability caused by the intervention. The results of the pilot study may serve for power analysis of the studied population and planning a larger experiment.

**Keywords:** NMR, dietary intervention, stool metabolome, metabolomics, apples

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Vědecká hypotéza</b>	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Střevní mikrobiom a metabolom u lidí</b>	<b>10</b>
3.1.1	Metabolom stolice	11
3.1.2	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem	12
<b>3.2</b>	<b>Vliv věku, stravy a životního stylu na střevní mikrobiotu</b>	<b>14</b>
3.2.1	Změny mikrobioty v průběhu života	14
3.2.2	Probiotika	15
3.2.3	Fermentované produkty	16
3.2.4	Prebiotika	18
3.2.5	Antibiotika a další vybrané léky	19
3.2.6	Mikrobiom a životní styl	21
<b>3.3</b>	<b>Mikrobiom a souvislost se zdravím</b>	<b>22</b>
3.3.1	Definice metabolického syndromu	23
3.3.2	Mikrobiom a obezita	24
3.3.3	Mikrobiom a diabetes mellitus 2. typu	25
3.3.4	Mikrobiom a vybraná autoimunitní onemocnění	26
3.3.5	Mikrobiom a nádorová onemocnění	27
<b>3.4</b>	<b>Změny mikrobiomu po krátkodobé výživové intervenci</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>Vliv konzumace jablek na zdraví</b>	<b>33</b>
3.5.1	Vliv konzumace jablek na mikrobiom a metabolom stolice	35
<b>3.6</b>	<b>Využití nukleární magnetické rezonance v analýze metabolomu stolice</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Účastníci studie</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Odběr vzorků</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Příprava vzorků pro NMR analýzu</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>NMR spektroskopie</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Zpracování výsledných spekter a statistická analýza</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Statistická analýza a testování hypotéz</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>53</b>

<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>
<b>10.1</b>	<b>Příloha č. 1: Souhlasné stanovisko etické komise.....</b>	<b>I</b>
<b>10.2</b>	<b>Příloha č. 2: Dotazník pro dobrovolníky.....</b>	<b>III</b>
<b>10.3</b>	<b>Příloha č. 3: Normalizované koncentrace jednotlivých metabolitů před a po intervenci.....</b>	<b>VI</b>
<b>10.4</b>	<b>Příloha č. 4: Boxploty metabolitů s nejnižší p-hodnotou.....</b>	<b>VIII</b>
10.4.1	Koncentrace isobutyrátu před a po intervenci .....	VIII
10.4.2	Koncentrace tyrosinu před a po intervenci .....	VIII
10.4.3	Koncentrace alaninu před a po intervenci.....	IX
10.4.4	Koncentrace valerátu před a po intervenci .....	IX
10.4.5	Koncentrace valinu před a po intervenci .....	X
10.4.6	Koncentrace glutamátu před a po intervenci .....	X
<b>10.5</b>	<b>Příloha č. 5: Seznam tabulek.....</b>	<b>XI</b>
<b>10.6</b>	<b>Příloha č. 6: Seznam obrázků .....</b>	<b>XII</b>
<b>10.7</b>	<b>Příloha č. 7 Seznam grafů.....</b>	<b>XIII</b>
<b>10.8</b>	<b>Příloha č. 8 Grafy odlehlých hodnot metabolitů .....</b>	<b>XIV</b>

# 1 Úvod

Střevní mikrobiota je soubor více než 100 bilionů bakterií, virů, archeí a hub obývajících lidský gastrointestinální trakt, které hrají důležitou roli ve fyziologii lidského organismu. Složení střevní mikrobioty je stejně unikátní jako otisk prstu. Existuje část mikrobiomu, tzv. „core microbiom“, který je podobná u všech jedinců, přesto ale existují významné individuální rozdíly nejen v zastoupení jednotlivých mikroorganismů, nýbrž i v jejich aktivitě a funkci. Odhaduje se, že dědičnost diverzity mikrobiomu se pohybuje okolo 30 %, což znamená, že zhruba 2/3 složení jsou ovlivnitelné vlivem prostředí (Franzosa et al. 2015; Sales & Reimer 2023)

Složení a aktivitu střevního mikrobiomu nejlépe odráží metabolom stolice. To je soubor malých molekul (metabolitů), které vznikají metabolickými procesy způsobenými mikrobiotou, a vzhledem k tomu, že metabolom odráží 68 % variace mikrobioty, je v dnešní společnosti metabolomika považována za nejlepší obrázek interakcí probíhajících v gastrointestinálním traktu. (Seth & Taga 2014; Muthubarathi et al. 2021) Hlavními metabolity střevní mikrobioty jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs), aminokyseliny, rozvětvené mastné kyseliny, alkoholy, aminy, organické kyseliny, sacharidy, sloučeniny obsahující síru, indoly a fenoly. (Lamichhane et al. 2015; Ganobis et al. 2020)

Mikrobiota hraje významnou roli v rozvoji imunitního systému, metabolismu jednotlivých živin, eliminaci xenobiotik, syntéze některých vitamínů či tvorbě serotoninu. Nicméně její složení se může výrazně podílet na patogenezi mnoha civilizačních onemocnění. (Lynch & Pedersen 2016) Mnohá z civilizačních onemocnění (jako je obezita, kardiovaskulární onemocnění, dyslipidémie, diabetes mellitus 2. typu či nealkoholická steatóza jater) mají společné znaky týkající se střevní mikrobioty. Mezi ně patří snížená diverzita, vyšší podíl patogenních bakterií (např. *Enterobacteriaceae*) a nižší produkce zdraví prospěšných látek, například SCFAs. (Fan & Pedersen 2021)

Střevní mikrobiota je nejvíce formována do 3 let věku, dále zůstává relativně stabilní. Lze ji však do jisté míry modifikovat environmentálními faktory jako je stres, strava, či fyzická aktivita. (Sales & Reimer 2023) Zdá se, že strava hraje v regulaci mikrobioty naprosto zásadní roli. Klíčový je zejména příjem vlákniny a fermentovatelných sacharidů. (Maukonen & Saarela 2015) Látky, které jsou využívány mikrobiotou hostitele a přinášejí mu zdravotní benefity, jsou nazývány jako prebiotika. V dnešní době zahrnují sacharidy (včetně vlákniny a fermentovatelných sacharidů), fenoly a fytochemikálie a polynenasycené mastné kyseliny. (Kocot et al. 2022) Ukazuje se, že strava se zvýšeným obsahem těchto probiotických látek vede k vyšší produkci SCFAs a tím zlepšuje parametry onemocnění patřících do metabolického syndromu díky regulaci pocitů hladu a sytosti a má tak pozitivní vliv na zdraví organismu. (Valdes et al. 2018). Vzhledem k tomu, že jablka jsou bohatým zdrojem vlákniny (celulózy a pektinu) a polyfenolů (Bator et al. 2024) a vzhledem k tomu, že jablka jsou v České republice nejkonzumovanějším druhem ovoce (Nejoblíbenější ovoce 2016), byl tento výzkum zaměřen na možnost ovlivnění metabolomu stolice zvýšeným příjmem jablek. Otázkou zůstává, jaké množství by bylo k alteraci mikrobioty třeba a jak dlouhá doba je třeba k ovlivnění složení mikrobioty.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

H0: Krátkodobá nutriční intervence jablky neovlivňuje složení metabolomu stolice i lidí.

H1: Krátkodobá nutriční intervence jablky ovlivňuje metabolom stolice u lidí.

### **2.2 Cíle práce**

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda krátkodobá výživová intervence ovlivňuje chemické složení stolice. Předpokládá se, že vláknina a polyfenoly obsažené v jablkách vedou ke zvýšené fermentaci v tlustém střevě. V důsledku toho se po nutriční intervenci vyšší dávkou jablek ve stolici zvýší obsah produktů sacharolytického metabolismu, mastných kyselin s krátkým řetězcem, derivátů kyseliny fenylactové a klesne podíl aminokyselin.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Střevní mikrobiom a metabolom u lidí

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) je osídlen přibližně 100 biliony bakterií, virů, archeí a hub a představuje složitý ekosystém nazývaný mikrobiota. Největší podíl ve střevní mikrobiotě představují bakterie, které zahrnují více než 1000 unikátních bakteriálních druhů patřících převážně do čtyř dominantních kmenů: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Přehled mikroorganismů se zaměřením na nejvýznamnější kmeny je zpracován v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 Nejvýznamnější mikroorganismy střevní mikrobioty u lidí

Doména	Kmen	Čeleď
Bakterie	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>
		<i>Ruminococcaceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>
		<i>Prevotellaceae</i>
		<i>Rikenellaceae</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
		<i>Coriobacteruaceae</i>
	<i>Proteobacteria</i>	
	<i>Fusobacteria</i>	
	<i>Verrucomicrobia</i>	
<i>Cyanobacteria</i>		
Archea	<i>Euryarchaeota</i>	

Tabulka vypracována podle Maukonen & Saarela (2015)

Mikrobiota obývá celý GIT, přičemž počet bakterií se zvyšuje distálně ve směru trávení – nejméně bakterií je v žaludku (10 bakterií/ 1 gram žaludečního obsahu) a nejvyšší zastoupení mikroorganismů je v tlustém střevě s neutrálním až mírně zásaditým pH a anaerobním prostředím ( $10^{12}$  bakterií/ 1 gram střevního obsahu), přičemž mikrobiota tvoří zhruba 1/3 hmoty stolice. S rostoucím množstvím bakterií se zvyšuje i biodiverzita. (Finlay & Finlay 2020; Sales & Reimer 2023) Střevní mikrobiota ve stolici je bohatá především na čeledi *Lachnospiraceae* (např. skupina *Eubacterium rectale*) a *Ruminococcaceae* (skupina *Clostridium leptum*) a *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, které dohromady tvoří 60–80 % střevní mikrobioty u zdravých jedinců. Tyto rody jsou polysacharolytické, striktně anaerobní a produkují butyrát – mastnou kyselinu s krátkým řetězcem významnou pro zdraví GIT. Bakterie z čeledi *Lachnospiraceae* tvoří v průměru 10–45 % bakterií, a *Ruminococcaceae* 16–27 %. Zástupci kmene *Bacteroidetes* se v mikrobiotě vyskytují z 12–60 %. Tyto bakterie fermentují jednoduché i složené sacharidy, produkují acetát a sukcinát (který spolu s laktátem může být přeměněn na propionát) jako hlavní metabolické konečné produkty a většina druhů je slabě proteolytická. *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. a zástupci *Coriobacteriaceae*, ačkoli se vyskytují u většiny lidských subjektů, tvoří menší část populace mezi střevními

bakteriemi u dospělých – bifidobakterie, 0,5–6 %, laktobacily 1–3 % a *Coribacteriaceae* 1–5 % celkové střevní mikrobioty. (Maukonen & Saarela 2015)

V odborné literatuře je dále často užíván termín střevní mikrobiom, který představuje genetickou výbavu mikrobioty. Řada současných metod, které analyzují mikrobiotu, je primárně zaměřená na kvantifikaci a funkční popis genů, nikoliv bakterií jako celku. V praxi jsou však termíny mikrobiom a mikrobiota často zaměňovány. (Sales & Reimer 2023)

Aktuální výzkumy poukazují na podobnosti ve složení a funkci střevní mikrobioty s možnou existencí tzv. „jádrového mikrobiomu“ (anglicky „core microbiome“) u všech jedinců. (Sales & Reimer 2023) Přesto však existují značné interindividuální rozdíly v hojnosti mikroorganismů, složení, diverzitě i funkci genů, což vede k teorii, že složení mikrobioty je stejně unikátní jako otisk prstu. Bylo odhadnuto, že dědičnost diverzity střevního mikrobiomu se pohybuje mezi 30–37 %, což znamená, že více než 60 % variability v mikrobiomu je určeno vlivem prostředí. Mnoho z těchto změn v mikrobiotě je stabilních v čase a studie ukázaly, že více než 80 % jedinců lze na základě informací o mikrobiotě jedinečně identifikovat i rok po odběru vzorku, s čímž vyvstávají i otázky týkající se soukromí a etiky při provádění výzkumu mikrobiomu. (Franzosa et al. 2015; Menni et al. 2017, Sales & Reimer 2023)

Přestože neexistuje přesná definice toho, jak by měl vypadat „zdravý“ mikrobiom a jak se liší od „nezdravého“ (dysbiotického), je všeobecně přijímáno, že zásadní roli hraje diverzita. Čím větší je rozmanitost mikrobioty, tím větší budou benefity pro hostitele. (Lynch & Pedersen 2016) Rovnováha mikrobiálního ekosystému ve střevech se nazývá eubióza a je charakterizována převahou symbiotických druhů, například *Firmicutes* či *Bacteroides*, zatímco potenciálně patogenní taxony jako *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*) jsou přítomny, ale v nízkém procentu a bez patogenních projevů. V případě dysbiózy se jedná o opačný jev. Fakultativně anaerobní bakteriální druhy (*Escherichia coli*) převládají v momentě zvýšené zánětlivé aktivity ve střevě. V tu chvíli zároveň dochází k poklesu prospěšných obligátně anaerobních druhů jako *Faecalibacterium prausnitzii*. Poměr těchto dvou druhů bakterií je v současné době používán k hodnocení stavu dysbiózy. (Iebba et al. 2015)

### 3.1.1 Metabolom stolice

Metabolom je soubor malých molekul (metabolitů), které jsou výsledkem metabolických procesů. Jedná se o různé chemické látky včetně aminokyselin, cukrů, mastných kyselin a dalších molekul menších než 1500 Da.

Metabolomika je vědecký obor, který využívá pokročilé techniky analytické chemie k měření velkého množství metabolitů v různých metabolických vzorcích. V biomedicínských vědách se pomocí metabolomiky zkoumají především tkáně a biofluidy, jako jsou plazma, moč, sliny, sérum a mozkomíšni mok. V souvislosti se složitým biosystémem v GIT a interakcí mezi rezidentní mikrobiotou je však nejvhodnější jiný typ vzorku – stolice. (Karu et al. 2018) Vzhledem k tomu, že metabolom je úzce spojen s fenotypem organismu a složení metabolomu je ovlivněno environmentálními i genetickými faktory, může být metabolomika vnímána jako most mezi genotypem a fenotypem. (Muthubarathi et al. 2021)

Fekální metabolom je jen mírně ovlivněn genetikou hostitele, dědičnost se pohybuje okolo 18 %. (Zierer et al. 2018) Metabolické profily stolice odrážejí složení střevního mikrobiomu a aktivitu jednotlivých mikroorganismů, složení metabolomu stolice vysvětluje

v průměru 68 % variace mikrobioty. Nicméně tato souvislost není postavena pouze na produkci konkrétního metabolitu konkrétním mikrobiálním druhem. To popisuje termín „cross-feeding“, kdy jeden mikrobiální druh produkuje metabolity, které může využít jak produkující organismus, tak ale i další mikroorganismy v prostředí. (Seth & Taga 2014) Například přítomnost *Lactobacillus helveticus* byla spojena se zvýšenými hladinami butyrátu a laktátu. Nicméně tato bakterie je striktně homofermentativní a může produkovat laktát jako výsledný produkt fermentace sacharidů, není ale producentem butyrátu. Korelace s butyrátem tudíž naznačuje právě výše zmíněný cross-feeding, kdy laktát produkovaný *Lactobacillus helveticus* může být využitý bakteriemi produkujícími butyrát. V lidském střevě by se to týkalo například *Eubacterium hallii* či *Anaerostipes caccae*. (Le Roy et al. 2015) Zároveň různé aminokyseliny využívané anaerobními bakteriemi mohou být metabolizovány na SCFAs. Glycin, threonin, glutamát, lysin, ornitin a aspartát jsou metabolizovány na acetát. Dále pak threonin, glutamát a lysin mohou být využity pro syntézu butyrátu a propionát je produkován hlavně z threoninu. Threonin je ale označován za všestrannou aminokyselinu, neboť může být využit k syntéze všech SCFAs. (Neis et al. 2015)

Mezi hlavní metabolity střevního mikrobiomu patří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, propionát, butyrát), rozvětvené mastné kyseliny (izovalerát, izobutyřát), aminokyseliny (valin, leucin, izoleucin, tyrosin, fenylalanin), alkoholy, biogenní aminy (trimethylamin, dimethylamin), organické kyseliny (sukcinát, fumarát), sacharidy (glukóza), sloučeniny obsahující síru, fenoly a indoly. (Lamichhane et al. 2015; Ganobis et al. 2020) Hlavními metabolity vznikajícími při katabolismu sacharidů jsou SCFAs, na rozdíl od toho trávení proteinů vede k větší diverzitě konečných produktů, včetně aminů, fenolů, indolů, thiolů, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, a H<sub>2</sub>S, z nichž mnohé mají toxické vlastnosti. (Macfarlane & Macfarlane 2012)

Ve studii zkoumající faktory ovlivňující metabolom stolice byli účastníci rozděleni na skupinu mladých (n = 40) a starších (n = 165) jedinců, přičemž jedincům v mladší skupině bylo 18 let a ve starší 65-80 let. Analýza pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie ukázala, že nejvýznamnější roli ve složení metabolomu hraje věk, přičemž SCFAs se ve výrazně vyšších koncentracích vyskytovaly u mladších osob v porovnání se staršími, kde naopak stoupla koncentrace aminokyselin. Zdá se, že hladiny lysinu a kyseliny glutamové jsou specifické pro mužské pohlaví a jejich koncentrace je závislá na věku jedince. (Cui et al. 2021)

### 3.1.2 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

Zdá se, že z metabolitů jsou naprosto klíčové SCFAs, které jsou nezbytné pro udržení integrity střeva. SCFAs jsou hlavními metabolity vznikajícími při fermentaci sacharidů, nicméně v menší míře jsou produkovány i při katabolismu bílkovin. Většina SCFAs (více než 95 %) je absorbována ze střeva a metabolizována v různých tkáních těla, což přispívá relativně malým, ale významným způsobem k denním energetickým potřebám organismu. Fermentace sacharidů je prospěšným procesem, neboť růst sacharolytických bakterií stimuluje požadavky na toxické produkty spojené s hnilobnými procesy, čímž chrání hostitele. (Macfarlane & Macfarlane 2012) Poměr produkce acetátu, propionátu a butyrátu je v molárním poměru přibližně 60 : 20 : 20, přičemž produkce těchto mastných kyselin je nejvyšší v proximálním tlustém střevě a distálním směrem klesá zhruba na polovinu, neboť v průběhu pohybu tráveniny střevem se sacharidy vyčerpávají. To může být spojeno se zvýšeným

výskytem střevních onemocnění v distálním střevě. (Macfarlane & Macfarlane 2012; Sales & Reimer 2023) Přehled jednotlivých bakteriálních druhů a SCFAs, které produkují, je znázorněn v Tabulce č. 2

Tabulka č. 2 Přehled SCFAs produkovaných hlavními skupinami fermentativních mikroorganismů

<b>Mikroorganismy produkující acetát</b>	<b>Mikroorganismy produkující propionát</b>	<b>Mikroorganismy produkující butyrát</b>
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Roseburia</i>
<i>Bifidobacteria</i>	<i>Propionibacteria</i>	<i>Faecalibacteria</i>
<i>Eubacteria</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Clostridia</i>
<i>Lactobacilli</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacteria</i>
<i>Clostridia</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Fusobacteria</i>
<i>Ruminococci</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Peptostreptococci</i>
<i>Peptostreptococci</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Butyrivibrio</i>
<i>Propionibacteria</i>		<i>Peptococci</i>
<i>Veillonella</i>		
<i>Fusobacteria</i>		
<i>Butyrivibrio</i>		
<i>Peptococci</i>		
<i>Streptococci</i>		
<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Atopobium</i>		
<i>Enterococci</i>		

Tabulka vypracována podle Macfarlane & Macfarlane (2012)

Butyrát je hlavním zdrojem energie pro kolonocyty v tlustém střevě, reguluje růst a diferenciaci buněk. Epiteliální buňky v distálním tlustém střevě získávají 60–70 % své energie z butyrátu, který je metabolizován na CO<sub>2</sub> a ketony, které slouží jako prekurzory pro syntézu lipidů ve sliznici. (Macfarlane & Macfarlane 2012) Butyrát také může zprostředkovat apoptózu nádorových buněk tlustého střeva a aktivovat intestinální glukoneogenezi, což má příznivé účinky na homeostázu glukózy. Zároveň je nezbytný pro spotřebu velkého množství kyslíku epitelovými buňkami prostřednictvím  $\beta$ -oxidace, čímž díky hypoxii udržuje rovnováhu kyslíku ve střevech a zabraňuje tak dysbióze. (Valdes et al. 2018) Acetát a propionát jsou též využívány kolonocyty, ale oxidují v mnohem menší míře než butyrát. (Sales & Reimer 2023) Propionát vstupuje portální žilou do jater, kde reguluje glukoneogenezi a podílí se na signálech sytosti díky interakci s receptory mastných kyselin ve střevech. Acetát je nejhojnější SCFAs, jež je zásadním metabolitem pro růst jiných bakterií. V periferních tkáních je využíván v metabolismu cholesterolu a lipogenezi a může hrát významnou roli v centrální regulaci chuti k jídlu. (Valdes et al. 2018; Sales & Reimer 2023)

SCFAs také podporují uvolňování serotoninu, klíčového regulátoru pohyblivosti GIT a jeho sekrece. To naznačuje roli mikrobioty v ose střevo-mozek, kdy zapojení do sekrece anorexigenních hormonů ovlivňuje chuť k jídlu a příjem potravy. (Codella et al. 2018)

## 3.2 Vliv věku, stravy a životního stylu na střevní mikrobiotu

Lze tvrdit, že lidský organismus hostí 2 genomy – jeden je zděděný genom po rodičích jedince, který zůstává během celého života téměř stabilní, zatímco získaný genom (mikrobiom) je extrémně dynamický a může být ovlivněn řadou faktorů, mezi něž patří věk, strava, hormonální cykly, cestování, lékové intervence či onemocnění. (D'Argenio & Salvatore 2015)

### 3.2.1 Změny mikrobioty v průběhu života

Počáteční vývoj střevní mikrobioty probíhá během prvních 3 let života, kdy má na osídlení střeva mikroorganismy vliv například způsob porodu, expozice léčivům s antibiotickým účinkem či složení kojenecké a dětské výživy. Přestože složení střevní mikrobioty zůstává od tohoto věku relativně stabilní, environmentální faktory včetně stresu, stravy či fyzické aktivity může ovlivnit složení mikrobioty a způsobit eubiotický či dysbiotický stav. (Sales & Reimer 2023) Napříč stárnoucí populací lze pozorovat vzorec, kdy s věkem dochází k úbytku rodů *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* a *Clostridium XIV*. Množství koliformních bakterií, *Clostridium perfringens*, enterokoků, streptokoků, stafylokoků a *Enterobacteriaceae* se naopak zvyšuje. Tyto dvě skutečnosti vedou ve stáří ke snížené produkci SCFAs a snížení sacharolytické funkce střevní mikrobioty. (Arnold et al. 2021) Přehled nejdůležitějších změn v mikrobiotě v průběhu života lze nalézt v Tabulce č. 3.

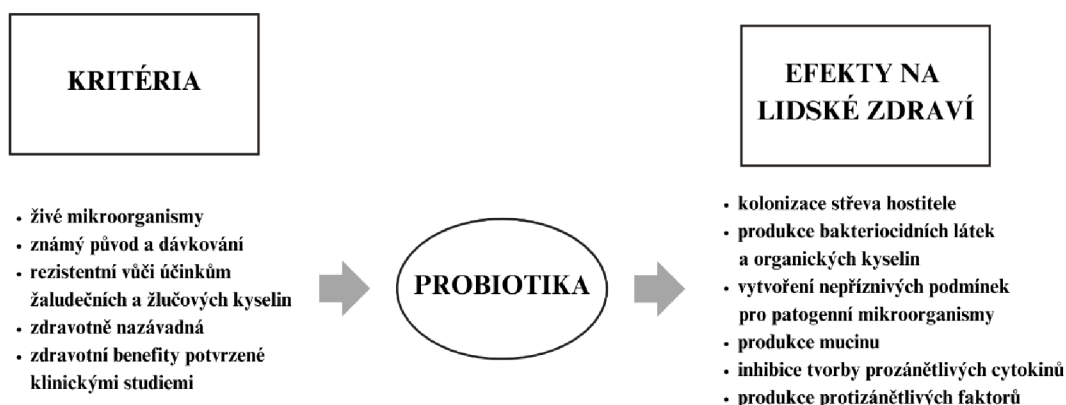
Tabulka č. 3 Změny střevní mikrobioty v průběhu života

Definice jedince	Nejvíce zastoupené kmeny (od nejvíce po méně zastoupené)	Faktory ovlivňující složení
Děti do 2–3 let	<i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i>	Způsob porodu (vaginální nebo císařským řezem), gestační věk, hospitalizace v dětském věku, doba kojení, doba zavádění příkrmů, malnutrice, antibiotická léčba
Dospělí	<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i>	Výživa, hormonální cykly, cestování, terapeutické zásahy, onemocnění
Senioři starší 70 let	<i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Proteobacteria</i>	Změny životního stylu a změna stravovacích návyků, zvýšená náchylnost k infekcím a zánětlivým onemocněním, užívání léků

Tabulka vypracována podle D'Argenio & Salvatore (2015)

### 3.2.2 Probiotika

Jednou z možností, jak ovlivnit složení střevní mikrobioty, jsou probiotika. Ta jsou dle nejnovějšího stanoviska Mezinárodní vědecké asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) z roku 2014 definována jako živé organismy, které v adekvátním množství poskytují zdravotní přínos hostiteli. Probiotika se na trh dodávají jako doplňky stravy nebo fermentované produkty s ověřeným probiotickým statutem a musí splňovat přísná kritéria. Podmínky pro schválení probiotického produktu a hlavní zdravotní přínosy probiotik jsou znázorněny v Obrázku č. 1. (Kocot et al. 2022)



Obrázek č. 1 Podmínky pro schválení probiotik a hlavní zdravotní přínosy – vypracován podle Kocot et al. (2022)

Vědecké důkazy naznačují, že probiotika mohou hrát klíčovou roli v zachování funkce střevní bariéry a ve snižování zánětlivých procesů. Hlavními zkoumanými skupinami probiotik jsou bakterie mléčného kvašení (zejm. *Lactobacillus*), bifidobakterie a *Saccharomyces boulardii*. (Kocot et al. 2022)

Modulace složení, funkčnosti či stability střevní mikrobioty je považována za preventivní přístup v rozvoji obezity a metabolického syndromu. Na vliv suplementace probiotik na změny související s hmotností se zaměřila dvojité zaslepená a placebem kontrolovaná studie 220 účastníků s nadváhou či obezitou. Probiotikum Lab4p, složené z *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* a *Lactobacillus plantarum*, bylo podáváno po dobu 6 měsíců. Výsledky byly velmi překvapivé, neboť došlo k redukci hmotnosti bez současného povinného zavedení redukční diety či fyzické aktivity. Spolu s redukcí hmotnosti došlo i ke snížení obvodu pasu, významnému snížení systolického krevního tlaku a u skupin s hypercholesterolemií i ke snížení hladin LDL-cholesterolu (low density lipoprotein, označení pro cholesterol s nízkou hustotou). Užívání probiotik zároveň vedlo ke snížení incidence infekcí horních cest dýchacích a ke zlepšení celkového životního stylu. První prokazatelné změny v reakci na suplementaci byly pozorovatelné až po 3 měsících, což naznačuje, že je nutná dlouhodobá suplementace. (Michael et al. 2020)

Vliv probiotik byl zkoumán i ve dvojité zaslepené klinické studii kontrolované placebem, kdy byl podáván probiotický druh *Lactobacillus rhamnosus GG* 141 dětem

se syndromem dráždivého tračníku během 8týdenní intervence. Výsledkem bylo signifikantní snížení bolestí břicha a snížení četnosti abnormálních nálezů střevní permeability. Přestože nebyla provedena analýza střevního mikrobiomu, tudíž nelze potvrdit či vyvrátit změnu bakteriálního osídlení GIT, je zřejmé, že suplementace probiotických kmenů může zlepšit střevní integritu a snížit projevy tohoto onemocnění. (Francavilla et al. 2010)

Ve srovnání s placebem bylo též u 10 zdravých dobrovolníků ve dvojitě zaslepené studii zjištěno, že na úrovni genové transkripce byla po 7denní intervenci probiotickými druhy *Lactobacillus plantare* zvýšena transkripce genů souvisejících s opravnými procesy porušené střevní bariéry po farmakologické zátěži. (Mujagic et al. 2017)

V třítydenní randomizované dvojitě zaslepené placebem kontrolované studii byl zkoumán vliv konzumace probiotického sýra na příznaky metabolického syndromu. Subjekty (n = 25) přijímaly po dobu intervence denně 1500 kcal a kus sýra obsahujícího *Lactobacillus plantarum TENSIA*. Kontrolní skupina s 15 jedinci měla stejný kalorický příjem, ale konzumovala sýr bez probiotické kultury. Výsledky ukázaly, že v probiotické skupině došlo k významnému snížení body mass indexu (BMI) ve srovnání s kontrolní skupinou. Zároveň došlo i k úpravám krevního tlaku. Závěrem studie tedy bylo, že hypokalorická dieta doplněná o probiotický sýr může pomoci zmírnit příznaky metabolického syndromu. (Sharafedinov et al. 2013)

### 3.2.3 Fermentované produkty

Fermentované potraviny jsou definovány jako potraviny nebo nápoje vyrobené kontrolovaným růstem mikroorganismů a přeměnou složek potravin jejich enzymatickou aktivitou. Zpravidla obsahují probiotické organismy v koncentracích nejméně  $10^6$  mikrobiálních buněk na gram. Tyto potraviny zaznamenaly v posledních letech nárůst popularity, především kvůli potenciálním zdravotním přínosům.

Přestože osídlení gastrointestinálního traktu mikroorganismy pocházejícími z fermentovaných potravin bývá přechodná, stále mají potenciál prokázat fyziologický přínos prostřednictvím konkurence s patogenními bakteriemi či produkce imunoregulačních a neurogenních vedlejších produktů. Příklady jednotlivých potravin včetně mikroorganismů, které obsahují, jsou uvedeny v Tabulce č. 4. (Dimidi et al. 2019)



Tabulka č. 4 Příklady fermentovaných potravin a mikroorganismů v nich obsažených

Potravina	Popis	Příklady mikroorganismů, které se v potravíně nachází
Kefir	Fermentovaný mléčný nápoj	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i>
Kombucha	Fermentovaný čajový nápoj	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>acetobacter pasteurianus</i> , <i>Actetobacter aceti</i>
Kysané zelí	Fermentované zelí	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Citrobacter freundii</i>
Tempeh	Fermentované vařené a loupané sójové boby	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Mucor indicus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichosporon beigeli</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>
Miso	Fermentovaná sójová pasta	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> , <i>Staphylococcus kloosii</i> , <i>Lactococcus spp.</i>
Kimchi	Fermentovaná zelenina	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Weissella koreensis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>

Tabulka vypracována podle Dimidi et al. (2019)

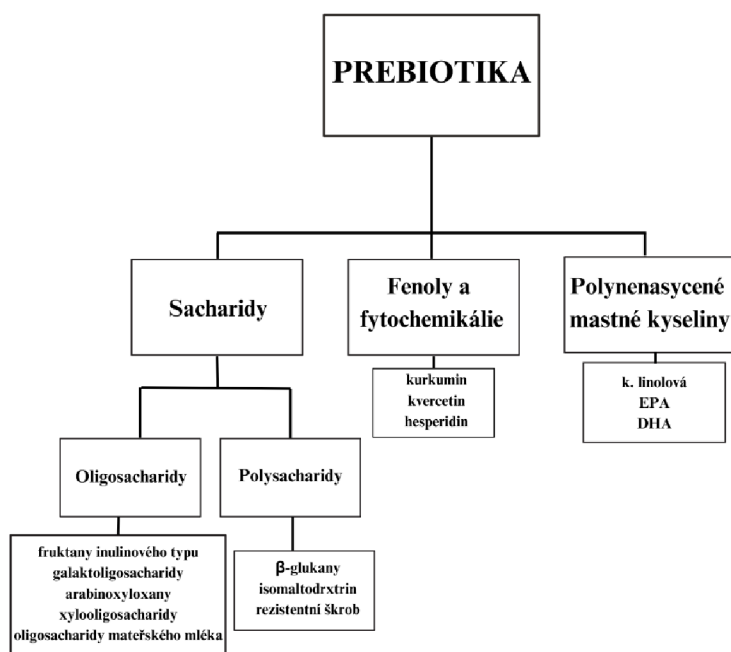
Nejčastěji zkoumanou fermentovanou potravinu v souvislosti s jejím dopadem na zdraví gastrointestinálního traktu u lidí je kefir. Jedná se o fermentovaný mléčný nápoj obsahující širokou škálu mikrobiálních druhů, vedle bakterií mléčného kvašení lze v nápoji identifikovat i symbiotické kmeny kvasinek. (Dimidi et al. 2019) Díky obsahu bakterií exprimujících beta-galaktosidázu je v kefiru nižší množství laktózy než např. v mléce (až o 30 %), takže je oproti jiným mléčným výrobkům relativně dobře snášen i u osob se sníženou tolerancí laktózy. (Hertzler & Clancy 2003) Zároveň existují důkazy o tom, že kefir může modifikovat střevní mikrobiotu a jeho pravidelná konzumace může zlepšit kvalitu života a zmírnit příznaky onemocnění u osob trpících nespecifickými střevními záněty. (Ilmaz et al. 2020) Pilotní studie z roku 2014 zkoumala u 20 osob trpících chronickou zácpou vliv konzumace 500 ml kefiru denně po dobu 4 týdnů. Intervence vedla ke zvýšené frekvenci defekace, zlepšení konzistence stolice a snížení spotřeby projímadel. (Turan et al. 2015)

Kysané zelí se vyrábí smícháním nasekaného zelí s 2,3–3 % soli. Směs se nechá spontánně fermentovat, na čemž se obvykle podílí bakterie rodu *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Pediococcus*. (Dimidi et al. 2019) V randomizované dvojité zaslepené studii zkoumající vliv konzumace kysaného zelí na projevy onemocnění u pacientů se syndromem dráždivého tračníku bylo 34 účastníkům studie podáváno po dobu 6 týdnů buď pasterizované nebo nepasterizované kysané zelí. U obou skupin došlo k výraznému zmírnění příznaků onemocnění a změně střevní mikrobioty, která však nebyla statisticky významná. Zajímavé bylo zjištění, že nedocházelo k výrazným rozdílům mezi skupinami, což může znamenat,

že pozitivní vliv kysaného zelí nespočívá ani tolik v obsažených mikroorganismech, jako v prebiotických složkách obsažených v zelí. (Nielsen et al. 2018)

### 3.2.4 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako substrát, který je selektivně využíván mikroorganismy hostitele, přinášející zdravotní přínos. Původně byly do skupiny prebiotik zařazeny především látky sacharidového typu, nicméně současná definice se rozšiřuje i na polyfenoly a polynenasycené mastné kyseliny. (Kocot et al. 2022) Přehled prebiotik je znázorněn na Obrázku č. 2.



Obrázek č. 2 Schéma rozdělení prebiotik – vypracováno podle Kocot et al. (2022)

Funkce prebiotik spočívá především ve stimulaci růstu rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* v tlustém střevě, čímž mohou přispívat k vyvážení či obnově střevní mikrobioty. (Kocot et al. 2022) To bylo potvrzeno i ve dvojité zaslepené placebem kontrolované studii, kdy se dětem s diabetes mellitus 1. typu podávala oligofruktóza a po 12týdenní intervenci došlo u prebiotické skupiny k výraznému nárůstu zastoupení bifidobakterií ve střevní mikrobiotě, což s sebou přineslo i pozitivní vliv na střevní bariéru. (Ho et al. 2019) Ke zvýšení podílu rodu *Bifidobacteria* ve střevní mikrobiotě došlo i při 6týdenní intervenci 10 g inulinu denně u pacientů s prediabetem v placebem kontrolované studii z roku 2021. (Mitchell et al. 2021)

Další známým prebioticky působícím sacharidem je β-glukan, který se nachází například v ovsu či ječmeni. Ve studii s 18 seniory trpícími zažívacími obtížemi a 21 mladými zdravými osobami došlo po zvýšení příjmu β-glukanů ve stravě ke snížení střevní propustnosti, což naznačuje možnost využití těchto prebiotik ve zmírnění příznaků průjmu či zácpy u starších osob. (Ganda Mall et al. 2018) Vliv β-glukanů byl zkoumán také během 3týdenní intervence s křížovým designem, kdy mladí zdraví dospělí přijímali β-glukany z ovsu, z ječmene anebo byli v kontrolní skupině bez navýšení obsahu vlákniny ve stravě. Výsledkem bylo,

že reakce na příjem  $\beta$ -glukanů se vyznačují značnou interindividuální variabilitou a také existují významné rozdíly mezi pohlavími. U metabolomu se efekt projevil pouze u několika metabolitů, jako byl butyrát, palmitát, kyselina linolová a kyselina eikosapentaenová. (Trimigno et al. 2017)

Polyfenoly jsou bioaktivní sloučeniny hojně rozšířeny například v ovoci či zelenině, kde plní funkci sekundárních metabolitů. Vzhledem k tomu, že tyto látky jsou fermentovány střevní mikrobiotou a mohou též ovlivnit její kompozici, jsou zařazeny mezi prebiotika. (Guglielmetti et al. 2020) Jejich vliv byl zkoumán například v zaslepené studii s cross-over designem, která se snažila otestovat hypotézu, že dieta bohatá na polyfenoly může snížit hladiny sérového zonulinu (nepřímého markeru propustnosti střevní stěny) a zároveň prospěšně modifikovat střevní mikrobiotu a s tím související biochemické markery. Senioři (n = 51) konzumovalo po dobu 8 týdnů dietu, která byla navýšena o 3 porce potravin bohatých na polyfenoly denně – jednalo se například o bobuloviny, jablka, granátová jablka či pomeranč. Po intervenci bylo pozorováno výrazné zvýšení čeledi *Ruminococcaceae* a *Faecalibacterium*, což jsou bakterie fermentující vlákninu a zároveň produkující SCFAs. Také došlo ke snížení hladin sérového zonulinu a snížení krevního tlaku. (Del Bo' et al. 2021)

Polynenasycené mastné kyseliny jsou zatím společností ISAPP označovány jako „kandidáti na prebiotika“, přičemž nejvíce se diskutuje o kyselině eikosapentaenové, dokosahexaenové a linolové. (Kocot et al. 2022) Mikrobiální druhy, které se zdají být podporovány zvýšeným příjmem omega-3 mastných kyselin, jsou například *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Lachnospiraceae*, *Bifidobacteria* a *Enterobacteriaceae*. Ty díky produkci SCFAs (zejm. butyrátu) přispívají ke snížení zánětu a endotoxémie. Nicméně silné důkazy pro modulaci střevní mikrobioty u lidí nejsou zatím dostatečné a je zapotřebí více kvalitních studií na toto téma. (Durkin et al. 2021)

### 3.2.5 Antibiotika a další vybrané léky

Nejvíce diskutovanou skupinou léčiv v souvislosti se střevní mikrobiotou jsou antibiotika, která jsou základem medicíny již 70 let a používají se v obrovském měřítku. Přestože jsou odborníky vnímána jako bezpečná, jejich užívání nese rizika, která jsou často podceňována. Bylo zjištěno, že tyto léky mění taxonomickou, genomovou a funkční kapacitu lidského střevního mikrobiomu, přičemž tyto účinky mohou být trvalé. Širokospektrá antibiotika snižují bakteriální diverzitu a negativně ovlivňují množství symbiotických kmenů. Zvláště se diskutuje o užívání antibiotik u malých dětí, u kterých je v prvních 2 letech života preskripce antibiotické léčby nejintenzivnější a u kterých může raná a častá expozice těmto léčivům vést k dlouhodobým negativním dopadům na zdraví. Jedná se například o ovlivnění metabolismu a vývoje a vlivu na rozvoj obezity, diabetu či astmatu. (Modi et al. 2014; Blaser et al. 2016 &)

Dále se zdá, že užívání antibiotik matkou může ovlivnit dítě již v prenatálním věku. V populační studii bylo v letech 2009–2011 sledováno 397 těhotných žen. Výsledky ukázaly, že expozice antibiotikům během těhotenství vedla k nižší porodní hmotnosti o 138 g ve srovnání s rodičkami, které antibiotika v průběhu těhotenství neužívaly. Asociace byla nejsilnější u novorozenců žen, které užívaly jiná antibiotika než penicilin. Nízká porodní hmotnost je spojena s běžnými onemocněními dospělého věku včetně obezity, kardiovaskulárních

onemocnění, diabetes mellitus 2. typu a některých druhů nádorových onemocnění. Vzhledem k těmto výsledkům je tedy na místě pečlivě zvážit preskripci antibiotik těhotným ženám z hlediska prevence rozvoje civilizačních onemocnění. (Vidal et al. 2013)

Vliv antibiotik na novorozence, kojence a batolata zkoumala kohortová studie zhruba 12 tisíc finských dětí, u kterých se zaměřila na výšku, hmotnost a užívání léků od narození do 24 měsíců věku. Statistické výsledky poukázaly na fakt, že děti exponované antibiotikům měly vyšší body mass index (BMI) než děti, které neužívaly antibiotika, přičemž účinek byl vyšší při vystavení makrolidovým antibiotikům před 6. měsícem věku anebo při opakované expozici. Tyto účinky mohou hrát roli v celosvětové epidemii obezity u dětí a zdůrazňují uvážlivé užívání antibiotické léčby u novorozenců, kojenců a batolat s preferencí antibiotik s úzkým spektrem. (Saari et al. 2015)

Přehled z roku 2022 došel z dosavadních poznatků k závěru, že po léčbě chinolony a metronidazolem dochází ke konzistentním prokazatelným změnám v mikrobiotě a při kombinované léčbě dochází k dlouhodobé dysbióze. (Nel Van Zyl et al. 2022) V randomizované, dvojitě zaslepené a placebem kontrolované studii 57 obézních prediabetických mužů byl zkoumán vliv krátkodobé antibiotické intervence na obezitu a inzulínovou senzitivitu. Účastníci byli rozdělení do 3 skupin a po dobu 7 dnů užívali buď amoxicilin, vankomycin nebo placebo. Po 7 dnech došlo u vankomycinové skupiny ke snížení bakteriální diverzity a redukci rodu *Firmicutes*, který je zapojen do metabolismu SCFAs a žlučových kyselin, což vedlo ke změně koncentraci metabolitů v plazmě a ve stolici. Přestože mikrobiota byla alterována ještě 8 týdnů po ukončení intervence, nedošlo ke změně tkáňové citlivosti na inzulín, metabolismu jednotlivých substrátů, velikosti adipocytů ani změně hladin postprandiálních hormonů a systémového zánětu. Tento výzkum naznačuje, že by krátkodobá antibiotická léčba u obézních jedinců nemusela mít významný klinický dopad na metabolické zdraví. (Reijnders et al. 2016)

Inhibitory protonové pumpy jsou léky, které se předepisují k potlačení produkce kyseliny chlorovodíkové v žaludku a k léčbě dalších poruch GIT (peptické vředy, reflux...). Jsou považovány za léky s nízkým rizikem a častokrát jsou užívány nadměrně. Náznaky studií, že tyto léky mohou negativně ovlivnit střevní mikrobiotu, byly ověřeny při analýze 1827 vzorků stolice zdravých dvojčat. Výsledky ukázaly výrazně nižší zastoupení kmenů komenzálních bakterií ve střevě a signifikantně nižší diverzitu mikrobioty. Zároveň studie poukazovala na vyšší mikrobiální osídlení dutiny ústní a horní části GIT, přičemž obě změny jsou nejspíš důsledkem odstranění žaludeční bariéry s nízkým pH. Ovlivnění mikrobioty užíváním těchto léků je tedy významné a lékaři by se měli vyvarovat nadměrného doporučení a předepisování inhibitorů protonové pumpy. (Jackson et al. 2016)

Nesteroidní antirevmatika (NSAID), hojně užívaná léčiva po celém světě, jsou též velkým stresorem a mohou výrazně zvýšit střevní permeabilitu. Velmi často je užívána například kyselina acetylsalicylová jakožto lék pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění u starších osob, což může indukovat gastrointestinální potíže u seniorů. (Ganda Mall et al. 2018) Byl zkoumán i vliv konzumace probiotických kmenů nasnížení dopadu konzumace těchto léků na střevní bariéru, nicméně u 10 zdravých dobrovolníků po 1denní intervenci indomethacinu a následném 7denním užívání probiotických druhů *Lactobacillus plantarum* nedošlo k signifikantnímu zlepšení střevní propustnosti. (Mujagic et al. 2017)

### 3.2.6 Mikrobiom a životní styl

Výzkumy ukázaly, že pravidelná fyzická aktivita má pozitivní vliv na střevní mikrobiotu – může zvyšovat diverzitu střevní mikrobioty prostřednictvím několika mechanismů, včetně podpory protizánětlivého stavu. Vztah mezi mikrobiotou a pohybem je však obousměrný a eubióza může významným způsobem podpořit sportovní výkon. (Codella et al. 2018; Sales & Reimer 2023)

Analýza střevní mikrobioty 39 zdravých jedinců s podobným věkem, BMI, stravovacími návyky, ale rozdílnou kardiorespirační zdatností ukázala, že kardiorespirační zdatnost pozitivně koreluje se zvýšenou diverzitou střevní mikrobioty. Zároveň se v mikrobiomu zvýšil počet genů souvisejících s produkcí SCFAs (zejm. butyrátu), což je spojeno s celkovým zdravím hostitele. To podporuje důležitost oficiálních doporučení pro zařazení fyzické aktivity jako podpůrného opatření při prevenci mnoha onemocnění. (Estaki et al. 2016)

Observační studie z roku 2019 však přinesal zcela nový pohled na ovlivnění složení mikrobioty fyzickou aktivitou a stravou uzpůsobenou potřebám sportovce. Nutriční doporučení pro výkonnostní sportovce totiž zahrnují omezení příjmu vlákniny jako prevenci gastrointestinálních potíží při výkonu, což ovšem může vést ke snížení diverzity mikrobioty. Navíc sportovci obvykle konzumují více živočišných bílkovin, aby pokryli potřeby pro hypertrofii a regeneraci svalové tkáně. Dalším potenciálně negativním vlivem může být i redistribuce krve během intenzivního cvičení, kdy se krev přesouvá od vnitřních orgánů do svalů, přičemž hypoperfuze spojená s ischemií a následná reperfuze může též negativně ovlivnit činnost střevní mikrobioty. Ve studii byla porovnávána mikrobiota 15 kulturistů, 15 elitních vytrvalostních běžců a 15 mužů se sedavým životním stylem. Ukázalo se, že typ fyzické aktivity souvisel s určitými dietními vzorci, kdy kulturisté konzumovali stravu s vysokým obsahem bílkovin a tuků a nízkým obsahem sacharidů a vlákniny a vytrvalostní sportovci se vyznačovali nízkou konzumací sacharidů a vlákniny. Přestože výsledky neprokázaly vliv na diverzitu střevní mikrobioty v závislosti na druhu sportu (mikrobiota byla alterovaná u všech atletů), byly patrné rozdíly v relativním zastoupení rodů a druhů. *Faecalibacterium*, *Sutterella*, *Clostridium*, *Haemophilus* a *Eisenbergiella* byly nejvyšší u kulturistů, zatímco *Bifidobacterium* a *Parasutterella* byly nejnižší. Na úrovni druhu byly střevní bakterie užívané jako probiotika (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* a skupina *Lactobacillus sakei*) a bakterie produkující SCFAs (*Blautia wexlerae*, *Eubacterium hallii*) nejnižší u kulturistů a nejvyšší u kontrol. Výsledky naznačují, že strava

s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem sacharidů může mít negativní dopad na diverzitu střevní mikrobioty prokazující se výrazným poklesem komenzálních bakterií produkujících SCFAs. (Jang et al. 2019)

Z pohledu stravy nedávná studie ukázala, že významnou roli v metabolomu stolice hraje obsah tuků ve stravě, který významně reguluje obsah SCFAs a aminokyselin ve stolici. Zároveň bylo na vzorcích stolice od 205 účastníků zjištěno, že obsah aminokyselin ve stolici je citlivější na příjem stravy u žen, naopak u mužů docházelo k větší interakci se SCFAs. V této studii se také ukázala slabá korelace s příjmem sacharidů a hladinami kyseliny valerové a izovalerové u žen. U mužů, kteří konzumovali méně bílkovin, byly v metabolomu vyšší hladiny kyseliny izovalerové a propionové, což potvrzuje vliv rozložení makronutrientů ve stravě na střevní mikrobiotu a tím i metabolismus jednotlivých živin. Závěrem studie bylo tvrzení, že veškeré studie zkoumající vliv stravy na střevní mikrobiotu by měly být hodnoceny v souvislosti s věkem a pohlavím účastníků. (Cui et al. 2021)

Z hlediska mikrobioty jsou ze sacharidů zásadní především fermentovatelné sacharidy a vláknina. S redukcí sacharidů ve stravě klesá zastoupení *Faecalibacterium prausnitzii*. Role fermentovatelných sacharidů byla shrnuta v kapitole 3.2.4. Prebiotika, nicméně souhrnně lze říci, že vláknina a její různé typy mají zásadní vliv na střevní mikrobiotu tím, že se stávají substráty pro fermentaci a produkci SCFAs v tlustém střevě. Změny ve stravě v podobě konzumace rozličných typů vlákniny mohou vést k ovlivnění střevní mikrobioty i jednotlivých metabolických produktů. (Maukonen & Saarela 2015)

Bílkoviny jsou ve střevě metabolizovány pomocí několika mechanismů. Kromě SCFAs mohou být z aminokyselin tvořeny také rozvětvené mastné kyseliny a aromatické sloučeniny, konkrétně fenol, indol, a řada dalších sloučenin odvozených od fenylyalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Mnoho metabolitů produkovaných fermentací aminokyselin je pro hostitele škodlivých a některé sloučeniny jsou dokonce označovány jako karcinogenní. Strava bohatá na bílkoviny, a naopak chudá na sacharidy může negativně ovlivnit střevní mikrobiotu a způsobit dysbiózu. (Maukonen & Saarela 2015) Vzhledem k tomu, že tento typ diet je velmi oblíben při redukci hmotnosti, více se na její vliv na střevní mikrobiom zaměřila klinická studie 17 obézních mužů. Účastníkům byla nejprve podávána po dobu 7 dnů definovaná dieta pro udržení hmotnosti s klasickým trojpoměrem živin, následovaly 4 týdny diety s vysokým obsahem bílkovin a středním obsahem sacharidů a nakonec 4 týdny diety s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem sacharidů. Vše probíhalo v křížovém designu. Obě diety s omezením sacharidů vedly ke zvýšení podílu rozvětvených mastných kyselin, fenylocetové kyseliny a N-nitrosových sloučenin v metabolomu stolice. Dieta s nízkým obsahem sacharidů také snížila podíl butyrátu, což bylo spojeno se snížením skupin *Roseburia/ Eubacterium rectale*. Výsledky tedy naznačují, že dlouhodobé dodržování takových diet může zvýšit zdravotní rizika spojená s dysbiózou. (Russell et al. 2011)

### 3.3 Mikrobiom a souvislost se zdravím

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli ve fyziologii lidského organismu. Podílí se na trávení polysacharidů, vývoji imunitního systému, obrany proti patogenům, syntéze vitamínů, ukládání tuků, regulaci angiogeneze a vývoji chování. Z tohoto důvodu se o střevní mikrobiotě často hovoří jako o „zapomenutém orgánu“. (D'Argenio & Salvatore 2015)

Výzkumy a pozorování provedená v posledních 20 letech poukazují na možnost ovlivnění rozvoje mnoha civilizačních onemocnění právě složením střevního mikrobiomu. Je sice pravda, že složení mikrobioty i význam jednotlivých mikrobiálních aktivit se individuálně velmi liší, s největší pravděpodobností se ale složení střevního mikrobiomu podílí na patogenezi mnoha chronických onemocnění (např. obezity, diabetes mellitus 2. typu, nealkoholické steatózy jater), kardiovaskulárních a autoimunitních onemocnění a má vliv i na řadu nádorových, neurologických a psychiatrických onemocnění. Tato onemocnění mají vesměs společného jmenovatele – sníženou diverzitu, zvýšené zastoupení fakultativních taxonů (např. *Enterobacteriaceae*) a nižší produkci zdraví prospěšných látek.

Nicméně to, zda se alterovaná mikrobiota přímo podílí na vzniku onemocnění anebo je jen sekundárním jevem, je stále předmětem výzkumů a četných diskuzí mezi odborníky. (Le Chatelier et al. 2013; Lynch & Pedersen 2016; Fan & Pedersen 2021)

### 3.3.1 Definice metabolického syndromu

Metabolický syndrom je soubor civilizačních onemocnění výrazně zvyšujících úmrtnost ve vyspělých zemích. Hlavními rysy metabolického syndromu jsou aterogenní dyslipidemie, prozánětlivý a protrombotický stav, inzulinová rezistence, hypertenze a abdominální obezita. Se syndromem mohou být spojeny i další poruchy jako zvýšená mikroalbuminurie, zvýšený fibrinogen, snížená aktivita plasminogenu, zvýšená viskozita krve a zvýšená hladina kyseliny močové. Každá z těchto abnormalit podporuje rozvoj aterosklerózy a výrazně zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Dle diagnostických kritérií Adult Treatment Panel III (ATP III) jsou pro diagnózu metabolického syndromu třeba alespoň 3 z kritérií vyjmenovaných v Tabulce č. 5. (Miccoli et al. 2005)

Tabulka č. 5 Kritéria pro diagnostiku metabolického syndromu

	<b>Muži</b>	<b>Ženy</b>
Obvod pasu (cm)	>102	>88
Triacylglyceroly v krvi (mmol/l)	>1,7 nebo léčba	
HDL cholesterol (mmol/l)	<1,0	<1,3
Krevní tlak (mm Hg)	>130/85 nebo léčba	
Glykémie nalačno (mmol/l)	>5,6 nebo léčba	

Tabulka vypracována podle Rodríguez-Ortiz et al. 2016

Společným jmenovatelem výše zmíněných onemocnění je nízký stupeň chronického zánětu. Ten může být způsoben změnou funkce střevní bariéry, což vede k translokaci bakterií a jejich produktů do organismu a následné endotoxémii vyvolávající zánětlivý stav. (Witkowski et al. 2020; Kocot et al. 2022)

Vlivu konzumace probiotik (a s tím souvisejícím ovlivněním mikrobiomu) na různé aspekty metabolického syndromu se věnovala např. studie s celkem 5 účastníky, kteří byli rozděleni do intervenční a kontrolní skupiny. Probiotická skupina konzumovala po dobu 45 dní 80 ml probiotického mléka obsahujícího v průměru  $3,4 \cdot 10^8$  CFU/ml *Bifidobacterium lactis*. Výsledky ukázaly, že u probiotické skupiny došlo oproti kontrolní k významnému snížení hmotnosti, celkového cholesterolu a low density lipoprotein (LDL) cholesterolu. Kromě toho

byly zaznamenány statisticky významné poklesy prozánětlivých cytokinů – tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-alfa) a interleukinu-6 (IL-6). Tato studie tedy poskytuje poznatky o potenciálním pozitivním vlivu probiotik na redukcii charakteristických parametrů metabolického syndromu a obezity. (Bernini et al. 2016)

### 3.3.2 Mikrobiom a obezita

Počet osob trpících obezitou a s ní souvisejícími komorbiditami neustále stoupá. Tento fakt je následkem především rozšiřujícího se sedavého způsobu života spolu se zvýšenou konzumací energeticky denzitních a nutričně chudých potravin. (Michael et al. 2020)

Přestože obecně lze říci, že mikrobiota u obézního jedince je méně rozmanitá, lze pozorovat také vzorce v relativním zastoupení jednotlivých kmenů. V Tabulce č. 6 je patrné, které kmeny jsou více typické pro obézní jedince a které pro osoby s normální hmotností. (Turnbaugh et al. 2009)

Tabulka č. 6 Kmeny typické pro osoby s obezitou a pro jedince s normální hmotností

<b>Kmeny bakterií typické pro obézní jedince</b>	<b>Kmeny bakterií typické pro štíhlé jedince</b>
<i>Bacteroides</i>	<i>Faecalibacterium</i>
<i>Parabacteroides</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Ruminococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Butyrivibrio</i>
<i>Dialister</i>	<i>Alistipes</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>Akkermansia</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Coprococcus</i>
<i>Anaerostipes</i>	<i>Methanobrevibacter</i>

Tabulka vypracována podle Turnbaugh et al. (2009)

Střevní metabolismus má silný vliv na abdominální adipozitu a metabolismus aminokyselin a vitamínů skupiny B může hrát významnou roli v regulaci tělesné hmotnosti a vzniku obezity. (Zierer et al. 2018) Mechanismy spojující střevní mikrobiotu s obezitou zahrnují 3 základní teorie. První je hypotéza skladování energie, která předpokládá, že různé druhy mikroorganismů mají rozdílnou kapacitu pro získání energie z potravy a její skladování v tukové tkáni. Například *Firmicutes* fermentují polysacharidy na SCFAs – vysoké hladiny těchto mastných kyselin spolu s krevní glukózou stimulují tvorbu tuků v játrech a zvyšují i produkci lipoproteinů nízké hustoty. SCFAs též zvyšují aktivitu lipoproteinové lipázy, což podporuje ukládání tuku v tukové tkáni. Druhý mechanismus je spojen s rozpoznávacím receptorem TLR5. Zvýšený počet patogenních bakterií (např. *Clostridium cluster XIV*) a zároveň změněný poměr *Firmicutes* a *Bacteroidetes* může vyvolat translokaci bakterií, zánět a signalizaci TLR5. S tím souvisí i třetí teorie – hypotéza zánětu. Ta předpokládá, že obezita souvisí s metabolickou endotoxémií a změnou střevní bariéry. Zvýšená střevní propustnost může negativně působit na epitelové membránové receptory a tím měnit senzorké signály komunikující s centrální nervovou soustavou. Tento jev může vést k metabolickým poruchám souvisejícím s obezitou hostitele. (Stephens et al. 2018)



Jedna z největších průřezových studií spojující obezitu s mikrobiomem u lidí analyzovala vzorky stolice 1632 zdravých žen. Výsledky ukázaly, že z 8 hlavních druhů, které souvisí s nárůstem hmotnosti, 7 z nich patří do rodu *Firmicutes*, přičemž mnoho z nich je součástí *Ruminococcaceae*. Dále bylo zjištěno, že diverzita střevního mikrobiomu byla negativně spojena s dlouhodobým přibýváním na hmotnosti, zatímco pozitivně korelovala s příjmem vlákniny, přičemž přínosný účinek vlákniny na hmotnost může být výraznější u jedinců s vyšší diverzitou mikrobiomu. (Menni et al. 2017)

V prospektivní studii trvající 7 let byla zkoumána střevní mikrobiota u 25 dětí s vyšší hmotností či nadváhou v porovnání s 24 dětmi s normální hmotností. Výsledky ukázaly, že počty bifidobakterií ve vzorcích stolice byly v kojeneckém věku vyšší u dětí, které si udržely normální hmotnost oproti těm, které dospěly k nadváze. Mikrobiota dětí s vyšší hmotností také vykazovala jisté abnormality, včetně vyššího zastoupení *Staphylococcus aureus*. Závěrem studie byla tedy teorie, že alterovaná střevní mikrobiota v dětství může vést k vyšší hmotnosti v pozdějším věku, což nabízí nové možnosti pro preventivní a terapeutické přístupy v regulaci hmotnosti. (Kalliomäki et al. 2008)

*Faecalibacterium prausnitzii* je často dávána do souvislosti s obezitou. Analýza vzorků stolice 54 obézních jedinců ve srovnání s 54 jedinci s normální hmotností však nepřinesla signifikantní výsledky v zastoupení tohoto mikroorganismu. Hodnoty u mužů však byly výrazně nižší než u žen a zároveň byla pozorována pozitivní korelace množství *Faecalibacterium prausnitzii* s hladinou glukózy nalačno u mužů (u žen nikoliv). Výsledky naznačují, že v pátrání po souvislostech tohoto organismu s obezitou je třeba zohlednit mimo polohy, etnicity, stravy a tranzitního času i pohlaví zkoumaných subjektů. (Feng et al. 2014)

Zajímavé výsledky přinesl výzkum zabývající se porovnáním mikrobioty po bariatrické operaci. Výzkumný soubor zahrnoval 3 jedince s normální hmotností, 3 pacienty s obezitou 3. stupně a 3 subjekty po operaci žaludečního bypassu. Rod *Firmicutes* byl dominantní u jedinců s normální hmotností a u obézních, nicméně se výrazně snížil u osob po bariatrické operaci, kde se naopak zvýšil výskyt *Gammaproteobacteria*. U obézních jedinců bylo typické vyšší zastoupení vodík produkujících čeledí jako *Prevotellaceae* a metanogenních archeí. Přestože výzkumný soubor byl velmi malý pro ověření tvrzení, výsledky vedou k hypotéze, že změny hmotnosti po bariatrické operaci mohou souviset i se změnami střevního mikrobiomu a může mít dopad na příjem a trávení potravy. (Zhang et al. 2009)

### 3.3.3 Mikrobiom a diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu je chronické metabolické onemocnění projevující se vysokou hladinou glukózy v krvi způsobené buď odolností tělesných tkání vůči působení inzulínu (inzulínová rezistence). Prediabetes je stav definovaný porušenou glukózovou tolerancí, zvýšenou hladinou glukózy v krvi nalačno nebo vyššími hodnotami glykovaného hemoglobinu, ale s hodnotami pod diagnostickými kritérii pro diabetes mellitus 2. typu. U většiny osob trpících prediabetem dochází postupem času k plné manifestaci onemocnění. (Mitchell et al. 2021)

Výsledky studie 36 dospělých mužů, z nichž 18 bylo diagnostikováno s diabetes mellitus 2. typu, poukázala na změny složení střevní mikrobioty související s diabetem. Poměr *Firmicutes* ku *Clostridia* byl u diabetické skupiny výrazně snížený. Zároveň poměry

*Bacteroidetes* k *Firmicutes*, stejně jako poměry *Bacteroides-Prevotella* ke skupině *C. coccoides-E. rectale* významně a pozitivně korelovaly s koncentrací plazmatické glukózy. Zároveň třída *Betaproteobacteria* byla více zastoupena u pacientů s diabetem a pozitivně korelovala s plazmatickou hladinou glukózy. (Larsen et al. 2010) U pacientů s prediabetem či diabetes mellitus 2. typu byly také zaznamenány vyšší hladiny endotoxinu v krvi ve srovnání se zdravými jedinci, což naznačuje zvýšenou střevní propustnost způsobenou dysbiózou. (Mitchell et al. 2021) Všechny tyto důkazy tedy vedou k teorii, zda lze modulací střevní mikrobioty zmírnit projevy diabetes mellitus 2. typu. Dvojitě zaslepená placebem kontrolovaná studie zkoumala vliv inulinu na inzulínovou rezistenci, změnu střevního mikrobiomu, střevní propustnost a koncentraci endotoxinu u 24 osob ohrožených rozvojem diabetes mellitus 2. typu. Intervenční skupina konzumovala po dobu 6 týdnů 10 g inulinu denně. I přes zvýšení podílu bifidobakterií ve střevní mikrobiotě nedošlo ke zlepšení citlivosti tkání na inzulín, přičemž sami autoři diskutují o důležitosti redukce hmotnosti při léčbě prediabetu. (Mitchell et al. 2021)

### 3.3.4 Mikrobiom a vybraná autoimunitní onemocnění

Autoimunitní onemocnění se projevují tak, že imunitní systém nedokáže adekvátně rozpoznat cizí antigeny a napadá i svou vlastní tkáň. Tato onemocnění jsou většinou celoživotní, jejich léčba je nákladná a obtížná. Jedná se například o celiakii, systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritidu, nespecifické střevní záněty, diabetes mellitus 1. typu, astma, autoimunitní thyroitidu, roztroušenou sklerózu a další. Přestože neexistuje jasná patologie vzniku těchto chorob, je jasné, že jejich etiologie je multifaktoriální a alterace střevní mikrobioty hraje v rozvoji velmi významnou roli. (Xu et al. 2022)

U osob trpících autoimunitním onemocněním dochází k identickým vzorcům ve změně střevní mikrobioty. Mění se především poměr *Bacteroides* k *Firmicutes*. Změna v poměru je u jedinců s predispozicí k rozvoji diabetes mellitus 1. typu pozorovatelná již 6 měsíců po narození. Mohlo by se tak jednat o časný diagnostický marker u osob náchylných k rozvoji autoimunitního onemocnění. (Turnbaugh et al. 2009)

Diabetes mellitus I. typu je způsoben autoimunitní reakcí a následnou destrukcí  $\beta$ -buněk slinivky břišní. Sice je geneticky podmíněn genotypem HLA (lidský leukocytární antigen), nicméně hlavní roli v rozvoji tohoto autoimunitního onemocnění hraje prostředí. Významnými činiteli je například kojenecká výživa, virové infekce, strava, ale i typ porodu, kdy u dětí rozených císařským řezem byla prokázána vyšší incidence diabetu 1. typu, nejspíš v souvislosti s alterovanou střevní mikrobiotou. Osoby, u kterých je rozvinutý diabetes 1. typu, mají sníženou diverzitu střevního mikrobiomu až o jednu čtvrtinu. (Turnbaugh et al. 2009)

Podávání prebiotik (např. inulinu nebo oligofruktózy) se ukazuje jako vhodná podpůrná léčba pro pacienty s diabetes mellitus 1. typu. Tato prebiotika zvyšují zastoupení rodu *Bifidobacterium* ve střevní mikrobiotě, přičemž tento rod se vyznačuje významnou produkcí SCFAs, které stimulují sekreci GLP a snižují zánět. V pilotní dvojitě zaslepené placebem kontrolované studii bylo 17 dětem ve věku 8–17 let podáváno prebiotikum po dobu 12 týdnů, kontrolní skupina 21 dětí dostávala placebo. Po intervenci bylo u prebiotické skupiny potvrzeno zvýšené zastoupení rodu *Bifidobacterium*, naopak u druhé skupiny bylo vyšší zastoupení rodů *Streptococcus*, *Roseburia inulinivorans*, *Terrisporobacter* a *Faecalitalea*. Zároveň u probiotické skupiny došlo ke snížení střevní propustnosti, a přestože nedošlo

k významným rozdílům ve frekvenci těžké hypoglykémie nebo diabetické ketoacidózy. Vzhledem ke své cenové dostupnosti a minimálním rizikům lze prebiotika považovat za vhodnou doplňkovou léčbu. (Ho et al. 2019)

Zánětlivá střevní onemocnění zahrnující ulcerózní kolitidu a Crohnovu chorobu se vyznačují chronickým a opakujícím se zánětem gastrointestinálního traktu. Výzkumy ukazují, že střevní mikrobiota hraje v kontextu s nescpecifickými střevními záněty významnou roli, přičemž u ulcerózní kolitidy dochází k poklesu rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, u Crohnovy nemoci klesá zastoupení kmenu *Firmicutes*. V rámci zkoumání ovlivnění střevní mikrobioty konzumací kefíru byla provedena randomizovaná studie s 45 pacienty trpícími zánětlivým střevním onemocněním. Intervenční skupině bylo po dobu 4 týdnů dvakrát denně podáváno 400 ml kefíru. Tato intervence vedla u pacientů s Crohnovou chorobou k významnému poklesu sedimentace erytrocytů a C-reaktivního proteinu, zatímco hladina hemoglobinu se zvýšila. Zároveň v posledních 2 týdnech subjekty uváděly sníženou frekvenci nadýmání a pocit gastrointestinálního komfortu. (Ilmaz et al. 2020)

Celiakie je chronické onemocnění na autoimunitním podkladě, jež je spuštěno požitím glutenu (lepku) u geneticky predisponovaných jedinců. Střevní mikrobiota má přímý dopad na trávení glutenu v GIT, kde jsou určité bakteriální kmeny schopny rozkládat imunogenní gliadinové peptidy. Absence nebo přítomnost specifických kmenů tak potenciálně může moderovat nebo vyvolat patologické stavy související s lepkem. (Cukrowska et al. 2017) Mikrobiota pacientů trpících celiakií vykazuje obecně nižší bakteriální diverzitu. Zároveň při zkoumání rozdílů v mikrobiotě mezi 10 zdravými dětmi a 10 pacienty s celiakií bylo zjištěno, že děti s celiakií měly vyšší zastoupení druhů *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* a *Bifidobacterium bifidum*. Naopak v mikrobiotě bylo u pacientů s celiakií výrazně méně *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium dentium* a *Bifidobacterium adolescentis* nebyly u pacientů s celiakií detekovány vůbec. (Sanz et al. 2007) Další poznatky týkající se složení střevní mikrobioty přinesla studie 57 jedinců, kdy 32 byli pacienti s celiakií v aktivním stadiu a obsahem lepku ve stravě, 17 pacienti s celiakií dodržující bezlepkovou dietu, tudíž s neaktivním onemocněním, a 8 zdravých kontrol. Na základě výsledků duodenální biopsie bylo zjištěno, že pacienti s aktivní celiakií měli oproti zbývajícím skupinám vyšší zastoupení čeledí *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae* a *Staphylococcaceae* a naopak se u nich vyskytovalo méně *Firmicutes*, *Streptococcae*. U kontrolní skupiny bylo oproti pacientům s celiakií zaznamenáno více *Streptococcus anginosus* a *Streptococcus mutans*. Tyto výsledky naznačují, že celiakie je spojena s přemnožením patogenních bakterií, které inhibují růst symbiontů a komenzálů, kteří jsou charakterističtí pro zdravou mikrobiotu tenkého střeva. (Sánchez et al. 2013)

### 3.3.5 Mikrobiom a nádorová onemocnění

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, změny ve složení a počtu bakterií mohou vést ke zdravotním komplikacím včetně nádorových onemocnění. Zatímco některé bakterie mohou podporovat nádorové bujení (např. *Escherichia coli* nebo *Bacteroides fragilis*, jejichž toxiny mohou přispívat ke karcinogenezi), jiné mikroorganismy mohou mít naopak protinádorové působení (*Lactobacillus spp.* či *Faecalibacterium prausnitzii*, druhy, jež produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem působící protektivně). (Bezabeh et al. 2009)

Bylo prokázáno, že střevní mikrobiom může regulovat rozvoj kolorektálního karcinomu díky metabolitům produkovaným střevními bakteriemi, viry, houbami a Archey. (Pandey et al. 2023) Se střevní dysmikrobií souvisí i rozvoj chronického zánětu mírné intenzity, který urychluje progresi nádoru, urychluje jeho invazi a metastázy. Zánětlivé faktory také mohou utlumit činnost tumor-supresorových genů, a naopak aktivovat onkogeny, čímž znovu podporují rakovinné bujení. (Meng et al. 2018) V Tabulce č. 7 jsou zaznamenány možné souvislosti nádorových onemocnění GIT s mikroby.

Tabulka č. 7 Souvislost nádorových onemocnění GIT s mikrobiálními vlivy

<b>Nádorové onemocnění – část GIT</b>	<b>Souvislost</b>	<b>Mikrobiální vliv</b>
Žaudek	Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
	Bez infekce <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Prevotella pallens</i> , <i>Streptococcus sinensis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
Jícen	Gastroezofageální reflux, Barrettův jícen	<i>Enterobacteriaceae</i>
	Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Kolorektální oblast	Strava s vysokým obsahem tuku	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	Strava s vysokým obsahem škrobu a vlákniny	<i>Eubacterium rectale</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	Kolorektální adenomy	<i>Proteobacteria</i>
	Adenomatózní polypóza	<i>Fusobacterium</i>
	Dysbióza	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>Helicobacter spp.</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Helicobacter ducreyi</i>
Játra	Strava s vysokým obsahem tuku, obezita	Dysbióza
	Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
	Hepatocelulární karcinom	<i>Escherichia coli</i>
Slinivka břišní	Mikrobiální infekce	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Fusobacteriae</i>

Tabulka vypracována podle Meng et al. (2018)

Je známo, že některé probiotické bakterie mohou mít pozitivní vliv na protinádorovou terapii, kdy například suplementace bifidobakteriemi poskytla na animálních modelech obdobné výsledky jako cílená protinádorová terapie. Zároveň i další druhy protinádorové léčby

jsou zřejmě umocněny symbiotickými bakteriemi. Nicméně obecně lze říci, že složení střevní mikrobioty by mohlo sloužit jednak jako slibný prognostický marker nádorového onemocnění, ale též jako adjuvantní léčba při současné imunoterapii. (Zhou et al. 2021)

### 3.4 Změny mikrobiomu po krátkodobé výživové intervenci

Přestože je složení střevní mikrobioty relativně stabilní po celý život, jsou pozorovány každodenní přechodné fluktuace. Strava je klíčovým modifikovatelným faktorem ovlivňujícím složení střevní mikrobioty, což poukazuje na potenciál terapeutických dietních zásahů zaměřených na manipulaci s mikrobiální diverzitou, složením a stabilitou. Přestože strava může vyvolat změny ve střevní mikrobiotě, zdá se, že tyto změny jsou pouze dočasné a je pravděpodobné, že dlouhodobé dietní vzorce ovlivňují mikrobiotu více než akutní dietní strategie. Některé studie naznačují, že mikrobiota hostitele může reagovat či naopak nereagovat na dietní intervenci na základě přítomnosti nebo absence konkrétních bakterií (např. bakterií fermentujících vlákninu) v jejich jádrovém mikrobiomu, což vede k heterogenním výsledkům. Za krátkodobou dietní intervenci jsou obecně považovány ty, které zkoumají dopad na mikrobiotu v rámci dnů, týdnů, maximálně však 6 měsíců. (Leeming et al. 2019)

V souvislosti s metabolomem stolice jsou nejčastěji zkoumány SCFAs, které bývají produktem fermentace nestravitelných sacharidů – vlákniny. *Bacteroides* spp. jsou spojeny s produkcí propionátu a acetátu, zatímco *Firmicutes* jsou nejčastěji spojovány s produkcí butyrátu. (Portincasa et al. 2022) Přehled potravin a bakterií fermentujících dané substráty je zobrazen v Tabulce č. 8.

Tabulka č. 8 Potraviny obsahující fermentovatelné zdroje a druhy bakterií produkující SCFAs

<b>Potravina</b>	<b>Substrát</b>	<b>Fermentující mikroorganismus</b>
Kešu, zelené banány, bílé fazole, vločky, brambory	Rezistentní škrob	<i>Ruminococcus, Bacteroides</i>
Mořské řasy, otruby	Celulóza	<i>Bacteroides, Ruminococcus</i>
Otruby	Hemicelulóza (xylan, arabinoxylan)	<i>Bacteroides, Roseburia, Prevotella</i>
Jablka, meruňky, třešně, pomeranče, mrkve	Pektin	<i>Eubacterium, Bacteroides, Fecalibacterium</i>
Chřest, pórek, cibule, banán, pšenice, česnek, čekanka, artyčok	Fruktany (inulin, fruktooligosacharidy)	<i>Bacteroides, Fecalibacterium</i>
Mateřské mléko	Oligosacharidy mateřského mléka	<i>Bifidobacterium</i>
Mléko, jogurt, podmásli, sýr	Laktóza (u osob se sníženou laktózovou tolerancí)	<i>Bifidobacterium</i>
Oves, ječmen, žito, pšenice, houby, mořské řasy	$\beta$ -glukan	<i>Eubacterium, Atopobium, Enterococcus, Lactobacillus, Prevotella, Clostridium</i>
Akácie, potravinová aditiva	Arabská guma	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Ruminococcus</i>
Fazole guar, potravinová aditiva	Guma guar	<i>Bifidobacterium, Ruminococcus</i>
Mořské řasy	Laminarin	<i>Prevotella</i>
Artyčoky, fazole, řepa, brokolice, cizrna, fenykl, salát, cibule	Galakto-oligosacharidy	<i>Bifidobacterium</i>
Sójová mouka, cibule, cizrna, fazole, hrách, čočka	Rafinóza, stachyóza	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus</i>

Tabulka vypracována podle Portincasa et al. (2022)

Dvojitě zaslepená randomizovaná placebem kontrolovaná studie zkoumala vliv polydextrózy (rozpuštěné vlákniny) na metabolom stolice. Účastníci (n = 12) konzumovali po dobu 3 týdnů 8 g polydextranového prášku denně, následovala třítydenní washout perioda a crossover. Výsledky ukázaly stopy nestrávené polydextrózy ve vzorcích, což je důkazem fermentace polydextrózy až v distálním tlustém střevě. Reziduální polydextróza pozitivně korelovala s koncentracemi acetátu a propionátu. Tato korelace naznačuje, že tyto 2 metabolity by mohly být vzájemně závislé. Zároveň u intervenční skupiny hladiny acetátu a sukcinátu negativně korelovaly s obsahem bifidobakterií, pozitivně naopak s *Bacteroides*, což je v souladu s tím, že acetát a sukcinát jsou hlavní metabolity tohoto mikrobiálního druhu. (Lamichhane et al. 2014)

Randomizovaná kontrolovaná studie 82 účastníků s nadváhou či obezitou zkoumala vliv středomořské stravy (jež je vyznačuje zvýšením příjmu ovoce, zeleniny, celozrnných potravin, luštěnin, ryb a ořechů, a naopak omezením konzumace masa a vysoce průmyslově zpracovaných potravin) na metabolické zdraví, střevní mikrobiom a systémový metabolom. Vzhledem ke zvýšenému příjmu vlákniny a sníženému příjmu živočišných bílkovin u intervenční skupiny došlo ke snížení karnitinu v plazmě a v moči a k významnému snížení cholesterolu v plazmě. Změny ve střevním mikrobiomu odrážely individuální dodržování diety středomořského typu. Dodržování protokolu vedlo ke zvýšení hladin vlákniny rozkládajícího druhu *Faecalibacterium prausnitzii* a genů pro mikrobiální degradaci sacharidů spojených s metabolismem butyrátu. Dietní intervence také vedla ke zvýšení urolithinů v moči, degradaci žlučových kyselin ve stolici a zvýšení citlivosti na inzulín, přičemž tyto změny korelovaly sespecifickými mikrobiálními taxony. (Meslier et al. 2020)

Vliv krátkodobé nutriční intervence vlákninou zkoumala studie 12 dobrovolníků s crossover designem. Účastníci konzumovali po dobu 4 dnů buď směs vlákniny (polyglukan, inulin, rezistentní škrob) nebo jako kontrolu syrovátkový peptidový prášek. Po intervenci následovala 4denní washout perioda, dále pak druhá intervence opačným produktem. Po intervenci vlákninou vzrostla relativní hojnost *Parasutella*, *Parabacteroides* *Alloprevotella*. Naopak kleslo zastoupení *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Anaerovorax*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* a dalších. Přestože výsledkem bylo, že 4denní intervence může modifikovat složení střevní mikrobioty, sami autoři uvádí značné limitace studie. Mimo malého počtu účastníků upozorňují na možnost krátkého trvání washout periody, kdy není známo, zda bylo toto období dostatečné pro eliminaci předchozích zásahů. (Tian et al. 2021)

Jedna ze studií se zaměřila na vliv změny stravování na střevní mikrobiotu po 5 dnech u 10 dobrovolníků. V rámci studie byly použity 2 diety – jedna založena na živočišných produktech a druhá na rostlinných (veganství). Výsledky ukázaly, že strava založená na živočišných produktech měla větší vliv na mikrobiotu než veganství. Došlo k nárůstu počtu mikroorganismů odolných vůči žluči (např. *Alistipes*, *Bilophila*, *Bacteroides*) a snížení na úrovni *Firmicutes*, které metabolizují polysacharidy. Tato změna byla zaznamenána již jeden den po tom, co dieta dosáhla distální části GIT. Analýza SCFAs a bakteriálních klastrových skupin ukázala, že změny v makronutrientech ovlivnily i metabolickou aktivitu mikroorganismů. Na živočišné dietě došlo k výrazně nižším hladinám produktů fermentace sacharidů na úkor zvýšené hladiny fermentace aminokyselin. Byly pozorovány signifikantní pozitivní vztahy mezi klastry složenými z mikrobů produkujících zápach. Také bylo zjištěno, že strava může zavést do distálního střeva i cizí mikroorganismy, které u živočišné stravy souvisely kulturami použitými v konzumovaných sýrech a masných výrobcích. Výsledky tedy ukázaly, že střevní mikrobiom může reagovat na takto radikální změnu stravy velmi rychle. (David et al. 2014)

Dvoutýdenní dietní intervence 248 dobrovolníků se zaměřovala na vliv personalizovaných dietních doporučení, které se týkalo především zvýšení příjmu vlákniny a vyhýbání se pravidelné konzumaci tzv. „západní stravy“. Po intervenci došlo ke snížení čeledi *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadacea* a *Rikenellaceae* a současně došlo ke zvýšení populace *Methanobrevibacter*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* a butyrát-produkující *Lachnospiraceae*. Tyto změny byly doprovázeny zvýšením prevalence tzv. permatypu, který byl spojen s vyšší diverzitou stravy. Výzkum také ukázal, že reakce mikrobioty na dietní intervenci závisela

na počátečním stavu mikrobioty jedinců. Rozdělení účastníků na „respondery“ a „nerespondery“ ukázalo, že ti, kteří měli na začátku nižší diverzitu mikrobioty, projeví silnější reakci na dietní změny. (Klimenko et al. 2018)

Třítýdenní intervence vlákninou  $\beta$ -glukany z ovsa či z ječmene probíhala jako zaslepená, čtyřramenná studie s cross-over designem. Analýza metabolomu ukázala signifikantní výsledky po zásahu  $\beta$ -glukanem u 15 metabolitů zahrnujících především butyrát, palmitoleovou kyselinu, kyselinu linolovou a kyselinu 11-eikosenovou. Zmiňuje, že efekt po této intervenci způsobil pouze 8 % variace mikrobioty, což je výrazně méně, než vliv pohlaví či interindividuální variability na složení mikrobioty. (Trimigno et al. 2017)

Desetýdenní studie s crossover designem pozorovala vliv rozdílných stravovacích směrů na mikrobiotu 14 obézních mužů. Po úvodním „zahřívacím týdnem“ účastníci vystřídalí dietu bohatou na rezistentní škrob, dietu bohatou na neškrobové polysacharidy a redukční dietu s vysokým obsahem proteinů a středním obsahem sacharidů, přičemž každá trvala 3 týdny. Výsledkem byly jasné a specifické změny v mikrobiotě indukované změnou diety. Celková variabilita v reakci na diety činila 10 %. Dieta bohatá na rezistentní škrob vedla ke zvýšení počtu bakterií *Ruminococcaceae* a zároveň ke snížení diverzity mikrobioty (zřejmě v důsledku malého počtu fylogenetických typů metabolizujících tento homogenní substrát), zatímco dieta s neškrobovými polysacharidy zvýšila zastoupení *Lachnospiraceae* a podpořila mikrobiální diverzitu. Redukční vysokobílkovinná dieta snížila počty bifidobakterií. Analýza SCFAs ukázala, že celkové množství SCFAs bylo nižší u diety s rezistentním škrobem, což může odrážet vyšší fermentaci v proximálním tlustém střevě anebo sníženou fermentaci neškrobových polysacharidů v distálním střevě. Byla pozorována pozitivní korelace mezi *Bacteroidetes* a propionátem, což poskytuje důkaz o souvislosti mezi těmito bakteriemi a fermentací ve střevě. Ze studie vyplývá, že 3týdenní intervence rozdílným typem stravy ovlivňuje složení mikrobioty. (Salonen et al. 2014)

Randomizovaná paralelní kontrolovaná studie zkoumala vliv konzumace 180 ml kefiru denně po dobu 12 týdnů na složení střevní mikrobioty. Analýza ukázala pouze signifikantní navýšení v zastoupení *Actinobacteria*, nicméně další změny nebyly významné. Nesignifikantní výsledky autoři vysvětlují individuální variabilitou v reakci na kefir, která může být ovlivněna existujícími mikrobiálními populacemi v GIT účastníků. Roli mohlo hrát i proměnlivé složení kefiru použitého ve studii. (Bellikci-Koyu et al. 2019)

Longitudinální studie trvající 1 rok a porovnávající akutní i dlouhodobé vlivy 2 jedinců na střevní mikrobiotu ukázala, že i přes relativní stabilitu mikrobioty docházelo k dynamickým změnám, které bylo možné spojit s konkrétním chováním hostitele – nejvýznamnější vliv měly změny v příjmu vlákniny, které pozitivně korelovaly se změnami v hojnosti 15 % mikrobiálních druhů hned následující den. (David et al. 2014)



Závěrem lze tedy říci, že změna mikrobioty z velké části závisí na výchozím stavu jedince, na typu dietní intervence, a především na jádrovém mikrobiomu jednotlivců, neboť zastoupení mikroorganismů určuje, jakým způsobem a zda vůbec bude reakce na dietní intervenci probíhat. Zdá se, že velkou roli hraje obsah vlákniny ve stravě a že změny v mikrobiotě mohou být patrné již po pár dnech, ale s největší pravděpodobností nedojde ke změnám větším než 10 %. Nicméně počty studií a jejich metodologie jsou stále značně omezené a bylo by třeba více kvalitních výzkumů, které by se zaměřovaly na konkrétní vliv jednotlivých potravin.

### **3.5 Vliv konzumace jablek na zdraví**

Jablka jsou po banánech druhým nejvíce konzumovaným ovocem na světě, a to díky jejich široké geografické a sezónní dostupnosti. (Bondonno et al. 2017) V České republice se dokonce jedná o nejoblíbenější ovoce, přičemž průměrný Čech zkonzumuje necelých 24 kg jablek ročně. (Nejoblíbenější ovoce, 2016) Jablka jsou z největší části tvořeny vodou a sacharidy, zejména fruktózou. (Bondonno et al. 2017) Dále jsou bohatým zdrojem fytochemikálií včetně kvercetinu, katechinu, flogretinu a kyseliny chlorogenové, které jsou velmi silnými antioxidanty. Fytochemické složení jablek se liší mezi různými odrůdami a zároveň v závislosti na zrání a dozrávání, skladování a zpracování. (Boyer & Liu 2004) Zdá se, že v obsahu polyfenolů hraje významnou roli barva jablka, přičemž obsah je vyšší u jablek s červenou slupkou, popř. i dužinou, v porovnání s jablky se zelenou slupkou a bílou dužinou. (Barnett et al. 2021) Průměrné nutriční složení jablek je uvedeno v Tabulce č. 9.

Tabulka č. 9 Průměrné nutriční hodnoty syrového jablka

<b>Složka</b>	<b>Průměrné množství na 100 g jablka v syrovém nezpracovaném stavu</b>
Voda	85,56 g
Sacharidy	13,81 g
➤ Vlákna	2,21 g
➤ Cukry	10,39 g
○ Fruktóza	5,9 g
○ Glukóza	2,43 g
Bílkoviny	0,26 g
Tuky	0,17 g
Vitamín C	4,6 mg
Vitamín B1	0,017 mg
Vitamín B2	0,026 mg
Vitamín B3	0,091 mg
Vitamín B6	0,041
Vitamín B9	3 g
Vitamín A	54 IU
Vitamín E	0,18 mg
Vitamín K	2,2 g
Vápník	6 mg
Železo	0,12 mg
Hořčík	5 mg
Fosfor	11 mg
Draslík	107 mg
Sodík	1 mg
Zinek	0,04 g
Polyfenoly	110,20 mg
➤ Flavanoly	96,33 mg
➤ Hydroxycinnamáty	14,21 mg
➤ Flavonoly	5,66 mg
➤ Dihydrochalkony	4,17 mg
➤ Antokyany	1,62 mg

Tabulka vypracována podle Bator et al. (2024)

Strava s nízkým obsahem ovoce a zeleniny patří mezi největší příčiny celkové úmrtnosti, hned po vysokém krevním tlaku a kouření. (Ezzati & Riboli 2013) Konzumace pěti porcí ovoce a zeleniny denně významně snižuje riziko úmrtnosti z jakýchkoliv příčin, k největšímu snížení dochází u kardiovaskulární úmrtnosti. To potvrdila i metaanalýza z roku 2014, která hodnotila 16 prospektivních kohortových studií zahrnujících více než 800 000 účastníků. V té bylo mimo jiné zjištěno, že po překročení pěti porcí ovoce a zeleniny denně nedocházelo k dalšímu významnému snížení rizika úmrtnosti. (Wang et al. 2014)

Jak je z Tabulky č. 9 patrné, mimo vlákninu jsou jablka velmi bohatým zdrojem polyfenolů, které jsou dávány do souvislosti právě se snížením kardiovaskulárního rizika. Se stejným postojem přišla i prospektivní studie trvající více než 4 roky, která pozorovala souvislost mezi příjmem polyfenolů a výskytem kardiovaskulárních onemocnění u 7172 účastníků. Výsledky v souvislosti s CVD (angl. cardiovascular diseases; kardiovaskulární onemocnění) poukázaly především na příjem lignanů, flavanolů a hydroxybenzoových kyselin. (Tresserra-Rimbau et al. 2014) Flavonoly a hydroxybenzoové kyseliny jsou hojně zastoupené právě v jablkách, přičemž jejich obsah ve slupce je výrazně vyšší než v dužině jablka. (Bondonno et al. 2017) Nutno podotknout, že jablečné produkty nemají stejné benefity jako čerstvá a nezpracovaná jablka. Analýza produktů ze zpracovaných jablek prokázala, že po jejich odšťavnění vykazoval výsledný džus pouze 10 % antioxidační aktivity čerstvých jablek a pokud pro zpracování dužiny byly použity enzymy, toto množství se snížilo dokonce na 3 %, přičemž většina bioaktivních sloučenin zůstala v jablečném výlisku. (Boyer & Liu 2004) Vliv na jednotlivé parametry související s metabolickým syndromem zkoumala randomizovaná zaslepená studie s crossover designem s 34 účastníky. Studie zahrnovala celkem 4týdenní intervence produkty z jablek (celá jablka, čirá jablečná šťáva, zakalená jablečná šťáva s pektinem a jablečný výlisk), přičemž jednotlivé týdny od sebe byly oddělené týdnem na kontrolované stravě bez přísunu jablek. Výsledky ukázaly snížení hladin celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu po konzumaci celých jablek, zakalené šťávy a jablečného výlisku, u kterého bylo snížení nejvýznamnější. Po konzumaci čiré šťávy však došlo naopak ke zvýšení hladin LDL-cholesterolu. Závěrem tedy bylo, že přestože je sklenice jablečné šťávy často označována za adekvátní náhradu jedné z pěti porcí ovoce a zeleniny za den, pro regulaci cholesterolu je stěžejní i konzumace jablečné vlákniny a čirý jablečný džus nemusí být vhodnou náhradou čerstvého ovoce a zeleniny. (Ravn-haren et al. 2013)

CVD ale nejsou jediná onemocnění, jejichž riziko může pravidelná konzumace jablek snížit. Review z roku 2024 shrnuje výsledky nejnovějších studií a naznačuje, že mimo CVD mohou jablka snížit i riziko rozvoje nádorových onemocnění, diabetu mellitu a jejich zařazení do jídelníčku může podporovat zdravou střevní mikrobiotu a funkci imunitního systému. Přestože existují kontroverze ohledně používání pesticidů při pěstování jablek, přínosy konzumace jablek výrazně převažují nad riziky a doporučuje se jablka zahrnout jako součást vyvážené stravy pro podporu zdraví. (Bator et al. 2024)

### **3.5.1 Vliv konzumace jablek na mikrobiom a metabolom stolice**

Jablka jsou bohatým zdrojem polyfenolů a vlákniny. Proanthokyanidiny, které jsou nejvýznamnějším zástupcem polyfenolů v jablkách, do tlustého střeva vstupují téměř nezměněny a mikrobiotou jsou fermentovány na jednoduché fenolové kyseliny vstupující do oběhu. (Koutsos et al. 2020) Studie naznačují, že mezi konzumací jablek bohatých napolyfenoly a jejich následnou koncentrací v krevní plazmě existuje značná interindividuální variabilita, která je s největší pravděpodobností způsobena rozdílným zastoupením mikroorganismů ve střevní mikrobiotě každého jedince. V této souvislosti lze poukázat i na synergický vztah mezi vlákninou, polyfenoly a dalšími složkami, což vede k závěru, že konzumace celých čerstvých jablek může přinést více zdravotních benefitů než zařazení pouze izolovaných složek (např. jablečného džusu) do jídelníčku. (Bondonno et al. 2017)

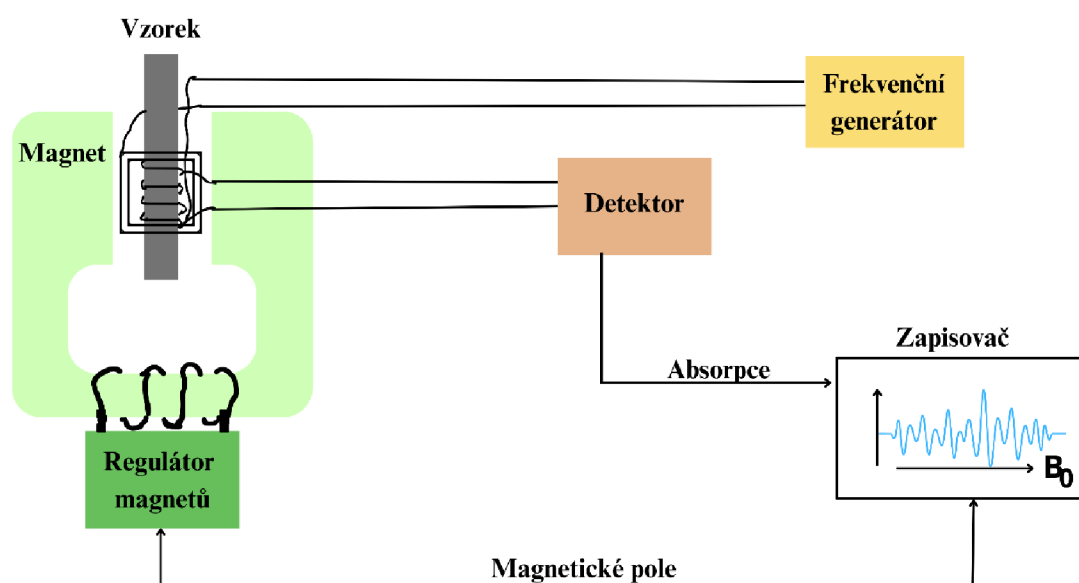
To naznačuje i placebem kontrolovaná studie s cross-over designem zkoumající vliv konzumace šťávy z jablek a ostružin na střevní mikrobiom a metabolom stolice. Účastníci (n = 30) konzumovali 350 ml nápoje 2× denně, přičemž ve studii byly 3 druhy šťáv (ostružinový, jablečný, kombinovaný). Po 4 týdnech, kdy účastníci absolvovaly všechny 3 intervence, nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny v bakteriích obsažených ve stolici ani v koncentracích SCFAs. To naznačuje, že ani izolovaná kombinace vlákniny a polyfenolů k ovlivnění složení mikrobioty nestačí. (Wallace et al. 2015)

Jablečný pektin, klíčová složka jablečné rozpustné vlákniny, je v tlustém střevě metabolizován především bifidobakteriemi a laktobacily. Synbiotická bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* může pektin využívat dokonce jako zdroj energie pro růst. Dále jablečný pektin ovlivňuje střevní mikrobiotu i svou bakteriostatickou aktivitou vůči patogenním druhům jako *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. (Shinohara et al. 2010; Barnett et al. 2021) Vliv konzumace jablek na střevní mikrobiom a metabolom zkoumala studie s 8 dobrovolníky ve věku 21–60 let, kdy účastníci konzumovali 2 jablka denně po dobu 2 týdnů bez jakýchkoliv dalších změn stravovacích návyků. Po nutriční intervenci došlo ke statisticky významnému nárůstu bifidobakterií, laktobacilů a enterokoků ve stolici, což souviselo i se zvýšením koncentrace acetátu v metabolomu stolice. Naopak došlo ke snížení zastoupení patogenních taxonů *Clostridium perfringens*, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas*, a to vedlo k redukci metabolitů souvisejících s hnilobnými procesy ve střevech jako jsou sulfidy či amoniak. Celkové pH stolice se po intervenci snížilo. Tato studie tak naznačuje příznivé účinky pravidelné konzumace jablek na střevní mikrobiotu. (Shinohara et al. 2010)

Změně mikrobioty a metabolomu stolice po konzumaci jablek se věnovala i randomizovaná klinická studie s křížovým designem. Zdraví, mírně hypercholesterolemičtí dobrovolníci (n = 40) konzumovali 2 jablka denně nebo kontrolní nápoj z jablek s odpovídajícím obsahem cukrů po dobu 8 týdnů, oddělených 4týdenní wash-out periodou. Konzumace jablek vedla k významnému snížení patogenní čeledi *Enterobacteriaceae*, nicméně k dalším změnám v zastoupení a hojnosti mikroorganismů nedošlo. V intervenční skupině bylo identifikováno 24 mikrobiálních metabolitů polyfenolů ve vyšších koncentracích ve srovnání s kontrolní skupinou. Mezi těmito metabolity byly mimo jiné valerolaktony, kyselina valerová a fenolové kyseliny. Výsledkem tedy bylo, že mikrobiální aktivita je zřejmě klíčová pro absorpci polyfenolů z jablek majících značné zdravotní přínosy. (Koutsos et al. 2020)

### 3.6 Využití nukleární magnetické rezonance v analýze metabolomu stolice

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je pokročilá analytická metoda pro identifikaci a charakterizaci struktury organických sloučenin a biomolekul. Princip NMR spektroskopie spočívá v interakci magnetických momentů jader s nepárovým počtem protonů s vnějším magnetickým polem. Tyto atomy mají povahu malých magnetů a pokud jsou vloženy do silného magnetického pole, mohou absorbovat radiové frekvence specifické pro každé jádro a jeho chemické prostředí. Frekvence jsou tedy použity k excitaci vybraných jader atomů, které po ukončení pulzu emitují rádiové vlny. Každá molekula produkuje unikátní NMR spektrum, na základě kterého lze identifikovat a kvantifikovat metabolity ve vzorku. Schéma principu NMR spektroskopie je znázorněno na Obrázku č. 3.



Obrázek č. 3 Schéma principu NMR spektroskopie

Stolice obsahuje širokou škálu molekul, které odrážejí výsledek příjmu živin, trávení a absorpce jak bakteriemi ve střevě, tak trávicím traktem. Stolice je produkována v průměrném množství 128 g (mokrý hmotnost) za den a obsahuje 63–85 % vody v závislosti na příjmu vlákniny. Suchá hmotnost se skládá z bakteriální biomasy (25–54 %), exfoliovaných buněk střevního epitelu, nestrávených zbytků potravy, makromolekul (vláknina, bílkoviny, DNA, mukopolysacharidy atd.) a tisíců malých molekul nebo metabolitů, jako jsou cukry, organické kyseliny a aminokyseliny, které tvoří střevní metabolom. (Karu et al. 2018) Stolice je v dnešní době nejběžnějším biologickým materiálem pro zkoumání střevního mikrobiomu v souvislosti se zdravím – výhody těchto vzorků tkví především v neinvazivním, jednoduchém a finančně nenáročném odběru. (Lamichhane et al. 2015; Ganobis et al. 2020)

Vzhledem ke složité povaze vzorků stolice je často třeba kombinovat více analytických metod k získání kompletního metabolického profilu. Efektivní kombinací je spojení hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR), jelikož se tyto metody navzájem doplňují. Přestože při samostatném využití mají oba způsoby své výhody i nevýhody,  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie bývá preferovanou metodou, neboť vyžaduje minimální předběžné zpracování

vzorků, což umožňuje rychlou a přesto snadnou spektroskopickou analýzu. (Bezabeh et al. 2009; Yen et al. 2015) I když množství sloučenin, které NMR spektroskopie dokáže detekovat, je oproti MS nižší, stále za pomoci NMR spektroskopie můžeme rozlišit cca 80 metabolitů v typických vzorcích stolice. Díky tomu, že NMR spektroskopie využívá vnitřní standard, umožňuje sloučeniny zároveň identifikovat i kvantifikovat. Mezi další výhody NMR spektroskopie patří nedestruktivní měření, což znamená, že vzorky lze analyzovat opakovaně. NMR spektroskopie má též vysokou reprodukcibilitu mezi různými laboratoři, což je důležité pro srovnávací studie a databázové porovnání. (Ganobis et al. 2020)

Ve většině studií založených na NMR metabolomice je využívána protonová NMR spektroskopie ( $^1\text{H}$  NMR) z důvodu, že  $^1\text{H}$  atomy se vyskytují téměř ve všech organických sloučeninách a tedy i téměř ve všech známých metabolitech. Zároveň je jednorozměrná  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie velmi rychlá, spolehlivá a snadno automatizovatelná. Získání jednoho spektra může trvat pouze několik minut a s moderními NMR zařízeními lze vzorky zpracovávat nepřetržitě dny i týdny. (Emwas et al. 2019)

Metodologie analýzy vzorků stolice pomocí NMR spektroskopie zahrnuje několik klíčových kroků. Vzorky stolice jsou obvykle ihned po odběru zmrazeny na co nejnižší teplotu – typicky na  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , teplotu domácího mrazáku. Následně by měly být v chladícím boxu či na suchém ledupřepravě do mrazáku, kde jsou uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Před analýzou se vzorky nechají rozmrazit při pokojové teplotě (vzorky stolice nejsou stabilní při pokojové teplotě déle než 5 hodin), poté následuje homogenizace. Dalším krokem ve zpracování vzorků je extrakce pomocí vody či pufru. Přestože extrakce pomocí PBS pufru (fosfátový pufr) snižuje mezivzorkovou variabilitu pH během extrakce, je momentálně doporučovaný jako nejvhodnější volba vzhledem k tomu, že ostatní metody jsou časově náročné, pracné, drahé či toxické. Důležitá je i volba správného Wf:Vb – poměr hmotnosti vzorku (Wf) k objemu pufru (Vb) použitého při extrakci, neboť optimální poměr zlepšuje detekci a kvantifikaci určitých metabolitů při zachování vysoké síly signálu oproti šumu (SNR) a stabilního chemického posunu. Vzorky extrahované s poměrem Wf:Vb = 1:2 poskytují signál s lepší kvalitou v porovnání s poměry 1:5 a 1:10 kvůli vyššímu rozředění metabolitů, které ztěžuje jejich detekci a snižuje kvalitu signálu. Tento poměr má mimo jiné výrazný vliv na pH vzorků, přičemž mezi vzorky je důležitá konzistence pH. To se u lidské stolice pohybuje mezi 6,8 a 7,0 a variabilita může být způsobena stravou, xenobiotiky či zdravotním stavem jedince. Variace pH mezi vzorky může vést k rozdílu v chemických posunech, což komplikuje jejich identifikaci.

Vzorky se znovu homogenizují (např. vortexováním) a následuje centrifugace. Ke vzorkům se přidá standardní roztok, obvykle 3-(trimethylsilyl)propionát sodný (TSP) nebo tetramethylsilan (TMS), dále se vzorky vortexují, centrifugují a přenesou se do NMR zkumavek. Vzorek se zavede do spektrometru, před měřením se nechá v sondě aklimatizovat zhruba 5 minut.

Spektra jsou zpracována pomocí Fourierovy transformace, korekce fáze a baseline a kalibrace chemického posunu pomocí signálu vnitřního standardu (TSP nebo TMS). Následuje normalizace a škálování dat a porovnání NMR signálů s databázemi a literaturou. Posledním krokem je kvantifikace metabolitů s následným přepočtem koncentrace podle hmotnosti každého vzorku stolice. (Lamichhane et al. 2015; Giera 2018)

## 4 Metodika

### 4.1 Účastníci studie

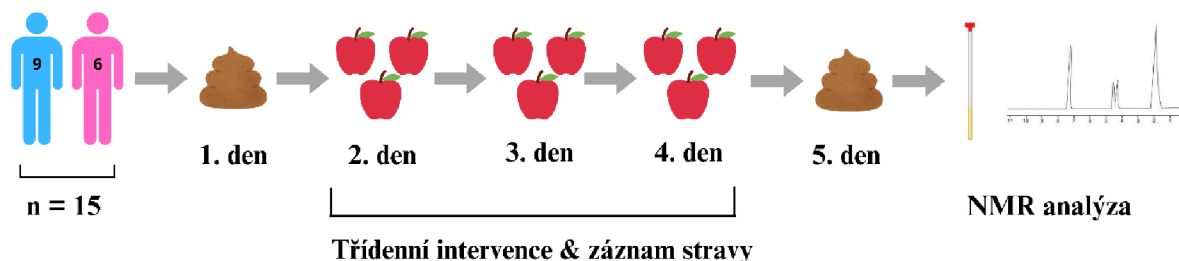
Do pilotní intervenční studie bylo zařazeno 15 dobrovolníků ( $n = 15$ ) ve věku 18–30 let. Studie byla schválena etickou komisí Krajské nemocnice Liberec dne 25. 10. 2023 (viz Příloha č. 1) a všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas. Kritéria pro zařazení do studie zahrnovala věk od 18 do 40 let s normální hmotností či nadváhou (BMI 18,5 – 30). Zároveň účastníci nesměli trpět závažným onemocněním či mít v anamnéze jakékoliv onemocnění střev. dále nesměli v posledních 2 týdnech před začátkem studie užívat antibiotika. Ihned po odsouhlasení účasti ve studii byl s dobrovolníky vyplněn dotazník týkající se antropometrických údajů, stravovacích a pohybových návyků, zdravotního stavu a celkového životního stylu (viz Příloha č. 2). Dobrovolníci konzumovali 3 ks středně velkých jablek kultivaru Gala denně po dobu 3 dní. Vzorky stolice byly odebrány před intervencí a následující den po intervenci. Celková doba trvání studie byla 5 dní. Stravovací návyky se kromě konzumace jablek nelišily od běžného režimu.

Průměrný věk účastníků byl  $23,4 \pm 3,76$  let. Skupina dobrovolníků se skládala z 9 mužů ( $n = 9$ ) a 6 žen ( $n = 6$ ). Průměrný body mass index byl  $23,56 \pm 2,55$ , přičemž 13 účastníků mělo normální hmotnost (BMI 18,5 – 25) a 2 účastníci měli nadváhu (BMI 25–30). Více než polovina účastníků ( $n = 8$ ) mělo aktivní zaměstnání, zbytek ( $n = 7$ ) měl zaměstnání sedavé. Téměř všichni účastníci ( $n = 14$ ) se pravidelně věnovali nějakému sportu (běh, běžecké lyžování, tanec, lezení, cyklistika, kick-box, disc-golf), přičemž fyzickou aktivitou trávili v průměru  $4,13 \pm 2,85$  hodin týdně. Účastník č. 1006 ze skupiny dobrovolníků vyčníval tím, že aktivně nesportoval a vybočoval i svým nepřijmem alkoholu (abstinenčí). Ostatní účastníci alkohol konzumovali přinejmenším příležitostně. Při analýze spotřeby alkoholu skupinou dobrovolníků bylo počítáno s následujícím obsahem alkoholu v nápojích: 0,5 l piva – 20 g alkoholu, 0,2 l vína – 20 g alkoholu, 40 cl lihovin a destilátů – 16 g alkoholu. Pokud subjekt uvedl, že konzumuje alkohol příležitostně, do průměru bylo zahrnuto množství 10 g alkoholu za týden. Při těchto hodnotách účastníci studie konzumovali v průměru  $62 \pm 82,65$  g alkoholu týdně. Žádný z dobrovolníků ( $n = 0$ ) nekouřil cigarety, ani elektronické. Pouze 2 účastníci ( $n = 2$ ) pravidelně užívali léky – subjekt č. 1001 Xyzal 1x denně a subjekt č. 1011 hormonální antikoncepci a Zenaro 1x denně. Účastníci spali v průměru  $7,47 \pm 0,92$  hodiny denně. Většina dobrovolníků ( $n = 14$ ) nedržela dietu ani neinklinovala k žádnému výživovému směru, pouze účastník 1003 byl v době studie 9 let veganem.

### 4.2 Odběr vzorků

Pro odběr vzorku stolice dobrovolníci obdrželi sadu pro odběr biologického materiálu skládající se z páru nitrilových rukavic a zkumavky s víčkem, jejíž součástí byla odběrová lžička z umělé hmoty. Dobrovolník toaletní mísu vyskládal toaletním papírem tak, aby nedošlo ke styku stolice s vodou v toaletní míse. Následně za pomoci odběrové lžičky odebral vzorek o velikost cca 1 g (tak, aby byla pokryta celá lžička) a uložil vzorek i s odběrovou lžičkou do zkumavky, kterou uzavřel.

Vzorek stolice byl od dobrovolníka urychleně vyzvednut a do 2 hodin po odběru vzorku zmrazen. Následně byly vzorky stolice během 7 dnů převezeny v chladicím boxu na FAPPZ, kde byly vzorky uchovávány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalšího zpracování. Každý účastník odebíral 2 vzorky stolice, jeden před intervencí jablky a druhý po intervenci. Princip intervence a odběru vzorků je znázorněn na Obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 Princip intervence a odběru vzorků ve studii

### 4.3 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Vzorky stolice byly rozmrazeny a z odběrových zkumavek byly za hygienických standardů do Eppendorf zkumavek odváženy vzorky o hmotnosti 150–250 mg. Dále byly vzorky centrifugovány při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $15000 \times g$  po dobu 15 minut. Následně bylo do jiné Eppendorf zkumavky odměřeno 630  $\mu\text{l}$  supernatantu a 70  $\mu\text{l}$  TSP (tetramethylsilanu) jakožto vnitřního standardu o pH 7,4 pro NMR spektroskopii. V této chvíli byl tedy objem pro NMR spektroskopii 700  $\mu\text{l}$  a stupeň ředění 1:10. Roztok byl vortexován po dobu 1 minuty. Následovala další centrifugace při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $15000 \times g$  po dobu 10 minut. Z takto připravených vzorků bylo odebráno 600  $\mu\text{l}$  a připraveno do 5 mm zkumavek určených pro NMR analýzu.

### 4.4 NMR spektroskopie

Vzorky stolice byly podrobeny analýze pomocí protonové nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR) s frekvencí 500,18 MHz. Spektra byla zaznamenána na spektrometru Bruker Avance III HD vybaveném širokopásmovou sondou pro pozorování fluoru SmartProbe<sup>TM</sup> se z-gradienty (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo). Byla použita pulzní sekvenční metoda pro potlačení signálu vody v roztoku 90 %  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  kalibrována na interní standard (sodná sůl kyseliny 3-(trimethylsilyl)propionové-2,2,3,3- $d_4$ ) na 0,0 ppm, ručně fázované v TopSpin 3.6.4. (Bruker biospin GmbH, Rheinstetten, Německo).

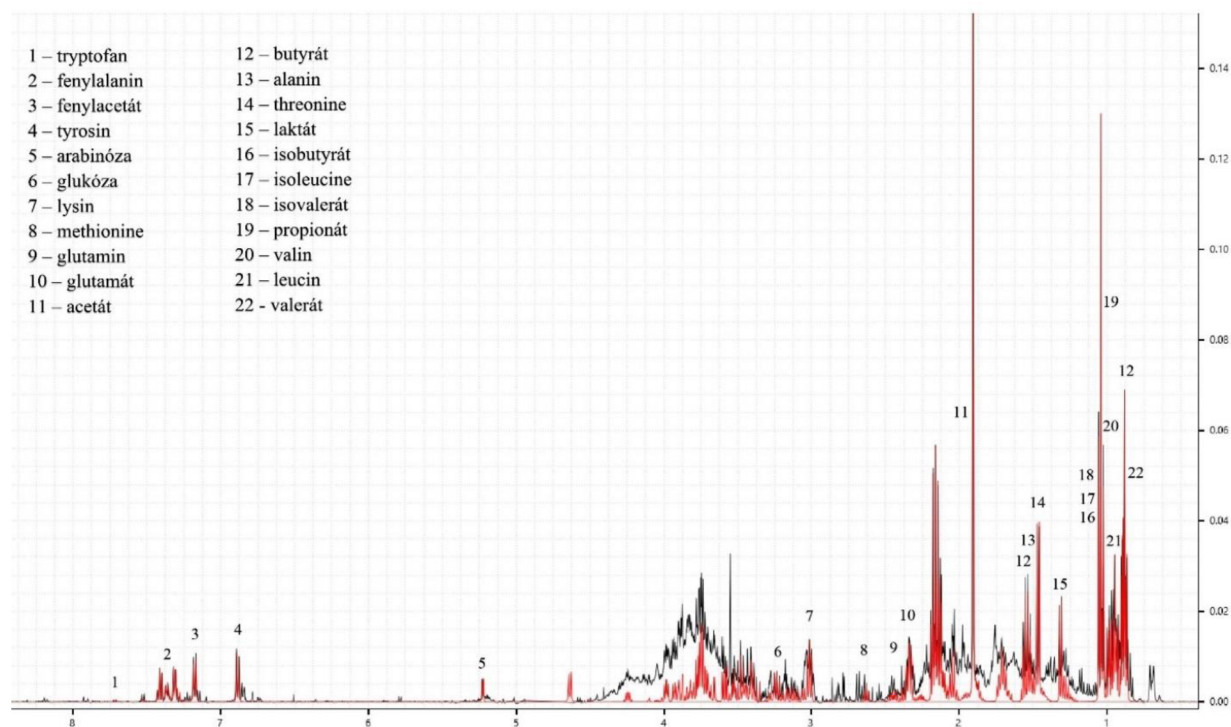


## **4.5 Zpracování výsledných spekter a statistická analýza**

Kvantifikace spekter proběhla po manuálním fázování, korekci baseliny a referenci v programu Chenomx v. 9.0 s interní knihovnou metabolitů. Následně byly výsledné koncentrace převedeny na mg/ dl dle individuální hmotnosti vzorků. Analýza byla provedena pomocí MetaboAnalyst 6.0 pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu.

## 5 Výsledky

V analyzovaných vzorcích stolice bylo identifikováno a kvantifikováno 22 metabolitů. Ilustrativní spektrum je zobrazeno na obrázku č. 5.



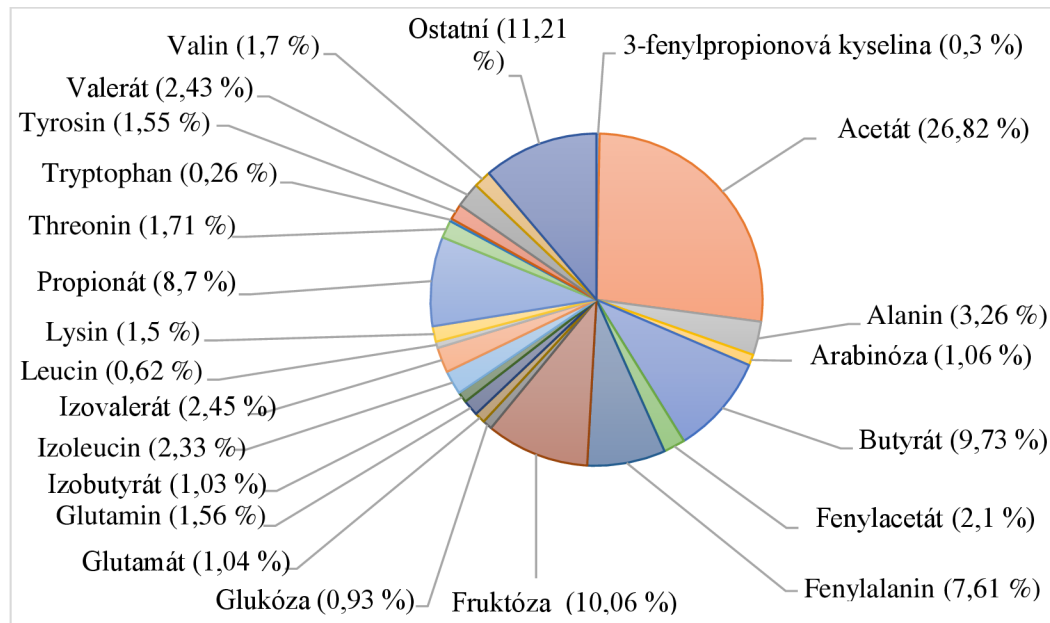
Obrázek č. 5 Ilustrativní spektrum

Černá barva reprezentuje výsledné spektrum z NMR spektroskopické analýzy, červená barva přiřazení sloučenin z databáze pro výpočet výsledných koncentrací

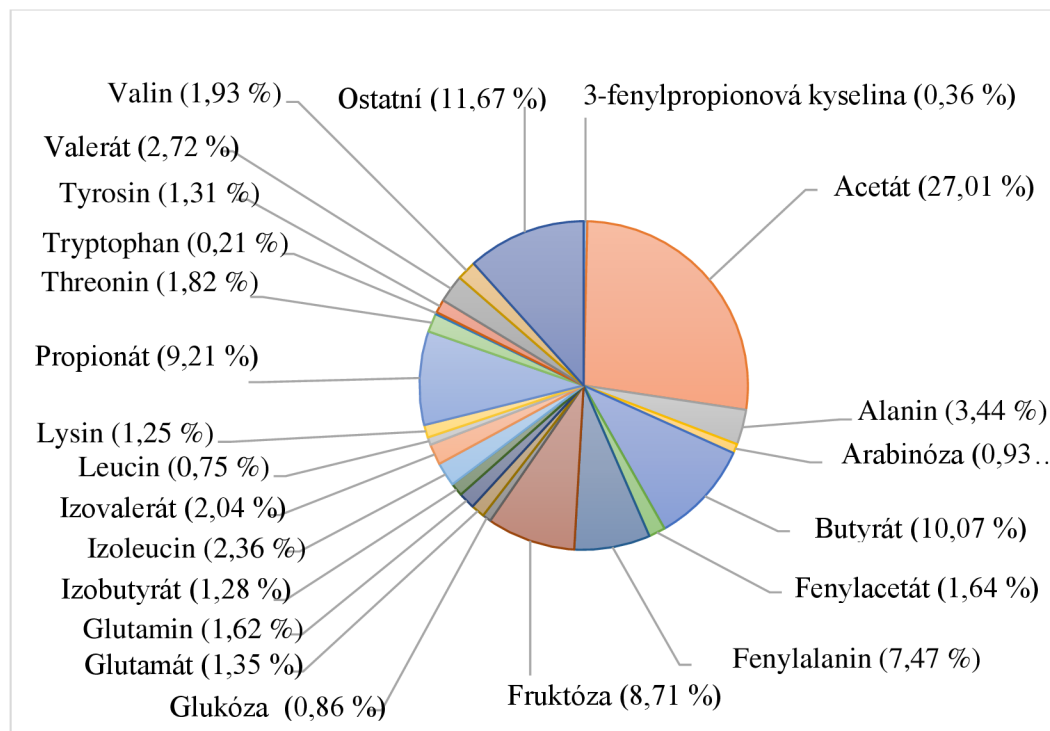
U každého účastníka byly koncentrace metabolitů normalizovány metodou PQN (Probabilistic Quotient Normalization), což je technika používaná k normalizaci spektrálních dat, aby se odstranily systematické variace mezi vzorky, které nejsou způsobené zkoumanými biologickými změnami. Normalizované koncentrace jednotlivých metabolitů u každého účastníka před intervencí a po intervenci jsou vyobrazeny v tabulce v Příloze č. 3.

Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých metabolitů před intervencí je znázorněno v Grafu č. 1, po intervenci v Grafu č. 2.

Graf č. 1 Průměrné zastoupení metabolitů před intervencí

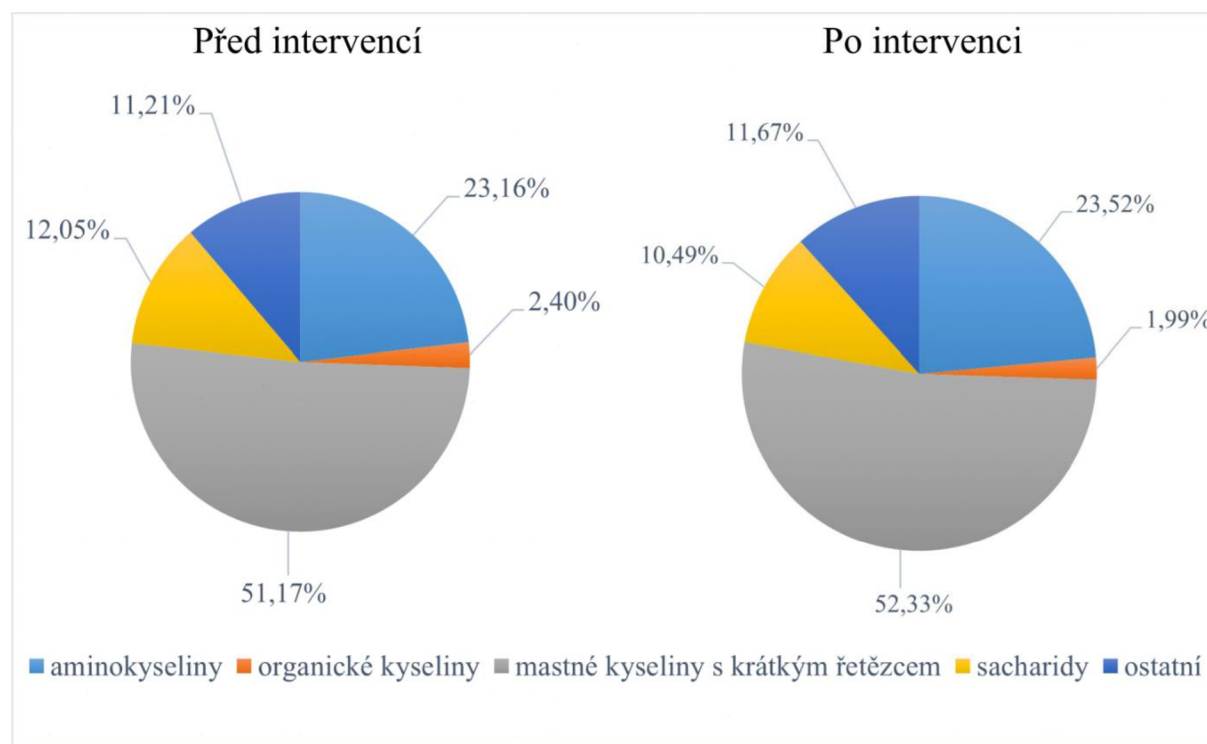


Graf č. 2 Průměrné zastoupení metabolitů po intervenci



Metabolity byly rozděleny do 4 hlavních skupin – aminokyseliny (alanin, glutamin, glutamát, leucin, izoleucin, lysin, fenylalanin, threonin, tryptofan, tyrosin, valin), organické kyseliny (3-fenylpropionová kyselina, fenylacetát), mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, butyrát, izovalerát, propionát, valerát), sacharidy (glukóza, fruktóza, arabinóza). Zastoupení po rozdělení do těchto skupin je zobrazeno na Grafu č. 3.

Graf č. 3 Zastoupení metabolických skupin před a po intervenci

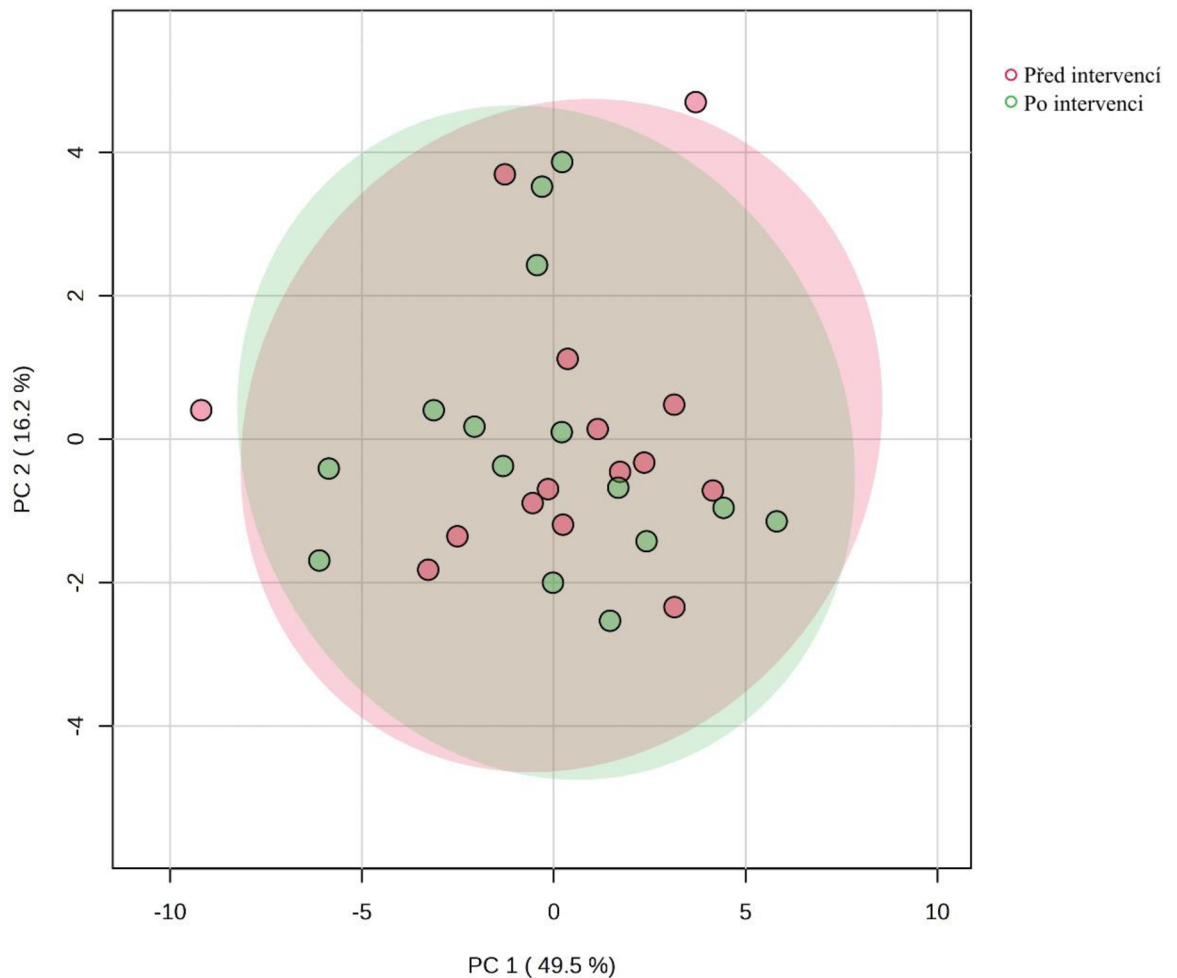


Jak je patrné z Grafů 1, 2 a 3, nejhojněji zastoupenou skupinou v metabolomu stolice byly mastné kyseliny s krátkým řetězcem, přičemž nejhojněji zastoupení SCFA je acetát, jehož koncentrace byla téměř 3× vyšší než u butyrátu a propionátu, jejichž koncentrace byly velmi podobné. Podrobnější výsledky jsou rozebrány v následující kapitole.

## 5.1 Statistická analýza a testování hypotéz

Nejprve byla provedena PCA analýza aneb Metoda hlavních komponent, jejíž výstup je znázorněn na Grafu č. 4. PCA analýza je statistická metoda používaná ke zdůraznění variability a zvýraznění vzorců v souboru dat. Obvykle se používá s cílem redukovat dimenzi dat hledáním nových proměnných, kterým říkáme hlavním komponenty. Ty jsou lineární kombinací původních proměnných, které uchovávají nejvíce variability původního souboru dat.

Graf č. 4 PCA analýza mezi vzorky před a po intervenci



Vodorovná osa v grafu představuje první komponentu, která odpovídá 49,5 % celkové variability dat. Vertikální osa je druhou komponentou s 16,2 % variability dat. Celkově tedy obě komponenty představují 65,7 % celkové variability, což je sice nadpoloviční většina, nemusí být však zachycena celá komplexita dat. Tvar koncentračních elips je daný hodnotou kovariance matic hodnot hlavních komponent. Pokud elipsa směřuje zleva doprava nahoru (viz růžová elipsa), znamená to pozitivní korelaci mezi oběma komponentami. Naopak pokud se hlavní osa elipsy svažuje zleva doprava směrem dolů (viz zelená elipsa), značí to negativní korelaci mezi proměnnými. Vzhledem k tomu, že zobrazené elipsy nejsou příliš protáhlé, oblast spolehlivosti výrazně neupřednostňuje jeden směr rozptylu před druhým, což opět naznačuje relativně slabší korelaci. Velikost elipsy odráží rozložení datových bodů v každé skupině podél hlavních komponent. Rozptyl je u obou skupin mírný, a protože je hodnota podobná, naznačuje podobnou variabilitu v obou skupinách podél dimenzí zachycených PC1 a PC2.

Elipsy se poměrně výrazně překrývají, což naznačuje, že na grafu PCA založeném na hlavních dvou komponentách nejsou obě skupiny zřetelně odděleny. Podél těchto složek existuje podstatná shoda ve struktuře rozptylů a kovariací obou skupin. Souhrnně lze říci, že graf PCA s elipsami koncentrace naznačuje, že mezi složkami každé skupiny existuje určitá

míra pozitivní korelace, ale překrývání elips vede k závěru, že obě skupiny nelze snadno rozlišit pouze na základě dvou hlavních složek.

Data byla dále statisticky analyzována a porovnána pomocí Wilcoxon testu. Ten je používán jako alternativa párového Studentova t-testu, pokud data nespĺňují normální rozdělení. Normalizované koncentrace, p-hodnoty jednotlivých metabolitů a Fold change kvantifikující změnu koncentrace jsou popsány v Tabulce č. 10.

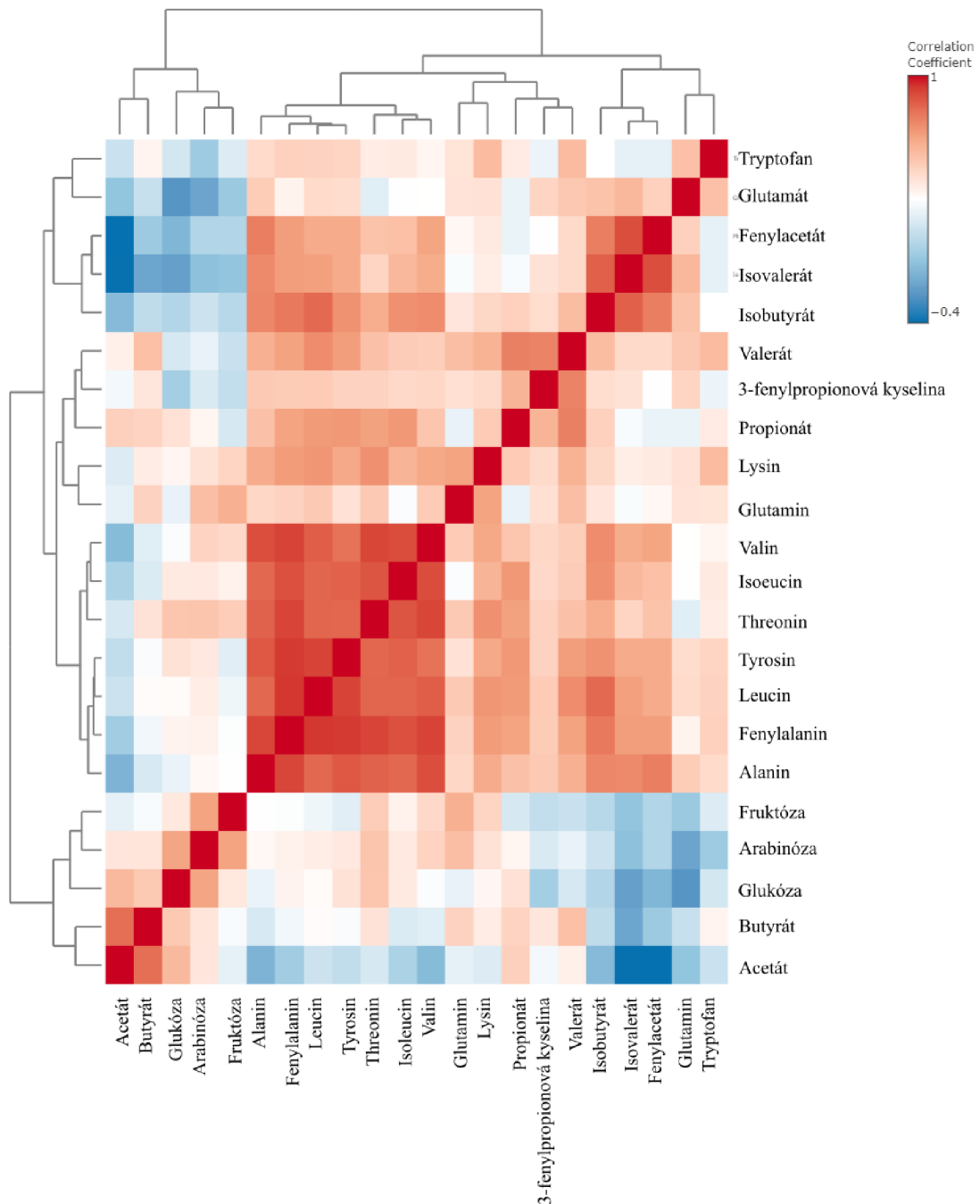
Tabulka č. 10 Průměrné koncentrace metabolitů před a po intervenci, p-hodnota a fold change

<b>Metabolit</b>	<b>Koncentrace před intervencí (mg/ dl)</b>	<b>Koncentrace po intervenci (mg/ dl)</b>	<b>p-hodnota</b>	<b>Fold change</b>
3-fenylpropionová kyselina	0,0030	0,0036	0,7615	0.8892
Acetát	0,2682	0,2701	0,9780	0.9828
Alanin	0,0326	0,0344	0,4212	0.9505
Arabinóza	0,0106	0,0093	0,7615	0.8585
Butyrát	0,0973	0,1007	0,9341	0.9821
Fruktóza	0,0210	0,0164	0,6387	0.8084
Glukóza	0,0761	0,0747	1	1.0738
Glutamát	0,1006	0,0871	0,4887	1.1840
Glutamin	0,0093	0,0086	0,7197	0.9272
Isobutyryát	0,0104	0,0135	0,3591	1.0957
Isoleucin	0,0156	0,0162	0,6387	0.9321
Isovalerát	0,0103	0,0128	0,8469	0.7863
Leucin	0,0233	0,0234	0,7197	0.9361
Lysin	0,0245	0,0204	0,9780	0.8424
Fenylacetát	0,0062	0,0075	0,5995	1.0044
Fenylalanin	0,0150	0,0125	0,5245	1.0548
Propionát	0,0870	0,0921	0,8469	0.9254
Threonin	0,0171	0,0182	0,5245	0.9540
Tryptofan	0,0026	0,0021	0,5614	1.1035
Tyrosin	0,0155	0,0131	0,3894	1.0019
Valerát	0,0243	0,0271	0,4543	0.8275
Valin	0,0170	0,0193	0,4543	0.8902

Jak je patrné z Tabulky č. 10, nejnižší p-hodnotu a tím pádem nejvýznamnější rozdíl ze všech metabolitů měly isobutyryát, tyrosin, alanin, valerát, valin a glutamát (seřazeno sestupně). Box-ploty těchto 6 nejvýznamnějších metabolitů jsou k nahlédnutí v Příloze č. 4. Hodnota Fold change popisuje, zda se koncentrace daného metabolitu nějakým způsobem změnila. Hodnota >1 naznačuje zvýšení koncentrace, hodnota <1 naopak snížení.

Vizualizace korelace je též znázorněna na Grafu č. 5.

Graf č. 5 Heatmapa korelační matice s dendrogramem



Každá buňka v Grafu č. 5 je reprezentována korelačním koeficientem mezi jednotlivými dvojicemi látek. Modrá barva signalizuje negativní korelaci, červená pozitivní. Čím je barva tmavší a sytější, tím je korelace silnější. Světlé barvy znázorňují velmi malou nebo žádnou korelaci. Z Grafu č. 5 lze tedy vyčíst, že existuje určitá míra pozitivní korelace mezi jednotlivými SCFAs navzájem a aminokyselinami mezi sebou, což potvrzuje předchozí zjištění.

Odlehlé hodnoty jsou znázorněny na grafech v Příloze č. 8. Pod sebou jsou znázorněny jednotlivé metabolity a v pravé části jejich koncentrace, které se lišily. Červeně zvýrazněné hodnoty jsou buď minimálně  $1,5\times$  pod prvním kvantilem nebo  $1,5\times$  nad třetím kvantilem

mezikvartilového rozpětí (rozdíl hraničních hodnot 1. a 3. kvartilu). Z Grafu odlehlých hodnot metabolitů zobrazeného v Příloze č. 9 vyplývá, že u subjektu č. 1001 došlo v porovnání s ostatními subjekty k výraznějšímu snížení hladin alaninu, glukózy, glutaminu, isoleucinu, isovalerátu, leucinu, lysinu, tryptofanu, tyrosinu a valinu.



## 6 Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, zda může krátkodobá nutriční intervence jablky ovlivnit metabolom stolice u 15 subjektů ve věku 18–30 let. Bylo předpokládáno, že změna by nastala v důsledku zvýšené fermentace vlákniny a polyfenolů střevní mikrobiotou a v metabolomu stolice by tak byly po intervenci zaznamenány vyšší koncentrace SCFAs a naopak nižší obsah aminokyselin.

Lidský střevní mikrobiom představuje složitý ekosystém komenzálních mikroorganismů, které obsahují biliony bakterií, virů a hub. (Portincasa, 2022) Hustota osídlení se značně zvětšuje distálním směrem, přičemž v tlustém střevě se nachází až  $10^{12}$  bakterií na gram střevního obsahu, přičemž většina z nich patří do 4 hlavních kmenů – *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. (Lamichhane et al. 2014) Některé složky potravy, především vláknina, celulóza, rezistentní škrob a polyfenoly, jsou potenciálními substráty promikroby v tlustém střevě. Tyto nestravitelné složky potravy, souhrnně nazývána jako prebiotika, jsou mikroby přeměňovány na širokou škálu sloučenin, jako jsou SCFAs (mastné kyseliny s krátkým řetězcem), rozvětvené mastné kyseliny, organické kyseliny, biogenní aminy, vitamíny, amoniak a fenoly. (Shinohara et al. 2010)

Metabolomika je studie nízkomolekulárních sloučenin (metabolitů) produkovaných daným organismem. Fekální metabolom poskytuje funkční záznam mikrobiální aktivity a může být použit jako intermediální fenotyp zprostředkávající interakce mezi hostitelem a střevním mikrobiomem. (Zierer et al. 2018)

V naší studii bylo pomocí NMR spektroskopie identifikováno a kvantifikováno 22 metabolitů rozdělených do 4 hlavních skupin – aminokyseliny (alanin, glutamin, glutamát, leucin, izoleucin, lysin, fenylalanin, threonin, tryptofan, tyrosin, valin), organické kyseliny (3-fenylpropionová kyselina, fenylacetát), mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, butyrát, isovalerát, propionát, valerát) a sacharidy (glukóza, fruktóza, arabinóza).

SCFAs (acetát, propionát, butyrát) jsou nejhojnějšími anionty v tlustém střevě. Modulují několik metabolických drah a jsou zapojeny do regulace obezity, inzulinové rezistence, diabetu mellitu 2. typu i autoimunitních onemocnění. (Portincasa et al. 2022) Tyto mastné kyseliny jsou obvykle produkovány v poměru 60 : 20 : 20, což se potvrdilo i v naší studii, kdy zastoupení acetátu v celkovém metabolomu stolice bylo 27 %, butyrát tvořil cca 10 % a propionát 9 %. (Sales & Reimer 2023) Hlavními producenty propionátu a acetátu jsou *Bacteroides* spp., butyrát je naopak spojován s *Firmicutes*. (Portincasa et al. 2022)

Analýza vzorků stolice v naší studii ukázala výrazné zastoupení SCFAs, které tvořily více než polovinu veškerých metabolitů. To může být způsobeno tím, že této studii se účastnili především mladí lidé v průměrném věku  $23,4 \pm 3,76$  let, neboť zastoupení SCFAs v metabolomu stolice s věkem klesá. Ve studii, která se zabývala právě vlivem věku na složení metabolomu stolice, bylo u osob ve věku 65–80 let zastoupení SCFAs pouze 34 %. (Cui et al. 2021) Výsledky naší studie dále korelují i se zjištěním, že zastoupení aminokyselin u starších osob naopak stoupá. Ve zmiňované studii v metabolomu stolice u starších osob tvořily aminokyseliny zhruba 30 %, zatímco v naší studii na mladších subjektech byl tento obsah 23 %. Vyšší množství SCFAs může souviset i s fyzickou aktivitou. (Estaki et al. 2016) Příčinnou vysokého zastoupení SCFAs v metabolomu v naší studii by tedy mohla být

i pravidelná sportovní aktivita, neboť 14 z 15 účastníků ( $n = 14$ ) se pravidelně věnovalo nějakému sportu a účastníci trávili sportem v průměru  $4,13 \pm 2,85$  hodin týdně.

Jablka jsou bohatým zdrojem pektinu, což je nestravitelný polysacharid, který je ve střevě fermentován synbiotickými bakteriemi, především *Faecalibacterium*, *Eubacterium* a *Bacteroides*. (Portincasa et al. 2022) Třítýdenní studie zkoumající vliv rozpustné vlákniny (polydextrózy) na metabolom stolice ukázala signifikantní zvýšení acetátu a propionátu. (Lamichhane et al. 2014) Další důležitou složkou jablek z pohledu mikrobioty jsou polyfenoly. Tyto bioaktivní sloučeniny plní funkci sekundárních metabolitů, jsou též považovány za prebiotika, neboť mohou být fermentovány střevní mikrobiotou. (Guglielmetti et al. 2020) Zdá se, že v obsahu polyfenolů hraje mimo zrání, skladování a zpracování důležitou roli i barva jablka, přičemž obsah polyfenolů je vyšší u jablek s červenou slupkou. (Boyer & Liu 2004; Bondonno et al. 2017) V naší studii byla použita jablka Gala s červenou slupkou, tudíž je zde předpoklad, že se jednalo o jablka bohatá na polyfenoly. Nejznámějším zástupcem polyfenolů v jablkách jsou proanthokyanidiny, které do tlustého střeva vstupují téměř nezměněny a mikrobiotou jsou fermentovány na jednoduché fenolové kyseliny. (Koutsos et al. 2020) Zdá se, že vláknina a polyfenoly fungují synergicky ještě s dalšími sloučeninami obsaženými v jablkách, neboť po intervenci izolovanými složkami s potenciálním přínosem na produkci SCFAs nedošlo k signifikantní změně metabolitů. (Wallace et al. 2015) Naopak po intervenci 2 jablky denně po dobu 8 týdnů došlo v intervenční skupině k nárůstu mikrobiálních metabolitů polyfenolů, včetně kyseliny valerové či fenolové. (Koutsos et al. 2020)

V této studii účastníci konzumovali 3 kusy jablek kultivaru Gala denně po dobu 3 dnů. První vzorek byl odebrán den před začátkem intervence, druhý vzorek následující den po skončení intervence. Po statistickém testování Willcoxonovým testem vyšla u všech 22 analyzovaných metabolitů p-hodnota vyšší než 0,05. Nulová hypotéza tvrdí, že mezi vzorky neexistuje žádný rozdíl. Při standardním uvažování hladiny významnosti 0,05 tedy nulovou hypotézu ani v jednom z případů nelze zamítnout. To znamená, že v koncentraci jednotlivých metabolitů neexistuje statisticky signifikantní rozdíl ve vzorcích před intervencí 3 jablky denně po dobu 3 dnů a po skončení intervence. To znázorňuje i PCA analýza (viz Graf č. 4), ze které je evidentní, že i přes existenci malé míry pozitivní korelace od sebe nelze vzorky snadno odlišit.

Zajímavá byla analýza vzorků subjektu č. 1001, neboť rozdíly koncentrací v metabolitech u tohoto subjektu vykazovaly výraznější rozdíly než u ostatních účastníků studie. Jako odlehlé hodnoty (viz Příloha č. 8) bylo analyzováno snížení v koncentracích alaninu, glukózy, glutaminu, isoleucinu, isovalerátu, leucinu, lysinu, tryptofanu, tyrosinu a valinu. Vzhledem k tomu, že kromě glukózy se jedná o snížení obsahu aminokyselin v metabolomu, může tento výsledek poukazovat na stravu založenou na živočišných produktech s minimem vlákniny. Díky intervenci jablky mohlo dojít k vyššímu příjmu vlákniny a tím pádem ke snížení produkce aminokyselin střevní mikrobiotou. Tento předpoklad vychází ze studie, která zkoumala vliv veganské stravy či diety založené na živočišných produktech na metabolom a poukázala na snížení produkce aminokyselin při zvýšeném příjmu vlákniny díky veganské dietě. (David et al. 2014) Nicméně se jedná pouze o domněnku a odlehlé hodnoty v metabolitech mohly být náhodným jevem či důsledkem jiných příčin.

Příčin nesignifikantních výsledků naší studie mohlo být několik. První limitací studie je především malý počet účastníků. Na jednu stranu je výhodou homogenita skupiny, na druhou

stranu by mohlo dojít k výraznějšímu zvýšení SCFAs po intervenci u starších osob, u kterých je obecně produkce SCFAs nižší. (Cui et al. 2021) Zároveň výsledky některých studií poukazují na fakt, že střevní mikrobiota bude na různé dietní intervence reagovat v závislosti na přítomnosti konkrétních mikroorganismů v jádrovém mikrobiomu střevní mikrobioty. (Leeming et al. 2019) Zásadní vliv mělo zřejmě i trvání intervence. Ve složení mikrobioty jsou pozorovány každodenní přechodné fluktuace, a přestože byli účastníci poučeni, aby během intervence nijak neměnili (kromě konzumace jablek) své stravovací návyky, tak nelze potvrdit dodržování tohoto požadavku. Obecně je známo, že dlouhodobé dietní vzorce ovlivňují mikrobiotu více než akutní dietní intervence, za které jsou obecně považovány zásahy zkoumající dopad na mikrobiotu v rámci dnů či týdnů. (Leeming et al. 2019) Studie zkoumající vliv 4denní intervence směsí vlákniny (polyglukanu, inulinu a rezistentního škrobu) sice poukázala na fakt, že i krátkodobá intervence může modifikovat složení střevní mikrobioty. Nicméně byla analyzována pouze relativní hojnost jednotlivých bakteriálních taxonů, nikoliv koncentrace jednotlivých metabolitů v metabolomu jako v našem případě. (Meslier et al. 2020) Další studie zkoumající vliv krátkodobé dietní intervence zkoumala změny mikrobioty p 5denní intervenci buď veganskou stravou nebo naopak dietou založenou výhradně na živočišných produktech. Výsledky ukázaly vyšší produkci SCFAs na rostlinné stravě vzhledem k vyššímu příjmu vlákniny, a naopak výrazně nižší produkci SCFAs na čistě živočišné stravě s téměř nulovým příjmem vlákniny. (David et al. 2014) Důvodem nesignifikantních výsledků naší studie v kontrastu s touto studií může být kratší doba trvání intervence, ale také méně drastický typ dietní intervence. Zároveň přestože byla provedena normalizace pomocí PQN metody, mohlo dojít ke zkreslení výsledků rozdílným obsahem sušiny ve vzorcích stolice jednotlivých účastníků. Další limitací naší studie je i absence kontrolní skupiny a odběr 3. vzorku po washout periodě. Výsledkem naší studie je, že krátkodobá nutriční intervence 3 jablek denně po dobu 3 dnů neovlivňuje metabolom stolice.

## 7 Závěr

Lidská střevní mikrobiota je soubor stovek bilionů mikroorganismů sídlících v lidském gastrointestinálním traktu. Mikrobiota se výrazným způsobem podílí na fyziologii hostitele a díky produkci malých molekul (metabolitů) dokáže ovlivnit i zdánlivě vzdálené orgány. Tyto metabolity společně tvoří metabolom, jehož analýzou v dnešní době získáváme lepší obraz činnosti střevní mikrobioty. Přestože je složení střevní mikrobioty v průběhu života víceméně stabilní, lze ho modifikovat například životním stylem. Strava a příjem vlákniny se zdá být velmi důležitým determinantem v celkovém složení a funkci mikrobioty. Jablka jsou druhým nejkonzumovanějším ovocem na světě a jsou zdrojem vlákniny, zejm. pektinu a polyfenolů sloužících též jako prebiotikum.

Cílem této práce bylo zjistit, zda může mít krátkodobá nutriční intervence zvýšeným příjmem jablek vliv na složení metabolomu stolice. V této studii bylo zjištěno, že po zařazení 3 jablek denně po dobu 3 dnů mají tendenci stoupat mastné kyseliny s krátkým řetězcem, nejdůležitější prospěšné metabolické produkty střevní mikrobioty, a určité aminokyseliny. Přestože ve výsledcích lze pozorovat zvýšení a snížení určitých metabolitů po intervenci, provedená statistická analýza nevyhodnotila žádné z rozdílů jako signifikantní. Nelze tedy zamítnout nulovou hypotézu, která tvrdí, že krátkodobá nutriční intervence jablek neovlivňuje složení metabolomu stolice.

Neprůkazné výsledky mohly být zapříčiněny krátkou dobou trvání intervence, malým vzorkem, interindividuální variabilitou složení mikrobioty každého jedince či neúmyslnou změnou stravovacích návyků během intervence. Vzhledem k tomu, že existují teorie pozitivního ovlivnění mikrobioty (a tím i celkového zdraví hostitele) jablek, přičemž jablka jsou v České republice lokální a velmi dostupnou potravinou, žádá si tato problematika rozsáhlejší a podrobnější výzkum s vhodnějším designem. Doporučujeme, aby intervence probíhala delší dobu na větším populačním vzorku s variabilnějšími antropometrickými údaji se záznamem stravy před, v průběhu i po ukončení intervence, aby mohlo zároveň docházet k analýze příjmu vlákniny. Zároveň by bylo vhodné zahrnout kontrolní skupinu či odběr kontrolního vzorku po wash-out období.

## 8 Literatura

- ARNOLD, Jason W., Jeffery ROACH, Salvador FABELA, et al., 2021. The pleiotropic effects of prebiotic galacto-oligosaccharides on the aging gut. *Microbiome* [online]. **9** (1), 31 [cit. 2024-03-30]. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-020-00980-0.
- BARNETT, Matthew P. G., Wayne YOUNG, Kelly ARMSTRONG, et al., 2021. A Polyphenol Enriched Variety of Apple Alters Circulating Immune Cell Gene Expression and Faecal Microbiota Composition in Healthy Adults: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* [online]. **13** (4), 1–15 [cit. 2024-04-10]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13041092.
- BATOR, Piotr, Michał RAZIK, Patrycja ROZWADOWSKA, et al., 2024. An apple a day keeps the doctor away? – a review of health benefits of apples. *Journal of Education, Health and Sport* [online]. 2024-01-22, **55**, 73–86 [cit. 2024-04-09]. ISSN 2391-8306. Dostupné z: doi:10.12775/JEHS.2024.55.005.
- BELLIKCI-KOYU, Ezgi, Banu Pinar SARER-YUREKLI, Yakut AKYON, et al., 2019. Effects of Regular Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. *Nutrients* [online]. **11** (9), 1–23. [cit. 2024-04-10]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11092089.
- BERNINI, Luciana Jesus, Andrea Name Colado SIMÃO, Daniela Frizon ALFIERI, Marcell Alysson Batisti LOZOVYOY, Naiara Lourenço MARI, Cínthia Hoch Batista DE SOUZA, Isaías DICHÍ a Giselle Nobre COSTA, 2016. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. *Nutrition* [online]. **32** (6), 716–719 [cit. 2024-03-29]. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2015.11.001.
- BEZABEH, Tedros, Ray L. SOMORJAI a Ian C. P. SMITH, 2009. MR metabolomics of fecal extracts: applications in the study of bowel diseases. *Magnetic Resonance in Chemistry* [online]. **47** (S1), 1–8 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0749-1581. Dostupné z: doi:10.1002/mrc.2530.
- BLASER, Martin J., 2016. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* [online]. 2016-04-29, **352** (6285), 544–545 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aad9358.
- BONDONNO, Nicola P., Catherine P. BONDONNO, Natalie C. WARD, Jonathan M. HODGSON a Kevin D. CROFT, 2017. The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **69** (69), 243–256 [cit. 2024-04-09]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2017.04.012.
- BOYER, Jeanelle a Rui Hai LIU, 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* [online]. **3** (1), 1–10 [cit. 2024-04-09]. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-3-5.

- CODELLA, Roberto, Livio LUZI a Ileana TERRUZZI, 2018. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Digestive and Liver Disease* [online]. **50** (4), 331–341 [cit. 2024-03-31]. ISSN 15908658. Dostupné z: doi:10.1016/j.dld.2017.11.016.
- CUI, Mengni, Alessia TRIMIGNO, Violetta ARU, Morten A. RASMUSSEN, Bekzod KHAKIMOV a Søren Balling ENGELSEN, 2021. Influence of Age, Sex, and Diet on the Human Fecal Metabolome Investigated by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Journal of Proteome Research* [online]. 2021-07-02, **20** (7), 3642–3653 [cit. 2024-03-31]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.1c00220.
- CUKROWSKA, Bożena, Agnieszka SOWIŃSKA, Joanna Beata BIERŁA, Elżbieta CZARNOWSKA, Anna RYBAK a Urszula GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, 2017. Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota – Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2017-11-14, **23** (42), 7505–7518 [cit. 2024-03-31]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v23.i42.7505.
- D'ARGENIO, Valeria a Francesco SALVATORE, 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* [online]. **451** (Part A), 97–102 [cit. 2024-03-31]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.01.003.
- DAVID, Lawrence A., Corinne F. MAURICE, Rachel N. CARMODY et al., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* [online]. **505** (7484), 559–563 [cit. 2024-03-06]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12820.
- DAVID, Lawrence A., Corinne F. MAURICE, Rachel N. CARMODY et al., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* [online]. **505** (7484), 559–563 [cit. 2024-04-11]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12820.
- DEL BO', Cristian, Stefano BERNARDI, Antonio CHERUBINI et al., 2021. A polyphenol-rich dietary pattern improves intestinal permeability, evaluated as serum zonulin levels, in older subjects: The MaPLE randomised controlled trial. *Clinical Nutrition* [online]. **40** (5), 3006-3018 [cit. 2024-03-30]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2020.12.014.
- DIMIDI, Eirini, Selina COX, Megan ROSSI a Kevin WHELAN, 2019. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients* [online]. **11** (8), 1–20 [cit. 2024-03-29]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11081806
- DURKIN, Luke A., Caroline E. CHILDS a Philip C. CALDER, 2021. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Intestinal Epithelium – A Review. *Foods* [online]. **10** (1), 1–16 [cit. 2024-03-30]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010199.

EMWAS, Abdul-Hamid, Raja ROY, Ryan T. MCKAY et al., 2019. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites* [online]. **9** (7), 1–39 [cit. 2024-03-27]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo9070123.

ESTAKI, Mehrbod, Jason PITHER, Peter BAUMEISTER et al., 2016. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* [online]. **4** (1), 1–12 [cit. 2024-03-31]. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-016-0189-7.

EZZATI, Majid a Elio RIBOLI, 2013. Behavioral and Dietary Risk Factors for Noncommunicable Diseases. *New England Journal of Medicine* [online]. 2013-09-05, **369** (10), 954–964 [cit. 2024-04-09]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1203528.

FAN, Yong a Oluf PEDERSEN, 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **19** (1), 55–71 [cit. 2024-03-02]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-0433-9.

FENG, Jie, Huang TANG, Min LI et al., 2014. The abundance of fecal *Faecalibacterium prausnitzii* in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Archives of Microbiology* [online]. **196** (1), 73–77 [cit. 2024-04-01]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-013-0942-2.

FINLAY, B. Brett a Jessica M. FINLAY, 2020. *Mikrobiom lidského těla: jak spolupracovat s mikroby v těle a prostředí a žít déle a zdravěji*. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. ISBN 978-80-7553-777-5.

FRANCAVILLA, Ruggiero, Vito MINIELLO, Anna Maria MAGISTÀ et al., 2010. A Randomized Controlled Trial of Lactobacillus GG in Children With Functional Abdominal Pain. *Pediatrics* [online]. 2010-12-01, **126** (6), e1445–e1452 [cit. 2024-03-28]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2010-0467.

FRANZOSA, Eric A., Katherine HUANG, James F. MEADOW, Dirk GEVERS, Katherine P. LEMON, Brendan J. M. BOHANNAN a Curtis HUTTENHOWER, 2015. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015-06-02, **112** (22), 1–2 [cit. 2024-03-28]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1423854112.

GANDA MALL, J. P., L. LÖFVENDAHL, C. M. LINDQVIST, R. J. BRUMMER, Å. V. KEITA a I. SCHOULTZ, 2018. Differential effects of dietary fibres on colonic barrier function in elderly individuals with gastrointestinal symptoms. *Scientific Reports* [online]. **8** (1), 1–9 [cit. 2024-03-30]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-31492-5.

GANOBIŠ, Caroline M., M. Sameer AL-ABDUL-WAHID, Simone RENWICK, Sandi YEN, Charley CARRIERO, Marc G. AUCCOIN a Emma ALLEN-VERCOE, 2020. 1D 1 H NMR as a Tool for Fecal Metabolomics. *Current Protocols in Chemical Biology* [online]. **12** (3), 1–26 [cit. 2024-03-23]. ISSN 2160-4762. Dostupné z: doi:10.1002/cpch.83.

GIERA, Martin, 2018. *Clinical Metabolomics Methods and Protocols*. Springer Science + Business Media. ISBN 978-1-4939-7591-4.

GUGLIELMETTI, Simone, Stefano BERNARDI, Cristian DEL BO' et al., 2020. Effect of a polyphenol-rich dietary pattern on intestinal permeability and gut and blood microbiomics in older subjects: study protocol of the MaPLE randomised controlled trial. *BMC Geriatrics* [online]. **20** (1), 1–5 [cit. 2024-03-30]. ISSN 1471-2318. Dostupné z: doi:10.1186/s12877-020-1472-9.

HERTZLER, Steven R. a Shannon M. CLANCY, 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. **103** (5), 582–587 [cit. 2024-03-29]. ISSN 00028223. Dostupné z: doi:10.1053/jada.2003.50111.

HO, Josephine, Alissa C NICOLUCCI, Heidi VIRTANEN, Alana SCHICK, Jon MEDDINGS, Raylene A REIMER a Carol HUANG, 2019. Effect of Prebiotic on Microbiota, Intestinal Permeability, and Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 2019-10-01, **104** (10), 4427–4440 [cit. 2024-03-30]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2019-00481.

IEBBA, Valerio, Valentina TOTINO, Antonella GAGLIARDI, Floriana SANTANGELO, Fatima CACCIOTTI, Maria TRANCASSINI, Carlo MANCINI, Clelia CICERONE, Enrico CORAZZIARI, Fabrizio PANTANELLA a Serena SCHIPPA, 2016. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol.* [online]. **39** (1): 1–12. [cit. 2024-03-29]. PMID: 26922981. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922981/>

ILMAZ, Ilkay, M. Enver DOLAR a Haydar OZPINAR, 2020. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *The Turkish Journal of Gastroenterology* [online]. 2020-02-12, **30** (3), 242–253 [cit. 2024-03-29]. ISSN 13004948. Dostupné z: doi:10.5152/tjg.2018.18227doi:10.3390/nu11081806.

JACKSON, Matthew A., Julia K. GOODRICH, Maria-Emanuela MAXAN et al., 2016. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* [online]. 2016-04-08, **65** (5), 749–756 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2015-310861.



JANG, Lae-Guen, Geunhoon CHOI, Sung-Woo KIM, Byung-Yong KIM, Sunghee LEE a Hyon PARK, 2019. The combination of sport and sport-specific diet is associated with characteristics of gut microbiota: an observational study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* [online]. 2019-01-15, **16** (1), 1–20 [cit. 2024-03-31]. ISSN 1550-2783. Dostupné z: doi:10.1186/s12970-019-0290-y.

KALLIOMÄKI, Marko, Maria CARMEN COLLADO, Seppo SALMINEN a Erika ISOLAURI, 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **87** (3), 534–538 [cit. 2024-04-01]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/87.3.534.

KARU, Naama, Lu DENG, Mordechai SLAE, An Chi GUO, Tanvir SAJED, Hien HUYNH, Eytan WINE a David S. WISHART, 2018. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta* [online]. **19** (1030), 1–24 [cit. 2024-04-13]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.05.031.

KLIMENKO, Natalia, Alexander TYAKHT, Anna POPENKO et al., 2018. Microbiome Responses to an Uncontrolled Short-Term Diet Intervention in the Frame of the Citizen Science Project. *Nutrients* [online]. **10** (5), 1–14 [cit. 2024-04-11]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10050576.

KOCOT, Aleksandra Maria, Elżbieta JAROCKA-CYRTA a Natalia DRABIŃSKA, 2022. Overview of the Importance of Biotics in Gut Barrier Integrity. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23** (5), 1–32 [cit. 2024-03-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23052896.

KOUTSOS, Athanasios, Maria M. ULASZEWSKA, Kajetan TROŠT et al., 2020. Impact of proanthocyanidin-rich apple intake on gut microbiota composition and polyphenol metabolomic activity in healthy mildly hypercholesterolemic subjects. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. **79** (OCE2), 1 [cit. 2024-04-10]. ISSN 0029-6651. Dostupné z: doi:10.1017/S002966512000436X.

LAMICHHANE, Santosh, Christian C. YDE, Mette S. SCHMEDES, Henrik Max JENSEN, Sebastian MEIER a Hanne Christine BERTRAM, 2015. Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces. *Analytical Chemistry* [online]. 2015-06-16, **87** (12), 5930–5937 [cit. 2024-03-24]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b00977.

LAMICHHANE, Santosh, Christian C. YDE, Sofia FORSSTEN et al., 2014. Impact of Dietary Polydextrose Fiber on the Human Gut Metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014-10-08, **62** (40), 9944–9951 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf5031218.

- LARSEN, Nadja, Finn K. VOGENSEN, Frans W. J. VAN DEN BERG et al., 2010. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE* [online]. 2010-2-5, **5** (2), 1–8 [cit. 2024-03-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0009085.
- LE CHATELIER, Emmanuelle, Trine NIELSEN, Junjie QIN et al., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* [online]. 2013-08-29, **500** (7464), 1–9 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12506.
- LE ROY, Caroline I., Jelena ŠTŠEPETOVA, Epp SEPP, Epp SONGISEPP, Sandrine P. CLAUS a Marika MIKELSAAR, 2015. New insights into the impact of Lactobacillus population on host-bacteria metabolic interplay. *Oncotarget* [online]. 2015-10-13, **6** (31), 30545-30556 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1949–2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.5906.
- LEEMING, Emily R, Abigail J. JOHNSON, Tim D. SPECTOR a Caroline I. LE ROY, 2019. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* [online]. **11** (12), 1–28 [cit. 2024-04-10]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11122862.
- LYNCH, Susan V. a Oluf PEDERSEN, 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2016-12-15, **375** (24), 2369–2379 [cit. 2024-03-06]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1600266.
- MACFARLANE, George T. a Sandra MACFARLANE, 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2012-01-01, **95** (1), 50–60 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.SGE\_Macfarlane.
- MAUKONEN, Johanna a Maria SAARELA, 2015. Human gut microbiota: does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. **74** (1), 23–36 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0029-6651. Dostupné z: doi:10.1017/S0029665114000688.
- MENG, Changting, Chunmei BAI, Thomas D. BROWN, Leroy E. HOOD a Qiang TIAN, 2018. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer. *GPB* [online]. **16** (1), 33–49 [cit. 2024-03-09]. ISSN 16720229. Dostupné z: doi:10.1016/j.gpb.2017.06.002.
- MENNI, C., M. A. JACKSON, T. PALLISTER, C. J. STEVES, T. D. SPECTOR a A. M. VALDES, 2017. Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International Journal of Obesity* [online]. **41** (7), 1099–1105 [cit. 2024-04-01]. ISSN 0307-0565. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2017.66.
- MESLIER, Victoria, Manolo LAIOLA, Henrik Munch ROAGER et al., 2020. Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut* [online]. 2020-06-06, **69** (7), 1258–1268 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2019-320438.

MICCOLI, Roberto, Cristina BIANCHI, Leonardo ODOGUARDI, Giuseppe PENNO, Francesco CARICATO, Maria Giovanna GIOVANNITTI, Laura PUCCI a Stefano DEL PRATO, 2005. Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [online]. **15** (4), 250–254 [cit. 2024-03-29]. ISSN 09394753. Dostupné z: doi:10.1016/j.numecd.2004.09.002.

MICHAEL, D. R., A. A. JACK, G. MASETTI et al., 2020. A randomised controlled study shows supplementation of overweight and obese adults with lactobacilli and bifidobacteria reduces bodyweight and improves well-being. *Scientific Reports* [online]. **10** (1), 1–12 [cit. 2024-04-01]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-60991-7.

MITCHELL, Cassie M., Brenda M. DAVY, Monica A. PONDER, Ryan P. MCMILLAN, Michael D. HUGHES, Matthew W. HULVER, Andrew P. NEILSON a Kevin P. DAVY, 2021. Prebiotic Inulin Supplementation and Peripheral Insulin Sensitivity in adults at Elevated Risk for Type 2 Diabetes: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Nutrients* [online]. **13** (9), 3235 [cit. 2024-03-30]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13093235.

MODI, Sheetal R., James J. COLLINS a David A. RELMAN, 2014. Antibiotics and the gut microbiota. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2014-10-1, **124** (10), 4212–4218 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI72333.

MUJAGIC, Zlatan, Paul DE VOS, Mark V. BOEKSCHOTEN et al., 2017. The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial. *Scientific Reports* [online]. 2017-03-15, **7** (1), 1–10 [cit. 2024-03-28]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep40128.

MUTHUBHARATHI, Balasubramanian Chellammal, Thirumugam GOWRIPRIYA a Krishnaswamy BALAMURUGAN, 2021. Metabolomics: small molecules that matter more. *Molecular Omics* [online]. 2021-04-19, **17** (2), 210–229 [cit. 2024-03-31]. ISSN 2515-4184. Dostupné z: doi:10.1039/D0MO00176G.

NEIS, Evelien, Cornelis DEJONG a Sander RENSEN, 2015. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients* [online]. **7** (4), 2930–2946 [cit. 2024-04-13]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7042930.

Nejoblíbenější ovoce, 2016. In: *Český statistický úřad* [online]. [cit. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/nejoblibenejsi-ovoce>.

NEL VAN ZYL, Kristien, Sipiwe R. MATUKANE, Bianca L. HAMMAN, Andrew C. WHITELAW a Mae NEWTON-FOOT, 2022. Effect of antibiotics on the human microbiome: a systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **59** (2), 1–2 [cit. 2024-04-03]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106502.

NIELSEN, Elsa Sandberg, Eirik GARNÅS, Kathrine Juul JENSEN, Lars Hestbjerg HANSEN, Peder Sandvold OLSEN, Christian RITZ, Lukasz KRYCH a Dennis Sandris NIELSEN, 2018. Lacto-fermented sauerkraut improves symptoms in IBS patients independent of product pasteurisation – a pilot study. *Food & Function* [online]. 2018-10-17, **9** (10), 5323–5335 [cit. 2024-03-29]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C8FO00968F.

PANDEY, Himani, Daryl W. T. TANG, Sunny H. WONG a Devi LAL, 2023. Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Biological Role and Therapeutic Opportunities. *Cancers* [online]. **15** (3), 1 [cit. 2024-03-09]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15030866.

PORTINCASA, Piero, Leonilde BONFRATE, Mirco VACCA et al., 2022. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23** (3), 1–15 [cit. 2024-04-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23031105.

RAVN-HAREN, Gitte, Lars O. DRAGSTED, Tine BUCH-ANDERSEN et al., 2013. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in healthy volunteers. *European Journal of Nutrition* [online]. **52** (8), 1875–1889 [cit. 2024-04-10]. ISSN 1436-6207. Dostupné z: doi:10.1007/s00394-012-0489-z.

REIJNDERS, Dorien, Gijs H. GOOSSENS, Gerben D. A. HERMES et al., 2016. Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Cell Metabolism* [online]. **24**(1), 63–74 [cit. 2024-04-03]. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2016.06.016.

RODRÍGUEZ-ORTIZ, Donají, Azucena REYES-PÉREZ, Pablo LEÓN, Hugo SÁNCHEZ, Maureen MOSTI, Carlos A. AGUILAR-SALINAS, David VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ a Miguel F. HERRERA, 2016. Assessment of two different diagnostic guidelines criteria (National Cholesterol Education Adult Treatment Panel III [ATP III] and International Diabetes Federation [IDF]) for the evaluation of metabolic syndrome remission in a longitudinal cohort of patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery* [online]. **159** (4), 1121–1128 [cit. 2024-03-29]. ISSN 00396060. Dostupné z: doi:10.1016/j.surg.2015.11.015.

RUSSELL, Wendy R, Silvia W GRATZ, Sylvia H DUNCAN et al., 2011. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **93** (5), 1062–1072 [cit. 2024-04-03]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.110.002188.

SAARI, Antti, Lauri J. VIRTÁ, Ulla SANKILAMPI, Leo DUNKEL a Harri SAXEN, 2015. Antibiotic Exposure in Infancy and Risk of Being Overweight in the First 24 Months of Life. *Pediatrics* [online]. 2015-04-01, **135** (4), 617–626 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2014-3407.

SALES, Kate M. a Raylene A. REIMER, 2023. Unlocking a novel determinant of athletic performance: The role of the gut microbiota, short-chain fatty acids, and „biotics“ in exercise. *Journal of Sport and Health Science* [online]. **12** (1), 36–44 [cit. 2024-03-27]. ISSN 20952546. Dostupné z: doi:10.1016/j.jshs.2022.09.002.

SALONEN, Anne, Leo LAHTI, Jarkko SALOJÄRVI et al., 2014. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME Journal* [online]. 2014-11-01, **8** (11), 2218–2230 [cit. 2024-04-11]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2014.63.

SÁNCHEZ, Ester, Ester DONAT, Carmen RIBES-KONINCKX, Maria Leonor FERNÁNDEZ-MURGA a Yolanda SANZ, 2013. Duodenal-Mucosal Bacteria Associated with Celiac Disease in Children. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2013-09-15, **79** (18), 5472–5479 [cit. 2024-03-31]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00869-13.

SANZ, Yolanda, Ester SÁNCHEZ, Marta MARZOTTO, Miguel CALABUIG, Sandra TORRIANI a Franco DELLAGLIO, 2007. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. **51** (3), 562–568 [cit. 2024-03-31]. ISSN 09288244. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00337.x.

SETH, Erica C. a Michiko E. TAGA, 2014. Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014-07-08, **5** (350), 1–3 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2014.00350.

SHARAFEDTINOV, Khaider K., Oksana A. PLOTNIKOVA, Ravilay I ALEXEEVA, Tatjana B. SENTSOVA, Epp SONGISEPP, Jelena STSEPETOVA, Imbi SMIDT a Marika MIKELSAAR, 2013. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients – a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutrition Journal* [online]. **12** (1), 1–2 [cit. 2024-04-14]. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-12-138.

SHINOHARA, Kenji, Yuji OHASHI, Koh KAWASUMI, Atsushi TERADA a Tomohiko FUJISAWA, 2010. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* [online]. **16** (5), 510–515 [cit. 2024-04-09]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2010.03.005.

STEPHENS, Richard W., Lidia ARHIRE a Mihai COVASA, 2018. Gut Microbiota: From Microorganisms to Metabolic Organ Influencing Obesity. *Obesity* [online]. **26** (5), 801–809 [cit. 2024-04-01]. ISSN 1930-7381. Dostupné z: doi:10.1002/oby.22179.

TIAN, Tian, Xiaobo ZHANG, Tao LUO, Duolao WANG, Yuping SUN a Jianghong DAI, 2021. Effects of Short-Term Dietary Fiber Intervention on Gut Microbiota in Young Healthy People. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* [online]. **14** (1), 3507–3516 [cit. 2024-04-11]. ISSN 1178-7007. Dostupné z: doi:10.2147/DMSO.S313385.

TRESSERRA-RIMBAU, A., E. B. RIMM, A. MEDINA-REMÓN et al., 2014. Inverse association between habitual polyphenol intake and incidence of cardiovascular events in the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [online]. **24** (6), 1 [cit. 2024-04-09]. ISSN 09394753. Dostupné z: doi:10.1016/j.numecd.2013.12.014.

TRIMIGNO, Alessia, Bekzod KHAKIMOV, Josue Leonardo Castro MEJIA, Mette Skau MIKKELSEN, Mette KRISTENSEN, Birthe Møller JESPERSEN a Søren Balling ENGELSEN, 2017. Identification of weak and gender specific effects in a short 3 weeks intervention study using barley and oat mixed linkage  $\beta$ -glucan dietary supplements: a human fecal metabolome study by GC-MS. *Metabolomics* [online]. **13** (10), 1 [cit. 2024-04-01]. ISSN 1573-3882. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-017-1247-2.

TURAN, Ilker, Ozden DEDELI, Serhat BOR a Tankut ILTER, 2015. Effects of a kefir supplement on symptoms, colonic transit, and bowel satisfaction score in patients with chronic constipation: A pilot study. *The Turkish Journal of Gastroenterology* [online]. 2015-01-13, **25** (6), 650–656 [cit. 2024-03-29]. ISSN 13004948. Dostupné z: doi:10.5152/tjg.2014.6990.

TURNBAUGH, Peter J., Micah HAMADY, Tanya YATSUNENKO et al., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* [online]. **457** (7228), 480–484 [cit. 2024-03-09]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature07540.

VALDES, M. Ana, Jens Walter, Eran Segal a Tim D. SPECTOR, 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. **13** (361) 2179 [cit. 2024-03-09]. Dostupné z: Doi: 10.1136/bmj.k2179.

VIDAL, A. C., S. K. MURPHY, A. P. MURTHA et al., 2013. Associations between antibiotic exposure during pregnancy, birth weight and aberrant methylation at imprinted genes among offspring. *International Journal of Obesity* [online]. **37** (7), 907–913 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0307-0565. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2013.47.

WALLACE, Alison J., Sarah L. EADY, Denise C. HUNTER et al., 2015. No difference in fecal levels of bacteria or short chain fatty acids in humans, when consuming fruit juice beverages containing fruit fiber, fruit polyphenols, and their combination. *Nutrition Research* [online]. **35** (1), 1–10 [cit. 2024-04-10]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2014.11.002.

WANG, X., Y. OUYANG, J. LIU, M. ZHU, G. ZHAO, W. BAO a F. B. HU, 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ* [online]. 2014-07-29, **349** (Jul 29, 3), g4490-g4490 [cit. 2024-04-09]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.g4490.

WITKOWSKI, Marco, Taylor L. WEEKS a Stanley L. HAZEN, 2020. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circulation Research* [online]. 2020-07-31, **127** (4), 553–570 [cit. 2024-03-06]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316242.

XU, Qian, Jing-Jing NI, Bai-Xue HAN et al., 2022. Causal Relationship Between Gut Microbiota and Autoimmune Diseases: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022-1-24, **12** (1) [cit. 2024-03-09]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.746998.

YEN, Sandi, Julie A. K. MCDONALD, Kathleen SCHROETER, Kaitlyn OLIPHANT, Stanislav SOKOLENKO, Eric J. M. BLONDEEL, Emma ALLEN-VERCOE a Marc G. AUCOIN, 2015. Metabolomic Analysis of Human Fecal Microbiota: A Comparison of Feces-Derived Communities and Defined Mixed Communities. *Journal of Proteome Research* [online]. 2015-03-06, **14** (3), 1472–1482 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr5011247.

ZHANG, Husen, John K. DIBAISE, Andrea ZUCCOLO et al., 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009-02-17, **106** (7), 1–3 [cit. 2024-04-01]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0812600106.

ZHOU, Cheng-Bei, Yi-Lu ZHOU a Jing-Yuan FANG, 2021. Gut Microbiota in Cancer Immune Response and Immunotherapy. *Trends in Cancer* [online]. **7** (7), 647–660 [cit. 2024-03-09]. ISSN 24058033. Dostupné z: doi:10.1016/j.trecan.2021.01.010.

ZIERER, Jonas, Matthew A. JACKSON, Gabi KASTENMÜLLER et al., 2018. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nature Genetics* [online]. **50** (6), 790–795 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/s41588-018-0135-7.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATP III – Adult Treatment Panel III, diagnostická kritéria pro metabolický syndrom

BMI – body mass index, index tělesné hmotnosti

CFU – colony forming units, jednotka užívaná v mikrobiologii pro vyjádření počtu životaschopných bakterií ve vzorku

CVD – cardiovascular diseases, kardiovaskulární onemocnění

DHA – dokosaheptaenová kyselina

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EPA – eikosapentaenová kyselina

FAPPZ – Fakulta přírodních a potravinových zdrojů

GIT – gastrointestinální trakt

HLA – human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen

GLP – glukagon-like peptid, glukagonu podobný peptid

IL-6 – interleukin-6

ISAPP – International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika

LDL – low density lipoprotein, označení pro cholesterol s nízkou hustotou

MS – mass spectroscopy, hmotnostní spektroskopie

NMR – nukleární magnetická rezonance

NSAID – nesteroidní antirevmatika

PBS – phosphate buffered saline, fosfátový pufr

PCA – Principal Component Analysis, analýza hlavních komponent

PQN – Probabilistic Quotient Normalization, technika používaná k normalizaci spektrálních dat

SCFAs – short chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem

SNR – signal to noise ratio, poměr signálu k šumu

TMS – tetramethylsilan

TNF alfa– tumor nekrotizující faktor alfa

TSP – 3-(trimethylsilyl)propionát sodný



# 10 Samostatné přílohy

## 10.1 Příloha č. 1: Souhlasné stanovisko etické komise

### ETICKÁ KOMISE PRO MULTICENTRICKÁ HODNOCENÍ

Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Ethics Committee of the Regional Hospital in Liberec

Husova 357/10, 460 01 Liberec 1- Staré Město, tel.: 485312835, e-mail: eticka.komise@nemlib.cz

**STANOVISKO ETICKÉ KOMISE**  
*Opinion of the Ethics Committee*

**Název projektu/Full Title of Project:**

**Metabolická aktivita mikroorganismů lidské stolice**

(Studie v rámci diplomové práce s názvem „Změny metabolomu stolice u lidí po krátkodobé výživové intervenci vybranou potravinou“)

**Žadatel/Applicant:**

Mgr. Šárka Knížková, studentka navazujícího magisterského oboru Výživa a potravinářství České zemědělské univerzity v Praze

**Datum podání žádosti/Date of submission of the Application Form:**

9. 10. 2023

**Datum a čas jednání EK/Date and time of Ethics Committee session:**

25. 10. 2023 (14,00 hod.)

**Číslo jednání/Reference number:**

EK/81/2023

**Hodnocené dokumenty/List of all Submitted documents:**

- Průvodní dopis ze dne 1. 10. 2023
- Žádost ze dne 20. 8. 2019
- Protokol studie
- Životopis hlavního zkoušejícího a všech zkoušejících
- Informace pro pacienta a Informovaný souhlas pacienta
- Žádost o odpuštění poplatku za projednání

**Stanovisko etické komise/Ethics Committee's opinion:**

Etická komise vydává souhlasné stanovisko/ Ethics Committee issues favourable opinion

Datum/Date: 25. 10. 2023

Podpis předsedy EK/Signature of Chairperson-EC

**Rozdělovník/ List of Distribution:**

Mgr. Šárka Knížková - žadatel

Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Husova 357/10, Liberec I - Staré Město

460 01 Liberec

Multicentrická etická komise

Seznam členů etické komise/ *List of the Ethics Committee Members:*

Jméno a příjmení/ <i>First name and surname</i>	Muž/ Žena <i>Male/ Female</i>	Odbornost/ <i>Specialism</i>	Zaměstnanec zřizovatele EK*		Funkce v EK/ <i>Role in EC</i>	Přítomen/ <i>Attendance</i>		Hlasoval/la <i>Voted</i>	
			Ano Yes	Ne No		Ano Yes	Ne No	Ano Yes	Ne No
MUDr. Karel Dvořák, Ph.D.	M/M	gastroenterolog/ gastroenterologist	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	předseda/ <i>chairperson</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Hana Věchtová	Ž/F	intenzivista/ <i>intensivist</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	místopředseda/ <i>vice-chairperson</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Magda Macháňová	Ž/F	radiční onkolog/ <i>radiation oncologist</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	člen/ <i>member</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Pavol Biath	M/M	chirurg/ <i>surgeon</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	člen/ <i>member</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Zdeněk Skalický	M/M	pediátr/ <i>pediatrician</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	člen/ <i>member</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ing. Marie Baxová	Ž/F	ekonom/ <i>economist</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	nezávislý člen/ <i>independent</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Mgr. Jitka Cerhová	Ž/F	pedagog/ <i>pedagogue</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	nezávislý člen/ <i>independent</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ing. Hana Gráfová	Ž/F	referentka/ <i>secretary</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	člen/ <i>member</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(pozn: \*Zaměstnanec zřizovatele EK/ *Employee of EC appointing authority*)

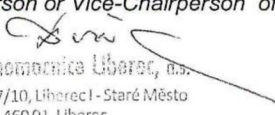
Etická komise prohlašuje, že byla ustavena a pracuje podle jednacího řádu v souladu se správnou klinickou praxí (GCP) a platnými právními předpisy/*The Ethics Committee hereby declares that it was established and operates in accordance with its Rules of Procedure in compliance with Good Clinical Practice and valid legal regulations:*

Ano/Yes    Ne/No

Komentář/*Comments:*

Datum/*Date:* 25. 10. 2023

Podpis předsedy EK nebo zástupce  
*Signature of Chairperson or Vice-Chairperson of the EC*

  
Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Husova 357/10, Liberec I - Staré Město  
460 01 Liberec

Multicentrická etická komise

## 10.2 Příloha č. 2: Dotazník pro dobrovolníky

### 1. Jaké je Vaše pohlaví?

*Vyberte 1 odpověď.*

- Muž
- Žena

### 2. Kolik je Vám let?

*Napište číslo.*

---

### 3. Jaká je Vaše výška v centimetrech?

*Napište číslo.*

---

### 4. Jaká je Vaše hmotnost v kilogramech?

*Napište číslo.*

---

### 5. Jaké je Vaše zaměstnání?

*Vyberte 1 odpověď.*

- Kancelářské – sedavé
- Aktivní

### 6. Věnujete se nějakému sportu?

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
- Ne

### 7. Jakému sportu se věnujete?

*Napište odpověď.*

---

**8. Kolik hodin týdně sportem trávíte?**

*Napište číslo.*

\_\_\_\_\_

**9. Pijete alkohol?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
  - *Napište typ nápoje a množství:* \_\_\_\_\_
- Ne

**10. Kouříte?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
  - *Napište počet cigaret za den:* \_\_\_\_\_
- Ne

**11. Berete nějaké léky?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
  - *Napište název léku a dávkování:* \_\_\_\_\_
- Ne

**12. Berete nebo bral(a) jste během posledních 14 dní antibiotika?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
- Ne

**13. Kolik hodin denně spíte?**

*Napište číslo.*

\_\_\_\_\_

**14. Byl(a) jste léčen(a) či léčíte se s nějakým střevním onemocněním?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
- Ne

**15. Držíte nějakou dietu nebo stravujete se nějakým výživovým směrem?**

*Vyberte 1 odpověď.*

- Ano
  - *Napište typ diety a dobu, po kterou se tak stravujete:* \_\_\_\_\_
- Ne

**10.3 Příloha č. 3: Normalizované koncentrace jednotlivých metabolitů před a po intervenci**

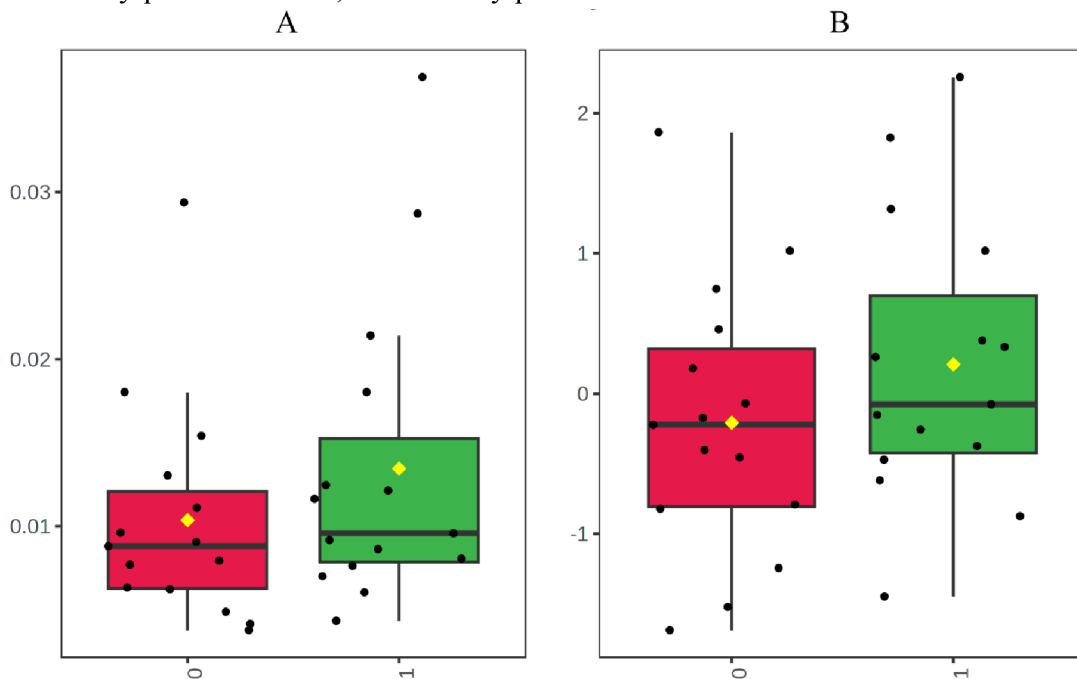
Subjekty	Hmotnost vzorku (mg)	Vztah k intervenci	3-fenylpropionová kyselina	Acetát	Alanin	Arabinóza	Butyrát	Fenylacetát	Fenylalanin	Fruktóza	Glukóza	Glutamát	Glutamin
1001 1/2	152	Před	0,0028	0,3000	0,0777	0,0061	0,1202	0,0330	0,1471	0,1957	0,0403	0,0294	0,0458
1001 2/2	241	Po	0,0013	0,3010	0,0134	0,0025	0,1061	0,0031	0,0168	0,0982	0,0048	0,0092	0,0051
1002 1/2	221	Před	0,0026	0,2603	0,0214	0,0025	0,1014	0,0149	0,0132	0,1317	0,0062	0,0038	0,0120
1002 2/2	232	Po	0,0028	0,3311	0,0302	0,0108	0,1181	0,0120	0,1168	0,0388	0,0078	0,0043	0,0132
1003 1/2	202	Před	0,0050	0,4023	0,0307	0,0283	0,1171	0,0370	0,1631	0,0670	0,0084	0,0079	0,0185
1003 2/2	222	Po	0,0020	0,2287	0,0552	0,0076	0,0890	0,0229	0,2201	0,1186	0,0086	0,0121	0,0257
1004 1/2	244	Před	0,0015	0,1047	0,0379	0,0101	0,0439	0,0115	0,3151	0,0581	0,0059	0,0096	0,0194
1004 2/2	231	Po	0,0073	0,3053	0,0379	0,0181	0,1381	0,0083	0,0780	0,0670	0,0095	0,0214	0,0165
1005 1/2	237	Před	0,0046	0,2537	0,0291	0,0061	0,0876	0,0058	0,0675	0,0743	0,0060	0,0077	0,0094
1005 2/2	215	Po	0,0122	0,2684	0,0712	0,0045	0,1385	0,0046	0,0225	0,1816	0,0070	0,0287	0,0296
1006 1/2	240	Před	0,0079	0,2366	0,0457	0,0044	0,0966	0,0128	0,0037	0,1495	0,0063	0,0154	0,0273
1006 2/2	216	Po	0,0021	0,2977	0,0350	0,0027	0,1103	0,0106	0,1081	0,0735	0,0038	0,0086	0,0175
1007 1/2	223	Před	0,0022	0,3301	0,0205	0,0025	0,1159	0,0054	0,0918	0,0721	0,0020	0,0062	0,0104
1007 2/2	231	Po	0,0017	0,3517	0,0274	0,0345	0,1391	0,0311	0,2266	0,0644	0,0116	0,0096	0,0142
1008 1/2	216	Před	0,0039	0,3363	0,0288	0,0026	0,1156	0,0067	0,0231	0,1511	0,0066	0,0130	0,0135
1008 2/2	237	Po	0,0016	0,2099	0,0325	0,0057	0,0646	0,0167	0,0221	0,0710	0,0038	0,0070	0,0109
1009 1/2	224	Před	0,0026	0,3136	0,0302	0,0260	0,0711	0,0269	0,0735	0,0813	0,0058	0,0111	0,0176
1009 2/2	217	Po	0,0019	0,1623	0,0282	0,0045	0,0402	0,0085	0,0084	0,0625	0,0042	0,0116	0,0142
1010 1/2	217	Před	0,0014	0,2010	0,0209	0,0008	0,0515	0,0093	0,0216	0,0495	0,0015	0,0091	0,0116
1010 2/2	250	Po	0,0026	0,4041	0,0303	0,0203	0,1401	0,0507	0,1474	0,0428	0,0087	0,0081	0,0175
1011 1/2	202	Před	0,0012	0,3405	0,0194	0,0527	0,1440	0,0811	0,1582	0,0269	0,0089	0,0042	0,0078
1011 2/2	218	Po	0,0078	0,3183	0,0342	0,0044	0,1071	0,0158	0,0340	0,1114	0,0132	0,0180	0,0122
1012 1/2	209	Před	0,0007	0,2331	0,0188	0,0019	0,0533	0,0065	0,0164	0,0537	0,0051	0,0049	0,0077
1012 2/2	230	Po	0,0022	0,1855	0,0346	0,0037	0,0723	0,0092	0,0105	0,0991	0,0062	0,0125	0,0167
1013 1/2	226	Před	0,0020	0,2050	0,0483	0,0052	0,0909	0,0204	0,0152	0,1431	0,0121	0,0180	0,0163
1013 2/2	211	Po	0,0022	0,1323	0,0264	0,0104	0,0368	0,0209	0,0106	0,0836	0,0146	0,0076	0,0101
1014 1/2	219	Před	0,0048	0,1612	0,0310	0,0028	0,1150	0,0333	0,0088	0,1022	0,0133	0,0088	0,0102
1014 2/2	210	Po	0,0022	0,2802	0,0143	0,0015	0,0949	0,0080	0,0130	0,0728	0,0041	0,0060	0,0069
1015 1/2	213	Před	0,0020	0,3447	0,0294	0,0065	0,1359	0,0109	0,0235	0,1529	0,0117	0,0063	0,0069
1015 2/2	244	Po	0,0040	0,2753	0,0456	0,0078	0,1153	0,0230	0,0858	0,1205	0,0202	0,0369	0,0325

Subjekty	Hmotnost vzorku (mg)	Vztah k intervenci	Izobutyrát	Izoleucin	Izovalerát	Leucin	Lysin	Propionát	Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valerát	Valin
1001 1/2	152	Před	0,0279	0,0779	0,1104	0,0237	0,0825	0,1568	0,0530	0,0105	0,0896	0,0645	0,0444
1001 2/2	241	Po	0,0045	0,0054	0,0054	0,0027	0,0017	0,0522	0,0051	0,0017	0,0042	0,0127	0,0073
1002 1/2	221	Před	0,0058	0,0122	0,0141	0,0021	0,0069	0,0621	0,0105	0,0015	0,0086	0,0145	0,0138
1002 2/2	232	Po	0,0048	0,0187	0,0376	0,0039	0,0110	0,2036	0,0202	0,0023	0,0111	0,0516	0,0151
1003 1/2	202	Před	0,0033	0,0240	0,0267	0,0010	0,0134	0,2423	0,0208	0,0024	0,0134	0,0344	0,0180
1003 2/2	222	Po	0,0125	0,0403	0,0259	0,0062	0,0206	0,0638	0,0329	0,0027	0,0254	0,0170	0,0338
1004 1/2	244	Před	0,0113	0,0195	0,0253	0,0071	0,0140	0,0510	0,0222	0,0013	0,0143	0,0112	0,0219
1004 2/2	231	Po	0,0196	0,0241	0,0135	0,0125	0,0142	0,1058	0,0197	0,0010	0,0156	0,0424	0,0191
1005 1/2	237	Před	0,0088	0,0161	0,0064	0,0042	0,0088	0,0720	0,0116	0,0008	0,0103	0,0194	0,0126
1005 2/2	215	Po	0,0251	0,0570	0,0434	0,0153	0,0315	0,1482	0,0380	0,0028	0,0345	0,0401	0,0439
1006 1/2	240	Před	0,0162	0,0399	0,0215	0,0098	0,0190	0,1191	0,0235	0,0028	0,0161	0,0336	0,0286
1006 2/2	216	Po	0,0087	0,0175	0,0103	0,0046	0,0119	0,0800	0,0170	0,0025	0,0152	0,0194	0,0146
1007 1/2	223	Před	0,0033	0,0134	0,0116	0,0012	0,0067	0,0653	0,0076	0,0050	0,0057	0,0212	0,0093
1007 2/2	231	Po	0,0024	0,0258	0,0204	0,0020	0,0113	0,1105	0,0170	0,0025	0,0124	0,0253	0,0163
1008 1/2	216	Před	0,0098	0,0225	0,0208	0,0059	0,0092	0,1216	0,0129	0,0018	0,0119	0,0524	0,0112
1008 2/2	237	Po	0,0083	0,0134	0,0123	0,0061	0,0081	0,0754	0,0122	0,0014	0,0092	0,0181	0,0150
1009 1/2	224	Před	0,0115	0,0176	0,0203	0,0038	0,0086	0,1028	0,0150	0,0009	0,0094	0,0134	0,0152
1009 2/2	217	Po	0,0151	0,0205	0,0116	0,0063	0,0107	0,0478	0,0104	0,0011	0,0100	0,0151	0,0174
1010 1/2	217	Před	0,0127	0,0159	0,0046	0,0060	0,0091	0,0564	0,0136	0,0012	0,0085	0,0118	0,0113
1010 2/2	250	Po	0,0021	0,0185	0,0159	0,0015	0,0109	0,0870	0,0266	0,0013	0,0087	0,0178	0,0233
1011 1/2	202	Před	0,0008	0,0113	0,0162	0,0042	0,0063	0,0413	0,0158	0,0011	0,0059	0,0049	0,0114
1011 2/2	218	Po	0,0181	0,0241	0,0248	0,0044	0,0121	0,0710	0,0176	0,0015	0,0109	0,0288	0,0166
1012 1/2	209	Před	0,0052	0,0124	0,0150	0,0013	0,0075	0,0519	0,0090	0,0019	0,0073	0,0096	0,0100
1012 2/2	230	Po	0,0137	0,0204	0,0147	0,0101	0,0108	0,0700	0,0160	0,0012	0,0093	0,0228	0,0181
1013 1/2	226	Před	0,0205	0,0337	0,0340	0,0117	0,0165	0,0784	0,0175	0,0033	0,0130	0,0268	0,0215
1013 2/2	211	Po	0,0078	0,0104	0,0147	0,0036	0,0068	0,0320	0,0091	0,0019	0,0065	0,0155	0,0125
1014 1/2	219	Před	0,0104	0,0155	0,0219	0,0074	0,0094	0,0346	0,0143	0,0024	0,0084	0,0232	0,0157
1014 2/2	210	Po	0,0060	0,0091	0,0164	0,0034	0,0040	0,0509	0,0061	0,0012	0,0053	0,0161	0,0071
1015 1/2	213	Před	0,0072	0,0180	0,0191	0,0040	0,0078	0,0498	0,0096	0,0025	0,0106	0,0233	0,0106
1015 2/2	244	Po	0,0432	0,0493	0,0390	0,0298	0,0215	0,1833	0,0250	0,0065	0,0185	0,0647	0,0299

## 10.4 Příloha č. 4: Boxploty metabolitů s nejnižší p-hodnotou

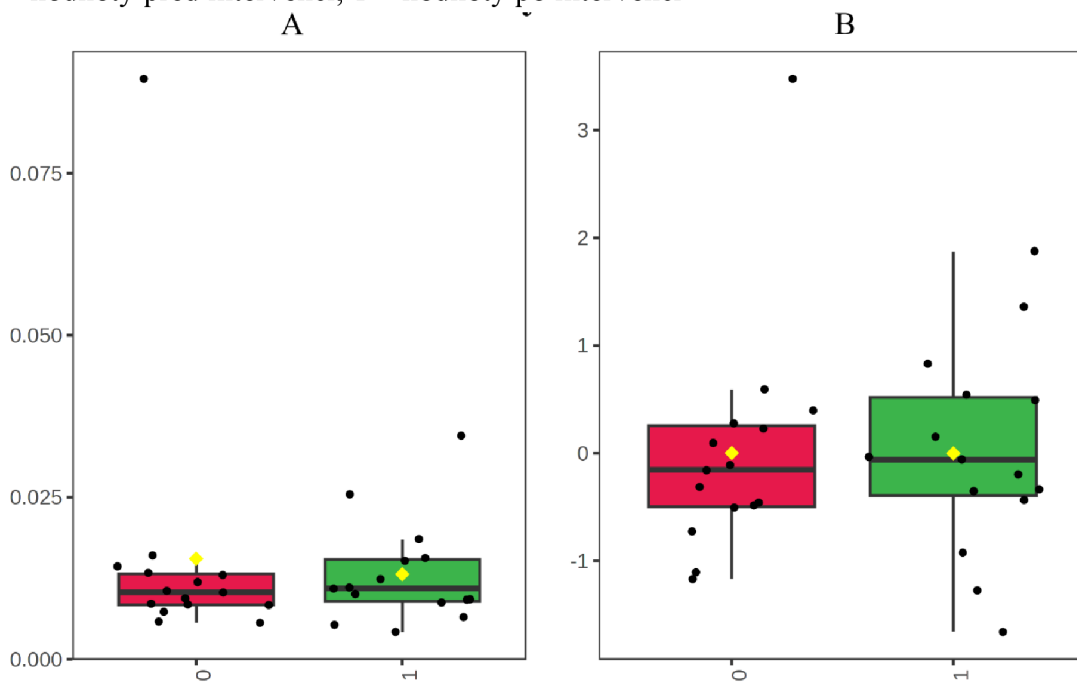
### 10.4.1 Koncentrace isobutyátu před a po intervenci

$p = 0,3591$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace,  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci



### 10.4.2 Koncentrace tyrosinu před a po intervenci

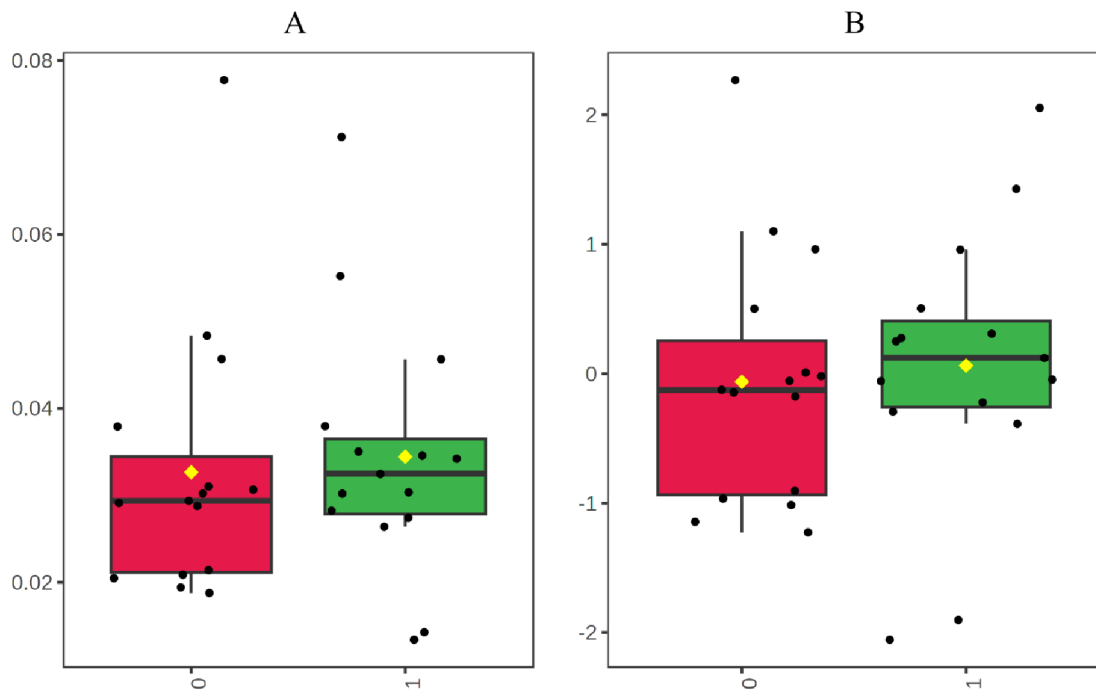
$p = 0,389$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci





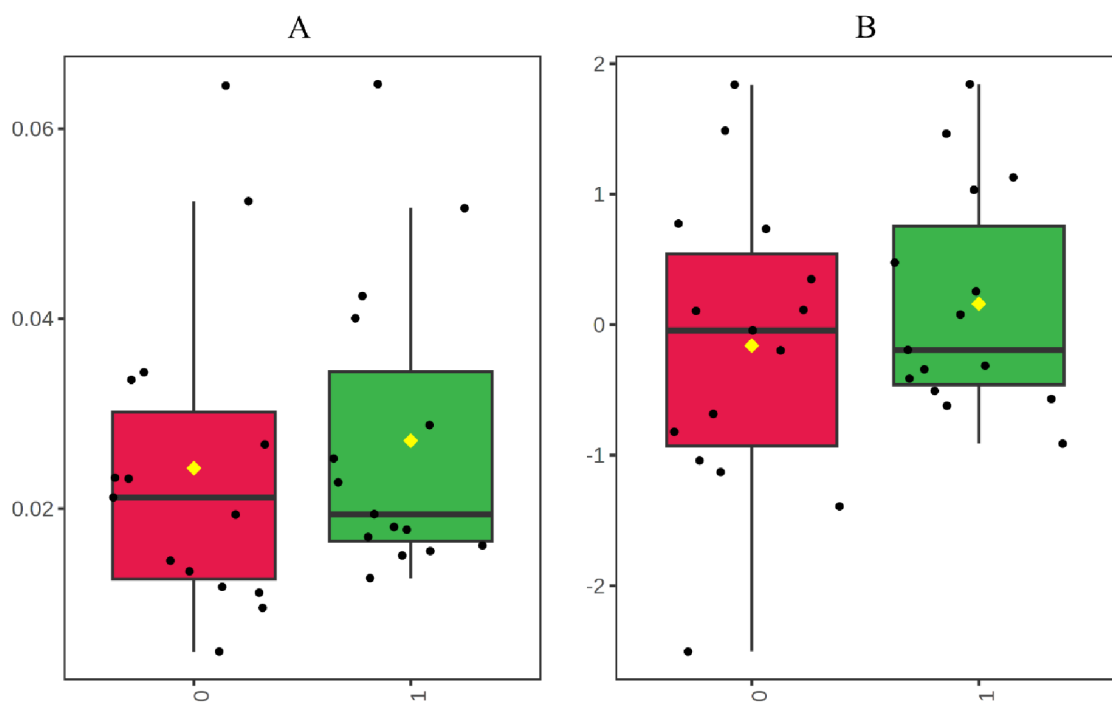
### 10.4.3 Koncentrace alaninu před a po intervenci

$p = 0,421$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci



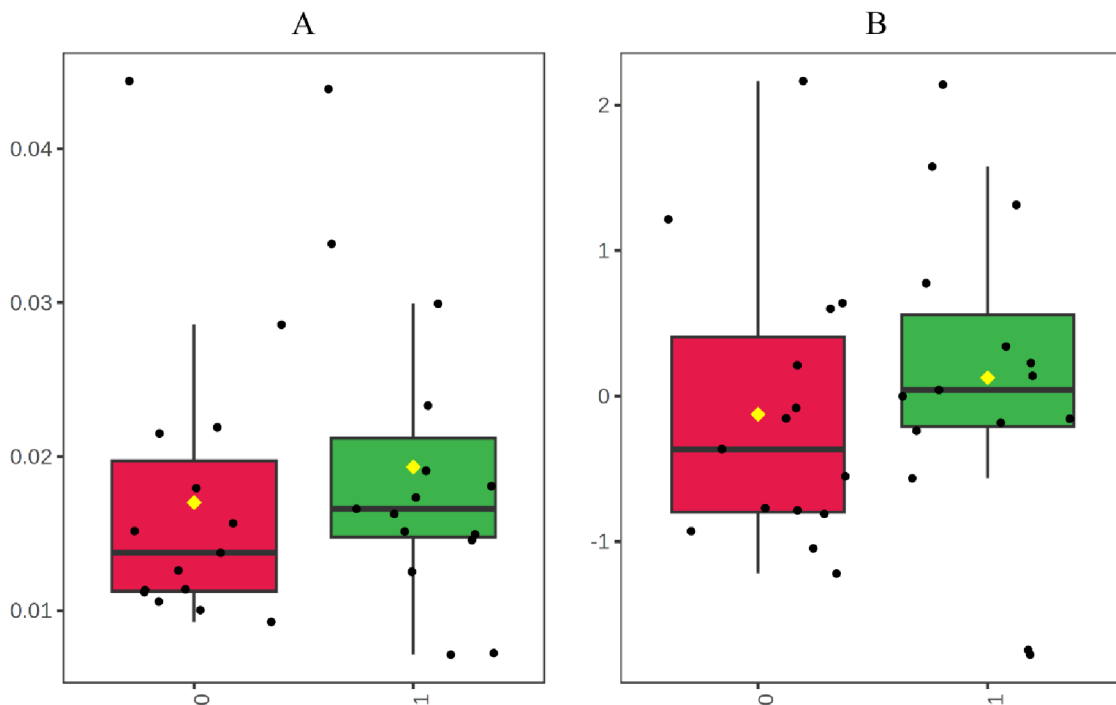
### 10.4.4 Koncentrace valerátu před a po intervenci

$p = 0,4543$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci



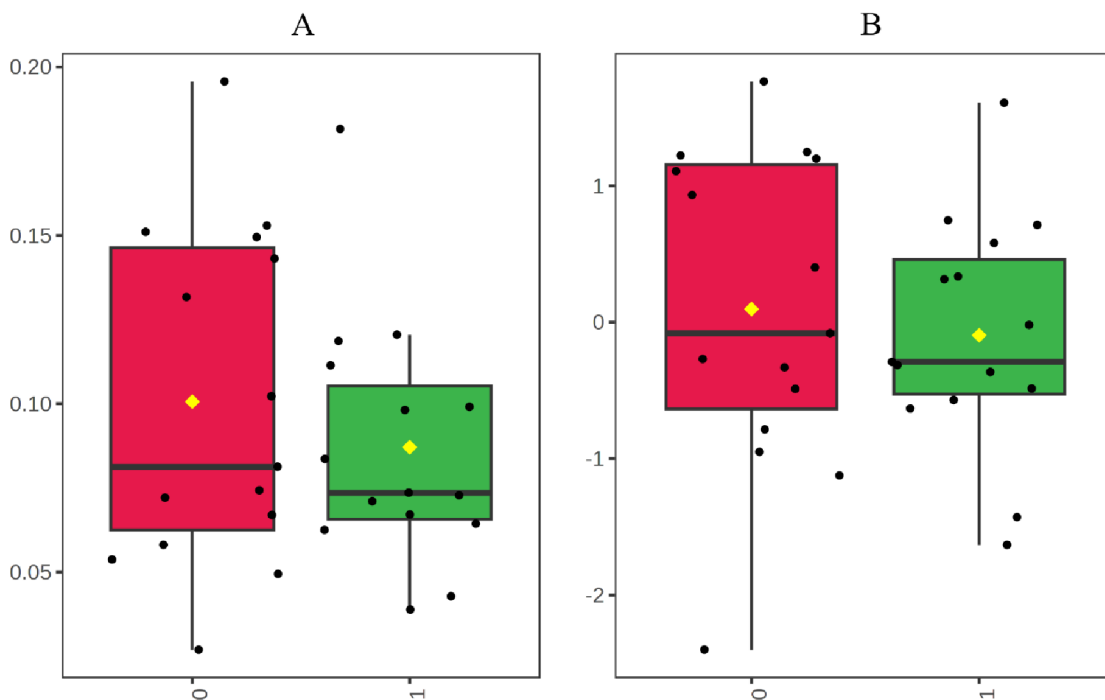
### 10.4.5 Koncentrace valinu před a po intervenci

$p = 0,4543$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci



### 10.4.6 Koncentrace glutamátu před a po intervenci

$p = 0,4887$ , A = původní koncentrace, B = normalizovaná koncentrace  
0 = hodnoty před intervencí, 1 = hodnoty po intervenci



## 10.5 Příloha č. 5: Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Nejvýznamnější mikroorganismy střevní mikrobioty u lidí

Tabulka č. 2: Přehled SCFAs produkovaných hlavními skupinami fermentativních mikroorganismů

Tabulka č. 3: Změny střevní mikrobioty v průběhu života

Tabulka č. 4: Příklady fermentovaných potravin a mikroorganismů v nich obsažených

Tabulka č. 5: Kritéria pro diagnostiku metabolického syndromu

Tabulka č. 6: Kmeny typické pro osoby s obezitou a pro jedince s normální hmotností

Tabulka č. 7: Souvislost nádorových onemocnění GIT s mikrobiálními vlivy

Tabulka č. 8: Potraviny obsahující fermentovatelné zdroje a druhy bakterií produkující SCFAs

Tabulka č. 9: Průměrné nutriční hodnoty syrového jablka

Tabulka č. 10: Průměrné koncentrace metabolitů před a po intervenci, p-hodnota a fold change

## **10.6 Příloha č. 6: Seznam obrázků**

Obrázek č. 1: Obrázek č. 1 Podmínky pro schválení probiotik a hlavní zdravotní přínosy

Obrázek č. 2: Schéma rozdělení prebiotik

Obrázek č. 3: Schéma principu NMR spektroskopie

Obrázek č. 4: Princip intervence a odběru vzorků ve studii

Obrázek č. 5: Výsledné spektrum

## **10.7 Příloha č. 7 Seznam grafů**

Graf č. 1: Průměrné zastoupení metabolitů před intervencí

Graf č. 2: Průměrné zastoupení metabolitů po intervencí

Graf č. 3: Zastoupení metabolických skupin před a po intervencí

Graf č. 4: PCA mezi vzorky před a po intervencí

Graf č. 5: Heatmapa korelační matice s dendrogramem

## 10.8 Příloha č. 8 Grafy odlehklých hodnot metabolitů

