

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Střevní mikrobiom – profil bakteriálního zastoupení u  
pacientů s onemocněním diabetes mellitus II. typu  
léčených antibiotiky**

**Diplomová práce**

**Bc. Kristina Baráková  
Výživa a potraviny**

**Mgr. Ing. Hana Sechovcová, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Střevní mikrobiom – profil bakteriálního zastoupení u pacientů s onemocněním diabetes mellitus II. typu léčených antibiotiky" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svojí vedoucí Mgr. Ing. Haně Sechovcové, Ph.D. za užitečné rady, věcné konzultace a ochotu, kterou mi po celou dobu diplomové práce trpělivě poskytovala. Také děkuji za konstruktivní kritiku, která mi byla velkým přínosem. Dále děkuji Akademii věd ČR za poskytnutí zázemí k tomuto výzkumu.

V neposlední řadě děkuji přátelům a rodině za podporu po dobu celého studia.

# Střevní mikrobiom – profil bakteriálního zastoupení u pacientů s onemocněním diabetes mellitus II. typu léčených antibiotiky

## Souhrn

Střevní mikrobiom obsahuje více než 1000 druhů bakterií, které si zachovávají specifickou skladbu pro každého individuálního jedince. Předpokládá se, že na změny jeho složení má vliv několik faktorů, jedním z nich je antibiotická terapie. Cílem této diplomové práce je popsání a porovnání bakteriálního profilu střevního mikrobiomu pacientů trpících onemocněním diabetes mellitus II. typu a pacientů trpících diabetes mellitus II. typu a zároveň byli vystaveni léčbě antibiotiky z důvodu výskytu diabetických vředů na nohou. Tímto výzkumem se zabýval Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, který ve spolupráci s IKEM.

Literární rešerše se zabývá teoretickými poznatky o onemocnění DM, střevním mikrobiomu a metodách molekulární genetiky (sekvenování nové generace), které byly později využity v praktické části.

Pro experimentální část byly odebrány vzorky stolice (1-3 odběry) od 26 pacientů, u kterých byla vyizolována DNA. Sledování mikrobiálního složení bylo provedeno pomocí PCR-DGGE s následným sekvenováním bakteriálních genů 16S rRNA a sekvenačními metodami nové generace (NGS).

Porovnáním získaných výsledků byly zjištěny znatelné rozdíly v bohatosti mikrobioty, která byla měřena před podáním antibiotik, po 1. týdnu antibiotické léčby a po 10. týdnu antibiotické léčby. V souvislosti mezi různorodostí mikrobioty a druhem užívaných antibiotik žádný významný rozdíl prokázán nebyl. Z identifikovaných kmenů se ve stolici v největším počtu nacházel kmen *Firmicutes*, který jako jediný vzrůstal s přibývajícím počtem týdnů antibiotické léčby.

Zhodnocení výsledků mikroorganismů ve stanovených vzorcích naznačuje, že antibiotická terapie střevní mikrobiom ovlivňuje. Dále je také možné uvažovat, že modulace střevní mikrobioty by tak mohla být účinná pro předcházení metabolického syndromu (a DM II) a jejich komplikacím.

**Klíčová slova:** diabetes mellitus II. typu, střevní mikrobiom, antibiotika, metabolický syndrom, NGS

# Gut microbiome – a bacterial profile of patients with type 2 diabetes mellitus treated by antibiotics

## Summary

The gut microbiome contains more than 1,000 species of bacteria that maintain a specific composition for each individual. Several factors are thought to influence changes in its composition, one of which is antibiotic therapy. The aim of this thesis is to describe and compare the bacterial profile of the gut microbiome of patients suffering from type II diabetes mellitus and patients suffering from type II diabetes mellitus who have been exposed to antibiotic treatment due to the occurrence of diabetic foot ulcers. This research was conducted by the Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Sciences, which collaborated with IKEM.

The literature search covers the theoretical knowledge of DM, the gut microbiome and molecular genetics methods (next-generation sequencing), which were later used in the practical part.

For the experimental part, stool samples (1-3 samples) were collected from 26 patients and DNA was isolated. Monitoring of microbial composition was performed by PCR-DGGE followed by sequencing of 16 rRNA bacterial genes and next-generation sequencing (NGS) methods.

A comparison of the results revealed noticeable differences in microbiota richness, measured after the 1st week of antibiotic treatment and after the 10th week of antibiotic treatment. No significant difference was found in the association between microbiota diversity and the type of antibiotics used. Of the strains identified, *Firmicutes* was the most abundant strain in stool and the only one that increased with increasing weeks of antibiotic treatment.

Evaluation of the results of microorganisms in the determined samples suggests that antibiotic therapy affects the gut microbiome. Furthermore, it is also possible to speculate that modulation of the gut microbiota could thus be effective in preventing metabolic syndrome (and DM II) and other complications.

**Keywords:** diabetes mellitus type 2, gut microbiome, dysbiosis, metabolic syndrome, NGS

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Metabolický syndrom</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2 Inzulín</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3 Typy diabetes mellitus (DM)</b> .....	<b>11</b>
3.3.1 Diabetes mellitus II. typu (DM II).....	11
3.3.2 Diabetes mellitus I. typu (DM I).....	11
3.3.3 Ostatní typy DM.....	12
<b>3.4 Komplikace DM</b> .....	<b>12</b>
3.4.1 Akutní komplikace.....	13
3.4.2 Chronické komplikace.....	14
<b>3.5 Léčba DM</b> .....	<b>16</b>
3.5.1 Léčba diabetické nohy.....	17
<b>3.6 Střevní mikrobiom</b> .....	<b>18</b>
3.6.1 Mikrobiom ve zdraví.....	19
3.6.2 Mikrobiom v nemoci.....	19
3.6.2.2 Mikrobiom a DM II.....	20
3.6.3 Bakteriální složení střevního mikrobiomu.....	21
3.6.3.1 Kmen <i>Bacteroidetes</i> .....	21
3.6.3.2 Kmen <i>Firmicutes</i> .....	22
3.6.3.3 Kmen <i>Actinobacteria</i> .....	23
3.6.3.4 Kmen <i>Proteobacteria</i> .....	24
3.6.4 Vliv stravy na mikrobiom.....	25
3.6.4.1 Sacharidy.....	25
3.6.4.2 Proteiny.....	25
3.6.4.3 Tuky.....	25
3.6.4.4. Vláknina.....	25
3.6.5 Antibiotika.....	26
<b>3.7 Metody molekulární genetiky</b> .....	<b>28</b>
3.7.1 Izolace DNA.....	28
3.7.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	28
3.7.2.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (PCR-DGGE).....	29
3.7.3 Elektroforetická separace nukleových kyselin.....	30
3.7.4 Sekvence.....	30
3.7.4.1 Sangerova metoda sekvenování.....	30

3.7.4.1.1 Sekvenování 16S.....	31
3.7.4.1.2 Ion torrent.....	31
3.7.4.1.3 Sekvenování nové generace .....	31
3.7.5 Další sekvenační metody nové generace .....	32
3.7.6 Statistické metody .....	33
3.7.6.1 Studentův T-test .....	33
3.7.6.2 Alfa diverzita – Shanon entropy.....	33
3.7.6.3 Analýza hlavních koordinát (PCoA).....	33
<b>4 Metodika.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Vážení a příprava.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Izolace DNA .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Sekvenování nové generace .....</b>	<b>35</b>
4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	35
4.3.2 Přечиštění směsi PCR.....	35
<b>4.4 Příprava knihovny (library).....</b>	<b>36</b>
4.4.1 Naředění knihovny a qPCR.....	36
4.4.2 Emulzní PCR.....	37
4.4.3 Sekvenování .....	37
<b>4.4 PCR-DGGE.....</b>	<b>37</b>
<b>5 Výsledky a diskuse.....</b>	<b>39</b>
5.1 Optimalizace.....	39
5.2 Amplifikace .....	39
<b>5.3 NGS.....</b>	<b>40</b>
5.3.1 Shannon entropy a PCoA .....	40
<b>5.4 PCR-DGGE.....</b>	<b>46</b>
5.4.1 Výsledky DGGE.....	46
<b>6 Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>53</b>
Seznam použitých obrázků.....	61
Seznam použitých tabulek.....	61
<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>62</b>
<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Střevní mikrobiom je důležitou součástí našeho těla. Bakterie plní mnoho významných funkcí, při kterých mikrobiom může pozitivně nebo negativně ovlivnit lidské zdraví, přes metabolické funkce po ochranu proti patogenům. V poslední době se střevní mikrobiom stal předmětem mnoha vědeckých výzkumů. Díky těmto výzkumům byly nalezeny souvislosti mezi mikrobiomem a různými druhy onemocnění, přes různě chronické onemocnění po diabetes. Mikrobiota také zastává důležitou roli při regulaci hmotnosti a obezité. Čím rozmanitější bakteriální složení, tím lépe. Pro správné bakteriální složení je potřeba se o mikrobiom starat. Narušení mikrobiální rovnováhy způsobuje mnoho faktorů – jedním z nich jsou antibiotika.

Antibiotika jsou účinným lékem i prevencí pro nespočet infekčních onemocnění, diabetu či idiopatické střevní záněty. Bohužel antibiotická terapie často působí nejen na cílené patogeny, ale i na střevní bakterie. Způsobuje tak jejich úbytek nebo změnu poměru složení v bakteriálních kmenech.

Tato diplomová práce se zabývá porovnáním bakteriálního profilu u skupiny pacientů, kteří byli léčeni s diabetickými vředy na nohou antibiotickou terapií. Tyto vředy jsou poměrně častou a závažnou komplikací při diabetu II typu. Významně snižují kvalitu života a mohou vést až k amputaci dolní končetiny. Část diplomové práce je také zaměřena na molekulární metody, které jsou neméně důležité, a díky kterým jsou výzkumy o střevním mikrobiomu umožněny.

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



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

Cílem diplomové práce bude porovnání profilu střevního mikrobiomu pacientů s diabetes mellitus II. typu a tzv. diabetickou nohou, kteří jsou léčeni antibiotiky. Diplomová práce je zaměřená na vznik dysbiózy střevního mikrobiomu v závislosti na mnoha faktorech, jako je strava, onemocnění a příjem antibiotik. Práce se také zabývá složením střevního bakteriálního profilu. V experimentální části byla izolována DNA ze vzorků stolice sledovaných pacientů a bakteriální profil byl sledován pomocí PCR-DGGE s následným sekvenováním bakteriálních genů 16S rRNA a metodou NGS (sekvenováním nové generace).

Hypotéza: Ovlivnění střevní mikrobioty u pacientů se syndromem diabetické nohy léčených vybranou antibiotickou terapií (betalaktamátová a cefalosporinová antibiotika).

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je metabolická porucha. Patofyziologie je z velké části přisuzována inzulínové rezistenci s nadměrným přísunem mastných kyselin. Četnost tohoto onemocnění se následkem inzulínové rezistence a stoupající prevalence obezity zvyšuje. Inzulínová rezistence charakterizuje reakci tkání na inzulín, která je snižená a buňky nejsou schopny rychle reagovat na inzulín. Metabolický syndrom zvyšuje pravděpodobnost kardiovaskulárních onemocnění, včetně infarktu, mrtvice, diabetu II. typu a mnoha dalších civilizačních onemocnění (Grundy 2016).

Soubor metabolických abnormalit syndromu zahrnuje glukózovou intoleranci a prediabetes, což je zvýšená hladina glukózy nalačno. Dále inzulínovou rezistenci. A také dyslipidémií, která je charakterizována zvýšenou hladinou triglyceridů v krvi a hypertenzi (vysoký krevní tlak). Infekce, nadměrný přísun potravy nebo stres zvyšuje hladinu kortizolu v krvi a ten snižuje množství glukózy využitelnou pro buňky svalové a jaterní. Důsledkem toho si buňky vytvářejí inzulínovou rezistenci a hladina glukózy roste. Rezistence zvyšuje hladinu mastných kyselin, které působí na metabolismus cukrů, což vede ještě k silnější rezistenci na inzulín. Následkem toho vzniká metabolický syndrom, který zapříčiňuje vznik DM II. typu (Eckel et al. 2005). Metabolický syndrom ovlivňuje mnoho faktorů. Mezi neovlivnitelné patří pohlaví, věk, rasa nebo etnický původ. Z ovlivnitelných faktorů se jedná především o životní styl a socioekonomický status. Tyto faktory je možné upravit změnou režimu a následnou redukcí hmotnosti. Omezení živočišných tuků a jednoduchých sacharidů ve stravě a dostatečného příjmu vlákniny. Dále také zařazení fyzické aktivity (Cornier et al. 2008). Farmakologická léčba by měla být zvážena u pacientů, jejichž rizikové faktory nejsou adekvátně redukovány preventivními opatřeními a změnou životního stylu. Klinická léčba je velmi obtížná, protože neexistuje žádná uznávaná metoda prevence nebo zlepšení syndromu jako komplexního onemocnění. Cílem terapie je snížit krátkodobé i celoživotní riziko (Kaur 2014).

### 3.2 Inzulín

Inzulín je endokrinní peptidový hormon, který se váže na receptory vázané na plazmatickou membránu v cílových buňkách, aby zprostředkoval integrovanou anabolickou odpověď na dostupnost živin. Inzulín nebo inzulínu podobné peptidy byly identifikovány u všech živočichů. Je produkován  $\beta$  buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (Petersen & Shulman 2018).

$\beta$  buňky tvoří 60 % buněk v pankreatických ostrůvcích a jsou promíseny s  $\alpha$  buňkami, které produkují glukagon,  $\delta$  buňkami produkující somatostatin a buňkami, které produkují pankreatický polypeptid, se kterými vzájemně komunikují a vzájemně se ovlivňují prostřednictvím hormonů uvolňovaných do krve.  $\beta$  buňky ovlivňují buněčné produkty, jako je ATP a zinek a ovlivňují jejich neurotransmitery (DeFronzo et al. 2015).

Citlivost tkání na inzulín se liší. Nejcitlivější na inzulín je tkáň tuková, oproti tomu nejméně je citlivá tkáň svalová. Chronická hyperglykémie diabetu je spojena s dlouhodobým poškozením, dysfunkcí a následným postižením různých orgánů, zejména očí, ledvin, srdce a cévní soustavy (Pociot & McDermott 2002).

### 3.3 Typy diabetes mellitus (DM)

Jedná se pravděpodobně o jedno z nejstarších onemocnění, které bylo popsáno již ve starověkém Egyptě. V roce 1936 došlo rozdělení diabetu na typ I. a II., přičemž typ II. byl popsán pouze jako součást metabolického syndromu (Olokoba et al. 2012).

Obecně diabetes pojímá skupinu metabolických onemocnění, která jsou charakterizována hyperglykemií v důsledku poruchy sekrece inzulínu, účinku inzulínu na organismus či jsou kombinací obojího (Tilburg et al. 2001)

#### 3.3.1 Diabetes mellitus II. typu (DM II)

Diabetes mellitus II. typu je chronické metabolické onemocnění, jehož prevalence ve světě neustále roste. Rozvíjí se nejčastěji po 40 roce života. Tvoří přibližně 90 % všech případů diabetu. Důsledkem tohoto trendu se nemoc stala celosvětovou epidemií s rychlým nárůstem počtu pacientů. Týká se převážně průmyslově vyspělých zemí. Citlivost na inzulín je ovlivněna mnoha faktory jako je etnický původ, genetické faktory, životní prostředí, věk, styl života a především strava. Další determinant, který ovlivňuje DM II je socioekonomická pozice. Do této kategorie spadá například dostupnost zdravotních služeb, nedostatek informací o tomto onemocnění nebo nedostatečná edukace ohledně zdravých potravin a cvičení (Agardh et al 2011).

Pacienti s DM II nejsou zcela závislí na exogenním podávání inzulínu. DM II. oproti DM I (diabetes mellitus I. typu) není obvykle způsoben autoimunitní destrukcí buněk pankreatu, ale vyznačuje se četnými defekty v závislosti na inzulínovou resistenci. Hyperglykémii způsobuje selhání  $\beta$  buněk a zvýšení potřeby těla na poptávání inzulínu (Tilburg et al. 2001). Nejvíce inzulín působí na hladinu krevního cukru, kdy se molekuly krevního cukru pomocí inzulínu dostávají do jaterních, svalových a tukových buněk, kde jsou dále metabolizovány. Bez přítomnosti inzulínu se molekuly k těmto buňkám dostávají velmi obtížně. Velké množství pacientů trpí obezitou (Malecki 2005).

Účinná prevence DM II je eliminace obezity a snížení tělesné hmotnosti. Intervence sloužící k prevenci diabetu se zaměřují především na udržení zdravé tělesné hmotnosti kombinací dietních opatření a zařazení fyzické aktivity. Zvláště u skupin, které už glukózovou intolerancí trpí, se jedná o vysoce rizikovou skupinu. Dietní doporučení kladou důraz především na snížení stravy s vysokým obsahem tuků a zvýšenou konzumací zeleniny s omezením kalorií, a to hlavně u skupiny trpících nadváhou a obezitou. Dále zařazení fyzické aktivity na 30-40 minut. Intenzita a četnost fyzické aktivity se liší podle individuálních možností a potřeb pacienta (Alberti et al. 2007).

#### 3.3.2 Diabetes mellitus I. typu (DM I)

Diabetes mellitus I. typu se řadí mezi autoimunitní onemocnění. Je charakterizován zvýšenou hladinou glukózy v krvi, která je způsobena nedostatkem inzulínu v krvi následkem destrukce  $\beta$  buněk Langerhansových pankreatických ostrůvků, které byly tímto zánětem, inzulitidou, postiženy. Nejčastěji se jedná o diabetes u dětí a mladistvých (Katsarou et al. 2017). Tvoří přibližně 10 % případů diabetu. Následkem destrukce buněk a vyčerpání inzulínu, dochází u pacientů k zjevné hyperglykémii, následnou nadprodukcí glukózy játry pomocí glykogenolýzy a glukoneogeneze a sníženou schopností buněčného vychytávání a odbourávání periferními tkáněmi, jako jsou svaly či tuková tkáň (Eiselein et al. 2004).

Ačkoli jsou pacienti s tímto typem diabetu obézní jen zřídka, přítomnost obezity není neslučitelná s touto diagnózou. Tito pacienti mají vyšší tendenci k dalším autoimunitním onemocněním, jako je Gravesonova choroba, Addisonova choroba, vitiligo,

autoimunitní hepatitida či percinózní anémie (Atkinson et al. 2014). Častější komplikace se vyskytují v souvislosti s mikrovaskulárními a makrovaskulárními změnami. U pacientů dochází k zvýšenému výskytu ischemické choroby srdeční, onemocnění mozkových cév, onemocnění periferních cév s gangrénou dolních končetin, chronické onemocnění ledvin a onemocnění očí. Tyto komplikace snižují životnost pacienta až o 25 % (Eiselein et al. 2004).

### **3.3.3 Ostatní typy DM**

#### **3.3.3.1 Gestační diabetes**

Velmi častým typem je gestační diabetes, který je diagnostikován u žen během těhotenství. Je diagnostikován přechodným zvýšením inzulinové rezistence během gravidity. Ten buď po těhotenství vymizí, nebo pokračuje i nadále a v tomto případě se z něj vyvine ve většině případů DM II. typu (Buchanan et al. 2007).

#### **3.3.3.2 LADA**

Dalším typem diabetu je diabetes LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), neřadí se do specifického typu DM, přestože se velmi neliší od DM I. Jedná se o důsledek inzulitidy, která je vyvolaná autoimunitně. Oproti DM I dochází však k pomalejšímu rozpadu a destrukci  $\beta$ -buněk a následně mírnější a pomalejší manifestaci onemocnění. Přestože tento typ postihuje převážně dospělé jedince, není výjimkou jeho manifestace i u mladých pacientů (Brophy et al. 2011).

#### **3.3.3.3 MODY**

Velmi vzácně se vyskytuje diabetes MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). Představuje označení pro soubor onemocnění diabetem dědičnou formou, která byla způsobena mutací buněk, které se podílejí na diferenciaci, vývoji a funkci  $\beta$ -buněk. Většina těchto pacientů není správně diagnostikovaných a jsou chybně vedeni s diagnózou diabetu I. nebo II. typu (Thanabalasingham & Owen 2011).

## **3.4 Komplikace DM**

Komplikace onemocnění od prediabetu po pozdní komplikace nejsou u všech pacientů stejné a jsou individuální. Rozdělují se na chronické a akutní, přičemž komplikace akutní je nutné řešit ihned odstraněním příčin, zatímco ty chronické se vyvíjí z postupně z dlouhodobého hlediska (Tripathi & Srivastava 2010).

### 3.4.1 Akutní komplikace

U jedinců s diabetem se mohou objevit různé akutní komplikace, které vznikají náhle a které přinášejí krátkodobé, avšak závažné riziko, které ovlivňuje morbiditu a mortalitu. Tyto potíže zažívá každý diabetik poměrně často, není možné se jim zcela úplně vyhnout. Akutním komplikacím lze však převážně předcházet a umět je v případě výskytu rychle vyřešit (Pinhas-Hamiel & Zeitler 2007).

#### 3.4.1.1 Hypoglykémie

Mezi akutní komplikace se řadí hypoglykémie. Jedná se o nízkou hladinu glukózy v krvi pod hodnoty hladiny glukózy v krvi u zdravého jedince 3,3 mmol/l. Hypoglykémie je výsledkem buď exogenního nebo endogenního nadbytku inzulínu. Dochází prvotně ke slabosti, závratím, snížené výkonnosti, pocitu hladu, studený pot a může dojít až k bezvědomí a dalším závažným poruchám mozkové činnosti, která se odvíjí od příjmu cukrů. Příčina hypoglykémie je předávkování inzulínem či požití léků na lačno, vynechávání jídla nebo velká tělesná námaha (Cryer et al. 2003). Jedná se o patologický pokles glykémie v krvi, které doprovází další biochemické pochody a vylučování antiregulačních hormonů. Hladina inzulínu neklesá společně s klesající hladinou glukózy a kombinace nedostatečných glukagonových a epinefrinových reakcí způsobuje defektní glukózovou kontraregulaci. Snížené sympatoadrenální reakce způsobují neuvědomování si hypoglykémie. Posunem glykemických prahů pro sympatoadrenální systém (včetně epinefrinu) a výslednými neurogenními reakcemi na nižší koncentrace glukózy v plazmě, vede předchozí hypoglykémie k začarovanému kruhu opakujících se hypoglykemií a k dalšímu zhoršení glukózové kontraregulace (Cryer et al. 2003).

#### 3.4.1.2 Diabetická ketoacidóza a hypersmolární hyperglykemický stav

Dalšími život ohrožujícími komplikacemi jsou diabetická ketoacidóza a hyperosmolární hyperglykemický stav (HHS). Ketoacidóza vzniká příčinou kombinace nedostatku inzulínu a zvýšené tvorby kontraregulačních hormonů. Dochází při ní k vzestupu hladiny ketolátek, deficitu vody a minerálů a hyperglykémii. Vyskytuje se více u DM I, zatímco HHS je více častý pro DM II. Základní charakteristikou HHS je těžká dehydratace, hyperglykémie a časté poruchy vědomí. Vyskytuje se v souvislosti s příčinami kardiovaskulárních onemocnění, infekcí a náhlé cévní mozkové příhody (Tripathi & Srivastava 2010).

#### 3.4.1.3 Hyperglykémie

Hyperglykémie je zvýšení glykémie přílivem glukózy převyšujícího odtok glukózy z kompartmentu plazmy nad hladinu u zdravého člověka 7,9 mmol/l. Ve stavu nalačno hyperglykémie přímo souvisí se zvýšenou produkcí glukózy v játrech. V postprandiálním stavu jsou další výkyvy glukózy výsledkem kombinace nedostatečné suprese tohoto výdeje glukózy a defektní inzulínové stimulace likvidace glukózy v cílových tkáních, zejména kosterním svalstvu. Je provázána s dehydratací, vznikem renální insuficience různého stupně a poruchou vědomí (Inzucchi et al., 2012).

#### 3.4.1.4 Laktacidotické koma

Mezi další akutní komplikace se řadí laktacidotické koma, které je výsledkem hromadění laktátu v tělesných tekutinách v organismu a je často spojen se špatnými klinickými výsledky. Účinek laktátové acidózy se řídí její závažností a klinickým stavem pacienta.

Objevuje se ve spojitosti s požíváním alkoholu nebo s nedostatečnou funkcí srdce, plic či jater. Je doprovázeno příznaky jako je únava, letargie a hypotenze. Může vést až k úmrtí (Kraut et al. 2014).

### 3.4.2 Chronické komplikace

Chronické komplikace mohou vznikat po dobu několika let. Rozdělují se na makrovaskulární, které se však vyskytují i u zdravé populace a diabetes u nich tedy slouží pouze jako katalyzátor, a mikrovaskulární, které jsou pro diabetes více specifické (Bailes 2002).

#### 3.4.2.1 Nefropatie

Mezi chronické komplikace patří nefropatie. Je hlavní příčinou chronického onemocnění ledvin u pacientů zahajujících renální substituční terapii a je spojena se zvýšenou kardiovaskulární mortalitou. Hlavními faktory diabetické nefropatie je trvale zvýšená hyperglykémie a hypertenze. Dalšími z faktorů, které tyto onemocnění způsobují jsou kouření, dyslipidemie a dietní faktory jako je strava velmi bohatá na bílkoviny a tuky (Gross et al. 2005).

#### 3.4.2.2. Diabetická retinopatie

Diabetická retinopatie je nejčastější mikrovaskulární komplikací diabetu. Pomocí mikrovaskulárních změn dochází ke specifickým morfologickým projevům na kapilárách řečiště očního pozadí. Jedná se o patologické změny sítnice a jejích cév. Důsledkem tohoto onemocnění je snížení zrakové ostrosti a v nejzávažnějším případě dochází i ke slepotě. Mezi důležité faktory diabetické retinopatie patří kouření, hypertenze, hyperglykémie a v neposlední řadě genetické predispozice či délka trvajícího onemocnění (Stitt et al. 2016).

#### 3.4.2.3 Diabetická neuropatie

Diabetická neuropatie je charakterizována difúzním nebo fokálním poškozením periferních somatických nebo autonomních nervových vláken. Příčinou je dlouhodobá hyperglykémie, která má za následek poškození membránového potenciálu a následné axonální degenerace. Protože postihuje různé části nervového systému, má za následek různé klinické projevy. Syndrom lze rozdělit do dvou obecných kategorií: difúzní a fokální neuropatie. Difúzní neuropatie, tj. distální symetrická senzomotorická polyneuropatie (DPN) a diabetická autonomní neuropatie (DAN) jsou běžné, obvykle chronické a často progresivní. Fokální neuropatie je méně častá. Jedná se o omezující bolestivé onemocnění, které postihuje nervovou soustavu (Edwards et al. 2008)

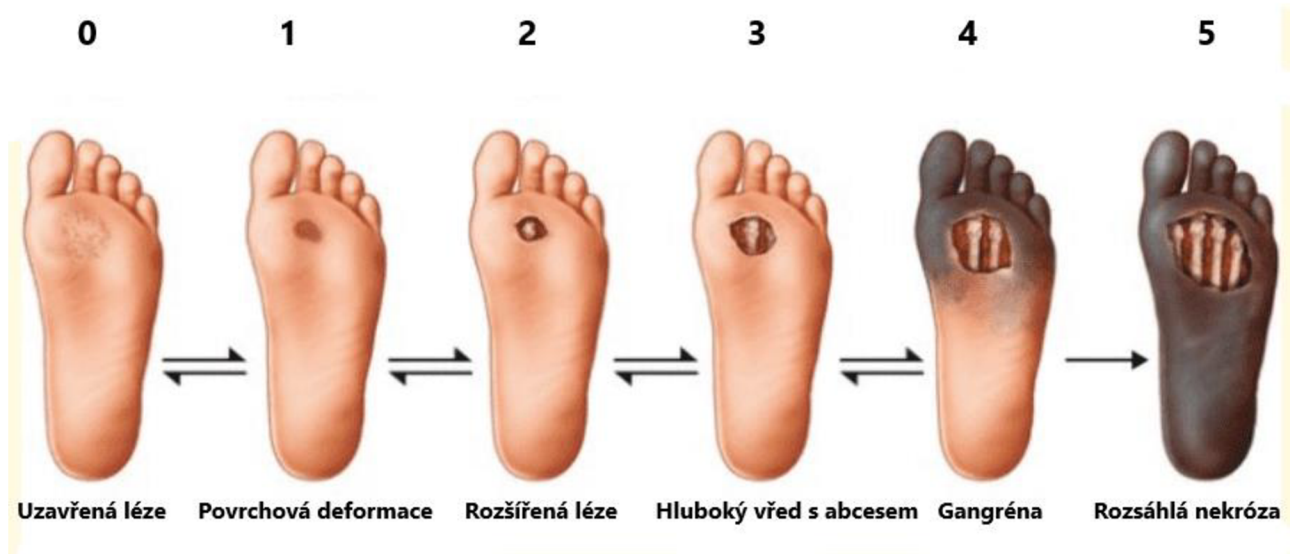
#### 3.4.2.4 Diabetická noha

Jedná se o diabetické vředy na nohou, přičemž postižení se vyskytuje distálně od kotníku směrem k prstům. Jedná se o časté komplikace a odhaduje se, že během života postihnou až 15 % všech diabetiků. V současné době se připouští že 15–20 % pacientů s takovými vředy na nohou končí s amputací. Toto onemocnění dolní končetiny je způsobeno senzoricou neuropatií následovanou onemocněním periferních cév, angiopatií a dále kouřením. U pacientů s diabetem je často přítomna omezená kloubní pohyblivost prvního metatarzofalangeálního kloubu (hallux limitus), která může být způsobena ztluštěním Achillovy šlachy a plantární fascie. Toto ztluštění plantární fascie a Achillovy šlachy vede k tužšímu typu nohy a možné nestabilitě chůze. Dochází ke svalovému oslabení a vzniku deformace chodidel a kladívkových prstů (Song & Chambers 2022). Výsledkem mohou být těžké infekce a následné bérkové vředy.

K vysoké prevalenci tohoto onemocnění přispívají určité faktory, jako je chůze naboso, nedostatečná informovanost o onemocnění, nízký socioekonomický status, pozdní návštěva lékaře, neznalost prevence péče vzniku diabetické nohy a víra v alternativní systémy medicíny (Pendsey 2010). Diagnostika vředů začíná posouzením a následnou klasifikací vředů. Wagnerův systém klasifikuje vředy podle stupně léze – léze blízko k 0 může být neotevřená, s malou deformitou nebo celulitis. Vřed klasifikován do stupně 1 je povrchový (částečně nebo úplně). Do stupně 2 patří rozšíření vředu do vazy, šlachy, kloubního pouzdra nebo hluboké fascie bez známky osteomyelitidy nebo abscesu. Do stupně 3 patří hluboké vředy s abscesem, osteomyelitidou nebo kloubní sepsí. Čtvrtý stupeň značí gangrénu lokalizovanou v přední části chodidla nebo paty a poslední klasifikace v 5 stupni charakterizuje rozsáhlé gangrenózní postižení celé nohy (viz obrázek 1). Systém klasifikace diabetických ran University of Texas hodnotí, na rozdíl od Wagnerova systému klasifikace hloubku vředu, přítomnost infekce v ráně a přítomnost klinických příznaků dolních končetin. Tento systém využívá kombinaci hodnocení pomocí 4 stupňů klasifikace vředů podle hloubky 0-3 a podle infekce v ráně A-D (Frykberg et al. 2022).

Všichni pacienti s diabetem by měli dostat edukaci o správné péči prevence vzniku diabetické nohy. Prevence komplikací diabetické nohy zahrnuje identifikaci rizikového pacienta, každodenní vyšetření a kontrolu pacientem, edukaci pacienta/rodiny/poskytovatele zdravotní péče, vhodnou obuv, správnou a včasnou léčbu preulcerózních lézí. Pacienti s vyšším rizikem by měli být doporučeni k léčbě a sledování podiatrie (Song & Chambers 2022).

Léčba diabetické nohy spočívá v dobré kompenzaci diabetu, odlehčování nohou, vhodné obuvi, Nošení čistých ponožek, čištění ran a dobrá hygiena, vhodné s léčbou v kombinaci s antibiotiky.



Obrázek 1 Klasifikace ulcerózních vředů (čerpáno z internetového webu <https://www.pacecvi.com/blog/diabetic-foot-sore>)

#### 3.4.3.1 Charcotova osteoartropatie

Akutní Charcotova noha je vzácný, invalidizující stav, který může způsobit rozsáhlou destrukci kostního a kloubního aparátu se ztrátou funkce. DM je v současnosti nejčastější příčinou tohoto onemocnění typicky postihující dolní končetiny v důsledku ztráty jejich ochranných vjemů. Včasné rozpoznání akutní Charcotovy nohy u diabetiků je diagnostickou výzvou, protože klinické podezření i u vysoce rizikových pacientů je často nízké a následky opomenutí diagnózy mohou být zničující. Je způsobena neuropatií, která naruší citlivost nohy a způsobuje přetěžování kloubů v kombinaci se změnami krevního zásobení do kostí. Dochází k otokům nohy, která je na dotek teplejší a úbytku kostní tkáně (Younis et al. 2018).

### 3.5 Léčba DM

Léčba diabetu se závisí na diagnóze pacienta. Zatímco pacienti s DM I jsou léčeni exogenním inzulínem, pacienti s určenou diagnózou DM II jsou počátečně léčeni perorální farmakoterapií. Léčba se skládá z antihyperglykemických látek jako je metformin a podle potřeby jsou přidávány další látky jako sulfonylmočovina, thiazolidion, inzulín a antagonistické peptidy podobné glukagonu (Asche et al. 2011).



### 3.5.1 Léčba diabetické nohy

Léčba diabetické nohy spočívá v dobré kompenzaci diabetu, odlehčování nohou, vhodná obuv, čisté ponožky, čištění rány a dobrá hygiena v kombinaci s antibiotiky. Poslední řešení tohoto onemocnění je amputace končetiny (Lim et al. 2017).

Jednou z moderních metod při léčbě diabetické nohy je larvální terapie. Zakládá se na principu, který spočívá v odstranění devitalizované tkáně. Používá se v případech, kdy se nenachází větší riziko porušení tkáně nebo pokud není vhodný chirurgický zákrok, například z důvodu rozsáhlých nektróz. Používají se larvy speciálního druhu Bzučivky zelené (*Lucilia sericata*). Tato terapie se osvědčila velmi kladně, neboť může významně urychlit hojení a čištění rány a tím snížit pravděpodobnost amputace končetiny (Dumville et al. 2009).

Další z moderních metod léčby následků diabetické nohy je aplikace řízeného podtlaku (V.A.C.). Přestože použití odsávání rány je známé již od konce 50. let, teprve v roce 1993 zavedl Fleischmann vakuové těsnění pro poškození měkkých tkání u otevřených zlomenin. V roce 1995 představila společnost Kinetic Concepts komerční systém V.A.C pro podporu vakuového těsnění. Metoda podporuje čištění a hojení ran různého typu. Funguje na základě speciální pumpy, která zajišťuje vyvinutí podtlaku, který je zaveden přímo do rány a následně odstranění tekutiny z rány pryč (Vuerstaek et al. 2006).

Dalším typem léčby je fixace. Jako fixace se využívá chirurgické odlehčení na vnitřní nebo vnější způsob. Vnitřní způsob fixace spočívá ve speciálním chirurgickém zákroku. Využívá se operace kloubních pouzder, prodlužování Achillovy šlachy, osteotomie a různé druhy resekce (Jirkovská et al. 2016). Jako vnější způsob se využívá kontaktní fixace v podobě sádry. Pacient však nesmí mít žádnou rozsáhlou infekci. Dále se používají snímatelné ortézy, které jsou výhodné především v tom, že je lze sundat a vyměňovat obvazy. Jak bylo zmíněno výše, je důležitá vhodná obuv. Pacienti s diabetickými vředy mají často zhoršenou chůzi a koordinaci, z tohoto důvodu je vhodné použít jako oporu berle (Pupp & Wilusz 2004).

### 3.6 Střevní mikrobiom

Vztah a provázanost mezi střevním mikrobiomem a lidským zdravím je stále více uznávána jako velmi blízká. Ve věku 3 let se začíná dětský mikrobiom podobat mikrobiomu dospělého člověka. Existují časové a prostorové variace v mikrobiální distribuci od jícnu po konečník po celou dobu života jedince (Jandhyala et al. 2017). Lidský mikrobiom se skládá z mnoha bakterií, virů a eukaryotních mikrobů, které sídlí uvnitř těla i na něm. Tito mikrobi mají obrovský potenciál ovlivňovat lidskou fyziologii jak ve zdraví, tak i v nemoci. Přispívají k metabolickým funkcím, chrání před patogeny, modelují imunitní systém a prostřednictvím těchto základních funkcí přímo či nepřímo ovlivňují většinu fyziologických funkcí člověka (Shreiner et al. 2015). Podílí se na produkci a syntéze vitamínů, enzymů a dalších sloučenin, které regulují náš imunitní systém (Zhernakova et al. 2016). Z imunologického hlediska je většina mikroorganismů vnímáno jako vlastní patogeny imunitního systému hostitele, který je rozpoznává a eliminuje. Většina střevních bakterií je však nepatogenní a kohabitovala s enterocyty v symbiotickém vztahu. Střevní komenzálové napomáhají především metabolismu živin, metabolismu léčiv, prevenci kolonizace patogenních mikroorganismů a funkci střevní bariéry. Imunitní systém se zároveň vyvinul tak, aby žil v kolaborativním vztahu se zdravou mikrobiotou a zároveň sloužil své funkci v boji proti invazivním patogenním mikroorganismům (Jandhyala et al. 2017).

Každý zdravý dospělý mikrobiom obvykle obsahuje více než 1000 druhů bakterií, které patří k relativně malému počtu známých bakteriálních kmenů, přičemž dominantní kmeny jsou *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Střevní mikrobiom je značně různorodý ve srovnání s jinými místy těla a mezi zdravými jedinci ve složkách střevní mikrobioty existují značné rozdíly (Shreiner et al. 2015). Tyto rozdíly jsou ovlivněny mnoha faktory včetně způsobu porodu a kojení, užívanými léky (především antibiotika), stářím organismu, pohlaví nebo prostředím, ve kterém žije (Cresci & Bawden 2015). Hlavním problémem používání antibiotik je dlouhodobá změna normálního zdravého střevního mikrobiomu a horizontální přenos genů rezistence, který by mohl vést k rezervoáru organismů s genofondem rezistence vůči více léčivům (Jandhyala et al. 2017). Faktor, který mikrobiotu nejvíce ovlivňuje je však strava. Pozitivní změny mikrobioty byly zaznamenány ve spojitosti s konzumací stravy s dostatkem vlákniny, jako je zelenina a ovoce. Strava, která je pestrá a komplexní způsobuje vyšší diverzifikaci mikrobioty (Cresci & Bawden 2015).

Dnes je pro studium střevního mikrobiomu třeba odebrat vzorky stolice od jednotlivců a izolovat DNA ze stolice. Dříve pomocí technik založených na kultivaci byli vědci schopni izolovat pouze 10 % až 25 % střevních bakterií. Izolace, identifikace a počítání velké většiny gastrointestinálních mikroorganismů pomocí konvenčních technik založených na kultivaci je obtížný úkol. Později, se zlepšením anaerobních kultivačních technik, byly identifikovány dominantní rody jako *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* etc. Hlavní nevýhodou při použití těchto technik je obtížnost studia kultivačních charakteristik různých kolonií na Petriho misce a také časová náročnost (Jandhyala et al. 2015). Pomocí kultivačních metod byl celkový počet střevních mikroorganismů stanoven na  $10^{14}$  -  $10^{15}$ , což je přibližně 10x-100x více nežli celkový počet eukaryotických buněk v těle s 400-500 druhy bakterií. Později pomocí metod molekulární genetiky, které byly více přesné, byly bakterie přesněji identifikovány (Foster & McVey Neufeld 2013).

### 3.6.1 Mikrobiom ve zdraví

Střevní mikrobiota se liší podle anatomických oblastí střeva, které se různí z hlediska fyziologie, pH a obsahu  $O_2$ , rychlosti toku tráveniny (postupuje nejrychleji od úst až do slepého střeva, později postupuje pomaleji). Tenké střevo poskytuje pro mikrobiální kolonizátory náročnější prostředí vzhledem k poměrně krátké době průchodu (3–5 h) a vysokým koncentracím žluči. Tlusté střevo, které se vyznačuje pomalými průtoky a neutrálním až mírně kyselým pH, obsahuje největší mikrobiální komunitu (dominují obligátní anaerobní bakterie). Postupně přibývá striktně anaerobních bakterií a ubývá fakultativně aerobních (Rinninella et al. 2019). Bakteriální složení se mění postupně s věkem. Narození je hlavním určujícím faktorem kolonizace při vývoji mikrobiomu. Předčasně narozené děti vykazují nízkou diverzitu se zvýšenou kolonizací potenciálně patogenních bakterií. Také rozdíly příchodu dítěte na svět velmi ovlivňují jeho mikrobiotu. Vaginální porod přispívá k vyšší diverzifikaci bakterií a tím podporuje lepší imunitu. Rinniella et. al 2019 ve svém výzkumu uvádí, že jedinci, kteří byli kojeni, mají střevní mikrobiotu s vyšší diverzitou a rozmanitostí *Bifidobacterium spp.* a s nižším počtem *Clostridium difficile* a *Escherichia coli* než kojenci krmení umělou výživou. Střevní mikrobiota hraje zásadní roli při trávení potravy díky přítomnosti genů, které kódují trávicí enzymy, které nejsou přítomny v lidských buňkách, ale jsou spojeny s metabolismem a fermentací několika potravinových sloučenin, které představují nutriční výhody pro hostitele. Nejhojnějšími metabolickými produkty střevní mikrobioty jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), zejména acetát, propionát a butyrát, které vznikají anaerobní fermentací nestrávených sacharidů (Stojanov et al. 2020). Diverzita mikrobioty se s věkem zvyšuje, dokud se nestane stabilním složením dospělé mikrobioty. U starších lidí nad 70 let dochází opět v úbytku diverzity střevních bakterií, což může být způsobeno změnami trávení, vstřebávání živin a oslabením imunity. Změnu diverzity bakterií také můžou ovlivňovat stravovací návyky seniorů (Rinninella et al. 2019).

### 3.6.2 Mikrobiom v nemoci

Souvislosti mezi určitými onemocněními a složením střevního mikrobiomu byly prokázány v mnoha nedávných publikacích. Stejně tak jako role střevního mikrobiomu při ovlivňování orgánů, sliznic a imunitních funkcí. Rozdíly ve složení a funkci střevního mikrobiomu jsou spojovány s mnoha chronickými onemocněními od gastrointestinálních zánětlivých a metabolických onemocnění až po neurologická, kardiovaskulární a respirační onemocnění (Fan & Pedersen 2021). Roli střevního mikrobiomu u různých chorobných stavů odhalily souvislosti se zánětlivými střevními onemocněními, nespecifickými střevními záněty (IBD), zánětlivými kožními onemocněními, jako je lupénka, autoimunitní artritida, diabetes typu 2, obezita a ateroskleróza. Například pacienti s IBD mají tendenci mít menší bakteriální diverzitu a také nižší počet *Bacteroides* a *Firmicutes* – což může společně přispívat ke sníženým koncentracím butyrátu pocházejícího z mikroorganismů. Bylo prokázáno že butyrát a další SCFA mají přímý protizánětlivý účinek ve střevě (Singh et al. 2017). Mezi nejčastější nemoci, které jsou spojované se střevním mikrobiomem patří například syndrom dráždivého tračníku (IBS) a kolorektální karcinom. Kompoziční a proporční rozdíly v mikrobiomu významně přispívají k rozvoji těchto onemocnění prostřednictvím imunomodulačního účinku bakterií. Onemocnění bylo charakterizováno zvýšeným počtem bakterií kmene *Firmicutes*, konkrétně *Ruminococcus*, *Clostridium* a *Dorea*. Navíc došlo k výraznému snížení prospěšných mikrobů, jako jsou *Bifidobacterium* a *Faecalibacterium*.

Systematické přehledy navíc prokázaly potenciálně škodlivou mikrobiotou u pacientů s IBS, včetně kmene *Proteobacteria*, čeledi *Enterobacteriaceae* (kmen *Proteobacteria*), čeledi *Lactobacillaceae* a rodu *Bacteroides* (kmen *Bacteroidetes*). Čeleď *Enterobacteriaceae* obsahuje několik patogenních bakterií; například *Escherichia*, *Shigella*, *Campylobacter* a *Salmonella*. Vedlejší produkty těchto potenciálně škodlivých bakterií byly spojovány s některými klasickými příznaky IBS, včetně bolesti břicha, nadýmání a průjmu (Vijay & Valdes 2022).

### 3.6.2.1 Dysbióza střevního mikrobiomu

Dysbióza zahrnuje ztrátu užitečného mikrobiálního vstupu nebo signálu a expanzi patogenních bakterií (patobiontů). Předpokládá se, že dysbióza spouští prozánětlivé účinky a imunitní dysregulaci spojenou s různými chorobnými stavy, včetně nealkoholické steatohepatitidy. Mění se v závislosti na stravě, podávání léků či například stresu. Jedním z typických projevů je průjem, zácpa nebo nadýmání (Martinez et al. 2021).

### 3.6.2.2 Mikrobiom a DM II

Změny střevního mikrobiomu jsou patrné i u dospělých jedinců s DM II oproti zdravým jedincům. Není však jasné, zda tyto změny představují příčinu nebo následek, a proto vyžadují další výzkum. Mezi běžně uváděnými nálezy, které byly negativně asociovány s DM II, patří rody *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* a *Roseburia*. Zatímco rody *Ruminococcus*, *Fusobacterium* a *Blautia* byly pozitivně asociovány s tímto onemocněním. Také byl prokázán střední stupeň střevní dysbiózy. Celkově byl DM II spojen se sníženým množstvím bakterií produkujících butyrát a SCFA (Fan & Pedersen 2021).

### 3.6.2.3 Mikrobiom a obezita

Obezita je charakterizována nadbytkem tělesného tuku a je obvykle diagnostikována podle indexu tělesné hmotnosti (BMI) vyšším než  $30 \text{ kg/m}^2$ . K určení přesnějších hodnot je ale potřeba zohlednit i další faktory jako je procento tělesného tuku a pohlaví (Phillips 2013). Studie ukazují, že v průměru je větší procento obézních žen ve věku mezi 40-60 lety (Bray et al. 2012). Obezita v dětství je důležitým prekurzorem obezity v dospělosti. Vzorce stravy a cvičení vyvinuté v dětství je velmi obtížné měnit. Etiologie obezity je multifaktoriální a obvykle se jedná o interakci genetické predispozice, prostředí a jejich vliv na metabolismus, např. pomalý metabolismus (McClellan et al. 2008).

Mezi další důležité faktory patří nízká fyzická aktivita, vysoký příjem energeticky bohatých potravin či socioekonomické podmínky (Vaidya 2006). Prevalence obezity se po celém světě rapidně zvýšila. Obezita je riziková z důvodu zvýšení výskytu mnoha dalších onemocnění, jako je ateroskleróza, nealkoholické ztučnění jater a některé druhy rakoviny. Dále podporuje inzulínovou rezistenci a je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje komorbidit včetně metabolického syndromu, DM II a kardiovaskulárních onemocnění. Všechny tyto faktory přispívají k předčasnému úmrtí a snížení kvality života lety (Bray et al. 2012) Střevní mikrobiom může také ovlivnit chuť k jídlu a sytost prostřednictvím aktivace *nervus vagus* nebo imunitních neuroendokrinních mechanismů. Střevní mikrobiota také podporuje metabolismus

žlučových kyselin a modifikuje homeostázu jaterních triglyceridů a glukózy prostřednictvím farnesoidního X receptoru (Stojanov et al. 2020).

Nové výzkumy se zaměřují na spojitost příjmu stravy v závislosti na psychickém stavu při depresi a stresu. Některé studie naznačují, že několik oblastí v mozku spojené s hypotalamem se podílejí na vědomé kontrole jídla a zavádějí kognitivní a emocionální procesy, které podněcují spojení potravin s potěšením a „za odměnu“ (Methiwala et al. 2021). Reakce na stres a zvýšená produkce kortizolu může souviset s rozvojem a přetrváváním obezity u dospělého jedince. Nedávné pokusy na zvířatech ukázaly, že kortikosteroidy indukují sekreci leptinu a nadbytkem glukokortikoidů je navozen stav leptinové rezistence. Zvýšený kortizol, zejména se sekundární inhibicí růstového hormonu a pohlavními steroidy, způsobuje hromadění tuku ve viscerálních tukových tkáních (centrální obezita) a také metabolické poruchy (metabolický syndrom). Ve spojitosti s depresí a hyperkortizolemickým stavem hrozí zvýšené riziko DM II. (Methiwala et al. 2021). Modulace střevní mikrobioty pomocí různých diet, suplementace probiotiky a vlákninou je slibným přístupem k léčbě a prevenci obezity (Stojanov et al. 2020). Jedním z nejcitovanějších faktorů souvisejících s mikrobiomem, který odlišuje obézní a jedince s normálním BMI, je posun v podílu mikrobioty patřící k *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které dohromady zastupují většinu mikrobioty ve střevech u dospělého jedince. A to zvýšením podílu bakterií rodu *Firmicutes* u obézních jedinců (John & Mullin 2016). Studie na kmenech *Firmicutes* a *Bacteroidetes* spojených s obezitou odhalila souvislosti mezi obezitou a následujícími bakteriemi *Firmicutes*: *Blautia hydrogenotrophica*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium ventriosum*, *Ruminococcus bromii* a *Ruminococcus obeum*. Naopak nejčastějšími bakteriemi u štíhlých jedinců byly *Bacteroides faecichinchillae* a *Bacteroides thetaiotaomicron* (rod *Bacteroidetes*) a *Blautia wexlerae*, *Clostridium bolteae* a *Flavonifractor plautii*. Tyto rozdíly byly vysvětleny schopností určitých bakterií, zejména z kmene *Firmicutes*, produkovat více enzymů, které jsou zodpovědné za degradaci sacharidů a jejich fermentaci. Kmen *Firmicutes R. bromii* je spojován s obezitou a využívá a odbourává rezistentní škrob lépe než *Eubacterium rectale*, *B. thetaiotaomicron* a *Bifidobacterium adolescentis* (Stojanov et al. 2020).

### 3.6.3 Bakteriální složení střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom je komplexní společenství mikroorganismů, které se nachází v gastrointestinálním traktu a které si vytvořily úzký symbiotický vztah se svým lidským hostitelem. Lidský střevní mikrobiom se obvykle skládá ze dvou dominantních bakteriálních kmenů – *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které představují více než 90 % z celkové komunity a dalšími subdominantními kmeny jako jsou *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia*. Toto mikrobiální složení zůstává převážně nedotčené a rychle se snaží vrátit do původního složení. Neustále je však vystavován zátěži spojené s moderním životním stylem jako jsou antibiotika, chlorované látky, pesticidy, potravinářské přídatné látky, polutanty, těžké kovy a mykotoxiny (Magne et al. 2020).

#### 3.6.3.1 Kmen *Bacteroidetes*

Jedná se o anaerobní, nesporeující gramnegativní tyčinky, pro které je charakteristická odolnost vůči žlučovým kyselinám (Wexler 2007). Tento bakteriální kmen patří mezi hlavní zástupce mikrobiomu živočichů v gastrointestinálním traktu. U lidí se však nachází v menším zastoupením i ve vagíně nebo horních cestách dýchacích. Mohou působit jako potenciální patogeny (Thomas et al. 2011).

Bakterie kmene *Bacteroidetes* mohou způsobovat nemoci a infekce na různých částech lidského těla. Byly například izolovány od mnoha pacientů trpících meningitidou a mozkovými abscesy. To je způsobeno vstupem bakterií do krevního řečiště a průnikem do CNS až do mozku pomocí trojklanných hlavových nervů. *B. vulgatus* byly hlášeny jako hlavní izoláty od pacientů trpících Crohnovou chorobou (Zafar & Saier 2021).

Patří v první řadě mezi specialisty při degradaci organických makromolekulárních látek – proteinů a sacharidů. Předpokládá se, že mikrobiom a zejména druh *Bacteroides* doplňují eukaryotické genomy degradačními enzymy zacílenými na rezistentní dietní polymery, jako jsou sloučeniny rostlinných buněčných stěn (např. celulóza, pektin a xylan). Jsou tedy lidem prospěšné při degradaci rezistentního škrobu. *Bacteroides* také degradují sacharidy, pocházející ze sekretů GIT, jako jsou N-glykany nalezené v mucinech nebo chondroitin v sulfátech. Také dále přispívají k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako je acetát, propionát a butyrát. Tyto mastné kyseliny jsou finálním produktem jejich metabolismu (Thomas et al. 2011). Butyrát je považován za zdraví prospěšnou chemickou sloučeninu díky své schopnosti zvyšovat citlivost na inzulín, vykazuje protizánětlivé účinky, reguluje energetický metabolismus a zvyšuje leptin a genová exprese. Propionát v tlustém střevě stimuluje uvolňování GLP-1, což jsou podobné peptidy glukagonu a PYY (peptid tyrosin-tyrosin) prostřednictvím L-entero-endokrinních buněk, což vede k inhibici chuti k jídlu. Může se také dostat do jaterního oběhu, kde je játry zachycen. Tam se podílí na jaterní glukoneogenezi a snižuje expresi enzymů zapojených do *de novo* syntézy mastných kyselin a cholesterolu. Acetát enzymy absorbuje také a dostává se do systémového oběhu a periferních orgánů včetně tukové tkáně, svalů a mozku. V játrech na rozdíl od propionátu stimuluje jaterní syntézu lipidů, přispívající k dyslipidémii. V mozku aktivuje parasympatický nervový systém, podporuje sekreci inzulínu a ghrelinu slinivkou a žaludeční sliznicí. Tyto události mají za následek zvýšené ukládání tuku a chuť k jídlu, které přispívají k obezitě. Na základě výsledků je acetát obecně považován za nejvíce obezogení mastnou kyselinu s krátkým řetězcem (Magne et al. 2020).

Druhy *Bacteroides* jsou obecně schopné přizpůsobit se a využít různé dostupné zdroje energie. V tlustém střevě tyto bakterie využívají k jejich růstu monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. V místech vzniku infekce může *B. fragilis* využívat i povrchové glykoproteiny a glykolipidy hostitelské buňky jako zdroj živin. Ty mohou zahrnovat jak jednoduché cukry, jako je galaktóza a manóza, tak i složitější sloučeniny např. N-acetyl-d-glukosamin [NAG] a N-acetylneuraminové kyseliny. Konečným produktem bývají převážně plyny – oxid uhličitý, sirovodík, vodík a amoniak (Wexler 2007). Z tohoto důvodu efektivního využití živin následně studie ukázaly, že tento druh je často detekován u pacientů s různými zánětlivými stavy, ačkoliv je běžnou součástí lidského tlustého střeva (Sun et al. 2019).

Dále sem řadíme také *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. dorei*, etc. (Yoshida et al. 2018).

Mezi tento kmen patří dále druhy *Prevotella* (Ismail et al. 2011).

### 3.6.3.2 Kmen *Firmicutes*

Zástupci tohoto rodu jsou fenotypově charakterizováni jako anaerobní, grampozitivní tyčinky schopné tvořit endospory. Kmen *Firmicutes* se skládá z více než 200 různých rodů, jako jsou *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Ruminococcus*. Mnoho z nich zastávají probiotickou funkci, například *Lactobacillus*. Tato probiotická bakterie se vyskytuje v jogurtech a fermentovaných výrobcích. Tyto bakterie vytvářejí acetát, laktát a další antimikrobiální látky, které pomáhají při imunitních funkcích. Do této skupiny se řadí i některé z patogenů (*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*), které vyvolávají gastrointestinální infekce, infekce kůže a další záněty (John & Mullin 2016).

Do kmene *Firmicutes* dále patří *Clostridium spp.*, které jsou v přírodě všudypřítomné, vyskytují se v půdách a sedimentech po celém světě a jako členové střevního mikrobiomu lidí a většiny ostatních zvířat. Některé druhy klostridií, jako *C. histolyticum*, mohou být aerobní (Bennett et al. 2020). Bakterie rodu *Firmicutes* jsou efektivní při fermentaci sacharidů, které nemohou být tráveny enzymy v těle na SCFA, vlákniny a rezistentního škrobu. Produkují hlavně butyrát. Ten pomáhá předcházet zánětům a zásobuje buňky střevní výstelkou, což udržuje zdravé tlusté střevo. Nedostatek butyrátu a dalších SCFA kyselin může způsobit snížení funkce střevní bariéry. Jestliže snížení střevní bariéry působí delší dobu, dochází k tzv. propustnému střevu, přičemž se do těla dostávají patogeny a jejich metabolity a stimulují imunitní odpověď (Huang et al. 2018).

#### 3.6.3.2.1 Rod *Enterococcus*

Bakterie rodu *Enterococcus* se běžně vyskytují v trávicím traktu lidí. Většina enterokoků není virulentní a jsou považovány za neškodné bakterie. Ačkoliv byly však také identifikovány oportunní patogeny způsobující infekce a se zvýšenou rezistencí vůči schváleným antimikrobiálním látkám. *Enterococcus faecalis* představuje 80-90 % lidských klinických enterokokových infekcí, 5-15 % je způsobeno *E. faecium*. V klinických izolátech jsou však příležitostně identifikovány i jiné druhy včetně *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* nebo *E. casseliflavus* (Silva et al. 2012).

#### 3.6.3.2.2 Rod *Blautia*

Bakteriální rod *Blautia* je předmětem mnoha výzkumů pro svůj přínos k potenciálnímu zmírnění zánětlivých onemocnění a metabolických chorob. Vykazují určitou antibakteriální aktivitu vůči specifickým patogenním organismům. Změny a složení bakteriálního rodu *Blautia* v populaci souvisí s několika faktory, jako je věk hostitele, geografická poloha, strava, genotyp, zdravotní stav a mnoho dalších. Dále bylo zjištěno, že tento rod hraje určitou roli při biotransformaci a vzájemném ovlivnění s další mikrobiotou. U bakteriálního rodu *Blautia* jsou prokázány řady probiotických vlastností. Komplexní přehled o tomto rodu neexistuje. Pravděpodobně z důvodu malého množství výzkumu v této oblasti (Liu et al. 2020).

#### 3.6.3.3 Kmen *Actinobacteria*

Jedná se o grampozitivní mnohočetné větvené tyčinky, které zahrnují 3 hlavní anaerobní rody *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* a *Corynebacterium* a 1 aerobní rod *Streptomyces* (Binda et al. 2018). Kmen *Actinobacteria* je proporcionalně v gastrointestinálním traktu méně početný a je zastoupen především rodem *Bifidobacterium* (Rinninella et al. 2019). Zatímco u dospělých jedinců převládají rody *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. *Actinobacteria* převládají u kojenců, kde se bifidobakterie nacházejí v zastoupení až 90 % (Hidalgo-Cantabrana et al. 2017). Bifidobakterie mají příznivé účinky při udržování střevní bariéry díky své produkci SCFA, zejména produkují vysokou koncentraci acetátu, který chrání hostitele před enteropatogenními infekcemi jako je enterohemoragická *Escherichia coli* a *Shigella*. Také metabolizují laktát, který může být bakteriemi metabolizován na butyrát, samy o sobě však butyrát, stejně tak jako

propionát nejsou schopny produkovat. Dále se podílejí na přeměně kyseliny linolové na konjugovanou kyselinu linolovou (CLA), která má potenciálně zdraví prospěšné účinky – jsou antikarcinogenní, antiaterosklerotické, antidiabetické, pomáhají v prevenci proti obezitě a při posílení imunitních funkcí. Je významný svou produkcí vitamínu K a vitamínů skupiny B (Binda et al. 2018). Proto jsou některé druhy bifidobakterií považovány za probiotické mikroorganismy a jsou zahrnovány jako bioaktivní složky ve funkčních potravinách, zejména se jedná o mléčné výrobky. Dále se přidávají do doplňků stravy a farmaceutických produktů ať už samostatně nebo společně s dalšími bakteriemi či mikrobiálními substráty (Hidalgo-Cantabrana et al. 2017).

#### 3.6.3.4 Kmen *Proteobacteria*

Kmen *Proteobacteria* patří také mezi ten méně početný, vyznačuje se však svou velkou genovou variabilitou. Do tohoto kmene se řadí *Escherichia coli*, která může mít jak prospěšné, tak patogenní účinky. Prospívá svou fermentací zdrojů uhlíku, za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem jako je kyselina octová a související metabolické produkty, jako je kyselina mléčná (Christofi et al. 2019). Při přemnožení patogenních bakterií vznikají průjmy, záněty močových cest či gynekologické problémy. Proteobakterie jsou celkově často nadměrně zastoupeny u několika střevních a extraintestinálních onemocnění, většinou se zánětlivým fenotypem (Rizzatti et al. 2017).

#### 3.6.3.5 Enterotypy

Střevní mikrobiota každého jedince je specificky charakterizována shluky bakterií nazývaných enterotypy. Jedná se o 3 skupiny, které jsou charakterizovány 3 dominantními kmeny bakterií: enterotyp I- *Bacteroides*, který se vyskytuje u jedinců se stravou zaměřenou na živočišné bílkoviny a nasycené tuky. Enterotyp II- *Prevotella*, který je charakteristický pro jedince se stravou zaměřenou na sacharidy a jednoduché cukry. Jedná se převážně o vegetariány. Enterotyp III- *Ruminococcus*. *Ruminococcus* a *Prevotella* jsou spojovány s rozkladem mucinu (Arumugam et al. 2011). Od dospělosti zůstávají stabilní. Každý enterotyp se vyznačuje rozdílným využíváním energie. Jsou v zásadě definovány stravovacími návyky (Rinninella et al. 2019). Tyto enterotypy nejsou ovlivněny věkem, pohlavím, BMI ani národností. V novějších studiích se uvádí pouze enterotypy I a II, jelikož enterotyp III obsahující bakterie rodu *Ruminococcus* byly velmi podobní rodu *Bacteroides* (Arumugam et al. 2011).



### 3.6.4 Vliv stravy na mikrobiom

Strava je jeden z nejzásadnějších faktorů, který ovlivňuje lidský mikrobiom. Většina mikroorganismů sídlí v distálních částech trávicího traktu.

Mikrobi v distálním střevě přispívají ke zdraví hostitele biosyntézou vitamínů a esenciálních aminokyselin a také tvorbou důležitých metabolických vedlejších produktů ze složek potravy, které tenké střevo nestráví (Singh et al. 2017).

#### 3.6.4.1 Sacharidy

Sacharidy lze rozdělit na stravitelné a nestravitelné substráty. Stravitelné sacharidy, jako je glukóza, fruktóza a galaktóza, jsou enzymaticky degradovány v tenkém střevě a rychle se uvolňují jako glukóza v krevním řečišti a stimulují inzulínovou odpověď. Naopak nestravitelné sacharidy, nazývané také jako vláknina, jsou odolné vůči trávení v tenkém střevě a dostávají se až do tlustého střeva, kde je bakteriemi fermentována (Rinninella et al. 2019).

#### 3.6.4.2 Proteiny

K fermentaci aminokyselin dochází v distálním tračníku hlavními mikrobiálními kmeny včetně *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*. Proteolytická fermentace produkuje méně SCFA než sacharolytická fermentace, ale také mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem BCFA (branched chain fatty acids), například isobutyryát, 2-methylbutyryát, izovalerát a potenciálně toxické substráty, jako je amoniak, mezi jehož aminy patří nitrosaminy a trimethylamin-N-oxid (Singh et al. 2017).

#### 3.6.4.3 Tuky

Konzumace potravin s vysokým obsahem nasycených tuků a trans tuků zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění prostřednictvím zvyšování celkového a LDL cholesterolu v krvi. Zdraví prospěšné tuky, jako jsou mononenasycené a polynenasycené tuky, jsou naopak klíčové pro zmírnění rizika chronických onemocnění. Výzkum Singh et al. 2017 naznačuje, že strava, která má vysoký obsah tuků, zvyšuje celkové množství bakterií *Bacteroides*. Naopak strava s nízkým obsahem tuků zvyšovala celkové počty bifidobakterií (Singh et al. 2017).

#### 3.6.4.4. Vláknina

Rostlinná vláknina obsahuje nerozpustné a rozpustné sacharidy včetně celulózy, ligninu a neškrobových polysacharidů, jako jsou hemicelulózy, pektiny a arabinoxylan oligosacharidy. Mezi další složky vlákniny patří nestravitelné oligosacharidy, jako je inulin a oligofruktóza, a také rezistentní škrob. Prokazují odolnost vůči trávení v lidském tenkém střevě a umožňují průchod z velké části neporušený do tlustého střeva, kde zvyšují viskozitu a objem fekální hmoty.

Výzkum Simpson & Campbell 2015 prokazuje, že jedinci se stravou obsahující dostatek vlákniny mají větší mikrobiální diverzitu a zjistili převahu rodu *Prevotella* vůči *Bacteroides* a celkově zvyšují počet bakterií z kmene *Proteobacteria*, včetně střevních patogenů (Simpson & Campbell 2015).

### 3.6.5 Antibiotika

Antibiotika jsou antimikrobiální látky, používány k farmakologické léčbě proti infekčním onemocněním. Původně byly získávány jako přírodní produkty mikroorganismů, dnes už se však vyrábějí převážně synteticky (Hutchings et al. 2019). Rozšířené používání antibiotik v posledních 80 letech zachránilo miliony lidských životů, umožnilo technologický pokrok a usmrtilo nevyčíslitelné množství mikrobů, jak patogenních, tak komenzálních. Hrozbou nadměrného užívání antibiotik se stala rezistence lidských patogenů na antibiotické látky a dysbióza střevního mikrobiomu (Langdon et al. 2016).

Antibiotika jsou rozlišována na přírodní, polosyntetické a syntetické. Mezi přírodní antibiotika jsou řazeny makrolidy (Larsson & Flach 2022). Makrolidy jsou nyní jedním z nejběžnějších antibiotik, které se používají po celém světě u dětí i dospělých. Mnoho pacientů užívá makrolidy po dlouhou dobu kvůli chronickým infekčním onemocněním. Mají minimální vedlejší účinky (Iizumi et al. 2017). Makrolidy jsou složeny z makrocyclického laktonu různé velikosti kruhu, ke kterému je připojen jeden nebo více zbytků deoxycukru nebo aminocukru. Makrolidy působí jako antibiotika vazbou na bakteriální 50S ribozomální podjednotku a narušují syntézu proteinů. První makrolidové antibiotikum bylo izolováno z kmene *Streptomyces* v roce 1950 a bylo pojmenováno pikromycin, z důvodu své hořké chuti (ze starověkého řeckého slova pikro = hořký) Mezi makrolidy patří například erythromycin, azithromycin a klarithromycin (Dinos 2017). Syntetické léky jsou chemoterapeutika. Jedná se o antimikrobiální léky syntetizované chemickými postupy v laboratoři (De Vries 2021).

Užívání antibiotik, ať už perorálně nebo intravenózně, ovlivňuje střevní mikrobiom. Každá třída antibiotik má jiné vlastnosti, chemické složení a následky na metabolismus, což má za následek různé vzorce změn v mikrobiomu (Iizumi et al. 2017). Narušený mikrobiom nezastává životně důležité funkce jako je dodávání živin, produkce vitamínů a ochrana před patogeny, následkem čehož vznikají zdravotní problémy spojené s metabolickými, imunologickými či vývojovými problémy a také náchylnost k infekcím (Langdon et al. 2016). Změna složení mikrobioty závisí na třídě antibiotik, dávce a době expozice. Existují také rozdíly související s jejich farmakologickým působením na cílové bakterie. Antibiotika úzkého spektra působení ovlivňují jen omezenou skupinu bakterií, ale oproti širokospektrálním antibiotikům léčí šetrněji. Širokospektrální antibiotika mohou ovlivnit množství až 30 % bakterií ve střevní komunitě, což způsobuje rychlé a významné poklesy v taxonomické bohatosti, rozmanitosti a vyrovnanosti střevního mikrobiomu. Jakmile je léčba antibiotiky ukončena, mikrobiota může vykazovat určitý stupeň odolnosti a je schopna se vrátit ke složení, které je podobné původnímu složení, ale počáteční stav se často zcela neobnoví. Ve skutečnosti mohou změny mikrobioty vyvolané antibiotiky přetrvávat i po dlouhé době, po měsících, a dokonce i letech. Z tohoto důvodu jsou antibiotika spojená s rizikem přírůstku hmotnosti a také s rozvojem metabolického syndromu u obézních jedinců s návazností na další onemocnění jako je diabetes, kardiovaskulární onemocnění atp. (Francino 2016).

### 3.6.5.1 Chloramfenikol

Chloramfenikol je širokospektrální bakteriální antibiotikum. Izoluje se z bakteriálního druhu *Streptomyces venezuelae*. Inhibuje tvorbu bakteriálních proteinů, váže se na podjednotku ribozomu 50S a tím způsobuje bakteriální smrt. Jedná se o relativně rizikové antibiotikum, proto se nepoužívá v rámci první volby léků a používá se jen v případě, že nelze podat jiné méně toxické antibiotikum. Přispívá k rozvoji aplastické anémie, což je onemocnění související s nedostatkem tvorby červených a bílých krvinek, které vede k poruchám krve a vysoké úmrtnosti (Nguyen et al. 2022). Používá se při léčbě diabetických vředů.

### 3.6.5.2 Amoxicilin

Amoxicilin je jedním z nejčastěji používaných antibiotik v prostředí primární péče o pacienta. Jedná se o aminopenicilin, vytvořený přidáním další aminoskupiny k penicilinu z důvodu eliminace antibiotické rezistence. Působí vazbou na peptidy, které inhibují transpeptidaci, která vede k aktivaci enzymů buněčné stěny a následnému zničení bakteriální buňky. Amoxicilin je indikován k léčbě infekcí způsobených citlivými (pouze beta-laktamázově negativními) izoláty bakterií při onemocnění streptokokovou nebo meningitidovou infekcí. Používá se při léčbě diabetických vředů (Akhavan 2022).

### **3.7 Metody molekulární genetiky**

Metody molekulární biologie jsou v současné době jedním z nejvíce rozvíjejících se oborů, díky vývoji nových metod a technologií. Zabývají se strukturou a funkcí genů na molekulární úrovni, čímž poskytují získání nových informací o genové expresi, chromozomech a mutacích (Sanz & Köchling 2007).

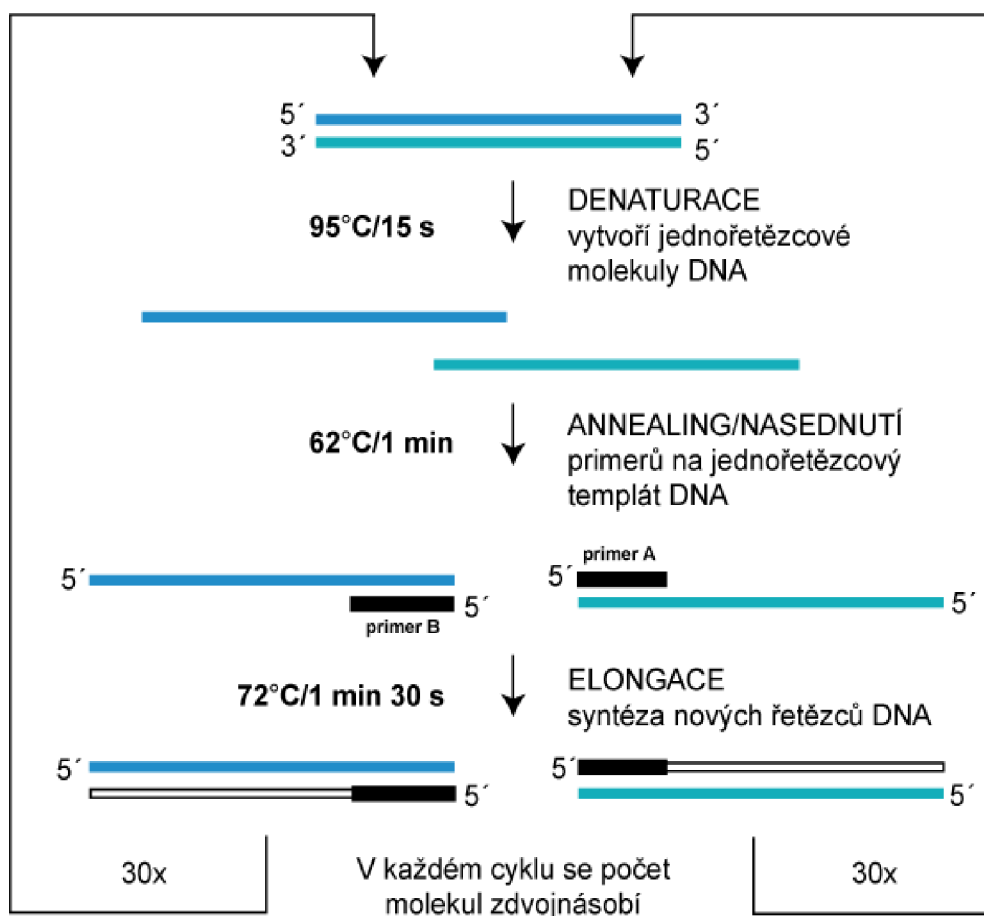
#### **3.7.1 Izolace DNA**

Extrakce biomolekul, DNA, RNA a proteinu, jsou jednou z nejdůležitějších metod, které se používají v molekulární biologii. První izolaci DNA provedl švýcarský fyzik Friedrich Miescher roku 1869. DNA, RNA a proteiny mohou být izolovány z jakéhokoli biologického materiálu jako jsou živé nebo konzervované tkáně, buňky, virové částice nebo jiné vzorky pro analytické nebo preparativní účely. K izolaci chromozomální nebo genomové DNA z prokaryotických nebo eukaryotických organismů se používají komerční kity, které jsou rychlé, spolehlivé a snadno použitelné. Využívají konvenční metody od guanidiniumthiokyanát-phenol-chloroformové extrakce po kolonovou technologii, která je široce používána při extrakci DNA a RNA, a také chromatografické purifikační metody (Tan & Yiap 2009).

#### **3.7.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

PCR byla objevena a popsána Kary Mullisem v roce 1990. Princip této metody spočívá v opakované denaturaci dvoušroubovice DNA a následnou renaturací řetězců s oligonukleotidy, které jsou v nadbytku v reakční směsi a slouží i jako primery při syntéze nového řetězce DNA. PCR metoda má 3 hlavní kroky – denaturace, annealing (hybridizace) a elongace. V prvním kroku je DNA denaturována při vysokých teplotách (90-97 °C). V druhém kroku primery nasedají na templát DNA k prodloužení. V posledním kroku dochází k samotnému prodloužení a vytvoření komplementární kopie řetězce DNA (viz obrázek 2). PCR bývá velmi oblíbená metoda z důvodu její rychlosti, přesnosti a nízké finanční nákladnosti (Joshi & Deshpande 2013).

## Schéma PCR



Obrázek 2 Schéma PCR (čerpáno z internetového webu [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1485&typ=html))

### 3.7.2.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (PCR-DGGE)

PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) je elektroforetická metoda schopná detekovat rozdíly mezi fragmenty DNA stejné velikosti, ale s různými sekvencemi. Je to proto, že tyto fragmenty mohou být separovány v denaturačním gradientovém gelu na základě jejich profilu diferenciální denaturace (tání). Teoretické aspekty této separace poprvé popsali Fisher & Lerman 1983. V akrylamidovém gelu jsou denaturační podmínky zajištěny močovinou a formamidem. Při této metodě se využívá rychlosti denaturace DNA na počtu vodíkových můstků. V místech s vyšším výskytem AT párů (nukleové báze adenin a thymin) se od sebe řetězce DNA budou oddělovat snadněji, než v místech s vyšším výskytem CG párů (nukleové báze cytosin a guanin), kde tyto úseky budou více stabilní. Technika PCR-DGGE je široce používána v mikrobiologii, protože je schopna poskytnout otisk bakteriální komunity ve vzorku po přímé extrakci DNA. Je to velmi citlivá metoda při vyhledávání mutací. Vzorek se podrobí extrakci DNA za získání směsi obsahující DNA z bakteriálních druhů vyskytujících se ve vzorku. Následně je směs DNA použita jako templát v PCR amplifikacích konkrétních variabilních oblastí DNA.

Různé bakteriální druhy mají rozdíly ve složení párů bází ve variabilních oblastech 16S rDNA, což umožňuje jejich rozlišení pomocí PCR-DGGE (Ercolini 2004). Řada sloučenin, jako jsou tuky, polysacharidy, polyfenoly a jiné sekundární sloučeniny mohou inhibovat PCR reakci interakcí s proteiny a nukleovými kyselinami a jejich přítomnost v extrahovaných vzorcích DNA může zabránit úspěšné amplifikaci cílového genu (El Sheikha 2019).

### 3.7.3 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforéza v agarózovém gelu je neúčinnějším způsobem separace fragmentů DNA různých velikostí. Agaróza je izolována z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria*. Rychlost migrace molekuly DNA přes gel je určena velikostí molekuly DNA, koncentrací agarózy, konformací DNA, použitým napětím, přítomností ethidium bromidu, typem agarózy a elektroforetickým pufrům. Po separaci jsou molekuly DNA vizualizovány pod UV světlem po obarvení vhodným barvivem. Ethidium bromid je nejběžnějším činidlem používaným k barvení DNA v agarózových gelech.

Při vystavení UV světlu se aktivují elektrony v aromatickém kruhu molekuly ethidia, což vede k uvolnění energie (světla), když se elektrony vrátí do základního stavu. Ethidium bromid působí tak, že se interkaluje do molekuly DNA způsobem závislým na koncentraci. To umožňuje odhadnout množství DNA v jakékoliv konkrétní části DNA na základě jeho intenzity (Lee et al. 2012).

### 3.7.4 Sekvence

Cílem sekvenace je určení přesného pořadí nukleových bází, které se mezi sebou párují. Díky této metodě je možné identifikovat variace v DNA spojené s různými druhy mutací, proto bývá často využívána v lékařských oborech z důvodu diagnostiky nemocí nebo také ve forenzní medicíně. Dále bývá velmi oblíbenou metodou v mikrobiologii z důvodu velké variability mikrobiálního genomu. Rozdělují se na klasické metody sekvenace, kam patří Sangerova metoda a Maxam – Gilbertova metoda a na sekvenační metody nové generace (Mardis 2017).

#### 3.7.4.1 Sangerova metoda sekvenování

Sangerova metoda sekvenování neboli také sekvenování první generace. Tato metoda byla objevena v roce 1977 Frederickem Sangerem a jeho kolegy. Tato metoda je založena na terminaci řetězce DNA, kde jsou nukleotidy v molekulách jednovláknové DNA určovány komplementární syntézou polynukleotidových řetězců. Syntéza je založena na selektivním začlenění nukleotidů ukončujících řetězec pomocí enzymu DNA polymerázy. Sangerovo sekvenování bylo posléze nahrazeno metodami sekvenování nové generace, ačkoliv stále bývá standartní metodou v klinické genetice (Totomoch-Serra et al. 2017).

#### 3.7.4.1.1 Sekvenování 16S

Tato metoda se využívá pro velmi spolehlivou identifikaci mikroorganismů. 16S rRNA je centrální strukturální složkou bakteriální a archeální ribozomální podjednotky 30S a je nezbytná pro zahájení syntézy proteinů a stabilizaci správného párování kodon-antikodon, což je trojice po sobě následujících nukleotidů v mRNA a antikodon trojice nukleotidů na tRNA, která umožňuje specifické navázání na kodon, v místě ribozomu během translace mRNA. Přímé sekvenování 16S rRNA genů ze vzorků se stalo standardní metodou hodnocení početnosti, struktury a funkce mikrobiální populace v mikrobiálních komunitách. Pro stanovení sekvence 16S je nutné z bakteriální kultury vyizolovat chromosomální DNA, pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) buď amplifikovat celý gen, nebo jeho část. Tato DNA slouží pro další sekvenační reakce jako templát (Jay & Inskeep 2015).

#### 3.7.4.2 Ion torrent

Ion torrent je sekvenační metoda, která zkoumá nové generace. Pracuje s čipy nesoucími miliony mikrojamek s tranzistorovými senzory, které umožňují detekci změn proudu produkovaného uvolňováním vodíku. Vodíkové ionty jsou detekovány při uvolňování DNA polymerací. Při sekvenování na ion torrent se jedná o metodu sekvenování pomocí syntézy, přičemž se na základě templátového DNA vytvoří komplementární vlákno (Galindo-González et al. 2015).

#### 3.7.4.3 Sekvenování nové generace

Technologie sekvenování nové generace (NGS) je metoda, která sekvenuje nukleotidy rychleji a levněji (Barba et al. 2013). Vysoce výkonná metodologie sekvenování DNA (sekvenování nové generace; NGS) se za posledních 15 let rychle vyvíjela a nové metody jsou neustále komercializovány. Základními metodami v sekvenování DNA byly metody Sangerova dideoxysyntéza a Maxam-Gilbertovo chemické štěpení. Současné metody NGS se liší od přístupu původního Sangerova sekvenování v tom, že spoléhají na mnohem kratší čtení, aktuálně do asi 300–500 bází (Slatko et al. 2018).

Ve srovnání s tradiční metodou sekvenování Sangerovou kapilární elektroforézou, která je považována za technologii sekvenování první generace, poskytují technologie NGS vyšší propustnost dat s nižšími náklady a umožňují výzkum genomu v populačním měřítku. Technologie NGS mají ve srovnání se sekvenováním první generace tři hlavní vylepšení. Za prvé, metody NGS nevyžadují bakteriální klonovací postup a připravují knihovny pro sekvenování v bezbuněčném systému. Za druhé, technologie NGS zpracovávají miliony sekvenačních reakcí paralelně a současně. Za třetí, detekce bází se provádí cyklicky a paralelně (Park & Kim 2016).

Začátek pracovního postupu sekvenování vyžaduje konverzi nukleových kyselin do knihoven kompatibilních s přístroji. Výběr sekvenačního nástroje by měl být proveden před generováním knihoven, protože specifické sekvence musí být přidány ve fázi přípravy knihovny.

Dalším krokem je sekvenování. Sekvenování je nejpřímějším krokem v procesu NGS, protože všechny značky sekvenátorů se relativně snadno obsluhují a zahrnují komplexní služby podpory výrobce. Posledním krokem je analýza dat NGS, který je časově (Vincent et al. 2017).

Jednou z výhod NGS je produkce velkého množství sekvenačních dat v krátkém čase, proto má obrovský potenciál uplatnění v klinické medicíně (Dahui 2019).

### **3.7.5 Další sekvenační metody nové generace**

#### 3.7.5.1 Masivně paralelní sekvenování

Klinické využití masivně paralelního sekvenování poskytuje způsob, jak identifikovat příčinu mnoha nemocí neznámé etiologie prostřednictvím současného screeningu tisíců lokusů na patogenní mutace a sekvenováním biologických vzorků pro genomové signatury nových infekčních agens. Kromě poskytování těchto zcela nových diagnostických schopností může masivní paralelní sekvenování také nahradit Sangerovo sekvenování v klinických aplikacích, kde se v současnosti používají (Tucker et al. 2009).

#### 3.7.5.2 Pyrosekvenace

Pyrosekvenování detekuje luminiscenci z uvolnění pyrofosfátu při začlenění nukleotidu do komplementárního vlákna. Pyrosekvenační studie také vyžadují spojení bisulfitového ošetření genomové DNA s PCR amplifikací cílové sekvence, ale výhodou pyrosekvenování je, že kvantitativní data o methylaci DNA lze získat z přímého sekvenování produktů PCR bez nutnosti klonování do bakteriálních expresních vektorů a sekvenování (Xiong et al., 2015)

#### 3.7.5.3 Illumina

Tato technologie NGS využívá sekvenování a klonální amplifikaci pomocí syntézy SBS (sequencing by synthesis), tím umožňuje přesné a rychlé sekvenování. Tento proces identifikuje báze DNA, které nejdříve rozštěpí na náhodných místech, připojí na adaptérové sekvence a následně začleňuje do řetězce nukleové kyseliny (Fadrosh et al. 2014).



### 3.7.6 Statistické metody

#### 3.7.6.1 Studentův T-test

T-test je typ statistického testu, který se používá k porovnání průměrů dvou skupin. Je to jeden z nejpoužívanějších testů statistických hypotéz při studiích dvou skupin. Existují dva typy statistické inference: parametrické a neparametrické metody. Parametrické metody se týkají statistické techniky, ve které se definuje rozdělení pravděpodobnosti proměnných pravděpodobnosti a vyvozuje se závěry o parametrech rozdělení. V případech, kdy nelze definovat rozdělení pravděpodobnosti, se používají neparametrické metody. T-testy jsou typem parametrické metody, lze je použít, když vzorky splňují podmínky normality, stejné odchylky a nezávislosti. T-testy lze rozdělit na dva typy. Existuje nezávislý t test, který lze použít, když jsou dvě srovnávané skupiny na sobě nezávislé, a párový T-test, který lze použít, když jsou dvě srovnávané skupiny na sobě závislé. T-testy se obvykle používají v případech, kdy jsou experimentální subjekty rozděleny do dvou nezávislých skupin (Kim et al. 2015).

#### 3.7.6.2 Alfa diverzita – Shannon entropy

Jedná se o typ statistického testu, který se zabývá matematickou interpretací míry neurčitosti. Byla objevena Claudem Shannonem roku 1948. Jeden z nejvýraznějších rysů Shannonovy entropie spočívá v tom, že každému můžeme přiřadit jinou váhu rozdělení pravděpodobnosti. Díky tomu je zvláště vhodný pro studium rozhodovacích problémů, kde mohou působit hodnoty z předchozích pravděpodobností (Bromiley et al. 2010).

#### 3.7.6.3 Analýza hlavních koordinát (PCoA)

Analýza hlavních koordinát (PCoA), známá také jako klasické škálování, je metoda metrického vícerozměrného škálování založená na projekci několika proměnných. K základním principů této metody patří redukce dat a interpretace dat (Gower 2015).

## 4 Metodika

### 4.1 Vážení a příprava

Byly odebrány vzorky stolice od 26 pacientů s onemocněním DM II léčených antibiotiky z důvodu komplikací tzv. diabetické nohy. Jednalo se o skupinu 24 mužů a 2 žen s věkovým rozpětím mezi 48-79 lety. S rozpětím BMI 19,44 - 37,1. Průměrné trvání antibiotické léčby v měsících před pokusem bylo 2,18, přičemž největší odchylky byly: 1 pacient se ATB neléčil vůbec a nejdelší léčení ATB trvalo 9,25 měsíců. Průměrné trvání ulcerace v měsících bylo 16,95, přičemž nejdelší trvání ulcerace bylo 76 měsíců. Průměrné trvání DM v letech bylo 19. Byly provedeny 1-3 odběry. Vzorky byly odebrány od pacientů z Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a zamrazeny při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bylo naváženo 60 vzorků po 0,200 g v toleranci 0,180g – 0,220 g na analytických vahách (Scaltec SPB 42).

Tabulka 1 Charakteristika pacientů podle BMI

Klasifikace podle BMI	Počet pacientů
Normální váha	1
Nadváha	6
Obezita 1. stupně	9
Obezita 2. stupně	5

Tabulka 2 Trvání ATB léčby

Trvání ATB léčby (měsíce)	2,18
Trvání ulcerace (měsíce)	16,95
Trvání DM (roky)	19

### 4.2 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu. Práce s DNA easy (Powersoil pro kit, Qiagen). Bylo postupováno podle návodu výrobce. K roztoku DNA byl přidán roztok CD 1, následně vzorky byly vloženy do beateru (MP fast prep 24) na 2 minuty. Následně vložen do termobloku (Heating-culting dry block cH 100, Biosan) na 10 minut při  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Celé bylo opakováno 2x a vloženo do centrifugy (Hermle ZR16 MK) 15 000 rpm na 1 minutu. Dále k vzorkům přidán roztok CD 2, poté odstředěno 15 000 rpm na 1 minutu. Přidáno CD 3, odstředěno 15 000 rpm na 1 minutu, opakováno 2x. Dále byl přidán roztok EA a vloženo do centrifugy 15 000 rpm na 1 minutu.

Dále byl přidán roztok CD 5 vloženo do centrifugy 15 000 rpm na 1 minutu a poté ještě jednou na 16 000 rpm na 2 minuty. Naposledy byl přidán roztok CD 6, vloženo do centrifugy 15 000 rpm na 1 minutu a přečištěná DNA byla měřena na přístroji NanoDrop one (ThermoScientific), 1,5  $\mu\text{l}$  roztoku.

### 4.3 Sekvenování nové generace

Izolace DNA z kultury bakterií byla provedena pomocí komerčního kitu DNA Extraction Kit (Mo-Bio, Qiagen)

#### 4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro optimalizaci byla použita izolovaná genomická DNA vzorků. DNA sledovaných vzorků byla 10x naředěná (destilovanou vodou) s primery 3386 C a 534 RP. Roztok reakční směsi PCR (1 µl forward primeru, 1 µl reverzního primeru, 12 µl PCR voda, 15 µl Master Mix (elizyme) a 1 µl genomické DNA). Finální objem byl 30 µl. Vzorky byly podrobeny v termocykleru PCR (Biometra, TAdvanced) reakci. Podmínky teplotního programu zaznamenány v tabulce 1.

Sekvence forward primeru 3386 C od konce 3' ke konci 5' - CGCAAACGTCGCCAAATCCT  
Sekvence reversního primeru 534 R od konce 5' ke 3' - ATTACCGCGGCTGCTGGCA

**Tabulka 3:** Teplotní program PCR k optimalizaci

Krok	°C	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 sek	34
Annealing	58	20 sek	34
Elongace	72	40 sek	34
Konečná elongace	72	5 min	1
Udržovací krok	15	-	-

Po ukončení programu byla provedena elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu (Serva, Biotech) kontrola produktu PCR. Byl přidán ethidium bromid. Bylo napipetováno 5 µl standardu a 2 µl vzorku. Separace DNA molekul trvala po dobu 20 minut při 110 V. Poté gel vložen pod UV světlo do UV transluminátoru (Top-Bio). Amplifikované produkty měly velikost 300 bp.

#### 4.3.2 Přečištění směsi PCR

Produkt PCR byl přečištěn pomocí komerčního kitu NucleoSpin Gel and PCR Cleanup (Monarch, Machery-Nagel). Vzorek byl naředěn v poměru buffer: vzorek 5:1 dsDNA <2 kb. Vzorky byly vloženy do kolony, odstředěny v centrifuze na 1 minutu 15 000 rpm, přefiltrovaný roztok přel filtr zkumavky roztok byl vylit do sběrné kádinky. Bylo přidáno 200 µl promývací pufru a centrifugováno 1 minutu 15 000 rpm. Přefiltrovaný roztok byl vylit. Tento krok byl opakován. Kolona byla přemístěna do čisté zkumavky a centrifugována 1 minutu 15 000 rpm. Byl přidán buffer 6 µl a centrifugováno 1 minutu 15 000 rpm.

Izolovaná DNA a její čistota byla měřena na přístroji NanoDrop one (ThermoScientific).

#### 4.4 Příprava knihovny (library)

K přípravě knihovny byl použit kit NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (BioLabs, New England). Jako první bylo nutné provést „úpravu konců“. Na přípravu směsi bylo použito 3  $\mu\text{l}$  End Repair Reaction Buffer (pro jednu směs), 20,5  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O, 1,5  $\mu\text{l}$  End Repair Reaction Enzymes, 5  $\mu\text{l}$  PCR amplikonu DNA. Reakční směs byla vložena do termocykleru s programem při 25 °C na 20 minut a poté při 70 °C na 10 minut. Poté byla směs zchlazena.

Dalším krokem byla „ligace adaptorů“, kdy byla připravená reakční směs smícháním 0,5  $\mu\text{l}$  DNA polymerázy, 0,5  $\mu\text{l}$  P1 adaptoru, 5  $\mu\text{l}$  T4 ligázy, 3  $\mu\text{l}$  T4 ligázy, 19  $\mu\text{l}$  vzorku z prvního kroku a 10  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O. Následně bylo ke vzorku přidáno 1  $\mu\text{l}$  barcodu (unikátní pro každý vzorek). Směs byla poté vložena na inkubaci do termocykleru s programem při 25 °C na 15 minut a poté při 65 °C na 5 minut, následováno chlazením.

Vzorky byly čištěny pomocí magnetických kuliček (AmpureBeads). Kuličky, které byly ponechány na laboratorní teplotu, byly připipetovány do vzorků. Poté vzorky byly umístěny na magnetickou podložku cca na 2 minuty, než došlo k vyčištění vzorku. Kuličky se přichytily k magnetům na strany mikrozkušavky, poté byl supernatant pipetou odstraněn. Mikrozkušavky na podložce byly ponechány a 2x promyty 70 % ethanolem. Po odstranění a odpaření ethanolu, kdy kuličky byly suché, byly zkumavky odebrány z desky, bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O, promícháno pipetou a ponecháno v inkubaci zhruba na 5 minut, aby se DNA uvolnila z magnetických kuliček.

Poté byly zkumavky vráceny na magnetickou desku a došlo k odstranění supernatantu pipetou, který byl pak následně přepipetován do jiné mikrozkušavky.

Následovala amplifikace. Byla připravena směs 2 primerů po 2  $\mu\text{l}$ , 23  $\mu\text{l}$  přečištěného vzorku a 2x PCR Mastermixu po 25  $\mu\text{l}$ . PCR reakce probíhala při 98 °C po 30 sekund, 98 °C po 10 sekund kdy cyklus byl opakován 8x, dále při 58 °C na 30 sekund a naposledy při 72 °C po dobu 10 sekund.

##### 4.4.1 Naředění knihovny a qPCR

DNA byla naředěna 1:20 (5  $\mu\text{l}$  DNA, 95  $\mu\text{l}$  destilovaná voda) a znovu naředěna (2  $\mu\text{l}$  DNA a 98  $\mu\text{l}$  destilovaná voda). Konečné ředění bylo 1:1000.

K takto naředěnému objemu 5  $\mu\text{l}$  DNA bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  Master Mixu, 1  $\mu\text{l}$  primer, 4  $\mu\text{l}$  destilovaná voda. Proběhla PCR v termocykleru. Dále byla DNA naředěna na koncentraci 26 pM.

Dále pracováno s přístrojem Ion One Touch 2 instrument a kitu IonPGM 0T2 Suppers. Bylo postupováno podle manuálu přístroje.

#### 4.4.2 Emulzní PCR

Pro přípravu emulzní PCR byla za potřebí instalace Ion OneTouch Recovery Tubes a Recovery Router, amplifikační desky Ion One Touch a injektoru, příprava amplifikačního roztoku, zkumavek s činidly, umístění a naplnění Ion PGM Hi-Q Reaction Filter. Bylo využito komerčního kitu Ion PGM Hi-Q View ISPs. Proběhlo naplnění osmi-jamkového stripu a zpuštění přístroje Ion OneTouch ES.

#### 4.4.3 Sekvenování

Pro sekvenování bylo využito komerčního kitu Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit. Bylo postupováno dle návodu. Nejdříve bylo nutné přístroj vyčistit. Poté následovala inicializace systému a byly připraveny reakční láhve (50 ml) s příslušnými nukleotidy – deoxyguanosin trifosfát (dGTP), deoxycytidin trifosfát (dCTP), deoxyadenosin trifosfát (dATP) nebo deoxytymidin trifosfát (dTTP). Do zásobních láhví bylo přidáno po 20 µl příslušného nukleotidu. Bylo postupováno podle návodu na přístroji. Nakonec přístrojem zkontrolováno pH.

Dále proběhlo dávkování vzorku na čip. Ke vzorku přidány templát-pozitivní ISP a poté proběhlo nasednutí sekvenačního primeru. Zkumavka byla promíchána pipetou a centrifugována 15 000 rpm 2 minuty. Roztok odpipetován na 15 µl. Do roztoku přidáno 12 µl sekvenačního primeru (objem celkem 27 µl). Dále byla rozrušena pipetou růžová sraženina. Zkumavka umístěna do termocykleru při 95 °C na 2 minuty, poté 37 °C na 2 minuty.

Dále proběhla kontrola čipu podle návodu přístroje. Po nasednutí sekvenačního primeru . přidáno 3 µl Ion PGM Hi-Q View Sequencing Polymerase k ISP (Celkový objem 30 µl. Směs promíchána a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Dále byla odstraněna kapalina z čipu pomocí pipety. Poté čip umístěn do držáku a centrifugován 5 sekund. Čip vyjmut, pomocí utěrky odstraněno zbytek kapaliny. Poté nanesen vzorek na čip (30 µl). Poté čip centrifugován 30 sekund. Posledním krokem bylo spuštění přístroje, postupováno podle pokynů.

#### 4.4 PCR-DGGE

Bylo postupováno podle protokolu na PCR-DGGE analýzu bakterií dle metodiky (Muyzer et al. 1993). Pro přípravu PCR produktů bylo potřeba připravit reakční směs o složení: naizolovaná DNA 1 µl, forward primer 10x338GC 1 µl, reverzní primer 10x534RP 1 µl, PCR mix 15 µl a PCR voda 12 µl. Celkový objem byl 30 µl. Vše smícháno ve zkumavce a vloženo do termocykleru. Poté byly vzorky zkontrolovány elektroforézou.

Sekvence forward primeru 338GC od konce 3' ke konci 5'-  
CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCGCCGCGCCGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAG

Sekvence reversního primeru 534 RP od konce 5' ke 3'-CCTACGGGAGGCAGCAG

Dále byl připraven DGGE gel, znázorněn v tabulce.

<b>Stupeň denaturace</b>	<b>35 %</b>	<b>60 %</b>
40% akrylamid (ml)	5,560	5,560
50x TAE (ml)	0,500	0,500
Formamid (ml)	3,500	6
Urea (g)	3,675	6,300
H <sub>2</sub> O (ml)	12,250	9,500

Pro polymerizaci gelu použito 20  $\mu$ l TEMEDu a 200  $\mu$ l 10% amonium persulfátu sodného. Gel 35 % a 60 % byl smíchán. Do tanku s pufrům naneseny vzorky (všech 30  $\mu$ l). Vzorky byly podrobeny reakci při 60 °C, napětí 60 V a čase 18 hodin.

Dále bylo připraveno 50 ml TAE pufru s 5  $\mu$ l interkalační barvou a gel byl v pufru ponechán po dobu 30 minut.

Na obrázku vyfoceného gelu byly vyznačeny bandy, vyříznuty pod UV světlem a bylo přidáno 1,5 ml sterilní vody. Zvortexováno po dobu 10 minut.

Dále byla DNA naamplifikována metodou PCR smícháním 5  $\mu$ l vody s kouskem gelu, 10x 341FP forward primer 1  $\mu$ l, 10x 534RP 1  $\mu$ l reversní primer, PCR mix 15  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ l. Produkt podroben reakci v termocykleru.

Proběhla kontrola na agarózové elektroforóze. Produkt měl velikost 200 bp.

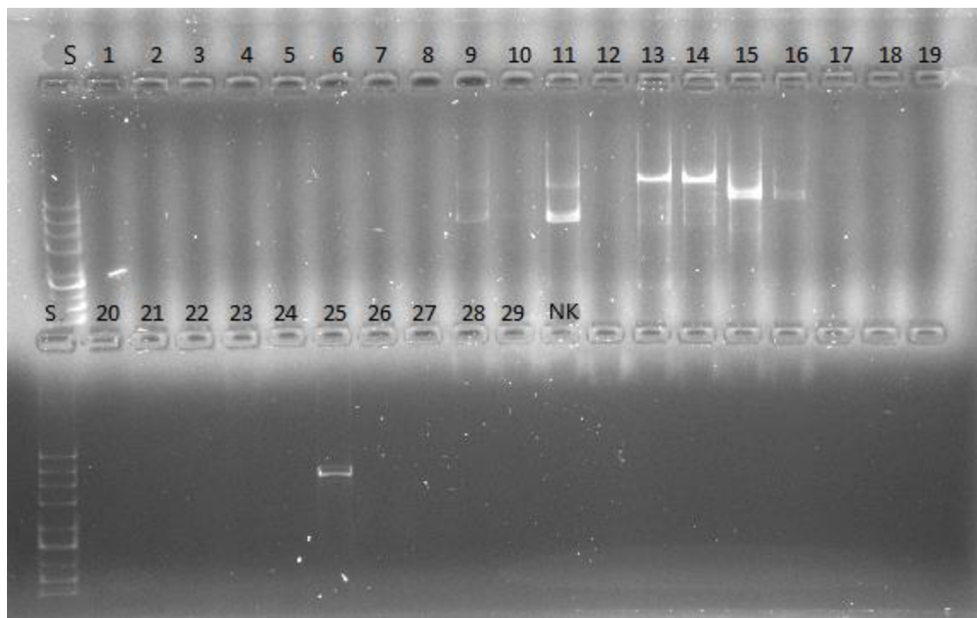
Směs přečištěna komerčním kitem QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) podle návodu a koncentrace změřena na přístroji NanoDrop one (ThermoScientific).

Vzorky zaslány na komerční sekvenování do firmy ([www.eurofinsgenomics.eu](http://www.eurofinsgenomics.eu)) dle příslušného protokolu.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Optimalizace

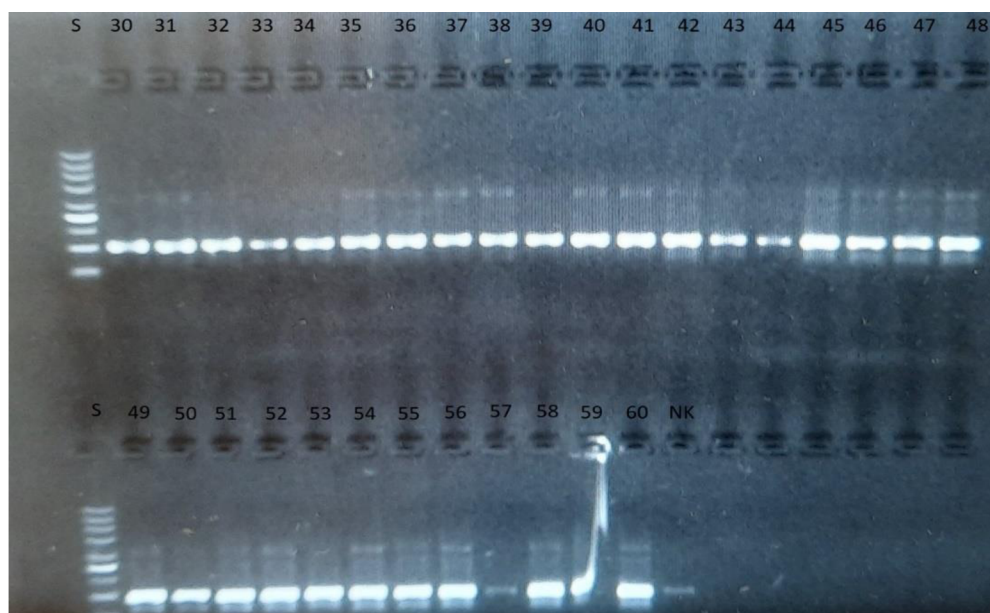
Optimalizace vzorků 1-29 se standardy (S) a negativní kontrolou (NK) se nezdařila. Důvodem byl nevhodně zvolený Master Mix Elyzime. Produkt nebyl správně zobrazen pomocí agarové elektroforézy (viz obrázek 3).



Obrázek 3 Optimalizace PCR

### 5.2 Amplifikace

Amplifikace vzorků 30-60 se standardy a negativní kontrolou proběhla úspěšně. Vzorky byly naamplifikovány a ověřeny agarovou elektroforézou (viz obrázek 4).



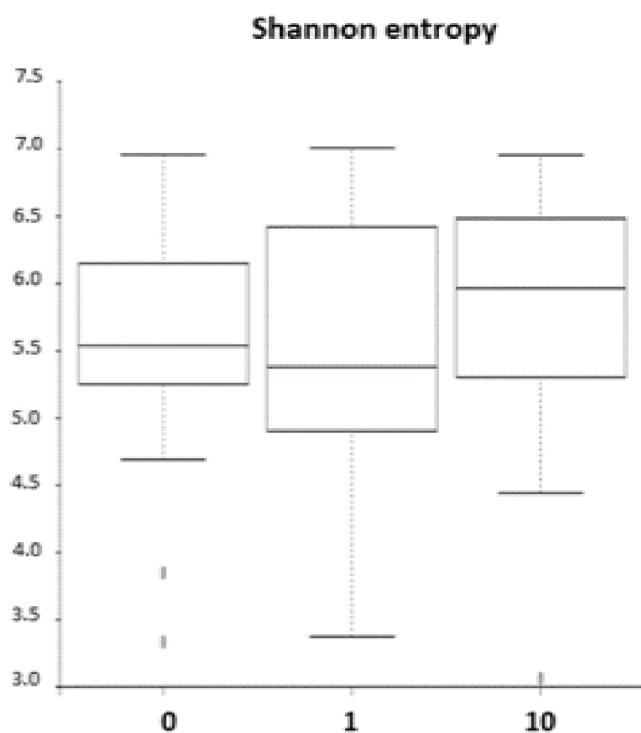
Obrázek 4 PCR amplifikace vzorků stolice

## 5.3 NGS

### 5.3.1 Shannon entropy a PCoA

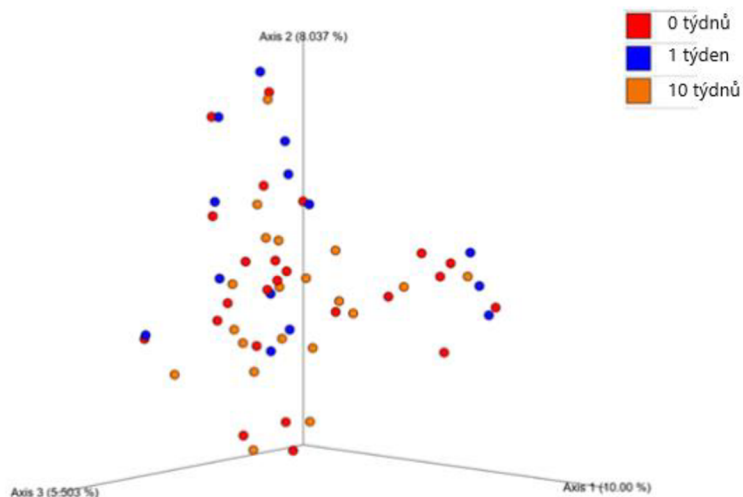
#### 5.3.1.1 Léčba antibiotiky

Ve vzorcích stolice pacientů s DM II byly bakterie zkoumány jak kvantitativně, tak kvalitativně. Byly zkoumány na druhovou bohatost před podáváním antibiotik, po 1 a po 10 týdnech antibiotické léčby. Hodnoty alfa diverzity neprokázaly žádné významné rozdíly mezi sledovanými skupinami. S kritérii studentova T – testu  $p > 0,05$ . Oddělení vzorků pomocí PCoA nebylo dobře viditelné. Významnější rozdíly byly mezi skupinami, které byly naměřeny po 1 a 10 týdny léčby antibiotiky (viz obrázky 5 a 6).



Obrázek 5 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky diabetických pacientů před, po 1 týdnů a po 10 týdnech léčby antibiotiky

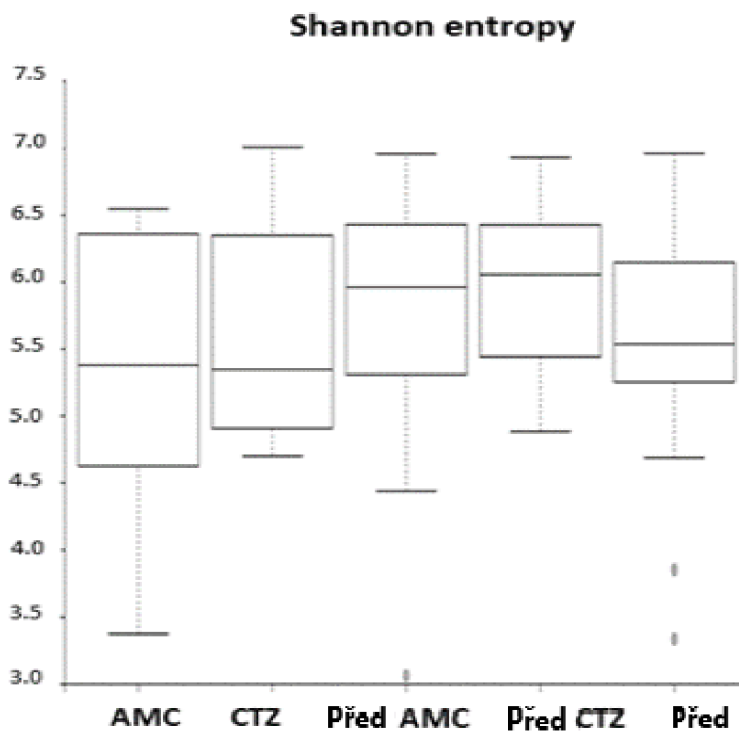




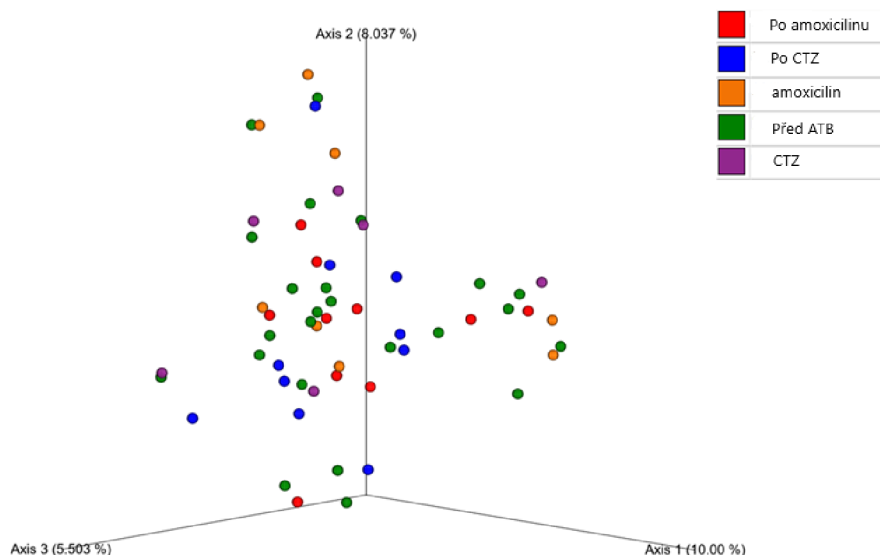
Obrázek 6 PCoA pro vzorky diabetických pacientů před, po 1 týdnu a po 10 týdnech léčby antibiotiky

### 5.3.1.2 Druhy antibiotik

Dále byly vzorky stolice od pacientů s DM II podrobeny kvalitativnímu a kvantitativnímu měření druhové bohatosti před podáváním antibiotiky, během podávání amoxicilinu (AMC), během podávání ceftazidinu (CTZ), po ukončení AMC a po ukončení CTZ. Hodnoty alfa diverzity neukázaly opět žádné významné rozdíly mezi sledovanými skupinami s kritérii studentova T-testu  $p > 0,05$ . Ani statistická analýza PCoA neukázala žádný významný rozdíl (viz obrázky 7 a 8).



Obrázek 7 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky stolice diabetických pacientů před, během a po léčbě antibiotiky

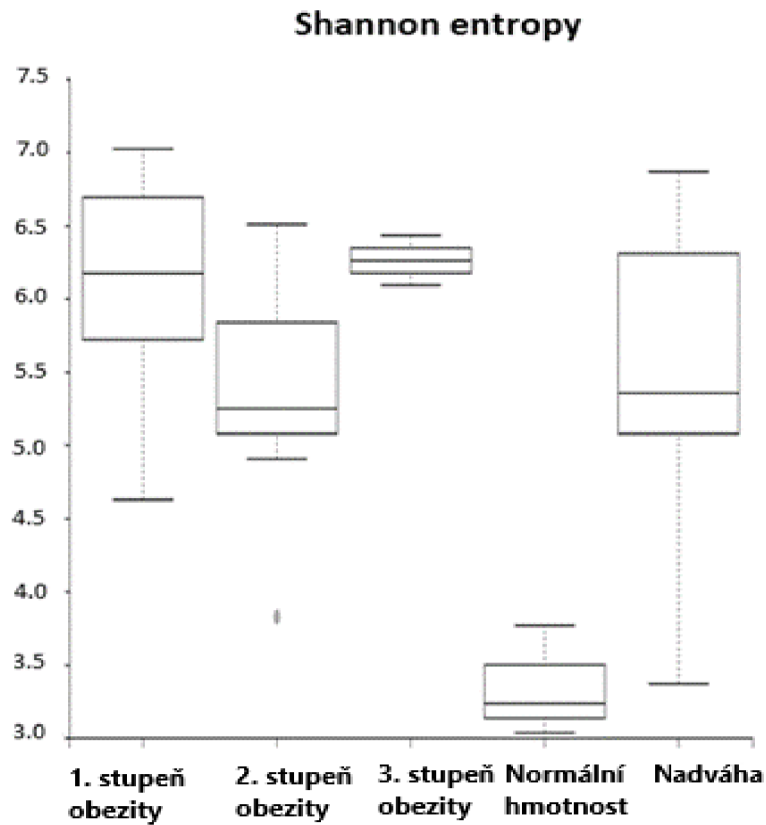


Obrázek 8 PCoA představující vzorky stolice diabetických pacientů před, během a po léčbě antibiotiky

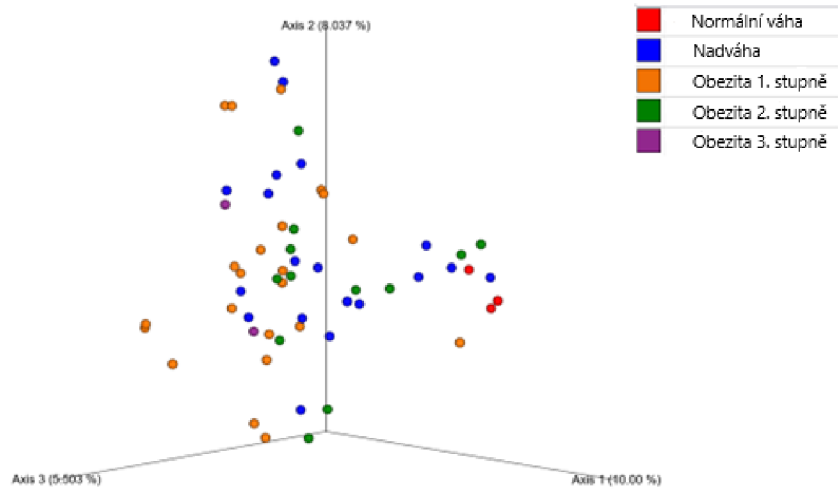
### 5.3.1.3 BMI

Vzorky stolice byly kvantitativně a kvalitativně zkoumány na druhovou bohatost skupin rozdělených podle BMI. Skupiny byly rozlišeny na pacienty s normální hmotností, nadváhou, obezitou 1. stupně, obezitou 2. stupně a obezitou 3. stupně.

Druhová bohatost byla významně nižší u skupiny pacientů s normální váhou oproti skupině pacientů trpících nadváhou, obezitou 1. a i obezitou 2. stupně. U pacientů s nadváhou tato hodnota může poukazovat na to, že mikrobiota skupiny s normální hmotností není schopna efektivně využívat všechny živiny z přijímané stravy. Dále ve srovnání měli pacienti trpící obezitou 1. stupně významně vyšší druhovou bohatost oproti pacientům s obezitou 2. stupně, jak ukazuje shannonova entropie  $p < 0,05$ . Analýza PCoA prokazuje některé významné rozdíly mezi skupinami normální vs nadváha, normální vs obezita 1. stupně, normální vs obezita 2. stupně, nadváha vs obezita 1. stupně, obezita 1. stupně vs obezita 2. stupně, obezita 2. stupně vs obezita 3. stupně (viz obrázky 9 a 10).



Obrázek 9 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro diabetické pacienty s různými třídami BMI



Obrázek 10 PcoA představující speciální oddělení mezi vzorky stolice diabetických pacientů s různými třídami BMI

#### 5.3.1.4 Taxonomické složení

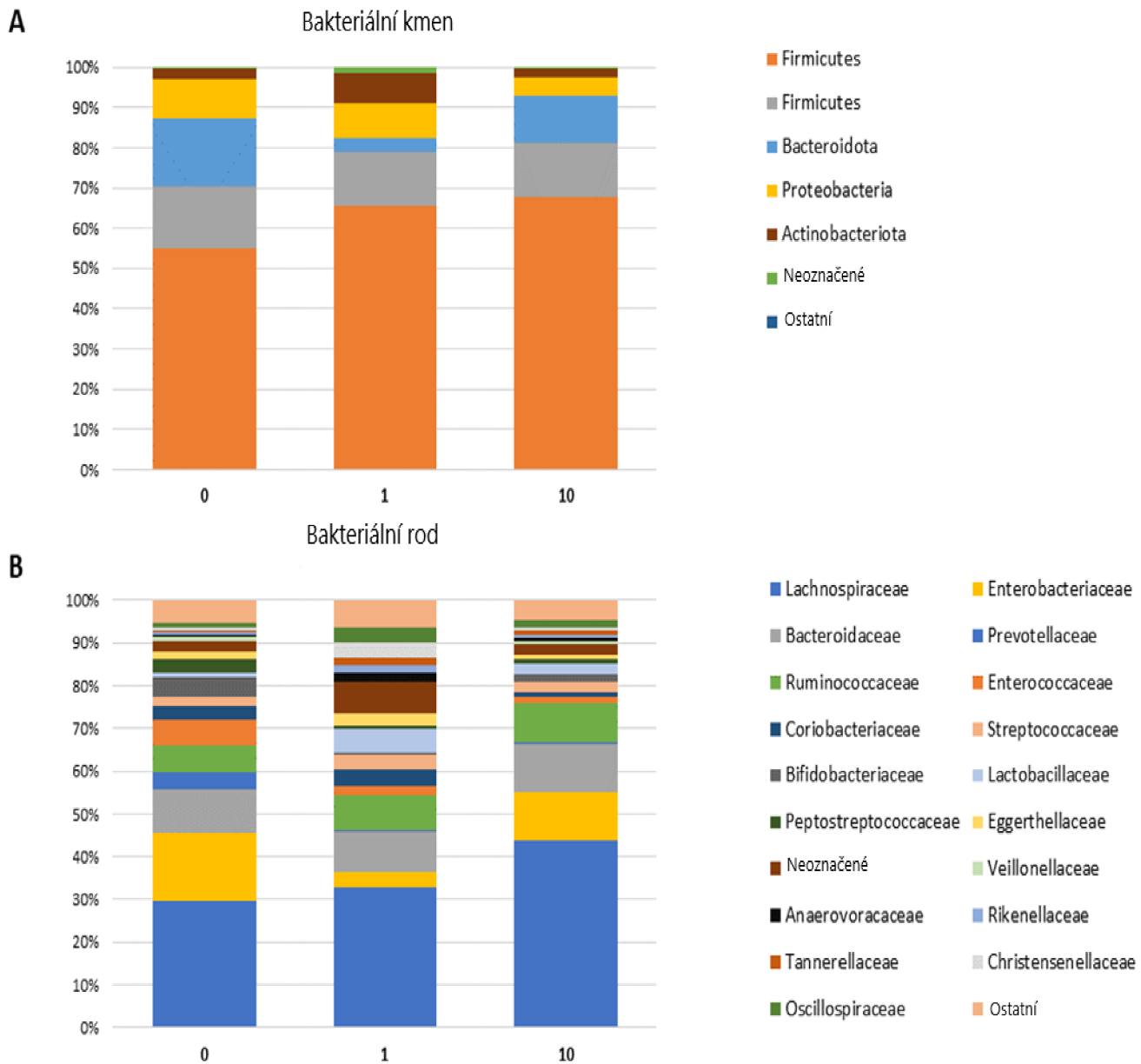
Ve vzorcích stolice pacientů DM II bylo detekováno největším zastoupením především 9 bakteriálních kmenů. Byly detekovány kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Synergistota*, *Fusobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Verrucomicrobiota*, *Campilobacterota*.

Hlavní bakteriální třídou u rodu *Firmicutes* (0 týdnů = 55 %, 1 týden = 65,3 %, 10 týdnů = 67,6 %) byla *Clostridium*, která byla zastoupena v čeledích *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Christensenellaceae*, *Anaerovoracaceae*, *Butyricoccaceae* a *Clostridiaceae*. Dále byly nalezeny i kmene *Firmicutes* i bacily, které byly nalezeny v čeledích *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae* a *Lactobacillaceae*.

Kmen *Bacteroidetes* (*Bacteroidota*) (0 týdnů = 15,4 %, 1 týden = 13,5 %, 10 týdnů = 13,6 %) byl zastoupen hlavně třídou *Bacteroides* s čeleděmi *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* a *Tannerellaceae*.

Dále u kmene *Proteobacteria* (0 týdnů = 16,7 %, 1 týden = 3,7 %, 10 týdnů = 11,6 %) byly především zástupci třídy *Gammaproteobacteria* s čeledí *Enterobacteriaceae*

U kmene *Actinobacteriota* (0 týdnů = 10 %, 1 týden = 8,5 %, 10 týdnů = 4,5 %) byly zástupci převážně třídy *Coriobacteriia* čeledí *Coriobacteriaceae* a *Eggerthellaceae*, a dále také třída *Actinobacteria* čeledí *Bifidobacteriaceae*. Taxony s relativní četností nižší než 1 % byly přiřazeny do seskupení jako Ostatní (viz obrázek 11).

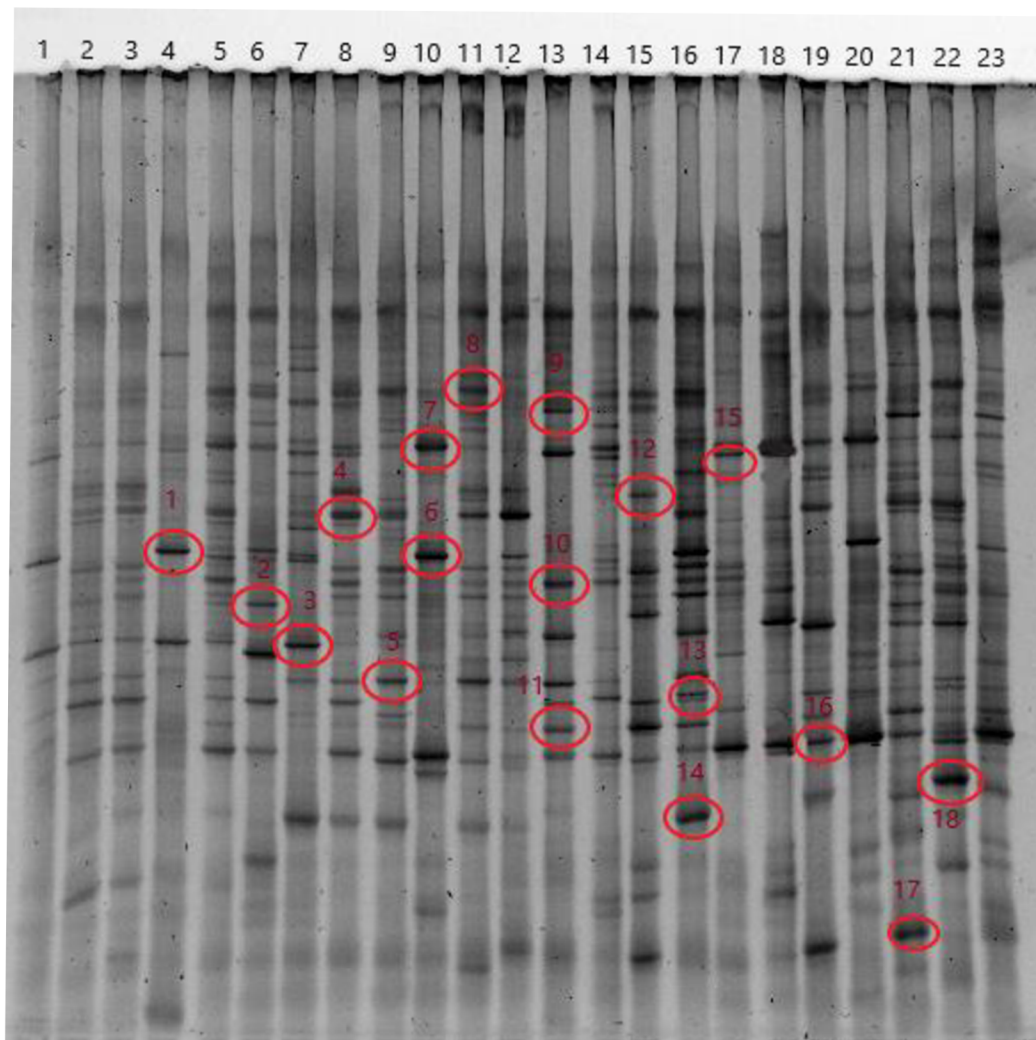


Obrázek 11 Srovnání fekálních bakterií diabetických pacientů před, po 1 týdnu a po 10 týdnech antibiotické léčby.

## 5.4 PCR-DGGE

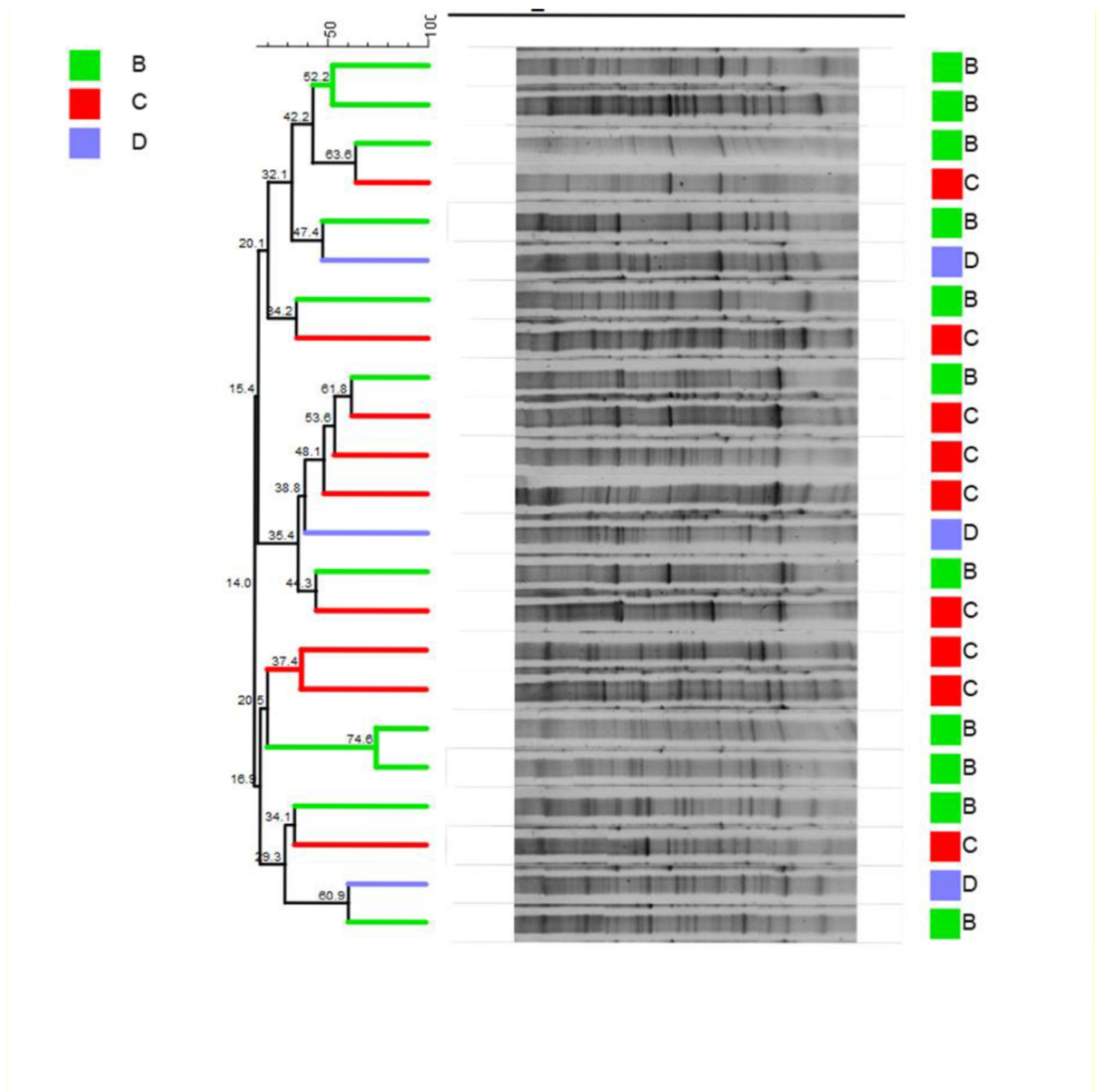
### 5.4.1 Výsledky DGGE

Na následujícím obrázku č. 12 je vyfocen DGGE gel s pacienty 1-23. Z každé dráhy byl vybrán jeden nebo více bandů pro další analýzu. Celkem bylo vyřiznuto 18 bandů (označeno červeně).



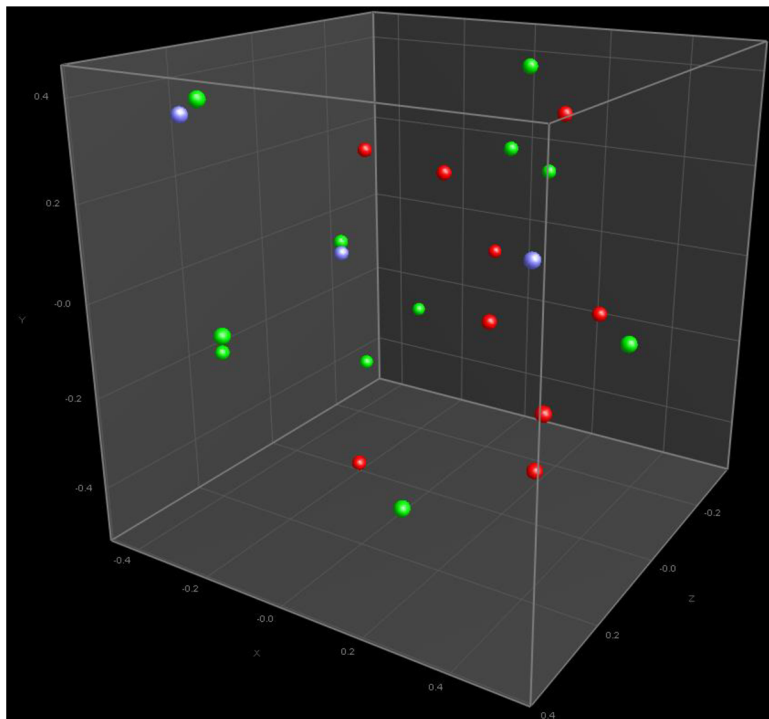
Obrázek 12 Výsledky DGGE a vyřezání bandů

Fylogenetický strom, který byl generován po získání genů 16S rRNA s výsledky elektroforézy podle BMI pacientů 1-23, sestavený dle maximální pravděpodobnosti, kdy B značí 1. stupeň nadváhy, C značí 2. stupeň nadváhy a D značí 3. stupeň nadváhy (viz obrázek číslo 13).

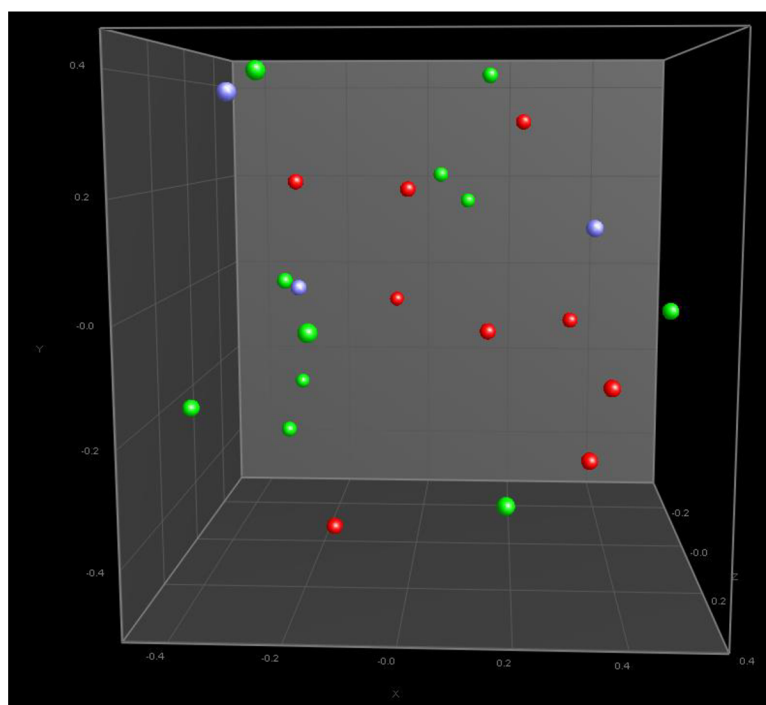


Obrázek 13 výsledky DGGE podle BMI

Výsledky DGGE neukázaly žádné velké rozdíly mezi sledovanými pacienty. Důvodem bylo, že vzorky si byly hodně podobné (viz obrázky 14 a 15). Mezi vzorky nebyly nalezeny žádné odchylky či výkyvy.



Obrázek 14 Výsledky PCR-DGGE 1-23 podle BMI



Obrázek 15 Výsledky PCR-DGGE 1-23 podle BMI



### 5.4.1.1 Seznam vyřiznutých bandů

Po vyřiznutí bandů byly určeny u jednotlivých pacientů bakterie s procentuální shodou s databází. Pro určení musela být shoda vyšší než 97 %. S 99 % shodou byla u pacienta číslo 3 určena bakterie *Enterococcus faecium*, dále byla určena u pacienta číslo 13 se 100 % shodou. Bakterie *Enterococcus faecalis* byla určena u pacienta číslo 1 se 100 % shodou, u téhož pacienta byl dále určen rod *Enterococcus spp.* se 100 % shodou u bandu číslo 7. U pacienta číslo 4 byla s 99 % shodou určena bakterie *Blautia pseudococcoides*. U pacienta číslo 14 s 99 % shodou byla určena bakterie *Blautia faecis*. Nejčastěji byly určeny nekultivovatelné bakteriální klony, a to u zbytku vyřiznutých bandů pacientů (viz tabulka č. 2).

Tabulka 4 Seznam bakterií identifikovaných z vystřižených bandů

Pacient (odběr)	Vyřiznutý band	Identifikace sekvence	Označení sekvenování	Výsledky	Procenta shody (%)
3 (I)	1	GFZ253	1R	<i>Enterococcus faecium</i>	99
		GFZ254	1F		
1 (III)	2	GFZ255	2R	<i>Enterococcus faecalis</i>	98
		GFZ256	2F		
2 (II)	3	GFZ257	3R	Nekultivovatelná bakterie	100
		GFZ258	3F		
4 (I)	4	GFZ259	4R	<i>Blautia pseudococcoides</i>	99
		GFZ260	4F		
12 (I)	5	GFZ261	5R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ262	5F		
13 (I)	6	GFZ263	6R	<i>Enterococcus spp.</i>	100
		GFZ264	6F		
13 (I)	7	GFZ265	7R	<i>Enterococcus faecium</i>	100
		GFZ266	7F		
13 (II)	8	GFZ267	8R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ268	8F		
14 (I)	9	GFZ269	9R	Nekultivovatelný bakteriální klon	99
		GFZ270	9F		
14 (I)	10	GFZ271	10R	<i>Blautia faecis</i>	99
		GFZ272	10F		
14 (I)	11	GFZ273	11R	<i>Blautia faecis</i>	99
		GFZ274	11F		
9 (I)	12	GFZ275	12R	Nekultivovatelný bakteriální klon	99
		GFZ276	12F		
10 (I)	13	GFZ277	13R	Nekultivovatelný bakteriální klon	98
		GFZ278	13F		

10 (I)	14	GFZ279	14R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ280	14F		
10 (II)	15	GFZ281	15R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ282	15F		
12 (II)	16	GFZ283	16R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ284	16F		
3 (III)	17	GFZ285	17R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ286	17F		
7 (II)	18	GFZ287	18R	Nekultivovatelný bakteriální klon	100
		GFZ288	18F		

#### 5.4.1.2 Záznam chromatogramu z aligmentu sekvencí

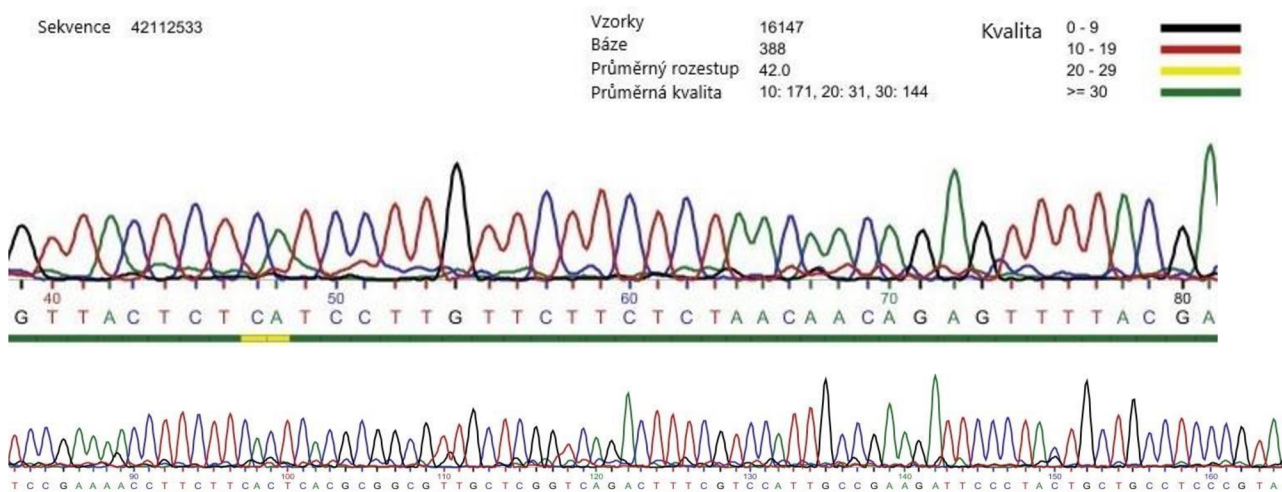
Ukázka ze záznamu chromatogramu z aligmentu sekvencí (viz obrázek číslo 16). Byly použity 4 různé barvy – každý nukleotid je barevně odlišen.

CCTACGGGAGCCACACATAGGGAATCTTCGCAATGACAAAATCTGACGAGCAACGCCCCTGAGTAAAGAGGTTTCCGATCGTAAAATCTCTTTTAAAGAAAGAAC  
AAGGATGAGGTAAGTNTCAYCCCTTACGGTATCTAACCAAGAAACCCACGGCTAACTACGTCCACCAAGCCCGGTAATAA

Obrázek 16 ukázka z aligmentu sekvencí

### 5.4.1.3 Chromatogram pro záznam sekvenování DNA

Chromatogram využívá 4 barev, každá barva zastupuje jednu sekvenci. Chromatogram umožňuje sledovat záznam sekvenování. Data byly ručně zkontrolována a byly odstraněny chyby na začátku a na konci sekvence. Pro lepší čitelnost byl chromatogram po vyříznutí rozdělen do dvou řádků (viz obrázek 17).



Obrázek 17 Chromatogram sekvenování

### 5.4.1.4 Seznam použitých tabulek vyříznutých z programu ve formátu FASTA srovnávající aligmenty DNA pro odpovídající si sekvence:

```
> GFZ265_42112656_42112656
TTAGGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAAC
AGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGCTGCC
TCCCGTAGGAGA – sekvence se shodou pro bakterii Enterococcus faecium
```

```
> GFZ271_42112717_42112717
GCATAGGACCGTCATTATCTTCCCTGCTGATAGAAGTTTACATACCGAGATACTTC
TTCCTTACGCGGCGTCGCTGCAT
CAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGCTGCCT
CCCGCT – sekvence se shodou pro bakterii Blautia faecis.
```

Sekvenování bylo prováděno firmou Eurofins. Pro zarovnání sekvencí byly použity softwary BioEdit a Genious. K vyhodnocení byl použit internetový program Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Shoda musela být větší než 97 %.

## 6 Závěr

Při léčbě antibiotiky ve skupinách rozdělených podle týdnů trvající léčby byly znatelné rozdíly v bohatosti mikrobioty mezi analýzou, která proběhla po 1 týdnu a analýzou, která proběhla po 10 týdnech antibiotické léčby.

V souvislosti mezi druhem užívaných antibiotik a různorodostí mikrobioty nebyl prokázán žádný významný rozdíl.

Naopak překvapujícím zjištěním bylo, že u skupin sledovaných podle BMI byla druhová bohatost nižší u pacientů s normální hmotností oproti ostatním skupinám (dle stupně obezity), a naopak skupina trpící obezitou měla významně vyšší druhově bohatou mikrobiotu oproti ostatním skupinám pacientů (dle stupně obezity).

Ve vzorcích stolice byly nejčastěji detekovány bakterie rodu *Firmicutes*, jejichž počty vzrůstaly s počtem týdnů antibiotické léčby. Mnoho výzkumů ukazuje, že obezita souvisí s vyšším počtem bakterií *Firmicutes*, ačkoliv toto tvrzení nebylo dostatečně vědecky prokázáno. Jedním z důvodů může být to, že mikrobiom je velmi individuální pro každého jedince. Například Duan et al. 2021 ve svém výzkumu publikoval, že kmen *Firmicutes* u skupiny obézních jedinců byl v nižším počtu nežli kmen *Bacteroidetes*, což souhlasilo se získanými výsledky. Naopak Schwiertz et al. 2010 u svého výzkumu prokázal, že obézní jedinci ve sledované skupině měli kmen *Bacteroidetes* ve vyšším poměru nežli *Firmicutes*.

Dále v naší studii byly detekovány kmeny *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria*, u kterých ale zastoupení klesalo.

Oproti výsledkům NGS byly PCR DGGE identifikovány konkrétní bakterie z kmene *Firmicutes*, a to rody *Enterococcus* a *Blautia*. Většina z vyříznutých bandů a zkoumaných bakterií byly nekultivované.

Sekvenační metody jednoznačně umožnily vývoj populačních studií při mapování mikrobiomu. Výsledky, které tyto studie přinesly, významně přispěly k rozšíření znalostí a upřesnění struktury mikrobioty u zdravých i nemocných jedinců. Modulace střevní mikrobioty se jeví jako významný nástroj pro předcházení metabolického syndromu (DM II) a tím by mohlo být zabráněno komplikacím diabetické nohy, a i mnoha dalším onemocněním.

Na základě výsledků bylo prokázáno, že antibiotická terapie ovlivňuje střevní mikrobiom, tudíž hypotézu potvrzujeme.

## Literatura

- Agardh, E., Allebeck, P., Hallqvist, J., Moradi, T., & Sidorchuk, A. 2011. Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 40(3), 804–818. doi: 10.1093/ije/dyr029
- Akhavan, B. J., Khanna, N. R., & Vijhani, P. 2023. *Amoxicillin*. PMID: 29489203
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. 2007. International Diabetes Federation: A consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabetic Medicine*, 24(5), 451–463. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02157.x
- A Kim, Ko. J. 2015. *Statistic and Probability*. Retrieved from <http://ekja.org>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., Zeller, G. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. doi: 10.1038/nature09944
- Asche, C., LaFleur, J., & Conner, C. 2011. A Review of Diabetes Treatment Adherence and the Association with Clinical and Economic Outcomes. *Clinical Therapeutics*, 33(1), 74–109. doi: 10.1016/j.clinthera.2011.01.019
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. 2014. Type 1 diabetes. *The Lancet*, Vol. 383, pp. 69–82. Elsevier B.V. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. 2013. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–136. doi: 10.3390/v6010106
- Bennett, C. J., Henry, R., Snipe, R. M. J., & Costa, R. J. S. 2020. Is the gut microbiota bacterial abundance and composition associated with intestinal epithelial injury, systemic inflammatory profile, and gastrointestinal symptoms in response to exertional-heat stress? *Journal of Science and Medicine in Sport*, 23(12), 1141–1153. doi: 10.1016/j.jsams.2020.06.002
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. 2018, May 1). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, Vol. 50, pp. 421–428. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.dld.2018.02.012
- Bray, G. A., Smith, S. R., DeJonge, L., de Souza, R., Rood, J., Champagne, C. M., Sacks, F. M. 2012. Effect of diet composition on energy expenditure during weight loss: the POUNDS LOST Study. *International Journal of Obesity*, 36(3), 448–455. doi: 10.1038/ijo.2011.173
- Bromiley, P. A., Thacker, N. A., & Bouhova-Thacker, E. 2010. *Shannon Entropy, Renyi Entropy, and Information*.

- Brophy, S., Davies, H., Mannan, S., Brunt, H., & Williams, R. 2011. Interventions for latent autoimmune diabetes (LADA) in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol. 2017. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD006165.pub3
- Buchanan, Thomas A. *Chemical Modification of Peptide Antibiotics* (University of Groningen) 2021. doi: 10.33612/diss.171585325
- Christofi, T., Panayidou, S., Dieronitou, I., Michael, C., & Apidianakis, Y. 2019. Metabolic output defines *Escherichia coli* as a health-promoting microbe against intestinal *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1), 14463. doi: 10.1038/s41598-019-51058-3
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., ... Eckel, R. H. 2008. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, Vol. 29, pp. 777–822. doi: 10.1210/er.2008-0024
- Cresci, G. A., & Bawden, E. 2015. Gut microbiome: What we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice*, Vol. 30, pp. 734–746. SAGE Publications Inc. doi: 10.1177/0884533615609899
- Cryer, P. E., Davis, S. N., & Shamon, H. 2003. *Hypoglycemia in Diabetes*. Retrieved from <http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/26/6/1902/591399/dc0603001902.pdf>
- Dahui, Q. 2019. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology & Medicine*, 16(1), 4–10. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Weiss, R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1. doi: 10.1038/nrdp.2015.19
- Dinos, G. P. 2017. The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 174, pp. 2967–2983. John Wiley and Sons Inc. doi: 10.1111/bph.13936
- Duan, M., Wang, Y., Zhang, Q., Zou, R., Guo, M., & Zheng, H. 2021. Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLoS ONE*, 16(8 August). doi: 10.1371/journal.pone.0255446
- Dumville, J. C., Worthy, G., Bland, J. M., Cullum, N., Dowson, C., Iglesias, C., Torgerson, D. J. 2009. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): Randomised controlled trial. *BMJ (Online)*, 338(7702), 1047–1049. doi: 10.1136/bmj.b773
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. 2005. Seminar The metabolic syndrome. In *www.thelancet.com* (Vol. 365). Retrieved from [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
- Edwards, J. L., Vincent, A. M., Cheng, H. T., & Feldman, E. L. 2008. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 120, pp. 1–34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005
- Eiselein, L., Schwartz, H. J., & Rutledge, J. C. 2004. *The Challenge of Type 1 Diabetes Mellitus*. Retrieved from <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/45/3/231/703403>

- El Sheikha, A. F. 2019. Molecular Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods: The Case for Using PCR-DGGE. *Food Biotechnology*, Vol. 33, pp. 54–108. Taylor and Francis Inc. doi: 10.1080/08905436.2018.1547644
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297–314. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.006
- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M., & Ravel, J. 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Retrieved from <http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/6>
- Fan, Y., & Pedersen, O. 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 19, pp. 55–71. Nature Research. doi: 10.1038/s41579-020-0433-9
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. 2013. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, Vol. 36, pp. 305–312. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005
- Francino, M. P. 2016. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543
- Frykberg, 2022, Diab.foot.Ulcers.
- Galindo-González, L., Pinzón-Latorre, D., Bergen, E. A., Jensen, D. C., & Deyholos, M. K. (2015). Ion Torrent sequencing as a tool for mutation discovery in the flax (*Linum usitatissimum* L.) genome. *Plant Methods*, 11(1). doi: 10.1186/s13007-015-0062-x
- Gower, J. C. 2015. Principal Coordinates Analysis. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–7). Wiley. doi: 10.1002/9781118445112.stat05670.pub2
- Gross, J. L., De Azevedo, M. J., Silveiro, S. P., Lu'is, L., Canani, H., Caramori, M. L., & Zelmanovitz, T. 2005. *Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment*. Retrieved from <http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/28/1/164/646111/zdc00105000164.pdf>
- Grundy, S. M. 2016. Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, Vol. 26, pp. 364–373. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.tcm.2015.10.004
- Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., & Margolles, A. 2017. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum*, 5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016
- Home Study Program. (n.d.).
- Huang, Y., Shi, X., Li, Z., Shen, Y., Shi, X., Wang, L., ... Liang, Y. 2018. Possible association of firmicutes in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 3329–3337. doi: 10.2147/NDT.S188340
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008

- Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V., & Perez Perez, G. I. 2017. Gut Microbiome and Antibiotics. *Archives of Medical Research*, Vol. 48, pp. 727–734. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.11.004
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... Matthews, D. R. 2012. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A patient-centered approach. *Diabetes Care*, 35(6), 1364–1379. doi: 10.2337/dc12-0413
- Ismail, N. A., Ragab, S. H., ElBaky, A. A., Shoeib, A. R. S., Alhosary, Y., & Fekry, D. 2011. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Medical Science*, 7(3), 501–507. doi: 10.5114/aoms.2011.23418
- Jandhyala, S. M., Madhulika, A., Deepika, G., Rao, G. V., Reddy, D. N., Subramanyam, C., ... Talukdar, R. 2017. Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. *Scientific Reports*, 7(1), 43640. doi: 10.1038/srep43640
- Jay, Z. J., & Inskeep, W. P. 2015. The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales. *Biology Direct*, 10(1). doi: 10.1186/s13062-015-0065-6
- John, G. K., & Mullin, G. E. 2016. The Gut Microbiome and Obesity. *Current Oncology Reports*, Vol. 18. Current Medicine Group LLC 1. doi: 10.1007/s11912-016-0528-7
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. 2022. *International Journal of Biomedical Research POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION*. Retrieved from www.ssjournals.com
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., ... Lernmark, A. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. doi: 10.1038/nrdp.2017.16
- Kraut, J. A., & Madias, N. E. 2014. Lactic Acidosis. *New England Journal of Medicine*, 371(24), 2309–2319. doi: 10.1056/NEJMra1309483
- Kumar Tripathi, B., & Srivastava, A. K. 2005. *Diabetes mellitus: Complications and therapeutics* RA130. Retrieved from <http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?IDMAN=4187>
- Langdon, A., Crook, N., & Dantas, G. 2016. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Medicine*, Vol. 8. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s13073-016-0294-z
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 20, pp. 257–269. Nature Research. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). doi: 10.3791/3923



- Lim, J. Z. M., Ng, N. S. L., & Thomas, C. 2017. Prevention and treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of the Royal Society of Medicine*, Vol. 110, pp. 104–109. SAGE Publications Ltd. doi: 10.1177/0141076816688346
- Liu X., Mao B., Gu J., Wu J., Cui S., Wang G., Zhao J., Zhang H. & Chen W. 2021. *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties?, *Gut Microbes*, 13:1, DOI: [10.1080/19490976.2021.1875796](https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796)
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. 2020. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, 12(5), 1474. doi: 10.3390/nu12051474
- Malecki, M. T. 2005. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 68(SUPPL. 1). doi: 10.1016/j.diabres.2005.03.003
- Mardis, E. R. 2017. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, Vol. 12, pp. 213–218. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nprot.2016.182
- Martinez, J. E., Kahana, D. D., Ghuman, S., Wilson, H. P., Wilson, J., Kim, S. C. J., ... Friedman, T. C. 2021. Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Frontiers in Endocrinology*, 12. doi: 10.3389/fendo.2021.667066
- McClellan, K. M., Kee, F., Young, I. S., & Elborn, J. S. 2008. Obesity and the lung: 1 · Epidemiology. *Thorax*, Vol. 63, pp. 649–654. doi: 10.1136/thx.2007.086801
- Methiwala, H. N., Vaidya, B., Addanki, V. K., Bishnoi, M., Sharma, S. S., & Kondepudi, K. K. 2021. Gut microbiota in mental health and depression: role of pre/pro/synbiotics in their modulation. *Food & Function*, 12(10), 4284–4314. doi: 10.1039/D0FO02855J
- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993
- Nguyen, L. M., Nguyen, N. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, D. T. C., & Tran, T. Van. 2022. Occurrence, toxicity and adsorptive removal of the chloramphenicol antibiotic in water: a review. *Environmental Chemistry Letters*, Vol. 20, pp. 1929–1963. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. doi: 10.1007/s10311-022-01416-x
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. 2013. *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends*.
- Park, S. T., & Kim, J. 2016. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neurology Journal*, 20(Suppl 2), S76–83. doi: 10.5213/inj.1632742.371
- Pendsey, S. 2010. Understanding diabetic foot. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 30(2), 75. doi: 10.4103/0973-3930.62596

- Phillips, C. M. 2013. Metabolically healthy obesity: Definitions, determinants and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(3), 219–227. doi: 10.1007/s11154-013-9252-x
- Pinhas-Hamiel, O., & Zeitler, P. 2007. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. In *www.thelancet.com* (Vol. 369). Retrieved from [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
- Pociot, F., & McDermott, M. F. 2002. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity*, Vol. 3, pp. 235–249. doi: 10.1038/sj.gene.6363875  
Retrieved from [www.internimedicina.cz](http://www.internimedicina.cz)
- Pupp, G. R., & Wilusz, P. M. 2004. External Fixation: Is It The Answer For Diabetic Limb Salvage? *Podiatry Today*.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). doi: 10.3390/microorganisms7010014
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. 2017. Proteobacteria: A common factor in human diseases. *BioMed Research International*, Vol. 2017. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/9351507
- Sanz, J. L., & Köchling, T. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, 42(2), 119–133. doi: 10.1016/j.procbio.2006.10.003
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190–195. doi: 10.1038/oby.2009.167
- Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69–75. doi: 10.1097/MOG.0000000000000139
- Silva, N., Igrejas, G., Gonçalves, A., Poeta P. 2012. Commensal gut bacteria: distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. *Ann Microbiol* 62, 449–459 .  
<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0308-4>
- Simpson, H. L., & Campbell, B. J. 2015. Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(2), 158–179. doi: 10.1111/apt.13248
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., ... Liao, W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, Vol. 15. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1). doi: 10.1002/cpmb.59
- Song, K., & Chambers, A. (n.d.). *Diabetic Foot Care*.

- Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A., ... Lois, N. 2016. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, Vol. 51, pp. 156–186. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.08.001
- Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. 2020. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, Vol. 8, pp. 1–16. MDPI AG. doi: 10.3390/microorganisms8111715
- Sun, F., Zhang, Q., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. 2019. A potential species of next-generation probiotics? The dark and light sides of *Bacteroides fragilis* in health. *Food Research International*, Vol. 126. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108590
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2009. doi: 10.1155/2009/574398
- Thanabalasingham, G., & Owen, K. R. 2011. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *BMJ (Online)*, Vol. 343. doi: 10.1136/bmj.d6044
- Thomas, F., Hehemann, J. H., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY). doi: 10.3389/fmicb.2011.00093
- Totomoch-Serra, A., Marquez, M. F., & Cervantes-Barragán, D. E. 2017. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research*, 6. doi: 10.12688/f1000research.11610.1
- Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. 2009. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 142–154. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022
- Van Tilburg, J., Van Haeften, T. W., Pearson, P., & Wijmenga, C. 2001. *Review articles Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus*. Retrieved from www.jmedgenet.com
- Vijay, A., & Valdes, A. M. 2022. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 489–501. doi: 10.1038/s41430-021-00991-6
- Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., & Charette, S. J. 2017. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 138, pp. 60–71. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.016
- Vuerstaek, J. D. D., Vainas, T., Wuite, J., Nelemans, P., Neumann, M. H. A., & Veraart, J. C. J. M. 2006. State-of-the-art treatment of chronic leg ulcers: A randomized controlled trial comparing vacuum-assisted closure (V.A.C.) with modern wound dressings. *Journal of Vascular Surgery*, 44(5), 1029–1037. doi: 10.1016/j.jvs.2006.07.030
- Wexler, H. M. 2007. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 20, pp. 593–621. doi: 10.1128/CMR.00008-07

- Xiong, W., Li, Z., Liu, H., Xue, C., Zhang, R., Wu, H., ... Shen, Q. 2015. The Effect of Long-Term Continuous Cropping of Black Pepper on Soil Bacterial Communities as Determined by 454 Pyrosequencing. *PLOS ONE*, *10*(8), e0136946. doi: 10.1371/journal.pone.0136946
- Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., ... Hirata, K. I. 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*, *138*(22), 2486–2498. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033714
- Younis, B. Bin, Shahid, A., Arshad, R., Khurshid, S., Ahmad, M., & Yousaf, H. 2018. Frequency of foot ulcers in people with type 2 diabetes, presenting to specialist diabetes clinic at a Tertiary Care Hospital, Lahore, Pakistan. *BMC Endocrine Disorders*, *18*(1), 53. doi: 10.1186/s12902-018-0282-y
- Zafar, H., & Saier, M. H. 2021. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*, *13*(1). doi: 10.1080/19490976.2020.1848158
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Jan Bonder, M., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., ... Fu, J. 2016. *Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity* Downloaded from (Vol. 2). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/>

## Seznam použitých obrázků

Obrázek 1 Klasifikace ulcerózních vředů .....	16
Obrázek 2 Schéma PCR .....	29
Obrázek 3 Optimalizace PCR .....	39
Obrázek 4 PCR amplifikace vzorků stolice .....	39
Obrázek 5 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky diabetických pacientů před, po 1 týdnu a po 10 týdnech léčby antibiotiky .....	40
Obrázek 6 PCoA pro vzorky diabetických pacientů před, po 1 týdnu a po 10 týdnech léčby antibiotiky .....	41
Obrázek 7 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro vzorky stolice diabetických pacientů před, během a po léčbě antibiotiky .....	41
Obrázek 8 PCoA představující vzorky stolice diabetických pacientů před, během a po léčbě antibiotiky .....	42
Obrázek 9 Boxploty alfa diverzity reprezentované Shannonovou entropií pro diabetické pacienty s různými třídami BMI .....	43
Obrázek 10 PcoA představující speciální oddělení mezi vzorky stolice diabetických pacientů s různými třídami BMI .....	43
Obrázek 11 Srovnání fekálních bakterií diabetických pacientů před, po 1 týdnu a po 10 týdnech antibiotické léčby. ....	45
Obrázek 12 Výsledky DGGE a vyřezání bandů .....	48
Obrázek 13 DGGE podle BMI .....	48
Obrázek 14 Výsledky PCR-DGGE 1-23 podle BMI .....	46
Obrázek 15 Výsledky PCR-DGGE 1-23 podle BMI .....	47
Obrázek 16 Ukázka z aligmentu sekvencí .....	49
Obrázek 17 Chromatogram pro záznam sekvenování DNA .....	49

## Seznam použitých tabulek

Tabulka 1: Charakteristika pacientů podle BMI.....	34
Tabulka 2: Trvání ATB léčby.....	34
Tabulka 3: Teplotní program PCR k optimalizaci.....	35
Tabulka 4: Seznam bakterií z vystřížených bandů.....	48

## Seznam použitých zkratk a symbolů

AMC – amoxicilin

ATB – antibiotika

BMI – body mass index

CTZ – ceftazidin

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonukleová kyselina

IBD – Inflammatory Bowel Diseases

IBS – Irritable Bowel Syndrome

IKEM – Institut Klinické a Experimentální Medicíny

NGS – Next generation sequencing

PCoA – Principal Coordinates Analysis

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

V.A.C. – vacuum assisted closure

# Samostatné přílohy

Tabulka – Přehled pacientů

stud. číslo pacienta	hmotnost (kg)	BMI		výška (m)	věk	pohlaví	ATB před pokusem (měsíce)	kolikrát ATB léčen	trvání DM (roky)	trvání ulcerace (měsíce)
1	104	29,42508	Nadváha	1,88	66	M		7 opakovane	46	8
2	96	28,35539	Nadváha	1,84	56	M		2,5 opakovane	9	3
3	120	31,23698	Obezita 1. stupně	1,96	59	M		1,75 opakovane	13	22
4	120	37,03704	Obezita 2. stupně	1,8	58	Ž		0	6	13
5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	108	31,21748	Obezita 1. stupně	1,86	66	M		1 opakovane	21	41
7	100	30,18959	Obezita 1. stupně	1,82	59	M		0,75 opakovane	17	1,5
8	116	33,89335	Obezita 1. stupně	1,85	61	M		4,5 opakovane	26	4
9	106	32,71605	Obezita 1. stupně	1,8	72	M		4,5 opakovane	26	4,5
10	82	25,30864	Nadváha	1,8	74	M		5 opakovane	22	14
11	86	27,76343	Nadváha	1,76	79	Ž		0,25 opakovane	31	9
12	123	37,1332	Obezita 2. stupně	1,82	58	M		9,25 opakovane	21	15
13	90	29,38776	Nadváha	1,75	58	M		0 opakovane	23	13
14	98	30,24691	Obezita 1. stupně	1,8	74	M		1,25 opakovane	29	33
15	90	28,72738	Nadváha	1,77	67	M		1 opakovane	34	23
16	63	19,44444	Normální	1,8	48	M		2 opakovane	21	3
17	110	35,51136	Obezita 2. stupně	1,76	74	M		0,5	3	10
18	110	36,33241	Obezita 2. stupně	1,74	61	M		2	2	7
19	92	28,39506	Nadváha	1,8	71	M		2	5	19
20	100	29,53686	Obezita 1. stupně	1,84	66	M		0,25 opakovane	15	16
21	140	35,71064	Obezita 2. stupně	1,98	62	M		1,25	1	7
22	129	34,99349	Obezita 1. stupně	1,92	63	M		1	8	24
23	110	34,71784	Obezita 1. stupně	1,78	69	M		0,25 opakovane	18	25
24	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
26	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x