

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv multivitaminové suplementace na složení a funkci  
střevní mikrobioty stanovené metodou  $^1\text{H}$  NMR**

**Diplomová práce**

**Bc. Riva Karo**

**Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

**© 2023 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vliv multivitaminové suplementace na složení a funkci střevní mikrobioty stanovené metodou  $^1\text{H}$  NMR“ 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za cenné rady a vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala MSc. Chandramě Roy Chowdhury za konzultace během zpracovávání a vyhodnocování dat a také Glasgow University za poskytnutí vzorků analyzovaných v rámci této práce.

# Vliv multivitaminové suplementace na složení a funkci střevní mikrobioty stanovené metodou $^1\text{H}$ NMR

## Souhrn

Užívání doplňků stravy, s cílem využít jejich preventivní účinky, je v populaci čím dál častějším jevem. Suplementace však neovlivňuje přímo pouze zdraví člověka, ale stejně jako přijímaná strava, může ovlivnit skladbu střevní mikrobioty a způsobit tak následnou změnu v profilu metabolomu, který dále ovlivňuje lidské zdraví. Cílem práce bylo zjistit, jakým způsobem příjem multivitaminových doplňků stravy, které se řadí mezi nejčastěji užívané suplementy, ovlivní skladbu a funkci mikrobioty.

V rámci studie The Effect of Micronutrient Supplementation on Gut Microbiome Composition and Function (Multigut) prováděné na Glasgow University, bylo získáno a dále zpracovááno 116 vzorků moči a 116 vzorků stolice od zdravých, dospělých účastníků, kteří se do studie zapojili. Vzorky byly analyzovány metodou spektroskopie  $^1\text{H}$  nukleární magnetické rezonance, pulzní sekvencí 1D NOESY. Spektra byla manuálně upravena a následně bylo identifikováno a kvantifikováno pomocí programu Chenomx 21 metabolitů ve vzorcích stolice a 8 metabolitů ve vzorcích moči. Statistické zpracování spočívalo ve srovnání relativní FC (Fold Change) mezi kontrolou a intervenční skupinou pro jednotlivé subjekty s pomocí neparametrického párového testu, při čemž bylo ignorováno, v jakém rameni se vzorek nachází. Výsledné FC byly také podrobeny PCA analýze.

PCA analýza neukázala výraznou separaci obou skupin u obou hlavních komponent PC1 (26,9 %) a PC2 (11,7 %). Určitý trend byl ale pozorován v komponentu PC5 (5,9 %). Byly 3 metabolity, které se statisticky průkazně lišily mezi skupinami: treonin ve stolici ( $p=0.0092162$ ), kyseliny hippurová v moči ( $p=0,024334$ ) a tyrosin v moči ( $p=0,04552$ ). Vliv na treonin by mohl souviset se změnou metabolických drah proteolýzy a přeměny aminokyselin u některých mikrobiálních taxonů.

Tyto znalosti mohou být po rozšíření a dalších studiích využity pro cílenou suplementaci doplňky stravy, nikoliv s vidinou přímého antioxidačního a protizánětlivého účinku, ale s cílem modulovat skladbu mikrobioty, jejíž metabolity dále ovlivní zdraví hostitele.

**Klíčová slova:** stolice, mikrobiota, metabolom, NMR, multivitaminy, suplementace

# The effect of multivitamin supplementation on gut microbiome composition and function determined by <sup>1</sup>H NMR

## Summary

The use of dietary supplements to utilize their preventive effects is becoming increasingly common in the population. However, supplementation not only directly affects human health, but like the diet, it can also affect the composition of the gut microbiota and cause subsequent changes in the metabolome profile, further affecting human health. The study aimed to determine how the intake of multivitamin dietary supplements, which are among the most commonly used supplements, affects the composition and function of the microbiota.

As part of the study, The Effect of Micronutrient Supplementation on Gut Microbiome Composition and Function (Multigut), conducted at the University of Glasgow, 116 urine and 116 stool samples were obtained and further processed from healthy adult participants who were enrolled in the study. The samples were analyzed using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy with a 1D NOESY pulse sequence. The spectra were manually adjusted, and 21 metabolites were identified and quantified using the Chenomx program in stool samples and 8 metabolites in urine samples. Statistical analysis involved comparing the relative fold change (FC) between the control and intervention groups for each subject using a non-parametric paired test, ignoring the location of the sample. The resulting FC was also subjected to PCA analysis.

PCA analysis did not show a significant separation of both groups in both main components, PC1 (26,9 %) and PC2 (11,7 %). However, a particular trend was observed in component PC5 (5,9 %). Three metabolites differed significantly between the groups: threonine in the stool ( $p = 0,0092162$ ), hippuric acid in the urine ( $p = 0,024334$ ), and tyrosine in the urine ( $p = 0,04552$ ). The effect on threonine could be related to changes in proteolysis and amino acid conversion pathways in specific microbial taxa.

This knowledge can be used for targeted supplementation with dietary supplements after expansion and further studies, not with the aim of direct antioxidant and anti-inflammatory effects but to modulate the composition of the microbiota, whose metabolites further affect the host's health.

**Keywords:** stool, microbiota, metabolome, NMR, multivitamins, supplementation

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3 Přehled literatury</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Mikrobiální osídlení</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Vývoj a skladba střevního mikrobiomu</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3 Faktory ovlivňující skladbu mikrobioty a její vliv na člověka</b> .....	<b>12</b>
3.3.1 Dysbióza a její následky .....	12
<b>3.4 Metabolity produkované mikrobiotou</b> .....	<b>14</b>
<b>3.5 Suplementace multivitaminovými a dalšími často užívanými doplňky stravy</b> <b>18</b>	
3.5.1 Dělení vitaminů, minerálních látek a jejich doporučený příjem.....	18
3.5.2 Význam a vliv suplementace vybraných výživových doplňků .....	19
3.5.2.1 Vitamin D .....	19
3.5.2.2 Vitamin C .....	21
3.5.2.3 Vitaminy skupiny B s výjimkou vitaminu B12 .....	22
3.5.2.4 Karotenoidy .....	23
<b>3.6 Vliv vitaminů na složení mikrobioty</b> .....	<b>25</b>
3.6.1 Vliv vitaminu D na střevní mikrobiom.....	26
3.6.2 Vliv dalších vybraných vitaminů na střevní mikrobiom .....	27
<b>3.7 NMR metabolomika stolice</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Metodika</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Celkový design</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 Demografie účastníků studie .....	31
4.1.2 Chemikálie, přístroje a software .....	32
4.1.3 Příprava vzorků pro NMR analýzu.....	32
4.1.4 NMR měření a analýza dat .....	33
4.1.5 Statistické zpracování dat .....	33
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>34</b>
<b>6 Diskuze</b> .....	<b>39</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>41</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>42</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>51</b>
<b>10 Seznam tabulek a obrázků</b> .....	<b>52</b>

# 1 Úvod

Doplňky stravy jsou populací čím dál více užívány primárně s vidinou jejich preventivních účinků a zdravotních benefitů, které jsou však mnohdy diskutabilní. Multivitaminové suplementy se řadí mezi jedny z nejprodávanějších suplementů vůbec a jsou populární pro jejich potenciální protektivní účinky vůči některým typům onemocnění, kterými jsou například kardiovaskulární onemocnění či rakovina. Jejich působení v této oblasti je však diskutabilní a snížení rizika vzniku těchto onemocnění se doposud neprokázalo. Suplementace těmito doplňky stravy však může ovlivnit skladbu našeho střevního mikrobiomu a dále tak skrze metabolity, které mikrobiom produkuje, ovlivnit zdraví hostitele. Tento komplexní ekosystém sídlící v našich střevech se vyvíjí spolu s hostitelem a během života dochází k mnoha změnám v jeho skladbě, v důsledku stárnutí, stravy a dalších přijímaných látek, prostředí, ve kterém žijeme či psychickém stavu hostitele.

NMR metabolomika je v posledních letech rozvíjenou a využívanou metodou k rozpoznávání vlivu stravy na spektrum malých molekul v prostředí trávicího traktu. Velmi často se využívá v rutinní analýze vzorků z klinických studií s cílem nalézt biomarkery onemocnění nebo vlivu stravy na prostředí střevního lumen a střevní mikrobiom. Je tedy vhodným nástrojem pro detekci metabolitů, které mikrobiota produkuje a nalezení souvislostí se změnami, ke kterým potenciálně došlo v důsledku suplementace multivitaminovými doplňky stravy.

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

Cílem práce je zjistit, zdali a jakým způsobem ovlivňuje multivitaminová suplementace složení a funkci mikrobioty, na základě porovnání profilů metabolitů ve stolici před užíváním a po skončení užívání multivitaminových suplementů, pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR).

Hypotéza: Bylo předpokládáno, že suplementace multivitaminy povede ke změně složení mikrobiomu střeva, a tedy i stolice.



## 3 Přehled literatury

### 3.1 Mikrobiální osídlení

Podle odhadů žije v každém lidském těle zhruba  $10^{14}$  mikrobů, z nichž většina obývá střeva, současný výzkum ale naznačuje, že je toto číslo nadsazené (Yong 2016).

Většina mikroorganismů nejsou patogeny a nejsou zodpovědné za vznik lidských onemocnění. Infekční onemocnění způsobuje v lidském organismu méně než 100 druhů bakterií (McFal-Ngai 2007). Mnoho bakterií však může disponovat oběma vlastnostmi a záleží na konkrétních okolnostech, zda budou plnit protektivní nebo patogenní funkci, v takovém případě se jedná o tzv. oportunní patogeny. Příkladem tohoto jevu je např. bakterie *Helicobacter pylori*, která může způsobit žaludeční vředy a rakovinu žaludku, na druhou stranu však zabraňuje vzniku rakoviny jícnu (Blaser 2010).

Mikrobiom označuje celkové mikrobiální osídlení lidského těla, ale jeho složení se liší v různých částech organismu. V oblasti střev převažuje pět hlavních bakteriálních kmenů: Firmicutes (zahrnující rody *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a producenty butyrátu *Eubacterium*, *Faecalibacterium* a *Roseburia*), Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria a Verrucomicrobia, a také skupina Archaea: Euryarchaeota, s výskytem převážně *Methanobrevibacter*, který se podílí na střevní metanogenezi. Méně běžné bakteriální skupiny zahrnují Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Spirochetes (Tremaroli & Bäckhed 2012). Na kůži jsou nejčastěji zastoupeny mikrobi z říše Propionobacteria, Corynebacteria a Staphylococca. V tlustém střevě se vyskytuje často rod *Bacteroides*, v pochvě *Lactobacillus* a ústech *Streptococcus* spp. Mikrobi se mohou lišit až do té míry, že složení mikrobiomu na začátku tenkého střeva se výrazně odlišuje od složení v konečníku. Lidská pravá ruka sdílí s levou pouze šestinu jejích mikrobiálních druhů (Fierer et al. 2008).

## 3.2 Vývoj a skladba střevního mikrobiomu

V prenatálním stadiu je plod téměř sterilní (Perez-Muñoz et al. 2017). Během porodu začínají lidské tělo kolonizovat první mikroorganismy. V případě přirozeného porodu se jedinec setká jako první s mikrobi z porodních cest a vagíny matky – téměř tři čtvrtiny kmenů novorozence pochází právě od matky (Yong 2016), zatímco děti narozené císařským řezem mají výrazně odlišnou mikrobiální skladbu od svých matek ve srovnání s těmi, které se narodily přirozenou cestou. Bylo zjištěno, že střevní mikrobiom kojenců narozených císařským řezem obsahuje větší množství genů pro antibiotickou rezistenci, ve srovnání s vaginálně porozenými kojenci. Skladbu mikrobioty dále ovlivňuje také výživa těchto dětí, kdy se jako klíčový faktor k dosažení skladby mikrobioty dospělého jedince jeví, spíše než zavedení příjmu pevné stravy, ukončení stravování mateřským mlékem (Bäckhed et al. 2015). Po ukončení kojení klesá počet bakterií rodu *Bifidobacterium* a zvyšuje se počet bakterií rodu *Bacteroides*, které metabolizují sacharidy, což je spojeno s přechodem na pevnou stravu (Yong 2016). U kojenců nebyl pozorován výskyt bakterií *Desulfovibrio* spp. a *Methanobrevibacter smithii*, naopak tyto dva taxony byly hojně zastoupené u matek, což je způsobeno vyšší fermentační kapacitou střevního mikrobiomu dospělých jedinců, který tímto způsobem metabolizuje vodík na methan či vedlejší produkty. U novorozenců byly pozorovány vyšší hladiny genů pro syntézu vitamínu K<sub>2</sub>, což korelovalo s vysokým výskytem druhů *Bacteroides* a *Escherichia* a *Shigella* spp., známých producentů tohoto vitamínu (Bäckhed et al. 2015). Složení mikrobioty se dramaticky vyvíjí a dospívá do stadia skladby mikrobioty dospělého jedince zhruba ve třech letech života (Yatsunenko et al. 2012).

Studie naznačují, že většina bakteriálních kmenů, které obývají tlusté střevo, zůstává stabilní po desetiletí, i když jejich počty mohou kolísat (Faith et al. 2013). Některé vědecké týmy došly k poznání, že mikrobiom je neuvěřitelně dynamický v rámci kratších časových intervalů (Caporaso et al. 2011, David et al. 2013, Thaïss et al. 2014). Jeho skladbu výrazně ovlivňuje také přijímaná strava, která jej může ovlivnit mnoha směry. Bylo prokázáno, že příjem nasycených mastných kyselin využívají jako substrát pro růst prozánětliví mikrobi a dochází tak k potlačení mikrobů protizánětlivých (Devkota et al. 2012). Tento účinek vykazují také přídatné látky jako je např. karboxymethylcelulóza a polysorbát-80, které se využívají k prodloužení skladovatelnosti potravin (Chassaing et al. 2015). Naopak pozitivní vliv na formování mikrobioty má konzumace vlákniny, která slouží jako potrava pro bakterie produkující SCFA, jež mají protizánětlivý vliv. Pokud není konzumováno dostatečné množství vlákniny, existuje vyšší riziko vzniku zánětlivých onemocnění, neboť bakterie nemají dostatečné množství potravy, konzumují mucin, v důsledku čehož může dojít ke ztenčení či poškození ochranné vrstvy střevní stěny a bakterie se tak mohou dostat ke střevní stěně blíže a spustit reakci imunitních buněk (Furusawa et al. 2013).

Ke změnám ve složení střevní mikrobioty dochází také v průběhu stárnutí. Stárnutí je spojeno s mnoha fyziologickými změnami gastrointestinálního traktu, a také se změnami ve stravovacích zvyklostech. Střevní mikrobiota starších jedinců se vyznačuje sníženou bakteriální diverzitou, přesuny dominantních druhů, poklesem prospěšných mikroorganismů, nárůstem fakultativně anaerobních bakterií a snížením dostupnosti mastných kyselin s krátkým řetězcem – SCFA (Salazar et al. 2017). Byly pozorovány nižší hladiny bakterií druhu Firmicutes, především klast *Clostridium* a *Faecalibacterium prausnitzii* (Cresci & Bawden 2015). Dále pak

Actinobacteria (především bifidobakterie), zvýšený výskyt byl také pozorován u kmene Proteobacteria. Na základě rozdílů ve skladbě mikrobioty lze očekávat také rozdíly v produkci metabolitů. Hladina SCFA, hlavních metabolitů produkovaných bakteriemi v tlustém střevě, je u starších osob nižší, různí se také poměry jednotlivých SCFA mezi staršími a mladšími osobami. Změna složení střevní mikrobioty však nutně nemusí znamenat negativní účinek na lidské zdraví, v literatuře je stále nedostatek studií, které popisují skladbu mikrobioty starších jedinců, je zapotřebí dalších výzkumů, aby bylo možné tyto mikrobiální změny dávat do spojitosti s vyšší náchylností starších jedinců (Salazar et al. 2017).

### 3.3 Faktory ovlivňující skladbu mikrobioty a její vliv na člověka

Uvnitř tlustého střeva žijí biliony bakterií, od jejichž úniku ze střev do cév a pak dále do našeho těla je dělí pouze jediná vrstva tkáně pokryté mucinem. Mikrobi mají na zdraví jednotlivce značný vliv (Yong 2016). Změny střevního mikrobiomu jsou pozorovány u řady nemocí, kterými jsou například astma, autismus, obezita, diabetes či karcinom tlustého střeva. I přes to, že se na první pohled zdají lidé žijící ve vyspělých zemích zdravější a výrazně méně často zasaženi infekčními onemocněními, jsou u nich ale na výrazném vzestupu autoimunitní onemocnění (Gomaa 2020). Jedním z faktorů, které jsou za to zodpovědné je i nedostatečně pestrá skladba mikrobioty a mikroorganismů, se kterými přicházíme do kontaktu.

Větší část obyvatel vyspělých zemí se přesunula z vesnic do měst, počet členů domácností klesá, a velký význam hraje také přítomnost domácích mazlíčků. Domácnosti, ve kterých se vyskytuje pes či kočka, jsou mikrobiálně rozmanitější. Zvíře vnáší mikroby zvenku do vnitřních prostor a rozšiřují tak druhové zastoupení mikrobů, kteří nás mohou následně osídlit (Fujimura et al. 2014). V domácnostech, kde žijí domácí mazlíčci byl u kojenců pozorován vyšší výskyt *Bifidobacterium pseudolongum*, bakterií čeledi Peptostreptococcaceae, *Oscillospira* a rodu *Ruminococcus*. Naopak byl pozorován nižší výskyt kmene Firmicutes (Kim et al. 2019).

Složení a pestrost mikrobiomu jsou zřejmě také korelovány s nadváhou a obezitou. Lidé s obezitou mají vyšší zastoupení kmene Firmicutes a nižší výskyt zástupců kmene Bacteroidetes, než štíhlí jedinci (Zhao 2013). Bylo zjištěno, že mikrobi mohou řídit ukládání tuku či vytváření nových cév (Yong 2016). Dokonce by mohli v některých případech ovlivňovat i lidské chování skrze vliv na mozkovou aktivitu. U žen, které dvakrát denně konzumovaly jogurt bohatý na mikroby, byla pozorována nižší aktivita v částech mozku zapojených do zpracování emocí v porovnání se ženami, které konzumovaly mléčné výrobky bez mikrobů (Tillisch et al. 2013). Tento a podobné výzkumy se však často potýkají s metodologickými problémy a je potřeba tyto účinky nadále zkoumat, přesto se ale jedná o zajímavý směr výzkumu, zasluhující hlubší poznání. V minulosti již bylo v menších klinických studiích pozorováno utlumení projevů deprese u pacientů trpících syndromem dráždivého tračníku pomocí podávání probiotik (psychobiotik, tedy probiotik příznivě ovlivňujících psychický stav) – konkrétně bakterií druhu *Bifidobacterium* (Sarkar et al. 2016).

#### 3.3.1 Dysbióza a její následky

V případě onemocnění, za které není odpovědná jedna patogenní bakterie či vir, se může jednat o onemocnění způsobené nerovnováhou, která nastala ve skladbě mikrobioty, tedy dysbiózou (Yong 2016). Jedná se o stav, kdy mikrobi již nežijí ve vzájemné harmonii (Iebba et al. 2016). Je doprovázena rozpadem komunikace mezi jednotlivými druhy, hostitelem a symbiontem (Yong 2016). Fungující mikrobiom funguje jako bariéra před invazními patogenními organismy, pokud je narušen a některé druhy vymizí, může dojít k nadměrnému výskytu druhů, které mohou být ve vyšším počtu patogenní. K narušení rovnováhy může dojít z mnoha důvodů, například užívání antibiotik či nevhodnými stravovacími návyky (Lemon et al. 2012). Příkladem je bakterie *Clostridium difficile*, která způsobuje těžká průjemová onemocnění (Antharam et al. 2013). U pacientů trpících zánětlivým střevním onemocněním převažují fakultativně anaerobní bakteriální druhy, jako je *Escherichia coli* (Rolhion &

Darfeuille-Michaud 2007). Nárůst výskytu *E. coli* byl také pozorován u jiných patologických stavů, jakými jsou např. celiakie (Girbovan et al. 2017), či cystická fibróza (Hoffman et al. 2014). Současně s tímto jevem dochází k poklesu užitečných druhů bakterií. Často se výrazně snižuje výskyt aerobního *Faecalibacterium prausnitzii*, bakterie, která produkuje butyrát a je považována za protizánětlivou. Nižší frekvence výskytu *F. prausnitzii* je pozorována nejen u pacientů s IBD, ale také u pacientů s kolorektálním karcinomem, cystickou fibrózou či starších nebo obézních pacientů. Pro celkový zdravotní stav je však důležité zohlednit celkové složení mikrobioty, nikoliv se zaměřovat pouze na výskyt konkrétního druhu. To je zjevné z úspěšných fekálních transplantací, které byly provedeny s cílem obnovit mikrobiotu pacientů s průjmovými onemocněními způsobenými bakterií *C. difficile* (Iebba et al. 2016).

U pacientů trpících IBD byl pozorován pokles výskytu bakterií rodu Firmicutes a zejména druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, jehož nedostatek je spojován se sníženou ochranou střevní sliznice (Sokol et al. 2009).

Je zřejmé, že dysbióza střevního mikrobiomu má značný vliv také na patogenezi astmatu, kterým trpí celosvětově 300 milionů dětí a dospělých. Rozvoj astmatu je ovlivněn environmentálními a dalšími exogenními faktory (Barcik et al. 2020). Dysbióza a snížená mikrobiální diverzita disregulují obousměrnou komunikaci napříč osou střevo–plíce, což může vést k přecitlivělosti na respirační a potravinové alergen (Hufnagl et al. 2020).

Dysbióza je také spojována s výskytem alergií. V americké populaci byla nalezena spojitost se změněným výskytem 7–9 kmenů u pacientů s alergií. Dospělí Američané s diagnostikovanými alergiemi, zejména na ořechy a sezónní pyl, mají nízkou diverzitu střevního mikrobiomu, který vykazuje pokles množství bakterií řádu *Clostridiales* a zvýšené množství bakterií řádu *Bacteroidales*. Tyto poznatky mohou být využity k léčbě a prevenci alergií (Hua et al. 2016). Pro ověření výskytu dysbiózy je však nezbytné mít k dispozici fekální vzorky pacienta odebrané před výskytem onemocnění, což je velmi nákladné. Příležitostí pro získání fekálního vzorku může být odběr během čištění střeva při přípravě na kolonoskopické vyšetření. Během tohoto procesu je snadné zajistit odběr fekálního vzorku před, během a po intervenci. V této oblasti je však třeba provést další výzkumy, aby bylo možné porozumět skladbě mikrobiomu a jeho odchylkám (Brüssow 2020).

### 3.4 Metabolity produkované mikrobiotou

Bakterie v tlustém střevě se pro přežití spoléhají na substráty, které jsou nestrávené v horní části trávicího traktu. Sacharolytická bakteriální fermentace produkuje obecně prospěšné metabolity, zatímco v případě omezeného množství sacharidů se bakterie živí alternativními zdroji energie, což vede k produkci odlišných metabolitů, které mohou být pro lidské zdraví škodlivé. Klíčovými bakteriálními fermentačními produkty po fermentaci sacharidů ze stravy jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a plyny (Rowland et al. 2018). Metabolity produkované mikroorganismy fungují jako signální molekuly, které ovlivňují metabolismus hostitele. Tyto metabolity mohou přímo ovlivnit funkci nejen střev, ale také játra, mozek, svalovou a tukovou tkáň, což může mít za následek rozvoj obezity a přidružených komorbidit (Gomes et al. 2018). Mikrobiální enzymy mohou přímo ovlivnit fermentaci sacharidů a metabolismus žlučových kyselin, či se účastnit ve spojení s hostitelem metabolismu cholinu. Druhy jako je např. *B. thetaiotaomicron* a *Bacteroides ovatus* obsahují více než dvojnásobné množství genů pro glukosidázu a lyázu než lidský genom a jsou schopny využívat téměř všechny hlavní rostlinné glykany, ze kterých produkují SCFA (Tremaroli & Bäckhed 2012). Mezi hlavní metabolity produkované mikrobiotou řadíme butyrát, propionát, acetát, fumarát, sukcinát a laktát vznikající jako produkty fermentace sacharidů. Produkty proteinové fermentace jsou kratší peptidy, aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan atd.) a plyny jako např. amoniak, vodík, oxid uhličitý a sulfan. Bakterie však syntetizují i některé vitamíny.

Ze SCFA produkovaných mikrobiální fermentací je zvláště důležitý butyrát, který funguje jako energetický substrát pro buněčný metabolismus v epitelu tlustého střeva (Louis & Flint 2017). SCFA také ovlivňují proliferaci, diferenciaci a modulaci genové exprese v savčích epiteliálních buňkách tlustého střeva. Tyto účinky byly připisovány butyrátu působícímu jako silný inhibitor histondeacetylázy (Tremaroli & Bäckhed 2012). Hlavními producenty butyrátu jsou bakterie kmene Firmicutes (Lin & Zhang 2017). SCFA mohou také regulovat genovou expresi vazbou na receptory spojené s G-proteinem (GPCR, také známým jako FFAR3) a FFAR2. Signalizace prostřednictvím těchto receptorů ovlivňuje několik různých funkcí v závislosti na buněčném typu. SCFA např. potlačují zánět prostřednictvím signalizace GPR43 v imunitních buňkách, jako jsou neutrofilové a moduluje sekreci hormonu GLP-1, který zlepšuje sekreci inzulínu a má antidiabetické účinky, pomocí enterendokrinních L-buněk v tenkém a tlustém střevě (Tremaroli & Bäckhed 2012). Mikrobiální fermentace polysacharidů může ovlivnit adipozitu hostitele prostřednictvím několika komplementárních mechanismů, takže modulace mikrobioty a její fermentační kapacita může poskytnout nové možnosti řízení obezity (Kimura et al. 2014).

Další významnou mastnou kyselinou s krátkým řetězcem, kterou produkuje střevní mikrobiota je propionát, který je také zdrojem energie pro epiteliální buňky, podobně jako butyrát, navíc je však přenášen do jater, kde hraje roli v glukoneogenezi. Předpokládá se, že je také důležitou molekulou v signalizaci sytosti, díky interakci se střevními receptory (Hosseini et al. 2011). Přeměna propionátu na glukózu ve střevní glukoneogenezi přímo podporuje energetickou homeostázu snížením produkce glukózy v játrech a následně snižuje adipozitu (Rowland et al. 2018). Velké množství propionátu produkují zejména bakterie kmene Bacteroidetes (Lin & Zhang 2017). Třetí SCFA nejhojněji detekovanou ve stolici je acetát, vyskytující se k předchozím dvěma v poměru 3:1:1, a který je nezbytným metabolitem pro růst

některých bakterií. V lidském těle je acetát transportován do periferních tkání a využíván při metabolismu cholesterolu a lipogenezi a na studiích na myších bylo zjištěno, že hraje významnou roli v centrální regulaci chuti k jídlu (Rowland et al. 2018).

Bakterie produkují meziproducty fermentace včetně fumarátu, sukcinátu a laktátu, ale ty jsou běžně detekovány ve stolici zdravých jedinců v nízkých hladinách z důvodu dalšího využití jinými bakteriemi (Louis & Flint 2017). Například laktát je typicky dále přeměňován na propionát či butyrát a je tedy přítomen ve stolici pouze v zanedbatelné míře. U pacientů s ulcerózní kolitidou může být laktát detekován ve výrazně vyšším množství a mohl by být potenciálně indikátorem onemocnění (Rowland et al. 2018).

Střevní mikrobiota také přeměňuje bílkoviny přijaté ze stravy, endogenní bílkoviny z hostitelských enzymů, mucinu a odloučených střevních buněk na kratší peptidy, aminokyseliny a plyny včetně amoniaku, vodíku, oxidu uhličitého a sulfanu (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) jsou fermentovány na metabolity fenyloctovými kyselinami, fenyloctovou kyselinu a kyselinu 4-hydroxyfenyloctovou, které jsou hojně zastoupeny ve stolici. Bylo zjištěno, že bakteriální přeměna volných aminokyselin na polypeptidy významně přispívá k metabolismu aminokyselin a jejich biologické dostupnosti ve střevě savců (Rowland et al. 2018).

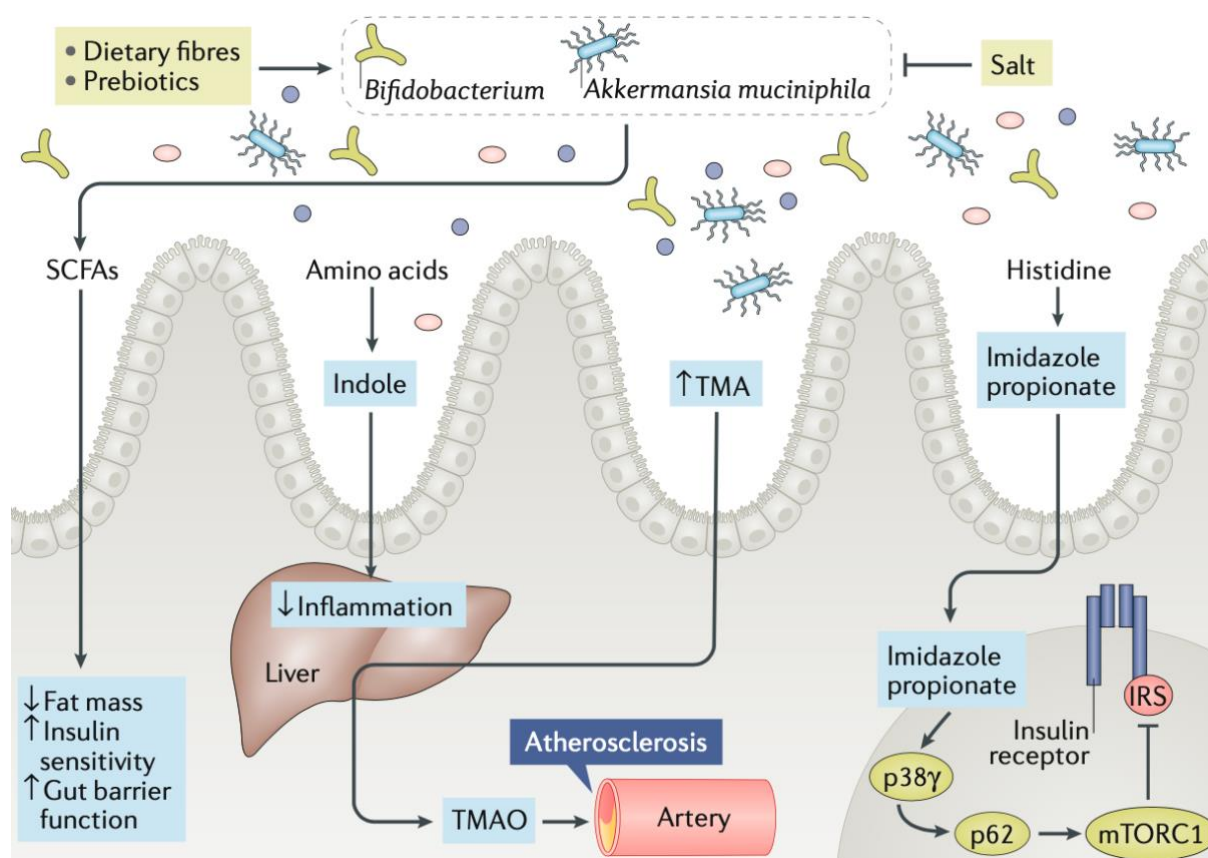
Enzymatická aktivita probíhající mezi hostitelem a mikrobiotou je také součástí přeměny cholinu na toxické methylyaminy (Tremaroli & Bäckhed 2012). Cholin je důležitou součástí buněčných membrán a většina cholinu je získávána z potravy, především z červeného masa a vajec. Může však být syntetizován i hostitelem. Je důležitý pro metabolismus lipidů a syntézu lipoproteinu s velmi nízkou denzitou v játrech a jeho nedostatek ve stravě je spojován se změnou mikrobioty a steatózou jater. (Zeisel & Da Costa 2009). Střevní mikrobiota produkuje například trimethylamin, který může být dále metabolizován na trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) v játrech. Tato transformace může snížit hladiny biologicky dostupného cholinu a předpokládá se, že může být příčinou steatózy jater u myši (Tremaroli & Bäckhed 2012). Zvýšená koncentrace TMAO a jeho prekurzorů byla spojena také se zvýšeným výskytem velkých kardiovaskulárních příhod (Heianza et al. 2017). Změna skladby střevního mikrobiomu a jeho schopnost metabolizovat cholin může mít důležitou roli při modulaci NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) a také v homeostázi glukózy (Tremaroli & Bäckhed 2012).

Střevní mikrobiota dokáže syntetizovat také některé vitaminy, zejména vitamin K, vitaminy skupiny B zahrnující biotin, kobalamin, foláty, kyselinu nikotinovou, panthotenu, pyridoxin, riboflavin a thiamin (LeBlanc et al. 2013). Potřebné dráhy pro tvorbu biotinu a riboflavinu mají prakticky všechny mikroby z kmene Bacteroidetes, Fusobacteria a Proteobacteria. Při čemž nejvýznamnějšími producenty jsou bakterie kmene Bacteroidetes. Mnohem méně vybavené pro tvorbu těchto vitamínů jsou bakterie z kmene Firmicutes a Actinobacteria. Odhaduje se, že střevní mikrobiom vytváří více než čtvrtinu potřebného příjmu pyridoxinu, folátu, niacinu a kobalaminu (Rowland et al. 2018).

Jedním z příkladů vlivu mikrobioty na imunitní zrání na úrovni tkání je mikrobiální metabolismus tryptofanu. Bylo prokázáno, že komenzální laktobacily využívají tryptofan jako zdroj energie k produkci ligandů receptoru pro aryl uhlovodíků (AhR), jako je metabolit indol-3aldehyd (Agus et al. 2018). AhR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, kriticky důležitý pro organogenezi střevních lymfoidních folikulů (ILF). AhR je také nezbytný pro udržení

epiteliární bariéry a homeostázy intraepiteliálních lymfocytů (IEL). Přenos funkčních IEL na AhR-deficientní myši vedl ke zlepšení stavu onemocnění a lepšímu zotavení (Levy et al. 2016).

Dalším významným metabolitem, který ovlivňuje imunitní systém je kyselina retinová – lipidový metabolit vitamínu A. Bylo prokázáno, že kyselina retinová reguluje rovnováhu mezi protizánětlivými a prozánětlivými imunitními odpověďmi (Hall et al. 2011). Nedostatek této kyseliny ovlivňuje jak složení mikrobioty, tak funkci imunitního systému. Myši s deficitem této kyseliny mají snížený počet segmentovaných vláknitých bakterií (SFB), což by mohlo přispívat ke sníženému počtu pomocných buněk TH17 u myši s deficitem vitamínu A. V ustáleném stavu má kyselina retinová důležitou roli při udržování imunitní homeostázy ve střevě. V nepřítomnosti vitamínu A jsou počty ILC3 významně nižší, zatímco ILC2 buňky a jejich imunitní program jsou dominantnější (Levy et al. 2016).



Obrázek 1 Mechanismus spojující molekuly produkované mikrobiotou s metabolismem (Cani 2019)

Na Obrázku 1 můžeme pozorovat mechanismus spojující chemické látky produkované mikrobiotou s lidským metabolismem. Je známo, že rod *Bifidobacterium* a *Akkermansia* produkují specifické SCFA, které jsou spojovány s nižším zastoupením tukové hmoty, zvýšenou citlivostí na inzulín a zlepšují funkci střevní bariéry.

Acetát, butyrát a propionát působí velmi příznivě na lidské zdraví, zatímco jiné mikrobiální metabolity mohou ovlivňovat lidské zdraví negativně. Jedná se například o sekundární žlučové kyseliny podporující karcinogenezi (Wang et al. 2019). Mezi škodlivé metabolity patří také některé produkty proteinové fermentace (Windey et al. 2012). Vysoký příjem bílkovin má za následek zvýšení fermentace bílkovin pocházejících ze stravy v tlustém



střevě, což lze odvodit z nárůstu metabolitů odvozených od aminokyselin, kterými jsou například mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem a fenylactová kyselina (Russell et al. 2011). Podskupina bakterií včetně několika *Bacteroides* spp. a některé bakterie kmene Firmicutes fermentují aromatické aminokyseliny za účelem produkce potenciálně bioaktivních produktů, včetně fenylactové kyseliny, fenolů, indolů, a *p*-kresolu (Kimura et al. 2014). Některé dusíkaté sloučeniny, zejména *N*-nitroso sloučeniny (NOC) zvyšují riziko vzniku rakoviny. Vykazují karcinogenní účinky prostřednictvím akrylace DNA, která může způsobit vznik mutací (Mirvish 1995). Do souvislosti se vznikem rakoviny se také dávají polyaminy, jejichž přítomnost může signalizovat právě její výskyt (Mendez et al. 2020). Hlavní polyaminy, kterými jsou putrescin, spermidin a spermin jsou produkovány z argininu v hostitelských tkáních, jejich syntéze však dochází také střevními bakteriemi (např. *Bacteroides fragilis*). Vysoké hladiny polyaminů jsou toxické a za hlavní mechanismus toxicity se považuje oxidativní stres který je výsledkem katabolismu polyaminů. Některé druhy patogenních bakterií jako např. *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* a *Helicobacter pylori* využívají polyaminy ke zvýšení své virulence (Louis et al. 2014)

### **3.5 Suplementace multivitaminovými a dalšími často užívanými doplňky stravy**

Doplňky stravy jsou hojně využívány a mohou mít potenciál zlepšit celkový zdravotní stav jedinců, pokud je jejich užívání vhodně cíleno. S nedostatkem mikroživin se potýká globálně mnoho jedinců, a i přes to, že je řešením tohoto problému primárně zlepšení stravovacích návyků, doplňky stravy či fortifikace potravin by mohly v určitých případech, zejména v rozvojových zemích, mít příznivý vliv. Příkladem může být suplementace vitamínem A a železem v rozvojových zemích, kde často trpí jeho nedostatkem ženy v reprodukčním věku, kojenci a děti. Nebo například kyselina listová v těhotenství, vitamin D u kojenců a dětí, vápník a vitamin D u dospělých ve starším věku, zejména 65 let a více. U zdravých jedinců je příznivý vliv diskutabilní a je zapotřebí dalších výzkumů. Bylo však zjištěno, že každodenní suplementace nízkými dávkami multivitaminu je spojována se snížením výskytu rakoviny a vzniku šedého zákalu, zejména u mužů. Zásadní vliv má však především strava, která má vliv i na výsledky suplementace (Rautiainen et al. 2016).

Ve Spojených státech amerických (USA) jsou doplňky stravy průmyslem s přibližně 30 miliardami dolarů a na trhu je dostupných více než 90 000 produktů. V národních průzkumech potvrdilo 52 % dospělých Američanů užívání alespoň jednoho suplementu a 10 % jedinců uvedlo, že užívají nejméně 4 takové produkty. Mezi nejoblíbenější suplementy se řadí vitaminy, které užívá 48 % dospělých obyvatel USA a minerální látky, které užívá 39 % dospělých, typicky s cílem udržení zdraví a jako prevenci nemocí (Medical Association 2018). Jedinci, kteří užívají doplňky stravy včetně multivitaminových a multiminerálových (MVMM) doplňků, obecně uvádí zdravější stravu a s tím spojený vyšší příjem živin ze stravy. Mezi dospělými s anamnézou rakoviny prsu či prostaty je míra užívání těchto doplňků stravy podstatně vyšší (např. 56–57 % u MVMM). Užívání MVMM tedy přispívá značnou částí v příjmu živin v USA (Rock 2007).

Spotřebitelé ve Spojeném království (UK) utratí 340–360 milionů liber každý rok za vitaminy, minerální látky a ostatní doplňky stravy a ty jsou tak jedním z největších volně prodejných sektorů zdravotní péče v UK. Částka je tak poměrně srovnatelná s částkou utracenou za biopotraviny, která činí 550 milionů liber ročně. V celé západní Evropě trh s vitaminy, minerálními látkami a doplňky stravy roste a je značně rozšířen, obsahuje rozsáhlý seznam produktů od jednosložkových a multivitaminových přípravků až po ty, které obsahují směsi rostlinných přípravků a mikroživin (Ransley et al. 2001).

#### **3.5.1 Dělení vitaminů, minerálních látek a jejich doporučený příjem**

Doplňky stravy se dělí do skupin dle různých teorií, jednou z nich je dělení dle Ivana Macha (2012) a dělí se na následující skupiny: vitaminy a minerální látky, antioxidanty, rostlinné výtažky, doplňky stravy podporující hubnutí, doplňky na povzbuzení, doplňky stravy na problémy s klouby, probiotika, doplňky s mastnými kyselinami, enzymy, hormony, doplňky sportovní výživy. Nejužívanější skupinou jsou již zmiňované vitaminy – tedy látky obsahující aminovou skupinu a minerální látky, které jsou téměř vždy užívané ve vázané formě sloučenin (např. jód, selen), či jako sloučeniny (Gogová 2021).

Doporučené denní dávky (DDD) vitaminů a minerálních látek jsou stanoveny v Příloze 5 Vyhlášky č. 225 / 2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. Tyto doporučené denní dávky vitaminů a minerálních látek se vztahují na celkový denní příjem vitaminů a minerálních látek. Za zdroj vitaminů a minerálních látek lze považovat doplňky stravy s obsahem nejméně 15 % z hodnot DDD obsaženo ve 100 g nebo ve 100 ml či jednom balení obsahujícím jednu porci (Ministerstvo zemědělství 2008). Referenční hodnoty příjmu energie a živin jsou v ČR přejaty z referenčních dávek společností pro výživu zemí označovaných jako DACH (Německo, Rakousko, Švýcarsko). Doporučené denní dávky vitaminů jsou vyobrazeny v Tabulce 1, kde data byla čerpána z National Institutes of Health – Office of Dietary Supplements.

Tabulka 1 Doporučený denní příjem vitaminů (National Institutes of Health 2011)

Skupina	Vitamin A	Vitamin C	Vitamin D	Vitamin E	Vitamin K	Thiamin	Riboflavin	Niacin	Vitamin B6	Folát	Vitamin B12	Kyselina pantotenová	Biotin	Cholin
Jednotka	(µg/d)	(mg/d)	(µg/d)	(mg/d)	(µg/d)	(mg/d)	(mg/d)	(mg/d)	(mg/d)	(µg/d)	(µg/d)	(mg/d)	(µg/d)	(mg/d)
<b>Kojenci</b>														
0–6 m	400,0	40,0	10,0	4,0	2,0	0,2	0,3	2,0	0,1	65,0	0,4	1,7	5,0	125,0
6–12 m	500,0	50,0	10,0	5,0	2,5	0,3	0,4	4,0	0,3	80,0	0,5	1,8	6,0	150,0
<b>Děti</b>														
1–3 r	300,0	15,0	15,0	6,0	30,0	0,5	0,5	6,0	0,5	150,0	0,9	2,0	8,0	200,0
4–8 r	400,0	25,0	15,0	7,0	55,0	0,6	0,6	8,0	0,6	200,0	1,2	3,0	12,0	250,0
<b>Muži</b>														
9–13 r	600,0	45,0	15,0	11,0	60,0	0,9	0,9	12,0	1,0	300,0	1,8	4,0	20,0	375,0
14–18 r	900,0	75,0	15,0	15,0	75,0	1,2	1,3	16,0	1,3	400,0	2,4	5,0	25,0	550,0
19–30 r	900,0	90,0	15,0	15,0	120,0	1,2	1,3	16,0	1,3	400,0	2,4	5,0	30,0	550,0
31–50 r	900,0	90,0	15,0	15,0	120,0	1,2	1,3	16,0	1,3	400,0	2,4	5,0	30,0	550,0
51–70 r	900,0	90,0	15,0	15,0	120,0	1,2	1,3	16,0	1,7	400,0	2,4	5,0	30,0	550,0
> 70 r	900,0	90,0	20,0	15,0	120,0	1,2	1,3	16,0	1,7	400,0	2,4	5,0	30,0	550,0
<b>Ženy</b>														
9–13 r	600,0	45,0	15,0	11,0	60,0	0,9	0,9	12,0	1,0	300,0	1,8	4,0	20,0	375,0
14–18 r	700,0	65,0	15,0	15,0	75,0	1,0	1,0	14,0	1,2	400	2,4	5,0	25,0	400,0
19–30 r	700,0	75,0	15,0	15,0	90,0	1,1	1,1	14,0	1,3	400	2,4	5,0	30,0	425,0
31–50 r	700,0	75,0	15,0	15,0	90,0	1,1	1,1	14,0	1,3	400	2,4	5,0	30,0	425,0
51–70 r	700,0	75,0	15,0	15,0	90,0	1,1	1,1	14,0	1,5	400	2,4	5,0	30,0	425,0
> 70 r	700,0	75,0	20,0	15,0	90,0	1,1	1,1	14,0	1,5	400	2,4	5,0	30,0	425,0
<b>Těhotenství</b>														
14–18 r	750,0	80,0	15,0	15,0	75,0	1,4	1,4	18,0	1,9	600	2,6	6,0	30,0	450,0
19–30 r	770,0	85,0	15,0	15,0	90,0	1,4	1,4	18,0	1,9	600	2,6	6,0	30,0	450,0
31–50 r	770,0	85,0	15,0	15,0	90,0	1,4	1,4	18,0	1,9	600	2,6	6,0	30,0	450,0
<b>Kojení</b>														
14–18 r	1200,0	115,0	15,0	19,0	75,0	1,4	1,6	17,0	2,0	500,0	2,8	7,0	35,0	550,0
19–30 r	1300,0	120,0	15,0	19,0	90,0	1,4	1,6	17,0	2,0	500,0	2,8	7,0	35,0	550,0
31–50 r	1300,0	120,0	15,0	19,0	90,0	1,4	1,6	17,0	2,0	500,0	2,8	7,0	35,0	550,0

### 3.5.2 Význam a vliv suplementace vybraných výživových doplňků

Byly vybrány nejvýznamnější vitaminy (vitamin D, C, vitaminy skupiny B, karotenoidy), u nichž nedochází k jejich syntéze v lidském těle, či je zapotřebí přijímat alespoň jejich část z potravy, případně suplementací pomocí doplňků stravy, aby byl zajištěn jejich dostatečný příjem. Tyto vitaminy bývají také často deficitní a jejich nedostatek je spojován s celou řadou onemocnění, proto je důležité v případě příjmu nedostatečně pestré stravy uvažovat o jejich suplementaci.

#### 3.5.2.1 Vitamin D

Vitamín D je steroidním hormonem s pleiotropním působením na většinu tkání a buněk v těle, nezbytným pro normální metabolismus vápníku a fosforu a je tak důležitým faktorem ovlivňujícím zdraví pohybového aparátu. Nízké hladiny vitamínu D jsou spojovány s celou řadou onemocnění, včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, autoimunitních onemocnění a infekcí (Nair & Maseeh 2012). Vitamín D je metabolizován v játrech a poté v ledvinách na 1,25–dihydroxycholecalciferol. Receptory na 1,25–dihydroxycholecalciferol

jsou přítomny nejen ve střevě a kostech, ale v celé řadě dalších tkání včetně mozku, srdce, žaludku, slinivky břišní aktivovaných T a B lymfocytů, kůže, gonád atd. (Holick 2003). Přiměřené hladiny vitamínu D jsou udržovány kožní fotosyntézou a orálním příjmem. Dle některých odhadů trpí jedna miliarda lidí na celém světě nedostatkem tohoto vitamínu (Nair & Maseeh 2012). Fotosyntézu a biologickou dostupnost vitamínu D ovlivňuje řada faktorů, mezi které řadíme kolísání expozice slunečnímu záření v důsledku zeměpisné šířky, ročního období, denní doby, složek atmosféry, oblečení, používání opalovacích krémů, pigmentace kůže a dále také faktory jako jsou věk, nadváha či obezita a výskyt chronických onemocnění (Tsiaras & Weinstock 2011). Současný doporučený denní příjem vitamínu D ve většině evropských zemí je 5 µg / den (200 IU / den) pro dospělé osoby a 10 µg / den (400 IU / den) pro osoby starší 60–65 let (Lehmann & Meurer 2010). Nejbezpečnějším a nejekonomičtějším způsobem, jak zajistit adekvátní stav vitamínu D při nedostatku, je využití perorálního dávkování nativního vitamínu D. Lze očekávat, že sérum 25(OH)D vzroste asi o 1 ng/ml (2,5 nmol/l) na každých 100 IU přijatého vitamínu D každý den. Studie naznačují, že cholekalciferol (vitamín D3) je podstatně účinnější než ergokalciferol (vitamín D2) a také že bezpečná horní hladina příjmu vitamínu D3 je 10000 IU / den (Heaney 2008).

Vitamín D v kombinaci s vápníkem je využíván také při léčbě či prevenci osteoporózy, která je významným zdravotním problémem způsobujícím značnou morbiditu a mortalitu. Tato kombinace funguje jako prevence osteoporotických zlomenin, tedy zlomenin vyskytujících se v důsledku ztráty kostní hmoty (Sunyecz 2008). Nedostatek vitamínu D definovaný sérovou hladinou 25(OH)D <50 nmol/L (<20 ng/ml) je pandemický. Tento nedostatek je velmi rozšířený právě u pacientů s osteoporózou (Holick 2007). Bischoff-Ferrari a kol. provedli metaanalýzu pěti randomizovaných kontrolovaných studií zlomeniny kyčle (n = 9294) a sedmi randomizovaných kontrolovaných studií rizika nevertebrálních zlomenin (n = 9820). Pacienti, kteří dostávali 400 IU vitamínu D3 denně, vykazovali malé zlepšení při redukci zlomenin, zatímco vyšší dávka 700–800 IU vitamínu D3 denně snížila relativní riziko zlomeniny kyčle o 26 % a nevertebrální zlomeniny o 23 % (Bischoff-Ferrari et al. 2006). Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováními Trivedi a kol. kteří podávali starším mužům a ženám 100 000 IU vitamínu D3 každé 4 měsíce (ekvivalent 833 IU vitamínu D3 denně). Pozorovali, že riziko první zlomeniny kyčle, zápěstí, předloktí nebo obratle se snížilo o 33 % (Trivedi et al. 2003). Podobně Heikinheima a kol. zjistili, že intramuskulární injekce 150 000–300 000 IU vitamínu D3 ročně snížila riziko zlomenin o 25 % (Heikinheima et al. 1992).

V mnoha studiích bylo také poukázáno na ochranný vztah mezi dostatkem vitamínu D a nižším rizikem rakoviny, zejména rakoviny střeva, prsu, prostaty a vaječnicků. Suplementace vitamínu D by mohla mít příznivý vliv na snížení výskytu rakoviny při nízkých nákladech s malými či žádnými nežádoucími účinky (Garland et al. 2006). Většina epidemiologických studií uvádí, že vyšší hladina sérového 25-hydroxyvitamínu D je spojována s nižší incidencí různých druhů rakoviny a vyšší koncentrace 25(OH)D a 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)2 D) s nižší incidencí agresivní prostaty karcinomu s občasnými výjimkami nebo hraničními výsledky. Podobně podpůrné výsledky existují pro orální příjem vitamínu D, až na některé výjimky a pro expozici slunečnímu ultrafialovému záření B (UVB). Ženy s vyšší expozicí slunečního UVB záření ve Třetím národním průzkumu zdraví a výživy (NHANES III) měly pouze poloviční výskyt rakoviny prsu než ženy s nižší expozicí slunečního záření, zatímco muži v jiném národním průzkumu, měli pouze poloviční výskyt fatálního karcinomu prostaty.

Vysoká rekreační sluneční expozice byla také spojena s o 50 % nižší úmrtností na karcinom prostaty. Vyšší sluneční expozice v dětství a dospívání je také spojena s podobným snížením celoživotní incidence karcinomu prostaty. Téměř všechny laboratorní studie využívající systémy tkáňových kultur uváděly inhibici růstu maligních buněk a mnohé identifikovaly rediferenciaci v reakci na metabolity vitamínu D, zejména 1,25(OH)<sub>2</sub>D a do určité míry i jiné metabolity vitamínu D, jako je 25 (OH)D (Garland et al. 2009).

Kromě své úlohy v homeostáze vápníku se předpokládá, že aktivní forma vitamínu D má imunomodulační účinky na buňky imunitního systému, zejména T lymfocyty, a také na produkci a působení několika cytokinů. Interakce vitamínu D s imunitním systémem je v posledních letech cílem rostoucího počtu publikací. Současné studie spojují nedostatek vitamínu D s různými autoimunitními onemocněními, včetně inzulin-dependentního diabetes mellitus, roztroušené sklerózy, zánětlivého onemocnění střev, systémového lupus erythematosus a revmatoidní artritidy (Marques et al. 2010). Bylo zjištěno, že vitamín D reguluje působení látek adaptivní imunity a že při nedostatku vitamínu D imunitní systém vykazuje zvýšený výskyt autoreaktivních T buněk. Důkazy, které vyplývají z analýzy těchto prací, umožňují předpokládat, že nárůst autoreaktivních T buněk by mohl být nepřímo vyvolán deficitem vitamínu D prostřednictvím změny zrání nebo funkcí dendritických buněk, které jsou klíčové pro udržení autotolerance. Absence imunoregulačního účinku vitamínu D na antigen prezentující buňky, které mohou vyvolat toleranci, by mohla způsobit ztrátu imunologické tolerance u subjektů s polymorfismem regulačních genů vitamínu s významnými důsledky na riziko nebo progresi autoimunitního onemocnění (Antico et al. 2012).

### 3.5.2.2 Vitamin C

Vitamin C je základní mikroživina s pleiotropními funkcemi souvisejícími s jeho schopností darovat elektrony. Je to silný antioxidant a kofaktor pro řadu biosyntetických a genových regulačních enzymů (Aghajanian et al. 2015). Vitamin C přispívá k imunitní obraně podporou různých buněčných funkcí jak vrozeného, tak adaptivního imunitního systému. Vitamin C podporuje funkci epiteliální bariéry proti patogenům a podporuje vychytávání oxidantů v pokožce, čímž potenciálně chrání před oxidačním stresem z okolního prostředí. Vitamin C se hromadí ve fagocytárních buňkách, jako jsou neutrofilové a může zvýšit chemotaxi, fagocytózu, tvorbu reaktivních forem kyslíku, a nakonec i zabít mikroby. Je také potřebný pro apoptózu a odstraňování vyčerpaných neutrofilů z míst infekce makrofágy, čímž se snižuje nekróza a potenciální poškození tkáně. Úloha vitamínu C v lymfocytech je méně jasná, ale bylo prokázáno, že zvyšuje diferenciaci a proliferaci B-buněk a T-buněk, pravděpodobně kvůli jeho účinkům na regulaci genů (Carr & Maggini 2017). Nedostatek vitamínu C má za následek zhoršenou imunitu a vyšší náchylnost k infekcím. Infekce zase významně ovlivňují hladiny vitamínu C v důsledku zvýšeného zánětu a metabolických požadavků. Nedostatek vitamínu C může také vést ke vzniku kurděj, tedy onemocnění postihujícího dásně, jehož součástí jsou bolesti kostí, kloubů a zhoršené hojení ran (Hirschmann & Raugi 1999). Kromě toho se zdá, že suplementace vitaminem C je schopna jak předcházet, tak léčit respirační a systémové infekce (Hemilä 2004). Profylaktická prevence infekce vyžaduje dietní příjem vitamínu C, který zajišťuje saturující hladiny

v plazmě (tj. 100–200 mg/den), které optimalizují hladiny v buňkách a tkáních. Naproti tomu léčba prokázaných infekcí vyžaduje výrazně vyšší (gramové) dávky vitamínu, aby se kompenzovala zvýšená zánětlivá odpověď a metabolická náročnost (Carr & Maggini 2017). Doporučená denní dávka (DDD) vitamínu C je stanovena dle referenčních hodnot DACH, kteří revidovali referenční hodnoty pro příjem vitamínu C a zveřejnili je v únoru 2015. Za průměrnou potřebu vitamínu C u zdravých dospělých osob se považuje množství vitamínu C, které kompenzuje metabolické ztráty vitamínu C a zajišťuje nalačno hladinu 50  $\mu\text{mol/l}$  askorbátu v plazmě. Metabolické ztráty u nekuřáků se předpokládají ve výši 50 mg/den, rychlost absorpce 80 % a vylučování močí 25 % přijatého vitamínu C. Na základě těchto informací je tedy doporučená denní dávka u mužů 91 mg/den, s variačním koeficientem 10 % je odvozena referenční hodnota příjmu 110 mg/den u mužů a 95 mg/den u žen. U těhotných a kojících žen se doporučuje příjem vyšší a to 105 mg/den pro těhotné ženy od čtvrtého měsíce a 125 mg/den pro kojící ženy (Bechthold 2015).

### 3.5.2.3 Vitaminy skupiny B s výjimkou vitamínu B12

Vitaminy skupiny B jsou syntetizovány rostlinami, kvasinkami, bakteriemi, nikoliv však savci, ti je tak musí získávat z potravy či mikrobiálních zdrojů, jako je střevní mikrobiom. Některé střevní bakterie však nejsou schopny syntetizovat vitaminy skupiny B a pro svůj růst a přežití je musí získávat ze stravy svého hostitele či od jiných střevních bakterií, které touto schopností disponují. To naznačuje, že střevní mikrobiom může ovlivnit využití vitamínu B a potažmo tak i imunitu hostitele.

Vitaminy skupiny B se řadí mezi vitaminy rozpustné ve vodě, neukládají se v těle a jejich přebytek je vylučován močí. Je tedy potřeba přijímat dostatek těchto vitaminů z potravy. Nedostatek vitaminů skupiny B se projevuje nejen v rozvojových zemích, ale také v zemích vyspělých, kdy není přijímána dostatečně pestrá strava. Komenzální bakterie jsou považovány za faktor hrající klíčovou roli v lidském zdraví. Z pohledu vitaminů skupiny B jsou komenzální bakterie jak producenty, tak i konzumenty těchto vitaminů. Vitaminy přijaté ze stravy jsou vstřebávány v tenkém střevě, vitaminy skupiny B jsou produkovány a absorbovány ve střevě tlustém, což naznačuje, že jsou lidským tělem vnímány odlišně. Vitaminy skupiny B jsou důležitými kofaktory a koenzymy několika metabolických drah a hrají důležitou roli v udržování homeostázy imunitního systému. Vitaminy skupiny B, taktéž nazývané B-komplex vzhledem k jejich komplexnímu, tedy společnému působení, přispívají k normální činnosti nervového systému, působí příznivě proti únavě a vyčerpání, příznivě ovlivňují stav pokožky a přispívají normální funkci imunitního systému (Yoshii et al. 2019). Nedostatek těchto vitaminů je spojován s řadou zdravotních komplikací. Nedostatek vitaminů skupiny B spolu se zvýšenou hladinou plazmatického homocysteinu byly spojeny s kognitivními poruchami a demencí v pozdějším věku. Není však známo, zdali suplementace tento stav může zlepšit (Ford & Almeida 2019). Vitaminy skupiny B jsou potřebné pro správné fungování metylačního cyklu, produkci monoaminoxidázy, syntézu DNA a udržení hladiny fosfolipidů. Zejména vitaminy B1, B3, B6, B9 a B12 jsou nezbytné pro funkci neuronů a jejich nedostatky jsou spojovány s depresí, respektive tento nedostatek přispívá ke komplexnosti symptomů

deprese (Mikkelsen et al. 2017). Nedostatek vitamínu B1 je příčinou onemocnění Beriberi. Jeho nedostatek je často spojován s přílišnou konzumací výhradně loupané rýže. Klinicky je nemoc charakterizována degenerativními změnami v nervovém systému včetně mnohočetné periferní neuritidy, která může existovat samostatně, avšak často je kombinována s generalizovaným edémem a serózními výpotky, až s tendencí k rozvoji srdeční hypertrofie, která často vede k srdečnímu selhání a náhlé smrti (Vedder & Washington 1938). Vitamíny skupiny B byly také zkoumány pro jejich možnou roli ve zdraví kostí. Možnou ochrannou roli by mohly mít zejména vitamíny B2, B6, folát a vitamín B12, výsledky klinických studií však nejsou jednoznačné a výsledky neprokazují příznivý vliv suplementace na redukci zlomenin (Dai & Koh 2015).

#### 3.5.2.3.1 Vitamin B12

Biosyntéza vitamínu B12 (také označovaný jako kobalamin) zahrnující až 30 různých enzymatických kroků probíhá pouze u bakterií, většina eukaryotických organismů tedy musí přijímat tento vitamin z vnějších zdrojů. Vitamin B12 má v podstatě u eukaryotických organismů dvě funkce – funguje jako kofaktor pro enzymy methionin syntázy a methylmalonylCoA mutázy. Tyto dvě funkce jsou však klíčové pro zdraví a zejména tvorba methioninu je nezbytná k poskytování methylových skupin ve více než 100 methylačních procesech. Interference s reakcí methionin syntázy vede k akumulaci homocysteinu, rizikovému faktoru mnohých onemocnění. Syndrom preciozní anémie, charakterizovaný nedostatkem vnitřního faktoru, vede k těžkému, někdy až smrtelnému nedostatku vitamínu B12 (Smith et al. 2018). Nedostatek vitamínu B12 způsobuje také reverzibilní megaloblastickou anémii, demyelinizační onemocnění, či obojí (Stabler 2013). Současné testy mají nedostatečnou citlivost a specifitu, a tak se pro potvrzení diagnózy využívá stanovení hladiny kyseliny methylmalonové, která bývá již při začínajícím nedostatku B12 zvýšená (Oh & Brown 2003). Účinnou terapií je parenterální či perorální podávání vitamínu B12 ve vysokých dávkách (Stabler 2013). Neexistuje však jasně stanovená hranice pro nedostatek vitamínu B12, existuje spíše nepřetržitý inverzní vztah mezi hladinou sérového vitamínu B12 a nežádoucími projevy zahrnujícími defekty neurální trubice, mrtvici a demenci. U dětí nedostatek vitamínu B12 zapříčiňuje zpomalený intelektuální vývoj a vývoj mozku. Suboptimální stav vitamínu B12, tedy sérový B12 <300 pmol/l se vyskytuje u 30–60 % populace (Smith et al. 2018). Nedostatek je způsoben buď nedostatečným příjmem, nedostatečnou biologickou dostupností nebo malabsorpcí. Narušení transportu B12 v krvi nebo porucha buněčného příjmu či metabolismu způsobuje intracelulární nedostatek (Green et al. 2017).

#### 3.5.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přirozeně se vyskytující oranžové, žluté a červené lipofilní pigmenty, které se nacházejí především v ovoci, zelenině, rostlinách, řasách a fotosyntetických bakteriích (Moran et al. 2018). Lidské tělo nedokáže karotenoidy syntetizovat, a tak je nezbytné přijímat je z potravy či prostřednictvím výživových doplňků. Karotenoidy mají v lidském zdraví mnoho funkcí – primárně mají antioxidační účinky, ale jednotlivé karotenoidy mohou působit i jinými

mechanismy (Fiedor & Burda 2014). Například  $\beta$ -karoten má funkci provitaminu A, zatímco lutein a zeaxantin vytváří makulární pigment v oku. Možný ochranný účinek karotenoidů lze přičíst jejich vlastnostem jako inhibitory singletového kyslíku a jako antioxidanty, zatímco jejich možné rakovinotvorné působení v plicích lze připsat pro oxidačnímu působení volných karotenoidových radikálů v poškozených buňkách. Kromě chronických onemocnění prokázal betakaroten významnou terapeutickou hodnotu u jedinců trpících poruchami fotosenzitivity a poskytuje dočasnou úlevu osobám postiženým leukoplakií (Olson 1999). Přínos luteinu při snižování progresu věkem podmíněné makulární degenerace a katarakty se posiluje. Doporučené množství jejich příjmu by mohlo vést ke zvýšení povědomí v populaci o důležitosti příjmu dostatku potravin bohatých na lutein. Karotenoidy kromě příznivých účinků na zdraví očí mají také příznivý vliv na kognitivní funkce a kardiovaskulární zdraví a mohou pomoci předcházet některým typům rakoviny. Aby mohly být prokázány příznivé zdravotní účinky díky suplementaci karotenoidy, je zapotřebí dalších výzkumů (Eggersdorfer & Wyss 2018).

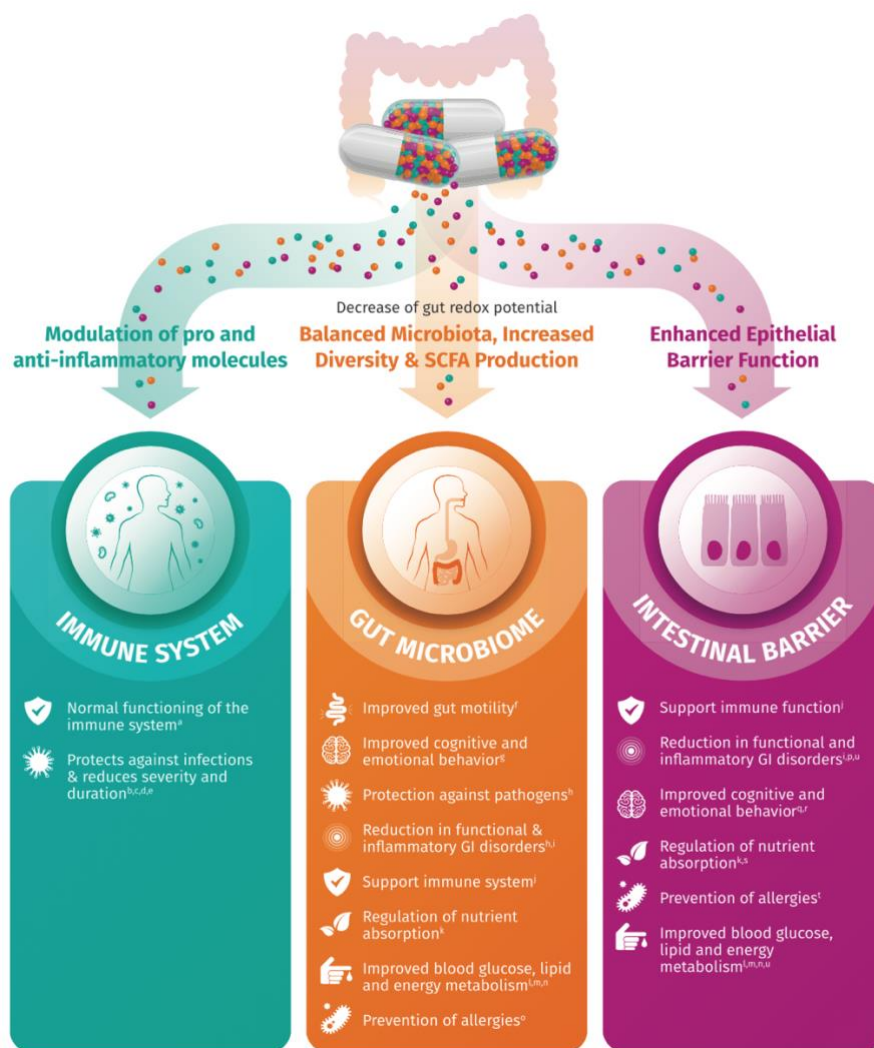


### 3.6 Vliv vitaminů na složení mikrobioty

Tradičně se nepředpokládalo, že vitaminy ovlivňují střevní mikrobiom, protože se nedostanou do distálního gastrointestinálního traktu, ale jsou účinně absorbovány v proximálním tenkém střevě. Nicméně přibývá důkazů, že když jsou vitaminy podávány ve velkém množství tak, aby se vyhnuly úplné absorpci, nebo ve formě kolon cílených transportních systémů (CTDS), mohou vitaminy přímo modulovat střevní mikrobiom. Kromě toho se zdá, že vitaminy ovlivňují střevní mikrobiom prostřednictvím nepřímých mechanismů, prostřednictvím systémové cirkulace s přímou vazbou na lidské zdraví (Steinert et al. 2019).

Vitaminy, především rozpustné ve vodě, které jsou buď syntetizovány pomocí mikrobioty či dodávány prostřednictvím výživy, mohou ovlivňovat imunitní systém jejich působením ve střevech. Neexistuje však jasný důkaz prokazující způsob jejich působení – není známo, zdali vitaminy zapojené do střevního imunitního systému působí prostřednictvím krevního zásobení, nebo lumenální interakce s mikrobiotou, či absorbcí do kolonocytů. Existují však data prokazující, že dochází k interakci s mikrobiotou a střevním imunitním systémem. Například hostitelské mutualistické bakterie dodávající vitaminy B-komplexu mohou působit jako obranná bariéra proti patogenům. Vitaminy B (zejména vitamin B2 a folát) mohou sloužit jako prekuzory k aktivaci speciálních imunitních T-buněk, nazývaných jako invariantní T-buňky spojené se sliznicí. Produkty degradace vitaminů B, navázané na povrch infikovaných buněk, mohou působit jako antigeny, které aktivují T a B buňky imunitního systému. Např. *B. thetaiotaomicron* syntetizuje vitamin B12, který snižuje aktivitu hlavního virulentního faktoru Shiga toxinu 2 produkovaného enterohemorganickou bakterií *Echerichia coli*.

Zánětlivá onemocnění střev jsou často spojována s nedostatkem určitých ve vodě rozpustných vitaminů. Např. 90 % pacientů trpících pelagrou, kteří mají nedostatek vitamínu B6, trpí také kolitidou. Biotin reguluje aktivitu NK buněk (natural killer cell), která je spolu se systémovými hladinami biotinu snížena u pacientů s Crohnovou chorobou (Biesalski 2016). Také pacienti s diabetes II. typu vykazovali významné změny v profilu genové četnosti související s metabolismem vitaminů zprostředkovaným mikrobiotou. Za určitých podmínek může být suplementace vitaminy zaměřená na střevní mikrobiom (přímo i nepřímo) zdraví prospěšná, jak můžeme pozorovat na Obrázku 2 (Steinert et al. 2019).



Obrázek 2 Mechanismus tří vzájemně propojených cest účinku vitaminové suplementace zaměřené na tlusté střevo (Steinert et al. 2019)

První studie provedené s vitaminy a doplňky stravy zaměřené na tlusté střevo naznačují, že vitaminy mohou modulovat mikrobiom, měnit redoxní potenciál a v případě vitamínu B3 pozitivně ovlivnit biomarkery systémové citlivosti na inzulin a metabolický zánět. Ačkoliv je zapotřebí dalších výzkumů, lze předpokládat, že vitaminy potřebují k prosperování nejen lidé, ale také střevní mikrobi. Je zapotřebí zjistit, zda a v jakých dávkách se tyto lokální účinky promítnou do přínosů pro zdraví hostitele, jako jsou zlepšení kognitivních funkcí, motorických funkcí střev, posílení imunity a související léčba a prevence nemocí (Steinert et al. 2019).

### 3.6.1 Vliv vitamínu D na střevní mikrobiom

Význam vitamínu D pro zdraví kostí byl již prokázán. V posledních letech jsou mu však přisuzovány i imunomodulační vlastnosti (Bashir et al. 2016). Hromadí se důkazy, převážně z observačních studií, které naznačují, že vitamín D může ovlivnit širokou škálu extraskeletálních onemocnění, kterými jsou diabetes, kardiovaskulární onemocnění, kolorektální karcinom, infekce, autoimunitní onemocnění a poruchy duševního zdraví. Mechanistické studie naznačují, že vitamín D ovlivňuje řadu buněčných funkcí, což

teoreticky podporuje hypotézu o vlivu, na již zmíněné zdravotní stavy (Yamamoto & Jørgensen 2020).

Jedním z mechanismů, jak může vitamín D ovlivnit riziko onemocnění je jeho schopnost ovlivnit a složení střevního mikrobiomu, pravděpodobně zvýšením regulace vrozené imunity, snížením zánětu a zachováním funkce střevní bariéry. Vazba aktivní formy vitamínu D – kalcitriolu, indukuje produkci antimikrobiálních peptidů makrofágy, což vede k zabíjení bakterií. Selektivní usmrcování patogenních bakterií by mohlo vést k větší příležitosti pro kolonizaci bakteriemi s příznivými zdravotními účinky. Vitamín D také hraje roli při udržování slizniční bariérové funkce tím, že reguluje expresi proteinů těsného spojení a adherentních spojení a potlačuje apoptózu epiteliálních buněk. Kromě toho fermentační produkty produkované symbiotickými bakteriemi zvyšují intestinální expresi receptoru vitamínu D a snižují zánět. Všechny tyto aktivity mají potenciálně vliv na mikrobiální složení (Waterhouse et al. 2019). Většina studií však byla prováděna na myších. Výsledky však naznačují, že nedostatek vitamínu D má vliv na vyšší zastoupení Bacteroidetes a Proteobacteria phyla (Ooi et al. 2013). V průřezové studii, která byla prováděna na vzorku zdravých lidských jedinců byl příjem vitamínu D negativně spojen s hojností *Prevotella* a silně pozitivně spojen s *Bacteroides* (Wu et al. 2011). Oproti tomu Luthold a kol. zjistili, že zdraví jedinci s vyšším uváděným příjmem vitamínu D měli vyšší zastoupení *Prevotella* ve stolici a snížený výskyt *Haemophilus* (ze kmene Proteobacterie) a *Veillonella* z kmene Firmicutes (Luthold et al. 2017). Ve studii, která kromě vzorků stolice využívala i edoskopické a kolonoskopické biopsie bylo zjištěno, že osmitýdenní suplementace vitamínem D3 vedla ke zvýšení druhového zastoupení v žaludečním antru, ke snížení *Proteobacteria* v žaludečním korpu a antru a zvýšení *Bacteroidetes* v žaludku a sestupném duodenu. Mikrobiální složení dolního gastrointestinálního traktu a stolice se nelišilo před a po suplementaci, což naznačuje, že analýza vzorku stolice nemusí být vhodným prostředkem ke studiu tohoto vztahu. (Bashir et al. 2016).

### 3.6.2 Vliv dalších vybraných vitaminů na střevní mikrobiom

Dalším vitaminem, u něhož je diskutován vliv na modulaci střevní mikrobioty, je vitamin A. Jeho účinky byly pozorovány zejména v případech nákazy norovirem, kdy bylo zjištěno, že suplementace vitamínem A snižuje míru infekce a klinické příznaky (Long et al. 2007). Dále bylo prokázáno, že dostatečná suplementace vitamínem A může snížit mortalitu i zlepšit průběh infekčních gastrointestinálních onemocnění a respiračních chorob (Thornton et al. 2014).

V tlustém střevě je hojně zastoupen vitamin B12 (kobalamin), a to díky jeho syntéze střevní mikrobiotou. Existuje však řada faktorů, které zabraňují čerpání vitamínu z tohoto zdroje. Kobalamin produkovaný mikroby představuje méně než 2 % celkového obsahu korinoidů ve stolici (Stabler & Allen 2008), není však biologicky dostupný, protože receptory nezbytné pro absorpci tohoto vitamínu se nacházejí v tenkém střevě, hlavním zdrojem vitamínu je tedy živočišná strava (Seetharam & Alpers 1982). Častý nedostatek vitamínu B12 se vyskytuje u vegetariánů a veganů (Antony 2003). Na pokusech s hlodavci však bylo zjištěno, že řasa nori obsahuje

dostatečné hladiny korionoidů a bylo možné její konzumaci tomuto nedostatku předejít (Takenaka et al. 2001). Mnoho nejasností spojených s dostupností kobalaminu v potravinách a probiotikách pochází z nejednoznačnosti metod používaných k měření hladin kobalaminu. Vývoj metod kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie pro měření korionoidů umožnil identifikaci specifických korionoidů v biologických vzorcích (Degnan et al. 2014). Použití těchto metod odhalilo, že potraviny a bakterie, které se dříve pokládaly za zdroj kobalaminu, jako je probiotická bakterie *Lactobacillus reuterii* a jedlá sinice *Arthrospira platensis* (dříve *Spirulina*), ve skutečnosti produkují pouze pseudokobalamin, který člověk nedokáže využít (Tanioka et al. 2010). Je pravděpodobné, že střevní mikroorganismy představují v případě využití kobalaminu přímou konkurenci pro svého lidského hostitele. U velké většiny lidských střevních druhů se předpokládá, že vyžadují exogenní korionoidy (Degnan et al. 2014). Bylo pozorováno, že jedinci s vysokou bakteriální zátěží v tenkém střevě mají tendenci k nízké hladině kobalaminu, pravděpodobně v důsledku soutěže o kobalamin mezi hostitelem a mikroby či nadbytku korionoidů jiných než kobalamin (Murphy et al. 1986). Vzhledem k omezené absorpci během trávení může přebytek kobalaminu vstoupit do tlustého střeva a modulovat střevní mikrobiom. Při pozorování dopadů suplementace kobalaminem v kombinaci se syrovátkou in vitro se zvýšilo zastoupení kmene Firmicutes a Bacteroidetes spp. a redukovalo se zastoupení kmene Proteobacteria, který zahrnuje patogeny jako např. *Escherichia coli*, *Shigella spp.* a *Pseudomonas spp.* (Wang et al. 2019).

Potenciálně ovlivnit skladbu střevní mikrobioty mohou také karotenoidy, které byly zkoumány pro jejich možný pomocný účinek při léčbě přetrvávajících zánětlivých onemocnění. I když jsou obecně považovány za prospěšné pro zdraví, pouze malá část karotenoidů z potravy je absorbována střevem a dostává se do tělesných tkání, zatímco zbytek je metabolizován mikrobiotou (Bas-Bellver et al. 2020). Karotenoidy také mohou mít probiotické účinky a suplementace může zvýšit mikrobiální diverzitu a vést ke změně složení mikrobioty. Některé studie naznačují, že suplementace karotenoidy může snížit počet bakterií z kmene Firmicutes, k ověření tohoto účinku je však zapotřebí dalších výzkumů (Guo et al. 2019).

### 3.7 NMR metabolomika stolice

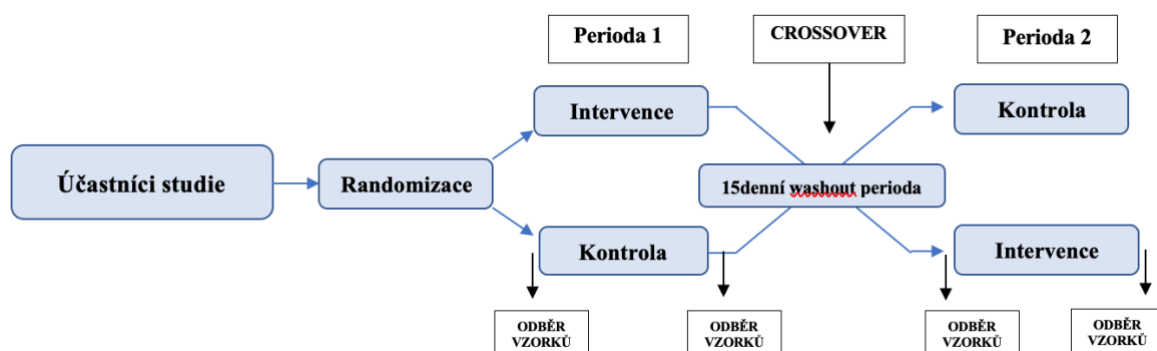
V posledních dvou desetiletích se nukleární magnetická rezonance (NMR) stala jednou ze tří hlavních analytických metod používaných v metabolomice. Metabolomika je analýzou metabolismu za konkrétního fyziologického stádia organismu, tkáně či buňky a provádí se z důvodu porozumění buněčným funkcím. Metabolický stav organismu závisí na jeho genomu, transkriptomu, proteomu, epigenomu, mikrobiomu a expozomu. Metabolomika, studium malých molekul (<1500 Da) v živých organismech, tedy poskytuje informace s vysokým potenciálem pro přesný popis fyziologického stavu organismu (Markley et al. 2017). Dalšími dvěma metodami jsou plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a kapalinová chromatografie spojená s jednostupňovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (Wishart 2008). Relativně snadná příprava vzorků, schopnost kvantifikovat hladiny metabolitů, vysoká úroveň experimentální reprodukovatelnosti a inhertně nedestruktivní povaha NMR spektroskopie z ní činí preferovanou metodu pro dlouhodobé či rozsáhlé klinické metabolomické studie. Tyto výhody však často bývají převáženy skutečností, že většina ostatních analytických technik, včetně LC-MS a GC-MS, je ze své podstaty citlivější než NMR, přičemž nižší limity detekce jsou obvykle 10 až 100 x lepší (Emwas et al. 2019). V naprosté většině metabolomických studií založených na NMR se využívá protonová NMR spektroskopie ( $^1\text{H}$  NMR). Důvodem je, že se jádra  $^1\text{H}$  nacházejí téměř v každé organické sloučenině, a tedy téměř v každém známém metabolitu. Existují stovky odlišných signálů vznikajících pro sloučeniny, z nichž každá obsahuje ve svých chemických strukturách jeden či více atomů  $^1\text{H}$ . Kromě své všudypřítomnosti atomy  $^1\text{H}$  vykazují zdaleka největší intenzitu signálu NMR, mají velmi vysoký (99 %) izotopový přirozený výskyt a vykazují poměrně úzké šířky čar (často <1 Hz u 500 MHz spektrometrů), které dávají spektru dobré rozlišení. Jednorozměrná  $^1\text{H}$  NMR spektra jsou zvláště užitečná pro metabolomické studie, z důvodu, že jednorozměrná  $^1\text{H}$  NMR je jako technika vysoce automatizovaná, velmi spolehlivá a rychlá. Časy sběru pro jedno spektrum jsou často jen několik minut. S moderním zařízením NMR lze vzorky NMR kontinuálně zavádět a odebírat pomocí robotických výměníků vzorků, které pracují dny či týdny v kuse. Navíc chemické informace obsažené v jediném 1D  $^1\text{H}$  NMR spektru biofluidního či tkáňového extraktu často postačí k identifikaci a kvantifikaci 50–100 metabolitů najednou (Holmes et al. 2000). Tomuto identifikačnímu procesu výhradně napomáhá skutečnost, že mnoho referenčních  $^1\text{H}$  NMR spekter ze stovek známých metabolitů bylo sestaveno a uloženo v řadě veřejných databází. Kromě toho existuje množství softwarových nástrojů pro automatické či poloautomatické zpracování a analýzu 1D  $^1\text{H}$  NMR spekter během minut či pár vteřin po shromáždění spekter (Canueto et al. 2018). Téměř všechna 1D  $^1\text{H}$  NMR spektra v metabolomických studiích jsou měřena ve vodě jako rozpouštědla, proto je důležitým aspektem potlačení rozpouštědlem. V závislosti na povaze studovaných metabolitů mohou být použita různá rozpouštědla. Např. pokud jsou předmětem pozorování pouze nevyměnitelné protony ve vzorku, lze se problému s potlačením vody v podstatě vyhnout použitím >99,9 % deuterovaných rozpouštědel – D<sub>2</sub>O na místo H<sub>2</sub>O (Emwas et al. 2019). Mimo metod nahrazování rozpouštědla, které často vyžadují lyofilizaci, jsou k dispozici také techniky NMR pulzní sekvence pro potlačení rozpouštědla a dvourozměrné (2D) NMR, tyto metody však obvykle nejsou vhodné pro rutinní metabolomickou analýzu a jsou časově náročné (Jézéquel et al. 2015).

Již od starověku lidé využívali tělesné tekutiny jako jsou sliny, moč a pot k diagnostice různých onemocnění. Vývoj a aplikace analytických metod pro detailní analýzu tělesných tekutin vedly k objevu řady biomarkerů onemocnění. NMR je začleněna do multidisciplinárního přístupu ke změnám profilu v malých molekulách spojených s nástupem a progresí lidských onemocnění. NMR pomáhá při identifikaci biomarkerů pro různé typy rakoviny, neurologických onemocnění, genetických poruch a infekčních onemocnění. Specifické metabolity korelující s onemocněním a potenciální biomarkery mohou být identifikovány pomocí dvourozměrných NMR experimentů v kombinaci s chemometrickými technikami, které zahrnují S-grafy a zátěžové grafy (Gebregiworgis & Powers 2012). Jedním ze vzorků, který lze takto analyzovat, je stolice či fekální extrakt. Vzhledem ke kontaktu a přechodnému pobytu v tlustém střevě a konečniku nese stolice mnoho užitečných informací o zdravotním stavu jak tlustého střeva, tak konečniku. To je potenciálně užitečné pro neinvazivní diagnostiku kolorektálního karcinomu a zánětlivého onemocnění střev, tedy dvou velmi častých střevních onemocnění, které představují významné problémy. Výzvou pro tuto metodu je extrahovat užitečné informace z komplexního vzorku, který obsahuje různé druhy bakterií, konečné produkty trávicího procesu (s nestráveným materiálem) a epitelální buňky tlustého střeva (Bezabeh et al. 2009). Vzhledem k tomu, že se očekává, že patologické stavy naruší homeostázu, což povede ke změně hladin nebo profilů metabolitů, má metabolomika velký potenciál v diagnostice a monitorování onemocnění, zejména pokud je založena na vzorcích, které lze odebrat neinvazivně, jako je dále také krev a moč. Od roku 2008–2014 bylo publikováno více než 140 prací zaměřených na výzkum nemocí s využitím metabolomiky biotekutin (zahrnujících především krevní plazmu a sérum, ale také moč a další biotekutiny specifičtější pro sledované znaky), což naznačuje pozitivní vývoj v užívání těchto výzkumných metod (Duarte et al. 2014).

## 4 Metodika

### 4.1 Celkový design

V rámci intervenční randomizované studie The Effect of Micronutrient Supplementation on Gut Microbiome Composition and Function (Multigut) prováděné na Glasgow University, byl zkoumán vliv doplňování mikroživin na složení a funkci střevní mikrobioty u zdravých jedinců. Účastníci byli požádáni, aby provedli dvě opakování, mezi nimiž došlo k 15dennímu vymývání suplementu. Účastníci studie, kteří byli zařazeni do skupiny užívající suplementy, byli požádáni, aby konzumovali ke své běžné stravě po dobu 10 dnů volně prodejný multivitaminový doplněk stravy v dávce jedna tableta za den. Účastníci následně poskytli vzorky stolice a moči před zahájením intervence a poté také na konci 10denní suplementace. Během 10 dnů byli účastníci požádáni, aby zaznamenávali stravu, kterou konzumují, do poskytnutých stravovacích deníků. Účastníci, kteří byli zařazeni do kontrolní skupiny, byli požádáni, aby poskytli stejný počet vzorků, ve stejných intervalech, jako suplementační skupina, tzn. na začátku a poté po 10 dnech suplementace. Suplementace u nich však neprobíhala. Účastníci byli také požádáni, aby co nejpřesněji zopakovali stravování, které dodržovali během první periody. Mezi dvěma sledováními probíhalo 15denní wash-out období s cílem navrátit vlastnosti a skladbu střevní mikrobioty zpět na výchozí úroveň. Studie byla vyhodnocena na základě posouzení změn ve složení střevní mikrobioty na základě metabolomiky stolice a moči. Design studie je znázorněn na Obrázku 3.



Obrázek 3 Design studie

#### 4.1.1 Demografie účastníků studie

V rámci studie bylo zpracováno 116 vzorků moči a 116 vzorků stolice. Podmínkou pro přijetí účastníků do studie byla věková hranice 18 let a více, dobrovolníci museli být zdraví. Do studie byli přijati muži i ženy. Kritériem pro vyloučení ze studie byly velké střevní operace provedené v minulosti, nestabilní hmotnost, užívání probiotik, mikronutrientů, antibiotik, či steroidů v posledních třech měsících před začátkem studie či účast na dalších výzkumech.

## 4.1.2 Chemikálie, přístroje a software

### Chemikálie

- NMR pufr - 1,5M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM TSP ((3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-d<sub>4</sub>), 0,2% NaN<sub>3</sub> v 99% deuterium oxidu, pD 7,4

### Spotřební materiál

- Mikrozkušavky značky VWR 1,5 ml (CZ)
- Pipetovací špičky značky Eppendorf (CZ)
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7“ Standard series (USA)

### Přístroje

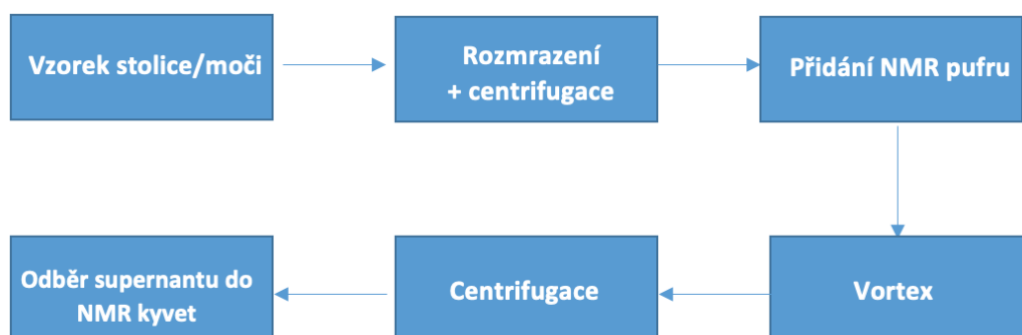
- Pipety VWR 20–200 µl a 100–1000 µl (CZ)
- Vortex IKA MS 3 Basic (DE)
- Centrifuga Rotanta 460R Hettich Zentrifugen (DE)
- NMR spektrometr Avance III Bruker s <sup>1</sup>H frekvencí 500,23 MHz (DE)

### Software

- Topspin 3.5 pl7, Bruker (DE)
- Chenomx NMR suite 8.4, Chenomx Inc. (CA)
- MNova 12, Mestrelab Research (ESP)
- Metaboanalyst 4.0 (CA)

## 4.1.3 Příprava vzorků pro NMR analýzu

Vzorky z biobanky byly rozmrazeny a centrifugovány při teplotě 4°C a 1500 ot./min. po dobu 10 minut. Následně bylo pipetováno 630µl každého vzorku do Eppendorf zkumavek, do kterých bylo přidáno 70µl NMR pufru (pH 7,4). Vzorek byl tedy zředěn v poměru 1:10 a jeho celkový objem byl 700µl. Vzorky byly dále homogenizovány na vortexu po dobu 1 minuty, dále znovu centrifugovány na předchlazené odstředivce při teplotě 4°C a 15000 ot./min. po dobu 10 minut. Na závěr bylo pipetováno 600µl supernantu do NMR kyvet. Proces přípravy vzorků pro NMR analýzu je vyobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4 Postup přípravy vzorků pro NMR analýzu



#### 4.1.4 NMR měření a analýza dat

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí spektrometru Bruker Avance III, s frekvencí  $^1\text{H}$  500,23 MHz při teplotě 298K (25 °C). Všechna  $^1\text{H}$  NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Bylo využito pulzní sekvence (1D NOESY), aby došlo k potlačení signálu zbytkové vody na 4,708 ppm. Pro každý vzorek bylo měřeno 128 skenů a 4 dummy skeny, počet datových bodů 64k, s použitím spektrální šířky 8KHz, fixní zisk přijímače 8, akviziční čas byl 4 s, směšovací čas 0,1 s.

Spektra byla Fourier.transformována fázována a baseline-korigována v programu Topspin. Byla také provedena exponenciální multiplikace a úprava reference na signál TSP (0,000 ppm). V programu Chenomx Processor (Chenomx, Kanada) byla provedena korekce shimu a kalibrace CSI. V Chenomx Profiler bylo identifikováno celkem 21 metabolitů ve vzorcích stolice a 8 metabolitů ve vzorcích moči.

#### 4.1.5 Statistické zpracování dat

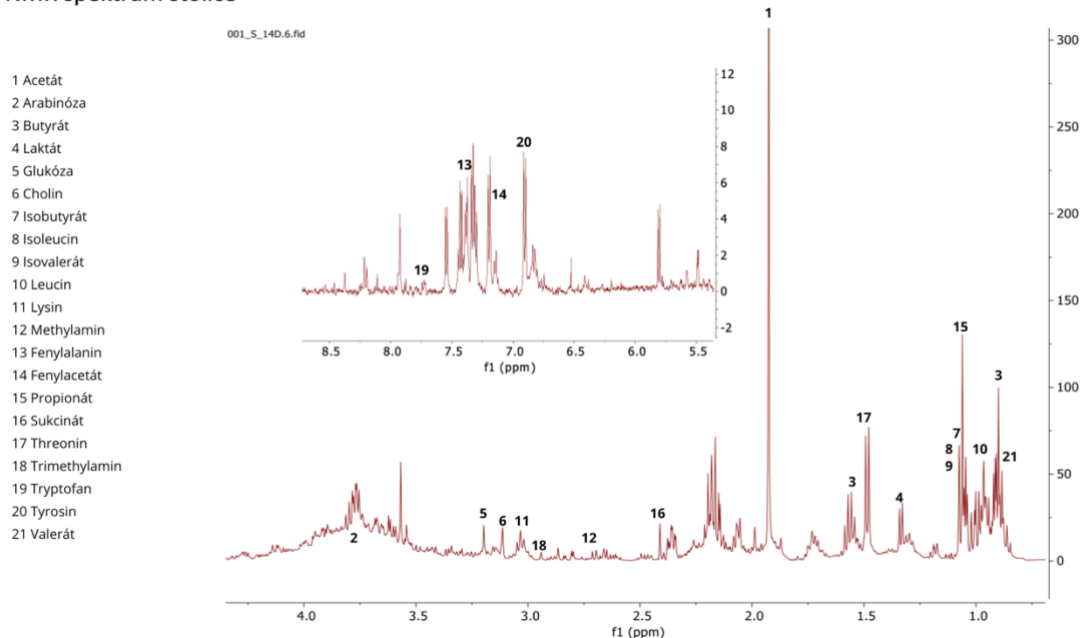
Data byla statisticky zpracována v programu Metabanalyst (Kanada, <https://www.metaboanalyst.ca>). Při statistickém zpracování byla vypočtena relativní FC (Fold Change), tedy násobek změny mezi intervencí a kontrolou. Bylo ignorováno, v jakém rameni se vzorek nachází, tedy zdali se jedná o kontrolu či intervenci, v potaz bylo bráno pouze zdali se jedná o vzorek měřený před podáním či po podání multivitaminového suplementu. Dále byla provedena PCA analýza, data byla normalizována pomocí automatického škálování. Byl proveden také neparametrický Wilcoxonův test. Následně byla data vizualizována prostřednictvím boxplotů.

## 5 Výsledky

V Chenomx Profiler bylo identifikováno celkem 21 metabolitů ve vzorcích stolice a 8 metabolitů ve vzorcích moči. Všechny identifikované metabolity jsou vyobrazeny na Obrázku 5 a 6. V tabulce 2 byla zaznamenána jejich p-hodnota, medián a FDR (False Discovery Rate), tedy poměr počtu falešně pozitivních výsledků k počtu celkových pozitivních výsledků testu. Na rozdíl od p-hodnoty, která udává kolik procent všech testů povede k falešně pozitivním výsledkům, hodnota FDR udává, kolik procent významných testů povede k falešně pozitivním výsledkům.

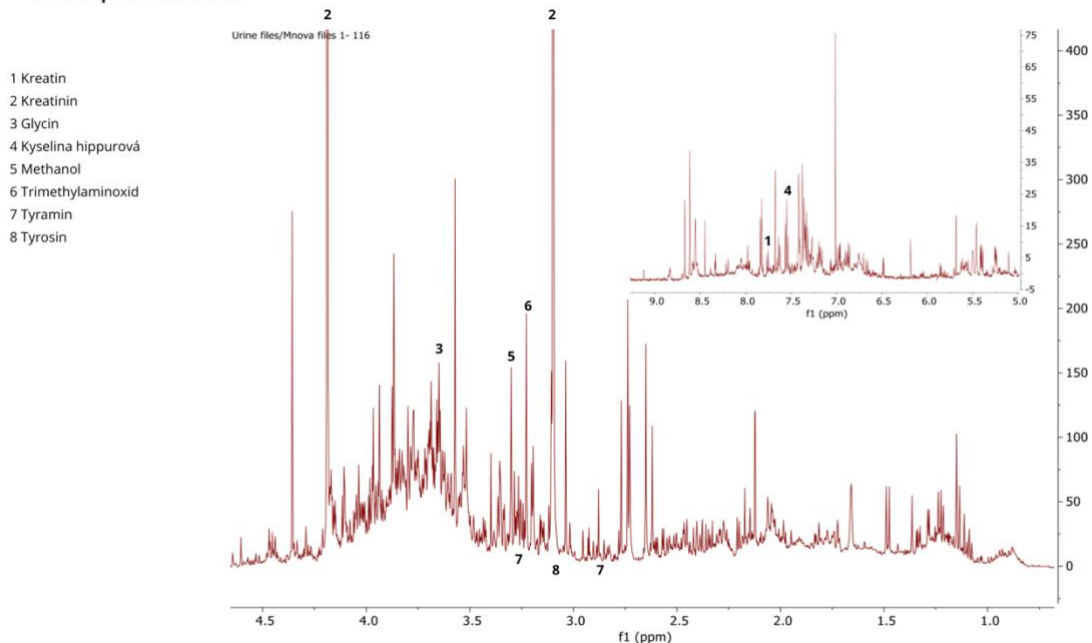
Jako statisticky průkazný byl vyhodnocen pouze výskyt kyseliny hippurové v moči ( $p=0,024334$ ) tyrosinu v moči ( $p=0,04552$ ) a treoninu ve stolici ( $p=0,0092162$ ). Dále byla provedena PCA analýza, data byla normalizována pomocí automatického škálování. Na Obrázku 7 lze pozorovat výraznější separaci v PC1 (26,9 %) a PC2 (11,7 %) a také v komponentu PC 4 (6,3 %) a PC5 (5,9 %).

NMR spektrum stolice



Obrázek 5 NMR spektrum stolice a identifikované metabolity

### NMR spektrum moči



Obrázek 6 NMR spektrum moči a identifikované metabolity

Tabulka 2 Metabolity identifikované v NMR spektru

Metabolity identifikované v NMR spektru				
	p-hodnota	medián FC <sup>1</sup> kontrola	medián FC intervence	FDR <sup>2</sup>
Acetát-ST <sup>3</sup>	0.21324	1.228744282	1.179669451	0.88057
Arabinóza-ST	0.94907	1.061154879	0.86930202	0.94907
Butyrát-ST	0.38084	0.78759037	1.336110194	0.91217
Kreatin-UR <sup>4</sup>	0.60888	1.096909593	0.976491142	0.91217
Glukóza-ST	0.68557	0.685020226	0.805021114	0.91217
Glycin-UR	0.28426	0.923735599	0.8450556	0.88057
Kyselina hippurová-UR	0.024334	1.202640786	0.957086133	0.34068
Cholin-ST	0.66995	0.823264593	1.089895654	0.91217
Isobutyát-ST	0.45488	0.889101155	0.990417276	0.91217
Isoleucin-ST	0.46794	0.811621347	0.998992423	0.91217
Isovalerát-ST	0.16885	0.899793195	1.330103422	0.88057
Laktát-ST	0.78186	1.126069121	1.098388379	0.91217
Leucin-ST	0.31449	1.100338399	0.964487669	0.88057
Lysin-ST	0.56473	1.037316145	0.899726219	0.91217

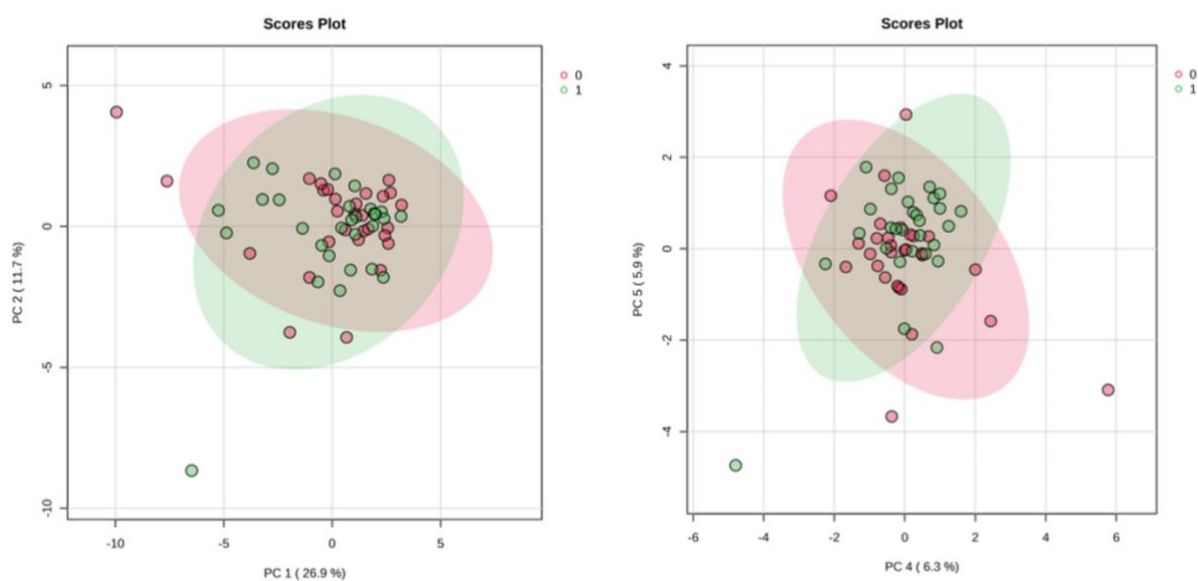
<sup>1</sup> FC – fold change

<sup>2</sup> FDR – false discovery rate

<sup>3</sup> ST– stool

<sup>4</sup> UR – urine

	p-hodnota	medián FC <sup>5</sup> kontrola	medián FC intervence	FDR <sup>6</sup>
Methanol-UR <sup>7</sup>	0.89834	0.836417014	0.845626802	0.94907
Methylamin-ST <sup>8</sup>	0.66995	0.931433179	1.297889571	0.91217
Fenylacetát-ST	0.84801	1.036638227	1.158396625	0.94907
Fenylalanin-ST	0.66995	0.857434183	0.968011639	0.91217
Propoinát-ST	0.78186	1.153410992	1.002032784	0.91217
Sukcinát-ST	0.73321	0.784846295	1.258190929	0.91217
Treonin-ST	0.0092162	0.745233486	1.576131054	0.25805
Trimethylaminoxid-UR	0.71721	1.049387264	1.044092148	0.91217
Trimethylamin-ST	0.45488	1.029314426	1.046907773	0.91217
Tryptofán-ST	0.91522	0.716248249	0.953917429	0.94907
Tyramin-UR	0.25601	1.823636782	0.75599767	0.88057
Tyrosin-ST	0.31449	0.821690826	0.93841582	0.88057
Tyrosin-UR	0.04552	1.187652297	0.805432151	0.42485
Valerát-ST	0.14937	1.242086012	1.288008193	0.88057



Obrázek 7 PCA analýza ukazující mírnou separaci vzorků pro komponenty PC1 a PC2, PC4 a PC5

<sup>5</sup> FC – fold change

<sup>6</sup> FDR – false discovery rate

<sup>7</sup> UR – urine

<sup>8</sup> ST– stool

Dále byl proveden neparametrický Wilcoxonův test, který testuje hypotézu rovnosti distribučních funkcí na základě ověření symetrického rozložení sledované náhodné veličiny. Výpočet testu vychází z párových hodnot dvou měření na jednom výběrovém souboru. Výsledky testu vyobrazené v Tabulce 3 poukazují na statisticky významný výskyt třech metabolitů: treoninu ve stolici ( $p=0,0092162$ ), kyseliny hippurové v moči ( $p=0,024334$ ) a tyrosinu v moči ( $p=0,04552$ ), u ostatních metabolitů se  $p$ -hodnota pohybovala již nad  $p=0,005$  a nelze tedy předpokládat, že je jejich výskyt statisticky významný. V případě treoninu ve stolici lze pozorovat nárůst jeho hodnot mediánu v kontrole z 0,745233486 na 1,576131054 v intervenci. Byla vypočtena FDR 0,25805 a lze tedy předpokládat, že se jedná o dílo náhody z pouhých 26 %. Taktéž byl pozorován mírný nárůst v mediánu tyrosinu v kontrole z 0,821690826 na 0,93841582 v intervenci při FDR 0,42485.

Pozitivní změny u ostatních metabolitů nebyly patrné, naopak u některých metabolitů došlo k poklesu jejich výskytu, může se však jednat o náhodné zjištění. U kyseliny hippurové došlo k poklesu, kdy pro kontrolu byl vypočten medián 1,202640786 a intervence klesla na 0,957086133 při FDR 0,34068.

Tabulka 3 Wilcoxonův test

Wilcoxonův test				
	p hodnota	medián FC <sup>9</sup> kontrola	medián FC intervence	FDR <sup>10</sup>
Treonin-ST <sup>11</sup>	0.0092162	0.745233486	1.576131054	0.25805
Kyselina hippurová-UR <sup>12</sup>	0.024334	1.202640786	0.957086133	0.34068
Tyrosin-UR	0.04552	0.821690826	0.93841582	0.42485
Valerát-ST	0.14937	1.242086012	1.288008193	0.88057
Isovalerát-ST	0.16885	0.899793195	1.330103422	0.88057
Acetát-ST	0.21324	1.228744282	1.179669451	0.88057
Tyramin-UR	0.25601	1.823636782	0.75599767	0.88057
Glycin-UR	0.28426	0.923735599	0.8450556	0.88057
Leucin-ST	0.31449	1.100338399	0.964487669	0.88057
Tyrosin-ST	0.31449	0.821690826	0.93841582	0.88057

Data byla vizualizována prostřednictvím boxplotů, tedy prostřednictvím vizualizace numerických dat pomocí kvartilů. Na Obrázku 8 je vyobrazen nárůst koncentrace treoninu ve

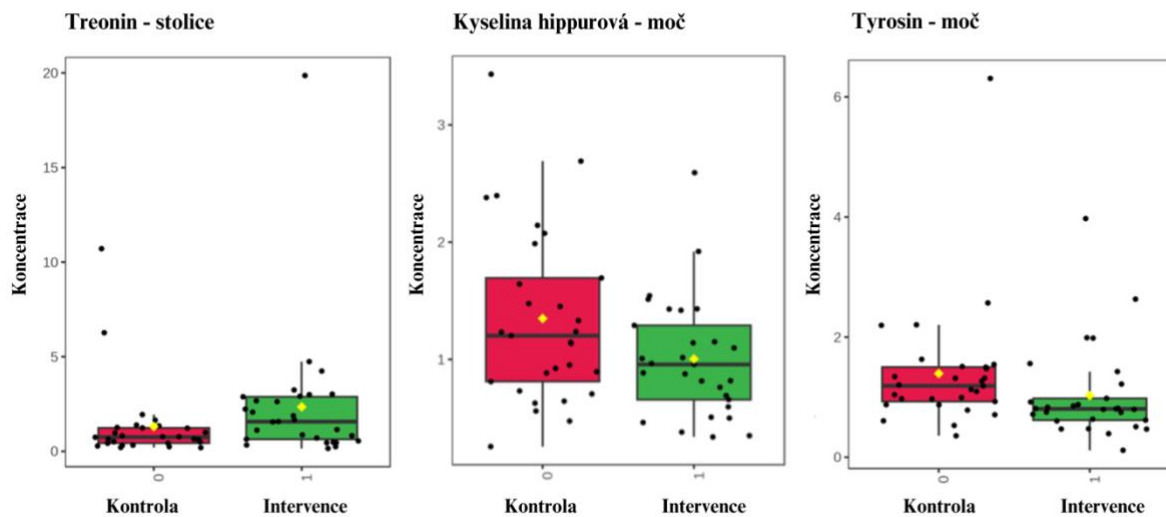
<sup>9</sup> FC – fold change

<sup>10</sup> FDR – false discovery rate

<sup>11</sup> ST– stool

<sup>12</sup> UR – urine

stolici v intervenci oproti kontrole, pokles kyseliny hippurové v moči, kde se v kontrole vyskytovaly vyšší koncentrace nežli v intervenci a pokles tyrosinu v moči – vyšší koncentrace byla v kontrole nežli v intervenci, což není shodný výsledek, který byl vyhodnocen pomocí Wilcoxonova testu, kde koncentrace naopak mírně stoupala. Může se však jednat o náhodná zjištění.



Obrázek 8 Boxploty statisticky průkazně odlišných látek

## 6 Diskuze

V rámci studie byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v koncentracích třech metabolitů, jejichž hladina rostla či klesala v závislosti na příjmu multivitaminových doplňků stravy. Rozdíly v hladinách koncentrací metabolitů byly pozorovány u treoninu v moči, kyseliny hippurové v moči a také tyrosinu ve stolici.

Treonin je esenciální aminokyselinou vyskytující se v trávicím traktu. Vzniká z asparaginu, který nebyl v rámci této studie změněn. Treonin také ovlivňuje integritu střevní sliznice, která je nezbytná pro trávení a vstřebání živin, stejně tak funkci slizniční bariéry. Nedostatek či nadbytek treoninu v potravě má negativní následky pro integritu a bariérovou funkci střevní sliznice. Treonin také ovlivňuje výšku klků, hloubku krypt, počet pohárkových buněk a syntézu mucinu, ale mechanismy, kterými k této regulaci dochází, je potřeba dále zkoumat (Mao et al. 2011). Esenciální aminokyseliny, mezi které se treonin řadí, mohou zvýšit expresi střevního  $\beta$ -defensinu, malého endogenního kationtového polypeptidu, který funguje jako širokospektrální antimikrobiální látka, a tudíž mohou potenciálně ovlivnit složení střevního mikrobiomu a následně také metabolity, které mikrobi produkují. Esenciální aminokyseliny i aminokyseliny s krátkým řetězcem, které jsou produkovány mikrobiotou, mají vliv na rovnováhu lipidů a metabolismus glukózy. Podání větvených aminokyselin s krátkým řetězcem, které jsou produkovány mikrobiotou, může vést ke zvýšenému uvolňování GLP-1 z enterocytů a snížení exprese genů zapojených do transportu mastných kyselin ve střevě a lipogenezi. Esenciální aminokyseliny také mohou ovlivňovat množství střevních metabolitů prostřednictvím produkce cholecystokininu a kontrakce žlučníku (Bifari et al. 2017). Zvýšení koncentrace treoninu ve stolici po podání suplementu může být způsobeno změnou složení mikrobioty či fermentačního profilu aminokyselin, které jsou produkovány mikrobiálními kmeny. Bez znalosti přesného složení multivitaminového přípravku, který byl účastníkům studie podáván, je však obtížné popsat tento trend podrobněji.

Ve vzorcích moči dále došlo k poklesu kyseliny hippurové. Změny v koncentracích kyseliny hippurové však pravděpodobně nejsou plauzibilní. Kyselina hippurová je konjugátem glycinu a kyseliny benzoové a je v těle se běžně vyskytujícím metabolitem. Vzniká z dietních proteinů a také kyseliny chinové, která je odpovědná za biosyntézu esenciálních aminokyselin, jako je tryptofan, fenyalanin a tyrosin. Kyselina chinová se metabolizuje nejen na kyselinu hippurovou, ale také na antioxidační aminokyseliny a vitaminy (Pero 2010). Je tedy možné, že došlo k odlišnému metabolismu kyseliny chinové, kdy byl vznik kyseliny hippurové minoritní a došlo k nárůstu koncentrace aminokyselin či vitaminů. Přítomnost kyseliny hippurové v moči je také spojována s konzumací ovoce a zeleniny či ovocných a zeleninových šťáv (Krupp et al. 2012). Dále se její množství zvyšuje také po konzumaci kaka, kávy či čaje. Zvýšená konzumace především černého čaje obsahujícího kyselinu benzoovou, již byla spojena s významným ( $p=0,00017$ ) zvýšeným vylučováním kyseliny hippurové (Clifford et al. 2000). Narůstající množství kyseliny hippurové může být způsobeno také konzumací brusinkového džusu. Existuje možnost využití kyseliny hippurové jako močového antiseptika, díky efektu snížení pH moči (Bodel et al. 1959). Vzhledem k četnému výskytu kyseliny benzoové v běžných potravinách je možné, že došlo ke zvýšenému příjmu těchto potravin v kontrolním rameni a v důsledku zvýšené konzumace těchto potravin bylo docíleno zvýšení hladiny kyseliny hippurové v moči účastníků, kteří nepřijímali doplňky stravy.

V intervenčním rameni byl zaznamenán nárůst koncentrace tyrosinu ve vzorcích moči ve srovnání s kontrolním ramenem. Tyrosin vzniká mikrobiální fermentací z bílkovin přijatých ze stravy (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Jedná se o aromatickou aminokyselinu, která přispívá k normální syntéze dopaminu (Daubner et al. 2011). Ke změně hladiny tyrosinu mohlo dojít přímo, v důsledku změny skladby mikrobioty a následnému posunu ve fermentačním profilu aminokyselin. Ke změně skladby mikrobioty mohlo dojít v důsledku neúplného vstřebání vitaminů v proximálním tenkém střevě a následné přímé modulaci mikrobioty či pomocí nepřímých mechanismů nebo systémové cirkulace.

Ve vzorcích stolice byl také pozorován nárůst butyrátu, výsledky však nebyly statisticky průkazné ( $p=0,38084$ ). Butyrát funguje jako energetický substrát pro buněčný metabolismus v epitelu tlustého střeva, působí jako silný inhibitor histonacetylázy a působí proti potlačení zánětu. Hlavními producenty butyrátu jsou bakterie kmene Firmicutes (Lin & Zhang 2017). Je tedy pravděpodobné, že došlo k nárůstu bakterií tohoto kmene a následné vyšší produkci butyrátu. Butyrát však může dále také vznikat z laktátu, který je přítomen ve stolici často pouze v zanedbatelné míře. Je tedy možné, že došlo k nárůstu laktátu, který se dále metabolizoval na butyrát. Ve vzorcích byl však pozorován u výskytu laktátu ve stolici mírný pokles, výsledky však nejsou statisticky průkazné a je tedy pravděpodobné, že jsou dílem náhody.

Další mastnou kyselinou s krátkým řetězcem hojně se vyskytující ve stolici je acetát, který je nezbytným metabolitem pro růst jiných bakterií. Acetát je v lidském těle využíván při metabolismu cholesterolu a lipogenezi (Rowland et al. 2018). Ve výsledcích byl však pozorován jeho pokles v intervenci oproti kontrole. Výsledky nebyly statisticky průkazné, a tak pravděpodobně nejsou plauzibilní. Kdyby však k poklesu acetátu došlo, ovlivní tento pokles skladbu mikrobiálního profilu. Např. pro *Faecalibacterium prausnitzii* je výskyt acetátu limitujícím faktorem pro její růst. *F. prausnitzii* je producentem např. butyrátu a je tedy možné, že pokles této bakterie ve střevě by mohl způsobit také nižší výskyt butyrátu. Koncentrace butyrátu v této studii však rostly, a tak není pravděpodobné, že k poklesu množství této bakterie či acetátu došlo.

Enzymatická aktivita, ke které dochází mezi mikrobiotou a hostitelem, je součástí přeměny cholinu na toxické metylaminy (Tremaroli & Bäckhed 2012). Ve výsledcích studie byl pozorován nárůst cholinu, avšak byl také statisticky neprůkazný. Cholin je součástí buněčných membrán a je získáván převážně z potravy, nicméně může být syntetizován i hostitelem. Střevní mikrobiota cholin dále metabolizuje na trimethylamin, jehož nárůst byl ve výsledcích studie také pozorován. Trimethylamin však může být metabolizován také z L-karnitinu či fosfatidylcholinu. Trimethylamin může být dále metabolizován v játrech na trimethylamin-N-oxid (TMAO), proaterogenní a protrombogenní látku – tato transformace může snížit hladiny biologicky dostupného cholinu (Tremaroli & Bäckhed 2012). Většina TMAO je však vyloučena za fyziologických okolností ledvinami do moči, jak bylo pozorováno i v našich výsledcích.

Je však nutné dodat, že mnoho našich výsledků nebylo statisticky průkazných a ze vzorků moči a stolice analyzovaných pomocí metabolomiky lze odvozovat probíhající procesy v gastrointestinálním traktu pouze nepřímo. Studii by bylo vhodné doplnit o analýzu skladby střevního mikrobiomu.



## 7 Závěr

Po podávání multivitaminových doplňků stravy došlo k významné změně koncentrací tří metabolitů ve vzorcích moči a stolice. Bylo zjištěno, že po 10denní suplementaci multivitaminovými doplňky stravy došlo k nárůstu koncentrace treoninu ve vzorcích stolice oproti kontrolní skupině. Tento nárůst koncentrace treoninu ve vzorcích stolice po podání suplementu by mohl být způsoben změnami ve skladbě mikrobioty či změnami ve fermentačním profilu nejen aminokyselin v důsledku skladby mikrobiálních kmenů. Je však velmi obtížné tento trend popsat bez znalosti přesné skladby multivitaminového přípravku, který byl účastníkům studie podáván. Ve vzorcích moči účastníků studie konzumujících multivitaminové suplementy dále došlo k neočekávanému poklesu kyseliny hippurové, která je konjugátem glycinu a kyseliny benzoové a je metabolizována z kyseliny chinové. Předpokládáme tedy, že došlo k odlišnému metabolismu kyseliny chinové za minoritního vzniku kyseliny hippurové, a naopak dominantního vzniku jiných aminokyselin a vitaminů. Vyšší koncentrace kyseliny hippurové v kontrolním rameni jsou přisuzovány možnému vyššímu příjmu potravin s přirozeným vyšším výskytem kyseliny benzoové, jako je černý čaj, kakao, káva či ovocné šťávy. Suplementace vedla k nárůstu hladiny tyrosinu ve vzorcích moči ve srovnání s kontrolní skupinou, což by mohlo být způsobeno změnou skladby mikrobioty a následným posunem ve fermentačním profilu aminokyselin.

Byla potvrzena hypotéza, že suplementace multivitaminů vede ke změně složení mikrobiomu střeva, a tedy i stolice a metabolitů, které se v ní nacházejí. Aby byl objasněn přesný mechanismus těchto změn, bylo by zapotřebí provést další studie doplněné mimo jiné o analýzu složení střevního mikrobiomu.

## 8 Literatura

- Aghajanian P, Hall S, Wongworawat MD, Mohan S. 2015. The Roles and Mechanisms of Actions of Vitamin C in Bone: New Developments. *J Bone Miner Res* **30(11)**:1945-55 DOI: 10.1002/jbmr.2709.
- Agus A, Planchais J, Sokol H. 2018. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* **23(6)**:716-724 DOI: 10.1016/j.chom.2018.05.003.
- Ahmed SM, Lopman BA, Levy KA. 2013. Systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PloS ONE* 8 (e75922) DOI: 10.1371/journal.pone.0075922.
- Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Sharma A, Mai V, Rand KH, Wang GP. 2013. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:2884–2892.
- Antico A, Tampona M, Tozzoli R, Bizzaro N. 2012. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev.* **12(2)**:127-36 DOI: 10.1016/j.autrev.2012.07.007.
- Antony AC. (2003). Vegetarianism and vitamin B-12 (cobalamin) deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**:3–6 DOI:10.1093/ajcn/78.1.3.
- Bäckhed F, et al. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe* **17**:690–703.
- Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, Finlay BB. 2020. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity* **52(2)**:241-255 DOI: 10.1016/j.immuni.2020.01.007.
- Bas-Bellver C, et al. 2016. Effects of high doses of vitamin D 3 on mucosa - associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *Eur J Nutr.* **55**:1479–89 DOI:10.1007/s00394-015-0966-2.
- Bashir M, Prietl B, Tauschmann M, Mautner SI, Kump PK, Treiber G, Wurm P, Gorkiewicz G, Högenauer C, Pieber TR. 2016. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *European Journal of Nutrition* **55**:1479–1489.
- Bechthold A. 2015. New reference values for Vitamin C intake. *Ann Nutr Metab* **67(1)**:13-20 DOI: 10.1159/000434757.
- Bezabeh T, Somorjai RL, Smith ICP. 2009. MR metabolomics of fecal extracts: Applications in the study of bowel diseases. *Magnetic Resonance in Chemistry* **47**.
- Biesalski HK. 2016. Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1372**:53–64.
- Bifari F, Ruocco C, Decimo I, Fumagalli G, Valerio A, Nisoli E. 2017. Amino acid supplements and metabolic health: a potential interplay between intestinal microbiota and systems control. *Genes Nutr* **12**, 27 DOI:10.1186/s12263-017-0582-2.
- Bischoff-Ferrari HA, et al. 2006. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**:18-28 DOI: 10.1093/ajcn/84.1.18.
- Blaser M. 2010. *Helicobacter pylori* and esophageal disease: wake upcall?. *Gastroenterology* **139**:1819-1822 DOI:10.1053/j.gastro.2010.10.037.

- Bodel PT, Cotran R, Kass EH. 1959. Cranberry juice and the antibacterial action of hippuric acid. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **54**:881-888.
- Brüssow H. 2020. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb Biotechnol.* **13**(2):423-434 DOI: 10.1111/1751-7915.13479.
- Cani PD. 2019. Microbiota and metabolites in metabolic diseases. *Nat Rev Endocrinol.* **15**(2):69-7 DOI: 10.1038/s41574-018-0143-9.
- Canueto D, Gomez J, Salek RM, Correig X, Canellas N. 2018. rDolphin: A GUI R package for proficient automatic profiling of 1D H-1-NMR spectra of study datasets. *Metabolomics*, 14-24 DOI:10.1007/s11306-018-1319-y.
- Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N. 2011. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* **12**:50 DOI: 10.1186/gb-2011-12-5-r50.
- Carr AC, Maggini S. 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients* 9, **11**:1211 DOI:10.3390/nu9111211.
- Clifford MN, Copeland EL, Bloxsidegeoe JP, Mitchell LA. 1956. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. Available from [www.tandf.co.uk](http://www.tandf.co.uk).
- Cresci GA, Bawden E. 2015. Gut microbiome: What we do and don't know. *Nutr Clin Pract.* **30**(6):734-46 DOI:10.1177/0884533615609899.
- Cui Q, Lewis IA, Hegeman AD, Anderson ME, Li J, Schulte CF, Westler WM, Eghbalian HR, Sussman MR, Markley JL. 2008. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol* **26**:162-164 DOI: 10.1038/nbt0208-162.
- Dai Z, Koh WP. 2015. B-vitamins and bone health—a review of the current evidence. *Nutrients* **7**:3322-3346 DOI:10.3390/nu7053322.
- Daubner SC, Le T, Wang S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* **508**(1):1-12 DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
- David LA, et al. 2013. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**:559-563 DOI:10.1038/nature12820.
- Degnan PH, Taga ME, Goodman AL. 2014. Vitamin B12 as a modulator of gut microbial ecology. *Cell Metab.* **20**(5):769-778 DOI: 10.1016/j.cmet.2014.10.002.
- Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, Antonopoulos DA, Jabri B, Chang EB. 2012. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10<sup>-/-</sup> mice. *Nature* **487**:104-108 DOI: 10.1038/nature11225.
- Duarte IF, Diaz SO, Gil AM. 2014. NMR metabolomics of human blood and urine in disease research. *J Pharm Biomed Anal.* **93**:17-26 DOI:10.1016/j.jpba.2013.09.025.
- Eggersdorfer M, Wyss A. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys.* **652**:18-26 DOI:10.1016/j.abb.2018.06.001.
- Emwas AH, et al. 2019. Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **7**:123 DOI: 10.3390/metabo9070123.
- Esophageal Sphincter Device for Gastroesophageal Reflux Disease. 2013. *New England Journal of Medicine* **368**:2038–2040.
- Everett JR. 2015. A new paradigm for known metabolite identification in metabonomics/metabolomics: metabolite identification efficiency. *Comput Struct Biotechnol. J.* **13**:131-144 DOI:10.1016/j.csbj.2015.01.002.

- Faith JJ, Guruge JL, Chabronneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, Clemente JC, Knight R, Heath AC, Leibel RL. 2013. The long-term stability of the human gut microbiota, *Science* 341. DOI: 10.1126/science.1237439.
- Fiedor J, Burda K. 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6:466–488.
- Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:17994-17999 DOI: 10.1073/pnas.0807920105.
- Ford AH, Almeida OP. 2019. Effect of Vitamin B Supplementation on Cognitive Function in the Elderly: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs Aging* 36(5):419-434 DOI: 10.1007/s40266-019-00649-w.
- Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, Faruqi AA, Jang S, Johnson CC, Boushey HA, Zoratti E, Ownby D, Lukacs NW, et al. 2014. House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:805-810 DOI: 10.1073/pnas.1310750111.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, et al. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446-450 DOI: 10.1038/nature12721.
- Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. 2006. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *American Journal of Public Health* 96.
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. 2009. Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective. *Ann Epidemiol.* 19(7):468-83 DOI: 10.1016/j.annepidem.2009.03.021.
- Gebregiorgis T, Powers R. 2012. Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers. *Page Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 15(8):595-610 DOI: 10.2174/138620712802650522.
- Giraudeau P, Silvestre V, Akoka S. 2015. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: A tutorial review. *Metabolomics* 11:1041–1055 DOI:10.1007/s11306-015-0794-7.
- Girbovan A, Sur G, Samasca G, Lupan I. 2017. Dysbiosis a risk factor for celiac disease. *Med Microbiol Immunol.* 206(2):83-91 DOI:10.1007/s00430-017-0496-z.
- Gogová, V. 2021. Nákupní chování spotřebitelů na trhu s doplňky stravy [Diploma Thesis]. Masarykova Univerzita, Brno.
- Gomaa EZ. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113(12):2019-2040 DOI: 10.1007/s10482-020-01474-7.
- Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. 2018. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* 9(4):308-325 DOI: 10.1080/19490976.2018.1465157.
- Green R, et al. 2017. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17040 DOI: 10.1038/nrdp.2017.40.
- Guo B, Yang B, Pang X, Chen T, Chen F, Cheng KW. 2019. Fucoxanthin modulates cecal and fecal microbiota differently based on diet. *Food Funct.* 10(9) DOI:10.1039/c9fo01018a.

- Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. 2011. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* **35(1)**:13-22 DOI:10.1016/j.immuni.2011.07.002.
- Heaney RP. 2008. Vitamin D in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**:1535–1541 DOI:10.2215/CJN.01160308.
- Heianza Y, Ma W, Manson JAE, Rexrode KM, Qi L. 2017. Gut microbiota metabolites and risk of major adverse cardiovascular disease events and death: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *J Am Heart Assoc.* **6(7)** DOI: 10.1161/JAHA.116.004947.
- Heikinheima RJ, et al. 1992. Annual injection of vitamin D and fractures of aged bones. *Calcif Tissue Int* **51**:105-10 DOI: 10.1007/BF00298497.
- Hemilä H. 2004. Vitamin C Supplementation and Respiratory Infections: a Systematic Review. *Mil Med.* **169(11)**:920-5 DOI: 10.7205/milmed.169.11.920.
- Hernandez N, Artacho A, Betoret N, Gosalbes MJ. 2020. Valorization of Persimmon and Blueberry Byproducts to Obtain Functional Powders: In Vitro Digestion and Fermentation by Gut Microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68(30)**. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c02088.
- Hoffman LR, et al. 2014. Escherichia coli dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clinical Infectious Diseases* **58**:396–399 DOI: 10.1093/cid/cit715.
- Holick MF. 2003. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 296–307 DOI: 10.1002/jcb.10338
- Holick MF. 2007. Optimal Vitamin D Status for the Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Drugs Aging* **24(12)**:1017-29 DOI: 10.2165/00002512-200724120-00005.
- Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Connor SC, Connelly JC, Haselden JN, Damment SJP, Spraul M, Neidig P, Nicholson JK. 2000. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:471–478 DOI: 10.1002/(sici)1099-1492(199806/08)11:4/5<235::aid-nbm507>3.0.co;2-v.
- Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Van de Wiele T. 2011. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr Rev.* **69(5)**:245-58 DOI: 10.1111/j.1753-4887.2011.00388.x.
- Hua X, Goedert JJ, Pu A, Yu G, Shi J. 2016. Allergy associations with the adult fecal microbiota: Analysis of the American Gut Project. *EBioMedicine* **3**:172–179 DOI:10.1016/j.ebiom.2015.11.038.
- Hufnagl K, Pali-Schöll I, Roth-Walter F, Jensen-Jarolim E. 2020. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol.* **42(1)**:75-93 DOI: 10.1007/s00281-019-00775-y.
- Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **519**:92-96 DOI: 10.1038/nature14232.
- Iebba V, et al. 2016. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARy. *New Microbiologica* **39(1)**:1-12.
- Jézéquel T, Deborde C, Maucourt M, Zhendre V, Moing A, Giraudeau P. 2015. Absolute quantification of metabolites in tomato fruit extracts by fast 2D NMR. *Metabolomics* **11**:1231–1242 DOI: 10.1007/s11306-015-0780-0.

- Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. 2019. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Curr Allergy Asthma Rep.* **19(4)**:22 DOI: 10.1007/s11882-019-0851-9.
- Kimura I, Inoue D, Hirano K, Tsujimoto G. 2014. The SCFA receptor GPR43 and energy metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**:85 DOI: 10.3389/fendo.2014.00085.
- Krupp D, Doberstein N, Shi L, Remer T. 2012. Hippuric acid in 24-hour urine collections is a potential biomarker for fruit and vegetable consumption in healthy children and adolescents. *Journal of Nutrition* **142**:1314–1320 DOI:10.3945/jn.112.159319.
- LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol.* **24(2)**:160-8 DOI: 10.1016/j.copbio.2012.08.005.
- Lehmann B, Meurer M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther.* **23(1)**:2-12 DOI: 10.1111/j.1529-8019.2009.01286.x.
- Lemon KP, Armitage GC, Relman DA, Fischbach MA. 2012. Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. *Sci. Transl. Med.* **4**:137 DOI: 10.1126/scitranslmed.3004183.
- Levy M, Thaiss CA, Elinav E. 2016. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system DOI: 10.1101/gad.284091.
- Lewis IA, Schommer SC, Markley JL. 2009. rNMR: open source software for identifying and quantifying metabolites in NMR spectra. *Magn Reson Chem* **47**:123-126 DOI: 10.1002/mrc.2526.
- Lin L, Zhang J. 2017. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* **18(1)**:2. DOI:10.1186/s12865-016-0187-3.
- Long KZ, et al. 2007. Vitamin A supplementation has divergent effects on norovirus infections and clinical symptoms among Mexican children. *The Journal of infectious diseases* **196**:978–985 DOI: 10.1086/521195.
- Long KZ, et al. 2011. Vitamin A modifies the intestinal chemokine and cytokine responses to norovirus infection in Mexican children. *J Nutr* **141**:957–963 DOI: 10.3945/jn.110.132134.
- Louis P, Flint HJ. 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* **19(1)**:29-41 DOI: 10.1111/1462-2920.13589.
- Louis P, Hold GL, Flint HJ. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* **12**:661–672 DOI: 10.1038/nrmicro3344.
- Luthold RV, Fernandes GR, Franco-de-Moraes AC, Folchetti LGD, Ferreira SRG. 2017. Gut microbiota interactions with the immunomodulatory role of vitamin D in normal individuals. *Metabolism* **69**:76–86 DOI: 10.1016/j.metabol.2017.01.007.
- Mao X, Zeng X, Qiao S, Wu G, Li D. 2011. Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function. *Frontiers in Bioscience* **3(4)**:1192-200 DOI: 10.2741/e322.
- Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalian HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* **43**:34-40 DOI: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
- Marques CDL, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte ALBP. 2010. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Bras J. Rheumatol* **50(1)**:67-80.
- McFal-Ngai M. 2007. Adaptive immunity: care for the community. *Nature* **445**:153 DOI: 10.1038/445153a.

- Medical Association A. 2018. Vitamin and Mineral Supplements What Clinicians Need to Know. *JAMA* **319**(9):859-860 DOI: 10.1001/jama.2017.21012.
- Mendez R, Kesh K, Arora N, Martino L Di, McAllister F, Merchant N, Banerjee S, Banerjee S. 2020. Microbial dysbiosis and polyamine metabolism as predictive markers for early detection of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **41**:561–570 DOI: 10.1093/carcin/bgz116.
- Mikkelsen K, Stojanovska L, Prakash M, Apostolopoulos V. 2017. The effects of vitamin B on the immune/cytokine network and their involvement in depression. *Maturitas* **96**:58-71 DOI:10.1016/j.maturitas.2016.11.012.
- Ministerstvo zemědělství. 2008. Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin Příl.5. eAGRI. Available from <https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html> (accessed April 2023).
- Mirvish SS. 1995. CANCER LETTERS Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters* **93**(1):17-48 DOI: 10.1016/0304-3835(95)03786-V.
- Moran NE, Mohn ES, Hason N, Erdman JW, Johnson EJ. 2018. Intrinsic and extrinsic factors impacting absorption, metabolism, and health effects of dietary carotenoids. *Advances in Nutrition* **9**:465–492 DOI: 10.1093/advances/nmy025.
- Nair R, Maseeh A. 2012. Vitamin D: The sunshine vitamin. *J Pharmacol Pharmacother* **3**(2):118-26 DOI: 10.4103/0976-500X.95506.
- National Institutes of Health – Office of Dietary Supplements. 2011. Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Vitamins. National Institutes of Health. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56068/table/summarytables.t2/?report=objectonly> (accessed April 2023).
- Oh RC, Brown DL. 2003. Vitamin B 12 Deficiency Clinical Manifestations of Vitamin B 12 Deficiency. *Am Fam Physician* **67**(5):979-86.
- Oliphant K, Allen-Vercoe E. 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* **7**:91 DOI: 10.1186/s40168-019-0704-8.
- Olson JA. 1999. Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. **49**(3 **Suppl 1**):7-11.
- Ooi JH, Li Y, Rogers CJ, Cantorna MT. 2013. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate – induced colitis 1 – 3. *J Nutr*. **143**:1679–86 DOI: 10.3945/jn.113.180794.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* **5**:48 DOI: 10.1186/s40168-017-0268-4.
- Pero RW. 2010. Health Consequences of Catabolic Synthesis of Hippuric Acid in Humans. *Current Clinical Pharmacology* **5**(1):67-73 DOI: 10.2174/157488410790410588.
- Ransley JK, Donnelly JK, Read NW. 2003. Food and Nutritional Supplements. *British Journal of Nutrition* **88** DOI: 10.1079/BJN2002597.

- Rautiainen S, Manson JE, Lichtenstein AH, Sesso HD. 2016. Dietary supplements and disease prevention—a global overview. *Nat Rev Endocrinol.* **12(7)**:407-20 DOI: 10.1038/nrendo.2016.54.
- Rock CL. 2007. Multivitamin-multimineral supplements: who uses them? *Am J Clin Nutr.* **85(1)**:277-279 DOI: 10.1093/ajcn/85.1.277S.
- Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. 2007. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* **67(3)**:574-587 DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314903.
- Rosner J. 2014. Ten times more microbial cells than body cells in humans? *Microbe* **9**:47 DOI: 10.1128/microbe.9.47.2.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* **57(1)**:1-24 DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8.
- Russell WR, et al. 2011. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *American Journal of Clinical Nutrition* **93**:1062–1072 DOI:10.3945/ajcn.110.002188.
- Salazar N, Valdés-Varela L, González S, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG. 2017. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes* **8(2)**:82-97 DOI: 10.1080/19490976.2016.1256525.
- Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. 2016. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends Neurosci* **39(11)**:763-781 DOI: 10.1016/j.tins.2016.09.002.
- Seetharam B, Alpers DH. 1982. Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu. Rev. Nutr.* **2**:343–369 DOI: 10.1146/annurev.nu.02.070182.002015.
- Smith AD, Warren MJ, Refsum H. 2018. Vitamin B12. *Advances in Food and Nutrition Research* **83**:215-279 DOI: 10.1016/bs.afnr.2017.11.005.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doraé J. 2009. Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**:1183–1189 DOI:10.1002/ibd.20903.
- Stabler SP, Allen RH. 2004. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu. Rev. Nutr.* **24**:299–326 DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132440
- Steinert J, et al. 2019. Vitamins for the Gut Microbiome. *Trends in Molecular Medicine* **43** DOI:10.1016/j.molmed.2019.11.005.
- Sunycz JA. 2008. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **4(4)**:827-36 DOI: 10.2147/tcrm.s3552.
- Takenaka S, Sugiyama S, Ebara S, Miyamoto E, Abe K, Tamura Y, Watanabe F, Tsuyama S, Nakano Y. 2001. Feeding dried purple laver (nori) to vitamin B12-deficient rats significantly improves vitamin B12 status. *Br. J. Nutr.* **85**:699–703 DOI: 10.1079/bjn2001352.
- Tanioka Y, Miyamoto E, Yabuta Y, Ohnishi K, Fujita T, Yamaji R, Misono H, Shigeoka S, Nakano Y, Inui H, Watanabe F. 2010. Methyladeninylcobamide functions as the cofactor of methionine synthase in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis* NIES-39. *FEBS Lett.* **584**:3223–3226 DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.013.
- Thaiss CA, et al. 2014. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* **159**:514-529 DOI:10.1016/j.cell.2014.09.048.



- Thornton KA, Mora-Plazas M, Marin C, Villamor E. 2014. Vitamin A deficiency is associated with gastrointestinal and respiratory morbidity in school-age children. *J Nutr* **144**: 496–503 DOI: 10.3945/jn.113.185876.
- Tillisch K, et al. 2013. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* **144**:1394-1401 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.02.043.
- Tremaroli V, Bäckhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**:242–249 DOI: 10.1038/nature11552.
- Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. 2003. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomized double blind controlled trial. *BMJ* **326**:469-75 DOI: 10.1136/bmj.326.7387.469.
- Tsiaras WG, Weinstock MA. 2011. Factors influencing vitamin d status. *Acta Derm Venereol.* **91**(2):115-24 DOI: 10.2340/00015555-0980.
- Vedder EB, Washington DC. 1938. The pathology of beri beri. *JAMA* **110**(12):893–896 DOI: 10.1001/jama.1938.62790120007009.
- Wang H, Shou Y, Zhu X, Xu Y, Shi L, Xiang S, Feng X, Han J. 2019. Stability of vitamin B12 with the protection of whey proteins and their effects on the gut microbiome. *Food Chemistry* **276**:298–306 DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.033.
- Wang S, Dong W, Liu L, Xu M, Wang Y, Liu T, Zhang Y, Wang B, Cao H. 2019. Interplay between bile acids and the gut microbiota promotes intestinal carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* **58**:1155–1167 DOI: 10.1002/mc.22999.
- Waterhouse M, Hope B, Krause L, Morrison M, Protani MM, Zakrzewski M, Neale RE. 2019. Vitamin D and the gut microbiome: a systematic review of in vivo studies. *European Journal of Nutrition* **58**:2895–2910 DOI: 10.1007/s00394-018-1842-7.
- Wei S, Zhang J, Liu L, Ye T, Gowda GA, Tayyari F, Raftery D. 2011. Ratio analysis nuclear magnetic resonance spectroscopy for selective metabolite identification in complex samples. *Anal. Chem.* **83**:7616-7623 DOI: 10.1021/ac201625f.
- Windey K, de Preter V, Verbeke K. 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res.* **56**(1):184-96 DOI: 10.1002/mnfr.201100542.
- Wishart DS. 2008. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry* **27**:228–237 DOI: 10.1016/j.trac.2007.12.001.
- Wu GD, et al. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**:105–108 DOI: 10.1126/science.1208344.
- Yamamoto EA, Jørgensen TN. 2020. Relationships Between Vitamin D, Gut Microbiome, and Systemic Autoimmunity. *Front Immunol.* **10**:3141 DOI: 10.3389/fimmu.2019.03141.
- Yatsunenkov T, et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486** (7402):222-227 DOI: 10.1038/nature11053.
- Yong E. 2016. Obsahují davy: O mikrobech v nás, kolem nás a o jejich fascinujícím vlivu na náš život. Jan Melvil Publishing, Brno.
- Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. 2019. Metabolism of dietary and microbial vitamin b family in the regulation of host immunity. *Sec. Nutrition and Microbes* **6** DOI: 10.3389/fnut.2019.00048.
- Zeisel SH, Da Costa KA. 2009. Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr Rev.* **67**(11):615-23 DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x.

Zhao L. 2013. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:639-647 DOI: 10.1038/nrmicro3089.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

1D	Jednorozměrné
2D	Dvourozměrné
AhR	Aryl uhlovodíků
CA	Kanada
CTDS	Kolon cílené transportní systémy
CZ	Česká republika
DACH	Německy mluvící země – Německo (D), Rakousko (A), Švýcarsko (CH)
DDD	Doporučená denní dávka
DE	Německo
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ESP	Španělsko
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
FFAR3	Receptor volných mastných kyselin
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GLP-1	Glukagon-like peptid
GPCR	Receptor spřažený s G-proteinem
GPR43	Receptor mastných kyselin s krátkým řetězcem
IEL	Intraepiteliální lymfocyty
ILC	Přirozené lymfoidní buňky
ILF	Izolované lymfoidní folikuly
IU	Mezinárodní jednotka
L-buňky	Vysoce specializované střevní endokrinní buňky produkující inkretiny
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MVMM	Multivitaminové a multiminerálové doplňky
NAFLD	Nealkoholové ztučnění jater
NHANES III	Třetí národní průzkum zdraví a výživy
NK buňky	Natural killer cells
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NOC	N-nitroso sloučeniny
PCA	Analýza hlavních komponent
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SFB	Segmentované vláknité bakterie
Th17	Pomocné T lymfocyty
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
UK	Spojené království
USA	Spojené státy americké
UVB	Středněvlnné ultrafialové záření

## 10 Seznam tabulek a obrázků

### Tabulky

Tabulka 1 Doporučený denní příjem vitaminů (National Institutes of Health 2011).....	19
Tabulka 2 Metabolity identifikované v NMR spektru.....	35
Tabulka 3 Wilcoxonův test.....	37

### Obrázky

Obrázek 1 Mechanismus spojující molekuly produkované mikrobiotou s metabolismem (Cani 2019).....	16
Obrázek 2 Mechanismus tří vzájemně propojených cest účinku vitaminové suplementace zaměřené na tlusté střevo (Steinert et al. 2019).....	26
Obrázek 3 Design studie.....	31
Obrázek 4 Postup přípravy vzorků pro NMR analýzu.....	32
Obrázek 5 NMR spektrum stolice a identifikované metabolity.....	34
Obrázek 6 NMR spektrum moči a identifikované metabolity.....	35
Obrázek 7 PCA analýza ukazující mírnou separaci vzorků pro komponenty PC1 a PC2, PC4 a PC5.....	36
Obrázek 8 Boxploty statisticky průkazně odlišných látek.....	38

