

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Růst střevní mikrobioty na enterálních výživách**

**Bakalářská práce**

**Anna Jelínková**

**Obor studia Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce doc. Ing. Věra Neuzil Bunešová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Růst střevní mikrobioty na enterálních výživách " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Nežil Bunešové, Ph.D. a Ing. Nikol Modráčkové za jejich odborné vedení, cenné rady a zaučení v laboratorních pracích. Dále bych ráda poděkovala ostatním pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za jejich pomoc a rady v laboratoři. A v neposlední řadě Romině Vezo, která s námi pracovala na laboratorních rozborech.

## Růst střevní mikrobioty na enterálních výživách

### Souhrn

Střevní mikrobiota je důležitou součástí člověka, která ovlivňuje jeho zdraví. S počtem buněk až  $10^{14}$ , jejich mezibuněčnou komunikací a komunikací s hostitelem by se dala označit za samostatný orgán. Její složení se mění s věkem, je ovlivněno způsobem narození, zdravím jedince, dietou a prostředím, ve kterém jedinec žije. Složení mikrobioty se v dospělosti, za předpokladu, že se jedná o zdravého člověka, nijak zásadně nemění, pokud není velká změna v dietě či prostředí. Zastoupení jednotlivých kmenů se liší v případě nemoci. Pacienti s Crohnovou chorobou se potýkají s významnou dysbiózou a bohužel zatím nebyl vyvinut účinný lék či léčebná metoda. Jednou z možností zmírnění příznaků je aplikace enterální výživy. Cílem práce bylo analyzovat pomocí kultivačních technik kvalitativní a kvantitativní mikrobiální složení fekálních vzorků kultivovaných na různých enterálních výživách *in vitro*. Zjistit tak, zda rozdíl ve složení určitých komponent může mít vliv na složení střevního mikrobiomu pacientů s Crohnovou nemocí (CD). Vzorky pacientů s CD se nepodařilo získat v požadované kvalitě, tak byly analyzovány vzorky zdravých jedinců. Studie probíhala na vzorcích stolice deseti účastníků, kteří dodali vzorky do 3 hodin po defekaci. Tyto vzorky byly posléze analyzovány a kultivovány ve čtyřech různých enterálních výživách (EN; Fortini Multi Fibre, Fresubin Energy Fibre, Renutryl Booster a Ensure Plus Advance). Tyto výživy se liší svým složením, zejména v množství prebiotických složek a vitamínů, proto jsme předpokládali, že toto bude mít vliv na množství vykultivovaných bakterií. Kvantifikovány byly bifidobakterie, laktobacili, *E. coli* a celkové počty anaerobních bakterií. Kvantifikace byla provedena pomocí deskové kultivační metody na příslušných médiích. Celkové počty anaerobních bakterií dosáhly více než  $10^9$  KTJ/g a u jednotlivých EN byly podobné i u původních vzorcích stolice (FS). Stejný trend byl pozorován u dalších dvou detekovaných skupin. Lactobacily vykazovaly v průměru počty  $6,21 \pm 2,43$  až  $6,71 \pm 2,59$  log KTJ/g, což bylo téměř o 1,5 řádu vyšší než u FS. Průměrné množství detekovaných bakterií *E. coli* ve vzorcích stolice bylo okolo 5 log KTJ/g, nárůst *E. coli* u EN se pohyboval v rozmezí  $3,50 \pm 1,86$  až  $6,21 \pm 2,74$  log KTJ/g. Bifidobakterie byly detekovány v signifikantně nižších počtech okolo  $10^7$  KTJ/g u Fortini Multi Fibre při porovnání s původním FS. Ostatní EN nevykazovaly zlepšení růstu bifidobakterií a umožnily jim růst pouze v rozsahu  $10^7$ – $10^9$  KTJ/g. Výsledky naznačují, že rozdílné složení a množství prebiotických složek a vitamínů ovlivnilo počty kultivovaných bakterií v *in vitro* experimentu, a může mít vliv na kvantitu a druhové složení mikroorganismů ve vzorcích stolice konzumentů.

**Klíčová slova:** Crohnova choroba; enterální výživa; prebiotika; stolice; kultivace



## Growth of intestinal microbiota on enteral nutrition

### Summary

The gut microbiota is very important part of human, which has an influence on human health. With the number of cells up to  $10^{14}$ , their cell-to-cell communication and communication with host it could be described as a body organ. It's composition is changed with age, mode of delivery, health, diet, and environment of living. Composition of gut microbiota of healthy adult is stable throughout his life, if there are not any big diet or environmental changes. In case of disease the composition of gut microbiota is changed. Patients with Crohn's disease (CD) must fight with significant dysbiosis and even nowadays the disease can't be cured completely. One of the methods of treatment is use of enteral nutrition. The aim of this study was to analyze and quantify microbial changes of faecal samples after their *in vitro* cultivation in various polymeric EN formulas using plate technique method. We assume that the difference of composition of various components would affect the composition of gut microbiota in CD patients. We could not get samples of CD patients in required quality, thus we had to analyse samples of healthy individuals. Ten faecal samples have been studied. They were analysed no longer than three hours after defecation. These samples were further analysed and cultivated in four various enteral nutritions (EN; Fortini Multi Fibre, Fresubin Energy Fibre, Renutryl Booster a Ensure Plus Advance). These EN differed in composition, especially in prebiotic and vitamin content. Therefore, we assumed that will affect the number of cultivated bacteria. We quantified bifidobacteria, lactobacilli, *E. coli* and total counts of anaerobic bacteria. Analysis was performed using plate technique with appropriate media. Total counts of anaerobic bacteria reached more than  $10^9$  CFU/g and were similar among each variant of EN formula and as well in comparison to the FS itself. The same trend was also detected in the other two monitored groups. Lactobacilli exhibited average numbers of  $(6.21 \pm 2.43)$ –  $(6.71 \pm 2.59)$  log CFU/g, that is almost 1.5 order of magnitudes higher than in FS. Average number of *E. coli* bacteria detected in FS was 5 log CFU/g, after cultivation in EN the number has increased to  $3.50 \pm 1.86$  to  $6.21 \pm 2.74$  log CFU/g. Bifidobacteria were detected in significantly decreased numbers, around  $10^7$  CFU/g in Fortini Multi Fibre in comparison with FS. Other EN formulas do not appear to have enhanced their growth and enabled bifidobacteria to grow in range  $10^7$ – $10^9$  CFU/g. Our results indicate that the different composition and amount of prebiotic components and vitamins affected numbers of cultivated bacteria in *in vitro* experiment. That could affect quantity and composition of bacterial species in faecal samples.

**Keywords:** Crohn's disease, Enteral nutrition, Prebiotics, Faeces, Cultivation

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Hypotéza</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Střevní mikrobiota a její složení</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Význam střevní mikrobioty</b>	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>Jednotlivé kmeny mikroorganismů a jejich význam</b>	<b>14</b>
3.3.1	Kmen Bacteroidetes	14
3.3.2	Kmen Firmicutes	15
3.3.3	Kmen Proteobacteria	15
3.3.4	Kmen Actinobacteria	16
<b>3.4</b>	<b>Složení mikrobioty ve vztahu ke zdraví</b>	<b>16</b>
3.4.1	Dysbióza a její příčiny a důsledky	16
<b>3.5</b>	<b>Kultivovatelné druhy mikroorganismů ve střevní mikrobiotě</b>	<b>17</b>
<b>3.6</b>	<b>Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty</b>	<b>18</b>
3.6.1	Probiotika, prebiotika, postbiotika	18
3.6.2	Vitamíny	20
3.6.3	Dieta	20
3.6.3.1	Enterální výživa	21
<b>3.7</b>	<b>Mikrobiota pacientů s IBD</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Získání a příprava vzorku</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Detekce testovaných bakteriálních skupin ve stolici</b>	<b>25</b>
4.2.1	Příprava médií	25
4.2.2	Rozbor vzorků	26
<b>4.3</b>	<b>Vyhodnocení počtu detekovaných bakterií</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Detekce testovaných bakteriálních skupin v enterálních výživách kultivovaných se stolicí</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistické zpracování dat</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Detekované počty kultivovatelných komenzálních bakterií</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>34</b>

# 1 Úvod

Mikrobiota a její složení má významný vliv na zdraví člověka. Vyvíjí se po celý život, a ovlivňuje imunitní systém, zdraví střev i psychiku člověka. Životní styl a prostředí jsou zásadní faktory ovlivňující naši mikrobiotu. Mikroorganismy, které mikrobiotu tvoří, žijí ve společenství, které se, je-li zdravé, navzájem podporuje v růstu, pomáhá svému hostiteli trávit nestravitelné části potravy, vytváří energii pro střevní buňky, tvoří část imunitního systému a vytváří důležité metabolity, jako například různé vitamíny a látky ovlivňující imunitní systém. Pokud se však tato rovnováha poruší, nastává dysbióza a stav nemoci. Tyto nemoci z velké části patří k takzvaným civilizačním chorobám, jako například obezita, metabolický syndrom či chronické záněty střeva. Příkladem chronického zánětu střeva je Crohnova choroba, která se vyznačuje významnou dysbiózou, zánětem GIT, narušeným trávením a řadí se též k civilizačním chorobám. Počet nemocných každým rokem narůstá a příčiny bohužel zatím nejsou přesně známy. Na tuto nemoc zatím nebyl nalezen účinný lék, proto se používají různé metody na potlačení příznaků. Jednou z těchto metod je i enterální výživa, roztok, který obsahuje všechny potřebné živiny v předepsaném poměru. U mírnějších forem nemoci lze podávat enterální výživu pouze doplňkově, u silnějších forem lze přistoupit pouze k enterální výživě. Enterálních výživ je více značek a typů které se liší ve složení – obsahu jak základních živin, tak vitamínů a zejména pak prebiotik. Je známo, že enterální výživa při léčbě pomáhá, přesný mechanismus účinku enterální výživy není však zcela znám. Otázkou je, jaký účinek při tom hrají právě například prebiotické substráty, jelikož jejich vliv je pro složení střevní mikrobioty významný.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je analyzovat pomocí kultivačních technik kvalitativní a kvantitativní mikrobiální složení fekálních vzorků kultivovaných na různých enterálních výživách *in vitro*. Zjistit tak, zda by rozdíl ve složení určitých komponent mohl mít vliv na složení střevního mikrobiomu pacientů s Crohnovou nemocí.

## **2.1 Hypotéza**

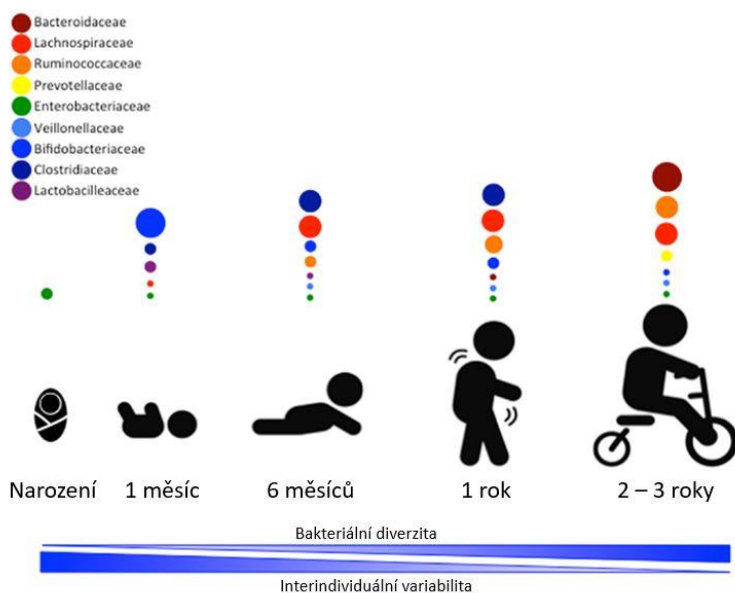
Předpokládáme, že rozdílné složení a množství prebiotických složek a vitamínů bude mít vliv na složení a množství kultivovatelných mikroorganismů ve vzorcích stolice.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Střevní mikrobiota a její složení

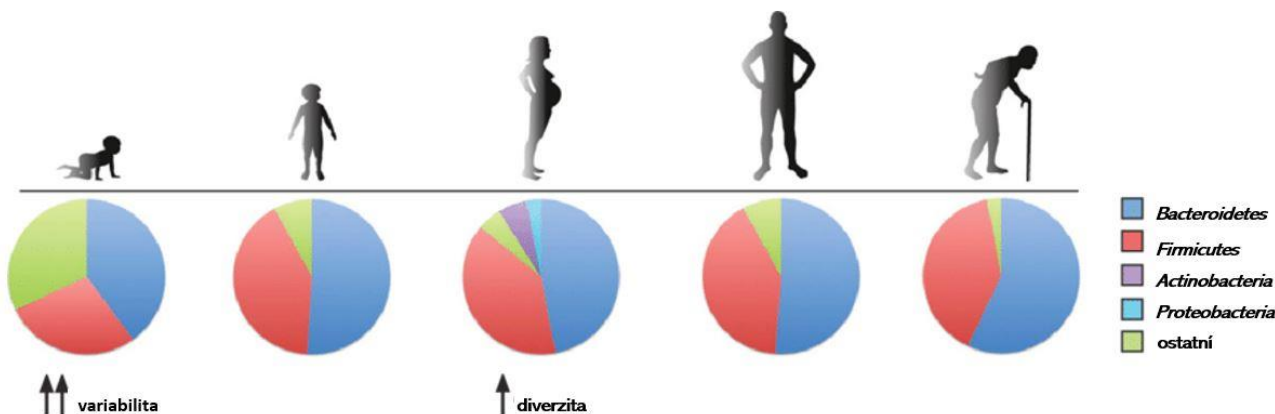
Mikroorganismy se vyskytují v celé trávicí trubici, od úst až po tlusté střevo. Jejich počet se vzdáleností od úst vzrůstá, tj. v tlustém střevě nalezneme mikroorganismů nejvíce. Každý člověk má ve svém trávicím traktu  $10^{13}$ – $10^{14}$  mikrobiálních buněk (Sender, R. et al. 2016, Thursby & Juge 2017). Souhrnně se tyto buňky nazývají mikrobiota. V počtu genů nás tyto buňky převyšují až stokrát. Takto vysoká množství dělají ze střevní mikrobioty samostatný orgán, který zastává mnoho fyziologických vlastností – využívá živiny, má metabolismus, rezistenci vůči nemocem, vytváří látky potřebné pro imunitu (Wexler & Goodman 2017, Wong et al. 2006). Mikrobiota se začíná vytvářet při porodu, ačkoli některé studie ukazují, že v placentě zdravých matek se vyskytuje malé množství bakterií (Aagaard K. et al. 2014, Gschwind et al. 2020). Nejdůležitější úlohu u prvotní mikrobioty má způsob porodu. Při porodu vaginální cestou se do trávicí trubice dostává vaginální mikrobiota, jako například bakterie rodu *Lactobacillus* (Yatsunenko et al. 2012). Při porodu císařským řezem se do trávicí trubice dítěte dostávají bakterie z okolí, velice často to bývají bakterie kmene Bacteroidetes, například rod *Clostridium* (Thursby & Juge 2017). Proto je důležité dítě dostat do kontaktu s matčinou mikrobiotou, což se dříve bohužel nedělo a tyto děti měly oslabený imunitní systém (Cheng et al. 2016). Diverzita bakterií se nejvíce zvyšuje v prvním roce života (Cheng J. et al. 2016), kdy je nejdůležitější kojení. Bakterie ve střevě dítěte jsou, co se týče druhového zastoupení, velmi podobné matčině vaginální a střevní mikrobiotě (Bäckhed F. et al. 2015). Děti do prvního roku života mají ve své mikrobiotě poměrně hojné zastoupení bakterií rodu *Bifidobacterium*, až 75 % vzorků obsahuje *Bifidobacterium longum* (Yatsunenko et al. 2012). Složení mikrobioty se mění při zavedení umělé mléčné výživy, či později pevné stravy. Po pátém roce začíná být mikrobiota stabilní, zastoupeno je mnoho bakterií z kmene Bacteroidetes, včetně druhů produkujících butyrát (Cheng J & Ringel-Kulka et al. 2016.). Tento proces můžeme vidět na obrázku 1.

Obrázek 1. Postupné osidlování střev dítěte (Arrieta et al. 2014)



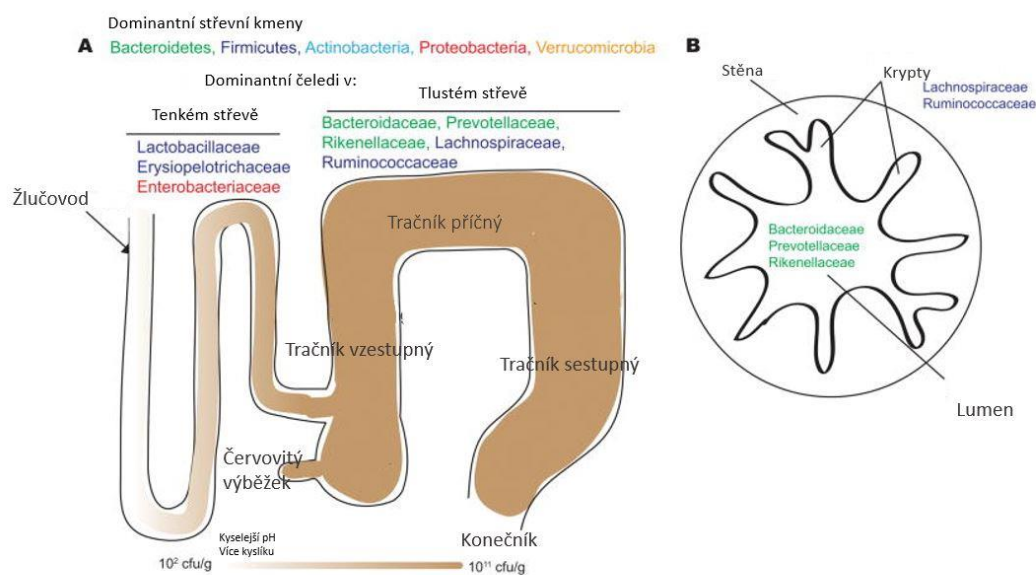
Ve školním věku je již mikrobiota dítěte velmi podobná dospělým, ovšem obsahuje více taxonů jako například *Anaerovorax*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* a bakterie produkují více vitamínu B<sub>12</sub> (Canfora EE et al. 2015.). U zdravých dospělých převažují kmeny Bacteroidetes a Firmicutes, ale najdeme u nich i malé množství *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, a *Verrucomicrobia*, *Archea*, kvasinky a bakteriofágy (Reyes A et al. 2010). Co se týče poměru mezi jednotlivými rody, u zdravých dospělých je stabilní, ovšem konkrétní složení mikrobioty je velmi specifické u každého člověka (Yatsunencko T et al. 2012). U starších lidí se snižují počty bakterií i jejich metabolická aktivita (Claesson MJ et al. 2012). Na obrázku 2. můžeme vidět, jak se složení mikrobioty mění v závislosti na věku.

Obrázek 2. Změny složení střevní mikrobioty v závislosti na věku (Kostic et al. 2013)



Komunity bakterií žijící ve střevech savců jsou ve složení velmi odlišné od ostatních mikrobiálních komunit, protože se vyvíjely v unikátním prostředí (Ley et al. 2008b). Lidské střevo dosahuje v průměru 7,5 až 8,5 metru, což dělá 32 m<sup>2</sup> plochy, kde mohou bakterie žít (Helander & Fändriks 2014). Střevo je rozděleno na 2 základní sekce – tenké střevo, kde se vstřebává většina živin z potravy a tlusté střevo, kde žije největší část mikrobioty (Donaldson et al. 2015). Při vstupu do organismu musí překonat různá prostředí, která nejsou pro jejich život ideální. Prvním je velký rozdíl v pH mezi tenkým a tlustým střevem (Evans et al. 1988). Další změnou v prostředí je množství kyslíku – v tenkém střevě je ho oproti tlustému střevu ještě poměrně velké množství (Albenberg et al. 2014). Třetím „problémem“ je imunitní obrana hostitele – imunoglobulin A (sIgA) a antimikrobiální peptidy sekretované epitelem tenkého střeva, při zánětlivém stavu střev je imunitní obrany mnohem více (Stecher et al. 2013, Belkaid & Hand 2014). Posledním problémem je neustávající peristaltika střev. Toto vše nejspíše způsobilo, že největší část bakterií žije v tlustém střevě, kde jsou podmínky přeci jen příznivější – neutrální pH a velmi malá koncentrace kyslíku (Kurokawa et al. 2007, Gill et al. 2006). Na obrázku 3. můžeme vidět habitat střevních bakterií.

Obrázek 3. Habitat bakterií ve střevech (Alatab et al. 2020)



### 3.2 Význam střevní mikrobioty

Střevní mikroorganismy mají zásadní vliv na celkové zdraví člověka. Mikrobiota se dá považovat za samostatný a opomíjený orgán. Obsahuje více buněk než celé lidské tělo a může vážit až 2 kg. Její nerovnováha může způsobovat množství nemocí, především ty chronické, kdy je nejvyšší výskyt zaznamenán ve vyspělých částech světa (Severní Amerika, Evropa) (Ehrlich, S. D. 2016). Bakterie nám pomáhají trávit látky, které by bez nich člověk trávil

nemohl, jako vlákninu a složité polysacharidy. Tyto látky poté metabolizují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA – short chain fatty acid), které jsou okamžitě vstřebávány střevními buňkami. Tři nejdominantnější jsou: propionát, butyrát a acetát, často v poměru 1:1:3 (Louis P. et al. 2014). Jedná se o konečný produkt fermentace. V proximální části tlustého střeva se SCFA nachází v koncentracích 70–140 mM (Veiga et al. 2018). Ve střevních buňkách ovlivňují expresi genů, proliferaci, apoptózu a chemotaxi (Corrêa-Oliveira R. et al. 2016). Další významná funkce mikroorganismů je tvorba vitamínů. Bakterie mléčného kvašení jsou klíčové pro syntézu vitamínu B12 (Martens J.H. et al. 2002). *Bifidobacterium* jsou hlavní producenti folátu – vitamínu B9, který je důležitý pro syntézu a opravy DNA (Pompei A. et al. 2007). Dále bakterie produkují vitamin K, vitamin B2 (riboflavin), vitamin B7 (biotin), vitamin B3 (niacin), vitamin B5 (kyselina panthotenová), vitamin B6 (pyridoxin) a vitamin B1 (thiamin) (Hill M.J. 1997). Dalším významným vlivem mikrobioty je vliv na imunitu jedince. Při prvním osídlování střev dětí tvoří mikrobiota velmi zásadní část imunity – takzvaný mukosální imunitní systém, a navíc tvoří obrannou vrstvu proti patogením organismům (Belizário & Napolitano 2015a). Metabolity bakterií, jako například SCFA, ovlivňují přirozené lymfoidní buňky v produkci cytokinů. Mikroorganismy dokážou rozpoznat látky regulující imunitu, jako jsou chemokiny, prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny (McDermott & Huffnagle 2014). Důležitost SCFA pro epitel tlustého střeva byla prokázána v mnoha studiích. Donohoe et al. (2012) zjistil, že střevní epitelární buňky germ-free (bezmikrobních) myši vykazovaly energeticky deprivovaný stav. Po kolonizaci střeva bakteriemi produkujícími butyrát i po přidání butyrátu k izolovaným epitelárním buňkám bylo možné pozorovat významné zlepšení jejich stavu – zintenzivnění procesu oxidativní fosforylace a snížení množství autofágů ve střevním epitelu. To znamená, že SCFA jsou důležitým energetickým substrátem pro epitelární buňky.

### 3.3 Jednotlivé kmeny mikroorganismů a jejich význam

#### 3.3.1 Kmen Bacteroidetes

Většina zdravých dospělých lidí má ve svých střevech z velké části jen dva bakteriální kmeny – Gram-pozitivní Firmicutes a Gram-negativní Bacteroidetes, z nichž dominují rody *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* a *Prevotella*. Nejvíce podobností v druzích nacházíme u lidí s blízkým příbuzenským vztahem, nejméně naopak u rozličných kultur (Yatsunencko et al. 2012, Turnbaugh et al. 2009). Ačkoli je poměrně velké množství faktorů, které by toto mohly vysvětlovat, tak bohužel přesnější vysvětlení stále není známo. Většina druhů sice již kultivována byla, ale je problém s manipulací s jejich genetickou informací, což je zásadní problém při odpovědi na tuto otázku (Browne et al. 2016, Sommer 2015, Lagier et al. 2016). Naštěstí je většina z nejpočetnějších druhů v našem střevě kultivovatelná.

Bacteroidetes, jako vysoce zastoupený kmen, jsou již od svého objevení nejčastěji zkoumanou oblastí mikrobiologie střeva (Eggerth' And & Gagnon n.d.). Žijí pouze ve střevech savců, což ukazuje jejich vysokou adaptaci na prostředí (Ley et al. 2008a). Jako komenzálové a mutualisté si vytvořili poměrně úzký a dlouhodobý vztah se svým hostitelem.

Protože tvoří tak velikou část mikrobioty, tak jsou v lidské populaci tyto bakterie velmi rozšířené, dobře adaptované na život ve střevě a tvoří základ metabolických cest v tomto orgánu. Toto z nich tvoří ideální modelovou skupinu ke zkoumání základních principů kolonizace našeho střeva a přežití mikroorganismů nejen po život jednoho člověka, ale skrz celou evoluci (Wexler & Goodman 2017). Tento kmen si vyvinul systém, jak v ne úplně ideálních podmínkách přežít. Velká část z nich má gen pro cytochrom bd oxidázu, u které existují hypotézy o tom, že by mohla redukovat množství kyslíku uvnitř buňky, což by mohlo vést i ke snížení množství kyslíku ve střevě, což pomáhá v růstu bakteriím, které jsou anaerobní a jinak by je vyšší obsah kyslíku zabil (Meehan et al. 2012, Rocha & Smith 2013). Tato schopnost tolerovat a zároveň redukovat množství kyslíku je něco, co tomuto kmenu pomáhá v osidlování nových hostitelů a zároveň nejspíše důvod, díky kterému jsou tak rozšířenou skupinou bakterií (Ley et al. 2008a, Smalley et al. 2002). Také dokážou ovlivnit živinový profil ve střevě pomocí fyziologických změn v hostiteli – uvolňují fukózu a zbytky sialové kyseliny z glykoproteinů, které mohou být potravou pro jiné mikroorganismy, včetně patogenních (Bry et al. 1996, Ng et al. 2013). Většina těchto změn, které provádí Bacteroidetes byla studována na bezmikrobiálních myších porovnávaných s těmi, co se narodily jako bezmikrobiální, ale později byly mikroorganismy osídleny (Ng et al. 2013). Jak již bylo zmíněno mnohokrát nejen v této práci, střevní mikrobiota je velice významná v trávení vlákniny a komplexních sacharidů. Právě Bacteroidetes jsou důležité pro metabolizování polysacharidů. To je jim umožněno díky enzymům, jako jsou například glykosidové hydrolázy a polysacharidové lyázy (Ng et al. 2013).

### 3.3.2 Kmen Firmicutes

Firmicutes tvoří cca. 40-65% střevní mikrobioty (Flint 2006). Jedná se kulovité bakterie, které se množí dělením na dvě dceřinné buňky (Schleifer 2009). Do tohoto kmene spadají rody jako *Lactobacillus*, *Clostridium* či *Enterococcus* (Veiga et al. 2018). Zatímco Bacteroidetes jsou lépe vybaveny pro metabolizování polysacharidů, Firmicutes dokážou metabolizovat i nerozpustnou vlákninu. Například *Ruminococcus champanellensis* je schopen degradovat mikrokrystalickou celulózu pomocí proteinového komplexu, který je známý jako celulozom (ben David et al. 2015). Firmicutes jsou pro trávení nerozpustné vlákniny zásadní, neboť právě oni jsou zodpovědní za prvotní krok jejího rozkladu. Za jejich pomoci jsme tedy schopni strávit například i otruby (Martínez et al. 2013). Například *Faecalibacterium prausnitzii* metabolizuje různé druhy polysacharidů, včetně škrobu a inulinu a přeměňuje je na D-laktát a butyrát (Duncan, S.H. et al. 2006).

### 3.3.3 Kmen Proteobacteria

Mikrobiota zdravého člověka obsahuje z největší části Bacteroidetes a Firmicutes, ostatní kmény by měly být zastoupeny minoritně. Proteobacteria se z větší části podílí například na mikrobiotě ústní dutiny (17–36 %) či kůže (6–30 %), zatímco ve střevě by měly být zastoupeny z cca 2–5 %. Ve střevě se pravděpodobně více vyskytují v mukóze, neboť jsou více zastoupeny v bioptických vzorcích než ve vzorcích fekálních, a to jak u zdravých

pacientů, tak u pacientů s idiopatickými střevními záněty (IBD – Inflammatory Bowel Disease) (Gevers et al. 2014, Morgan et al. 2012). Ačkoli jsou Proteobacteria zastoupena jen v malých procentech, tak plní důležitou funkci, zejména u novorozenců. U nich jsou ve větších počtech (až 16 %), neboť právě fakultativní anaerobové – zejména *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella* jsou ti, kteří připravují ideální prostředí (úprava pH, metabolisme kyslíku, produkce oxidu uhličitého) pro striktně anaerobní bakterie, tedy jejich následnou kolonizaci střeva. Do jejich traktu se dostávají již v těle matky, neboť jsou součástí placentální mikrobioty. Z tohoto důvodu v pozdním stadiu těhotenství mají matky ve střevní mikrobiotě zvýšené procento Proteobacteria (Bradley & Pollard 2017).

### 3.3.4 Kmen Actinobacteria

Kmen Actinobacteria společně s Proteobacteria tvoří, jak již bylo zmíněno, minoritní část mikrobioty. Tyto dva kmény by měly dohromady mít cca 10% zastoupení (Segata et al. 2012). Actinobacteria jsou Gram pozitivní, anaerobní a nesporulující bakterie, které tvoří tři hlavní anaerobní rody *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* a *Corynebacterium* a jeden aerobní rod *Streptomyces*. Z nich je v lidském střevě nejvíce zastoupen rod *Bifidobacterium* (Belizário & Napolitano 2015b). Jak jsem již uvedla výše, tak rod *Bifidobacterium* je více zastoupen u dětí, které přišly na svět vaginální cestou než u dětí, které byly porozeny císařským řezem (Huurre et al. 2008). Tento nižší výskyt bifidobakterií by se dal vysvětlit podáváním antibiotik před i po zákroku (Penders et al. 2006). Dále je také vyšší výskyt bifidobakterií u dětí, které jsou kojeny. Mateřské mléko obsahuje oligosacharidy, které mají roli prebiotik a stimulovat růst bifidobakterií (Underwood et al. 2015). V dospělosti by Actinobacteria měly tvořit cca 5–8 % z celkového počtu bakterií (D'Argenio & Salvatore 2015). Ačkoli jsou zastoupeny v takto nízkém počtu, tak hrají zásadní roli v ochraně střevní bariéry. *Bifidobacterie* produkují acetát a laktát v teoretickém poměru 3:2 (Scott et al. 2014). Dalším benefitem bifidobakterií je právě jejich produkce laktátu, který může být metabolizován jinými bakteriemi na butyrát (Scott et al. 2014). *In vitro* studie prokázaly, že SCFA, zejména butyrát, koreluje se zvýšenou expresí genu MUC2, který kóduje mucinový glykoprotein – zásadní složka mukózy (Gaudier et al. 2004).

## 3.4 Složení mikrobioty ve vztahu ke zdraví

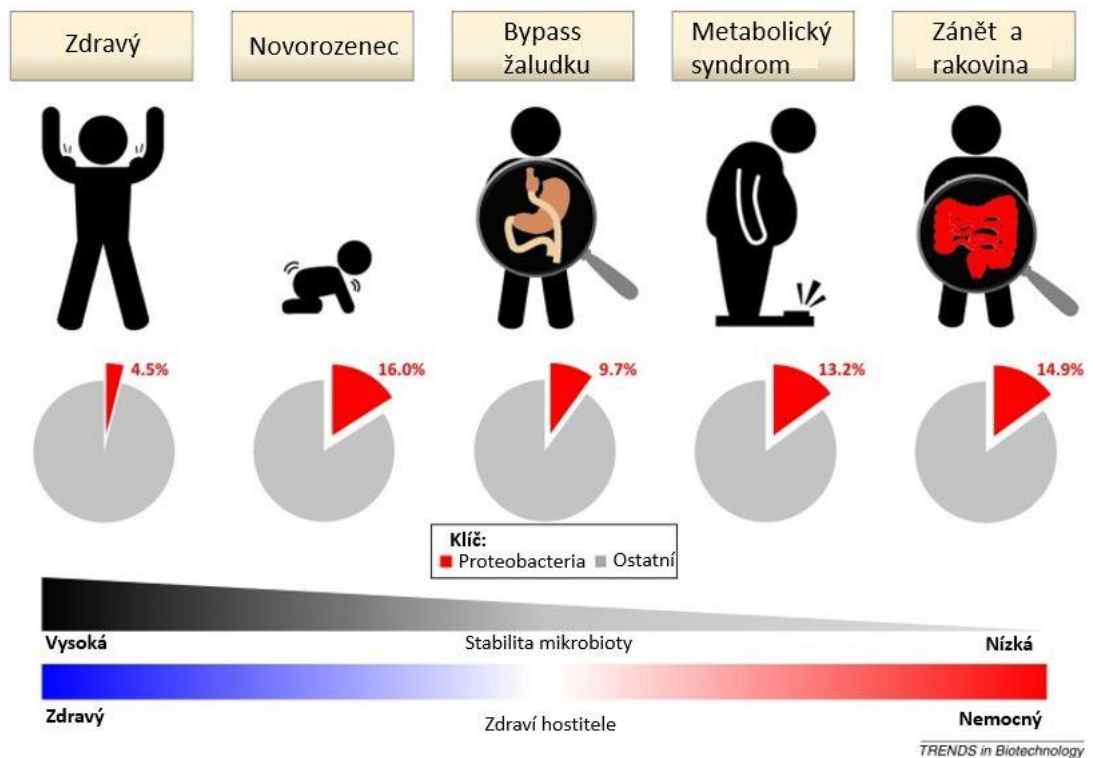
### 3.4.1 Dysbióza a její příčiny a důsledky

Dysbióza je definována jako odchylka od normální a zdravé mikrobioty. Odchylka může být jak v druhu bakterií, tak v množství. Jedním z ukazatelů dysbiózy je „Firmicutes:Bacteroidetes ratio“ (F:B) – tedy poměr mezi Bacteroidetes a Firmicutes. Bacteroidetes by měly být v převaze (Shin et al. 2015). Pokud to tak není, tedy jsou v převaze Firmicutes, a jedná se o dospělého člověka, je pravděpodobné, že se jedná o člověka s nadváhou či obezitou. Není však zatím úplně jasné, zda to platí vždy. Existuje množství studií, které dokazují, že bakterie kmene Firmicutes vytváří svým metabolismem z potravy



větší množství energie, které se v těle ukládá ve formě tukových zásob. A tedy pokud je člověk obézní, tak má poměr F:B posunutý k Firmicutes (Turnbaugh et al. 2009, Ley et al. 2005). Zároveň existuje neméně studií, které dokazují, že tento poměr není důležitý, ale je důležitá diverzita (Tims et al. 2013, Duncan et al. 2008, Zhang et al. 2009). Dalším ukazatelem je množství bakterií kmene Proteobacteria. Studie porovnávající africké a evropské děti ukázala, že děti z Burkina Faso, které měly vysoký příjem vlákniny a nízký příjem tuku, měly ve své mikrobiotě nižší zastoupení bakterií kmene Proteobacteria než evropské děti s nízkým příjmem vlákniny a vysokým příjmem tuku. Dalším faktorem, který způsobil dysbiózu u evropských dětí, byla umělá sladidla a emulgátory (tedy vysoce zpracované potraviny). Zejména umělá sladidla způsobovala vysoký nárůst Proteobacterií, zejména *Enterobacteriaceae* (de Filippo et al. 2010). Na obrázku 4. můžeme vidět vliv Proteobacteria na zdraví.

Obrázek 4.: Vliv bakterií kmene Proteobacteria na zdraví jedince (Shin et al. 2015)



Dalším důsledkem dysbiózy jsou chronické střevní záněty, o kterých bude řeč později.

### 3.5 Kultivovatelné druhy mikroorganismů ve střevní mikrobiotě

Střevní mikrobiota obsahuje více 1000 druhů různých bakterií, eukaryot a archeí (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Flint (2006) uvádí, že z tohoto počtu je kultivovatelných cca 25 %, novější studie však dokazují, že toto procento je vyšší (Lagier et al. 2016). Většina z těchto bakterií jsou striktní anaerobové, proto potřebujeme pro jejich kultivaci připravit prostředí

bez pro ně toxického kyslíku. Do média pro růst je třeba přidat redukční činidlo, které zařídí anaerobní prostředí (Duncan, S. H. et al. 2007). Velké množství těchto bakterií postrádá metabolické řetězce pro přenos elektronů, které regenerují redukované kofaktory (NADH<sub>2</sub>). Anaerobní bakterie místo toho mají metabolické dráhy pouze pro regeneraci redukováného NAD<sup>+</sup>, které jsou z většiny zodpovědné za tvorbu kyselých produktů fermentace (Duncan et al. 2007).

### 3.6 Možnosti ovlivnění střevní mikrobioty

Jak se ukazuje, střevní mikrobiotu lze ovlivnit mnoha různými faktory. Jak již bylo zmíněno, tak prvním významným vlivem je způsob porodu. S tím je spojené také místo porodu. L. Combellick et al. (2018) uvádí, že děti, které byly porozeny doma, mají větší diverzitu střevních bakterií. Děti narozené v porodnici měly menší množství *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* a *Lactobacillus* a vyšší množství *Clostridium* a čeled *Enterobacteriaceae*.

Jedním z nejvlivnějších faktorů však i nadále zůstává naše strava. Bakterie v našich střevech jsou schopné trávit to, co naše trávicí enzymy nedokážou – vlákninu a polysacharidy. V nich obsažené „mikrobiotě přístupné sacharidy“ (MACs - microbiota-accessible carbohydrates) jsou pro život naší mikrobioty zásadní (Yatsunenko et al. 2012). Množství těchto látek a různých bioaktivních látek, jako jsou například fenolické látky a anthokyany (Mariana Veiga et al. 2018), významně ovlivňuje druhové složení mikrobioty. Předpokládá se, že každá významná změna ve stravování člověka – od zavedení masa do stravy až po dnešní západní stravovací návyky, které jsou založené na vysoce procesovaných potravinách – znamenala významnou změnu ve složení střevní mikrobioty (Yatsunenko, T. et al. 2012). Sonnenburg et al. (2016) ve své studii uvádí, že významné snížení MACs v západní stravě může mít zásadnější dopad, než bylo předpokládáno. V experimentu na myších se ukázalo, že pokud myš přijímala po delší dobu (6 týdnů) stravu s nízkým obsahem MACs, tak se diverzita a množství střevní mikrobioty významně snížila. Po opětovném zavedení MACs (tato strava byla podávána po dobu 7 týdnů) do stravy se stav ovšem nezlepšil, a bylo nutné zároveň doplnit chybějící druhy bakterií (Veiga et al. 2018).

#### 3.6.1 Probiotika, prebiotika, postbiotika

Probiotika jsou podle definice nepatogenní organismy, převážně lidského původu, které mají na člověka pozitivní vliv, a jsou schopné zlepšit zdravotní stav, pokud jsou dodávány ve vhodných dávkách (Fric 2007). V dnešní době jsou nejčastěji využívanými mikroorganismy bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Probiotické kultury ve většině případů obsahují *Lactobacillus rhamnosus* CG, *Sachatomyces cerevisiae* Boulardi, *Lactobacillus casei* Shirota a *Bifidobacterium animalis*, což jsou prozatím nejčastěji zkoumané mikroorganismy s prokázanými pozitivními účinky (Vasiljevic & Shah 2008, Fric 2007). Podle Saiera (2005) mají probiotik tři hlavní mechanismy účinku na zdraví člověka: a) dodávají metabolity anaerobní fermentace sacharidů, jako například organické kyseliny,

kteře po vstřebání střevní stěnou dokážou ovlivnit náladu, energii a kognitivní schopnosti, b) jsou schopné konkurovat patogenním organismům a nahradit je a c) stimulují imunitní odpověď hostitele (Saier Jr. & Mansour 2005). Nejčastěji jsou probiotika konzumována ve fermentovaných mléčných produktech, které se vyrábí za pomoci bakterií mléčného kvašení (lactic acid bacteria, LAB). Z nich jsou nejpoužívanějšími rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, a *Leuconostoc* (Stiles & Holzapfel 1997). LAB se dělí na dvě skupiny, homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní bakterie vytváří z uhlíkatých řetězců z velké části pouze kyselinu mléčnou. Do této skupiny patří například *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a *Streptococcus*. Heterofermentativní bakterie, na rozdíl od homofermentativních, vytváří z glukózy stejná molární množství laktátu, CO<sub>2</sub>, ethanolu anebo acetátu. Do této skupiny patří *Leuconostoc* či *Weissella* (Franz et al. 1999).

Úpravy mikrobioty pomocí probiotik mají mnoho pozitivních účinků a dokážou pomoci s velkou škálou zdravotních problémů, avšak v této práci jsou nejpodstatnější idiopatické střevní záněty (IBD), konkrétně Crohnova choroba, k níž se detailněji dostanu později. *In vivo* studie na zvířatech ukazují důležitost komenzálních bakterií při vývoji funkčního imunitního systému. Střevní bakteriální homeostáze je pro zdraví člověka velmi důležitá a při IBD je zásadně narušena. Například *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 brání rozvoji zánětu způsobeného *Bacteroides vulgatus* (Ruiz et al. 2005). Gionchetti et al. (2000) ve své studii podal přesvědčující důkazy o pozitivním účinku probiotik na IBD. Jeho randomizovaná dvojitě zaslepená studie VSL#3 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) na pacientech s pouchitidou (záněť neorekta). Pacientů bylo do studie zahrnuto 40, všichni trpící chronickou pouchitidou. Ve skupině, která skutečně dostávala VSL#3 byla po 4 měsících nižší pravděpodobnost recidivy.

Prebiotika byla definována Glennem Gibsonem a Marcelem Roberfroidem roku 1995 jako nestravitelná součást potravy, která selektivně stimuluje růst či aktivitu jednoho (či menšího množství kmenů) kmene bakterií ve střevě a tím zlepšuje zdraví hostitele (Gibson & Roberfroid 1995). Aby látka mohla být označena jako prebiotikum, musí splňovat tři body: a) být nestravitelná; b) být fermentovatelná střevními bakteriemi; c) mít selektivní efekt na mikrobiotu, který bude mít pozitivní vliv na zdraví hostitele. Navíc musí do tlustého střeva dorazit v chemicky i strukturálně nezměněné podobě, aby měla správný efekt. Většina prebiotik jsou oligosacharidy, například inulin, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy či pyrodextriny (MACFARLANE et al. 2006).

Postbiotika jsou rozpustné látky produkované živými bakteriemi nebo látky uvolněné po lyzi bakteriální buňky, jako například enzymy, peptidy, kyselina teichoová, peptydoglykan a další (Aguilar-Toalá et al. 2018). Oproti probiotikům mohou mít postbiotika bezpečnostní výhody, vzhledem k tomu, že obsahují pouze část buňky. Mají nižší potenciál k vyvolání zánětlivé reakce, kterou mohou vyvolat probiotika u jedinců s poškozeným imunitním systémem (Taverniti & Guglielmetti n.d.). Inaktivace bakterií se dá dosáhnout pomocí fyzikálních (vysokou teplotou, mechanicky, UV nebo  $\gamma$  – zářením, vysokým tlakem) nebo chemických

(deaktivace pomocí kyselin) metod (de Almada et al. 2016). Tyto látky hrají klíčovou roli v regulaci růstu, vývoje a množení bakterií a jejich vzájemné komunikaci (Netzker et al. 2015).

### 3.6.2 Vitamíny

Vitamíny jsou organické látky různorodého chemického složení, které jsou pro člověka esenciální. V těle mají různé funkce, jedna z důležitých je, že slouží jako kofaktory enzymů (Yang et al. 2020). Jejich hlavním zdrojem je potrava, ale některé vitamíny (K a vitamíny skupiny B) syntetizuje střevní mikrobiota (Rowland et al. 2018). Vliv vitamínů na střevní bakterie zatím není dostatečně prozkoumán, ale zdá se, že vitamín A by mohl mít pozitivní vliv na pacienty s autismem, možná právě díky ovlivnění mikrobioty (Liu et al. 2017). V této studii byl díky vitamínu A zvýšen počet Bacteroidetes, čímž se vylepšil poměr Firmicutes:Bacteroides. Další studie ukazuje, že suplementace vitamínu A dětem do dvou let zlepšila počty bifidobakterií (Huda et al. 2019). Vitamín D<sub>3</sub> má pravděpodobně též pozitivní vliv na složení mikrobioty, zdá se, že by mohl (ve vyšších dávkách) zlepšovat stav pacientů s IBD (Bashir et al. 2016). U pacientů s CD suplementace vitamínu D<sub>3</sub> měla pozitivní vliv na složení mikrobioty, ovšem u zdravých jedinců se tento efekt neprokázal (Schäffler et al. 2018). Tyto vlivy na mikrobiotu zatím ovšem nejsou potvrzené a taktéž záleží na saturaci zkoumaných jedinců uvedenými vitamíny, neboť je zde možné nebezpečí předávkování (Yang et al. 2020).

### 3.6.3 Dieta

Dieta je společně s prostředím a věkem jeden z nejzásadnějších faktorů ovlivňujících střevní mikrobiotu. Její složení – tedy tři hlavní složky (sacharidy, bílkoviny, tuky), jejich vzájemný poměr a kvalita – mají prokázáný vliv na mikrobiotu. Pro bakterie jsou nejdůležitějšími sacharidy (tedy hlavně oligo- a polysacharidy) a bílkoviny, jež metabolizují na SCFA, z nichž jsou to nejčastěji butyrát, propionát a acetát. SCFA mají na člověka mnoho různých účinků, z nich je jedním z nejdůležitějších zdroj energie pro střevní buňky (Walsh et al. 2014). Nejvíce mikrobiální degradace bílkovin probíhá v distální části tlustého střeva, díky ideálním podmínkám pro růst proteolytických bakterií, jako například *Bacteroides*, *Propionibacterium* a *Clostridium* (Walker et al. 2005). Hlavní metabolický proces, kterým dochází k rozkladu bílkovin je deaminace aminokyselin, kdy vznikají SCFA a amoniak (Cummins & Macfarlane 1991). Vysoké koncentrace amoniaku je u potkanů pravděpodobně karcinogenní (Clinton et al. 1988). Ze sacharidů jsou pro mikrobiotu nejpodstatnější člověkem nestravitelné sacharidy, které jsou hlavním zdrojem energie bakterií (Cummins & Englyst 1991). Do této skupiny spadají rezistentní škroby a neškrobové polysacharidy, které jsou mikroorganismy metabolizovány na různé plyny a SCFA (Walsh et al. 2014).

### 3.6.3.1 Enterální výživa

Enterální výživa (EN; enteral nutrition) je typ diety, která se používá u nemocí, kdy pacienti nemohou buď dostatečně nebo vůbec přijímat potravu. Je indikovaná například při úrazech čelistí, po operacích GIT, u starých lidí, při podvýživě či jako podpůrná léčba IBD (Urbaníková 2014). Existují dva typy EN – sipping (popíjení) - podávaná perorálně a podávaná sondou. Ta může být zavedena buď nazojejunálně nebo chirurgicky (Dastych 2012). Sipping je nejjednodušší forma podání EN, používá se většinou jako doplňková výživa, jako kompletní se nedoporučuje podávat dlouhodobě (Mgr et al. 2011).

EN je používána také v rámci terapie Crohnovy choroby. V pediatrické léčbě se používá EN jako kompletní výživa pro indukci remise (Critch et al. 2012). Tato léčebná metoda bývá poměrně úspěšná (až v 80 % (Rubio et al. 2011)) a je to pravděpodobně z důvodu vynechání těch dietních faktorů, které mohou vést ke stimulaci zánětlivé reakce imunitního systému (Levine & Wine 2013).

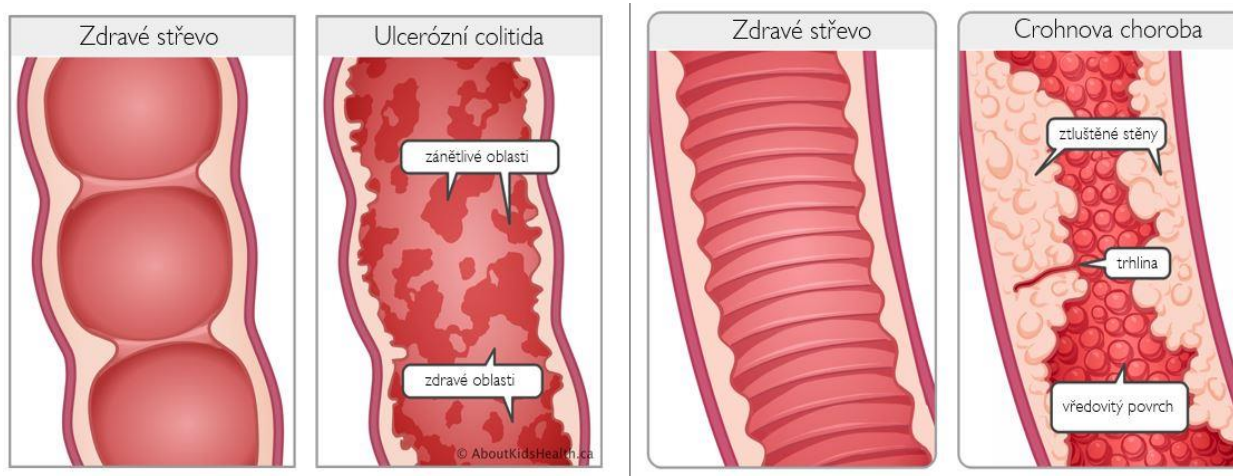
EN má tři základní typy, elementární, oligomerní a polymerní. Elementární EN obsahuje aminokyseliny, fruktózu, glukózu, MCT tuky (Medium-Chain-Triglycerides – triglyceridy se středně dlouhým řetězcem) a mastné kyseliny (Dastych 2012). Oligomerní EN obsahuje rozštěpené živiny – aminokyseliny nebo oligopeptidy, maltodextriny, disacharidy, MCT tuky a neobsahuje vlákninu (Bohatcová 2015). Polymerní EN obsahují nerozštěpené živiny, tedy bílkoviny, polysacharidy a LCT tuky (Long-Chain-Triglycerides – triglyceridy s dlouhým řetězcem), mohou obsahovat vlákninu (Bohatcová 2015). Rozdíly ve složení polymerních výživ jsme využili v naší práci, o čemž bude řeč v metodické části. Perorálních EN je více druhů, dělí se podle energetické denzity na izokalorické (1 kcal/1ml) a hyperkalorické (1,5 – 2 kcal/1ml) (Grofová 2009). Dalším typem může být EN obohacená o více bílkovin nebo hyperkalorická s energetickou denzitou až 4 kcal/1ml (Urbaníková 2014).

## 3.7 Mikrobiota pacientů s IBD

Idiopatické střevní záněty jsou chronická onemocnění s nejistou etiologií, kterou v roce 2017 trpělo 6,8 milionu lidí celosvětově (Alatab et al. 2020) Nejčastější příčiny jsou pravděpodobně vlivy prostředí, genetický faktor a změny mikrobioty. Toto vše způsobí imunitní odpověď, a tedy střevní zánět, který je u IBD chronický. Jedná se o typicky „západní“ onemocnění, neboť jsou významně ovlivněna stravovacími návyky, kulturními zvyklostmi a prostředím. Mezi tato onemocnění spadají dvě hlavní kategorie – Ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD) (Yatsunenکو et al. 2012). Ulcerózní kolitida je specifická zánětem sliznice a submukózy začínajícím v distálních částech tlustého střeva, nejčastěji u konečníku, tenké střevo nepostihuje. Naproti tomu Crohnova choroba může postihnout kteroukoli část trávicí trubice od jícnu po konečník a zánět prostupuje celou stěnou trávicí trubice. Nejčastěji postiženou částí GIT je konec tenkého střeva. Ani jedno z těchto onemocnění nelze úplně vyléčit, existují ovšem metody, pomocí kterých lze nemocným pomoci. Mezi ně patří i chirurgické odstranění postižené části GIT (Rutgeerts et al. 1991). Studie ovšem ukazují na zásadní vliv střevní mikrobioty na vývoj těchto

zánětlivých onemocnění (Frank et al. 2007). Jak rozdíly mezi UC a CD vypadají můžeme vidět na obrázku č. 5.

Obrázek 5. Porovnání zdravého střeva, střeva postiženého Crohnovou chorobou a střeva postiženého ulcerózní kolitidou (“Maladie de Crohn” n.d.)



Za normálních okolností host (člověk) poskytuje bakteriím vhodné prostředí plné nutrientů a ochranu před vnějšími vlivy a bakterie díky tomu vytváří esenciální vitamíny a SCFA – v tomto případě se jedná o symbiózu. Pokud se však z jakýchkoliv důvodů změní složení či poměr jednotlivých druhů ve prospěch patogenních, tak se jedná o dysbiózu. Pacienti s IBD mají často nižší diverzitu bakteriálních druhů než zdraví lidé. Typické pro dysbiózu u IBD je snížení počtu *Firmicutes* a zvýšení počtu *Proteobacteria* (Rutgeerts et al. 1991). Konkrétně u *Firmicutes* se jedná zejména o *Faecalibacterium prausnitzii*. U některých dalších druhů se studie neshodují, což může být způsobeno více faktory – rozdílný odběr vzorku (biopsie, fekální vzorek), biopsie z rozdílných částí GIT, dieta, kouření, medikace a rozdílné metody k určování počtů bakterií (Eckburg et al. n.d., Frank et al. 2007, Andrews et al. 2011). Zatímco mikrobiota zdravých lidí zůstává v podstatě nezměněna, u lidí s IBD se mění poměrně často. Závisí na momentálním stádiu nemoci a medikaci. Několik studií ukazuje, že dysbióza pokračuje i u pacientů v remisi (Gevers et al. 2014). Při posuzování dysbiózy hraje zásadní roli způsob odebrání vzorku. Základní dva typy vzorku jsou fekální a mukosální. Co se týče reprezentativnosti, tak je mukosální vzorek v mnoha ohledech lepší (Lepage et al. 2005, Swidsinski et al. 2002, Walker et al. 2011). Bakterie asociované s IBD jsou v mukose četnější – čili je snadnější identifikovat dysbiózu z mukosálního vzorku, než z vzorku fekálního (Walker et al. 2011).

## 4 Metodika

### 4.1 Získání a příprava vzorku

Cílem experimentální části práce bylo otestovat růst mikroorganismů přítomných ve vzorcích stolice zdravých dětí a dětí s Crohnovou chorobou (CD) na různých enterálních výživách. Vzhledem k náročnosti získávání čerstvých vzorků (do 3 hodin od defekce) u dětí s CD, byly pro experimentální část práce použity pouze vzorky zdravých dětí. Dále stanovit pomocí kultivace na selektivních médiích počty vybraných skupin bakterií v původním vzorku stolice a také ve vzorcích enterálních výživ kultivovaných se stolicí. Získaná data byla poté porovnána s ohledem na druh použité výživy jakožto média pro kultivaci.

#### *Přehled testovaných enterálních výživ:*

**EN-A** Nutridrink – Nutricia (Fortini Multi Fibre)

**EN-B** Fresubin – Fresenius Kabi (Fresubin Energy Fibre)

**EN-C** Renutryl – Nestlé (Renutryl Booster)

**EN-D** Ensure – Abbott Laboratories (Ensure Plus Advance)

Všechny výše uvedené výživy jsou polymerní (obsahují zdroje bílkovin – mléčné bílkoviny, vaječný bílek, sojové bílkoviny, zdroje sacharidů – škrob, maltodextrin, sacharóza, zdroje tuků – rostlinné oleje či živočišné tuky a minerály a vitamíny v doporučené denní dávce) a v době experimentu byly všechny s řádným datem spotřeby. V tabulce 1. je uvedeno podrobné složení enterálních výživ.

Tabulka 1. Složení jednotlivých EN

Enterální výživa		Fortini Multi Fibre	Fresubin Energy Fibre	Renutryl Booster	Ensure Plus Advance
<b>Energetická hodnota (kJ/kcal)</b>		<b>640/153</b>	<b>630/150</b>	<b>840/200</b>	<b>631/150</b>
<b>Osmolarita (mOsm/l)</b>		380	410	580	557
<b>Makroživiny</b>	<b>Tuky (g)</b>	6,8	5,8	7	4,8
	z toho nasycené (g)	0,7	0,4	0,9	0,42
	mononenasycené (g)		3,8	4	
	polynenasycené (g)		1,6	1,3	
	<b>Sacharidy (g)</b>	18,8	17,8	24	16,8
	z toho cukry (g)	4,6	5,6	7	6,8
	laktóza (g)	<0,025	<0,26	<0,05	
	<b>Vláknina* (g)</b>	1,5	2	0	0
	<b>Bílkoviny (g)</b>	3,4	5,6	10	9,1
<b>Sůl (g)</b>	0,17	0,43		0,43	
<b>Minerální látky</b>	Sodík (mg)	67	80	95	160
	Chlór (mg)	100	100	85	139

	Draslík (mg)	140	135	240	270
	Vápník (mg)	84	135	229	227
	Fosfor (mg)	75	80	153	120
	Hořčík (mg)	17	21	50	25
	Železo (mg)	1,5	2	1,7	2,1
	Zinek (mg)	1,5	1,5	2,5	1,75
	Měď (mg)	0,135	300	250	0,45
	Jód (mg)	15	30	25	22
	Selen (μg)	4,5	10	13	8,5
	Mangan (mg)	0,23	0,4	0,16	0,45
	Chrom (μg)	0,23	10	21	10
	Molybden (μg)	6	15	7	15
	Fluor (mg)	0,11	0,2	0,4	
<b>Vitamíny</b>	Vitamín A (μg)	61	120	117	60
	Vitamín D (μg)	1,5	2	1,7	5,7
	Vitamín E (mg α-TE)	1,9	3	3,4	2,5
	Vitamín K (μg)	6	16,7	12	15
	Vitamín C (mg)	15	15	20	16
	Vitamín B <sub>1</sub> (mg)	0,23	0,23	0,2	0,26
	Vitamín B <sub>2</sub> (mg)	0,24	0,32	0,27	0,34
	Vitamín B <sub>6</sub> (mg)	0,18	0,33	0,37	0,734
	Niacin (mg)	0,88	3	4,5	3
	Listová k. (μg)	23	50	67	35
	Vitamín B <sub>12</sub> (mg)	0,26	0,6	0,8	0,65
	Panthotenová k. (mg)	0,5	1,2	0,83	1,1
	Biotin (μg)	6	7,5	10	6
<b>Ostatní živiny</b>	Karotenoidy (mg)	0,15			
	L-karnitin (mg)	3			18
	Cholin (mg)	30	26,7		70
	Taurin (mg)	11			
	Betakaroten (μg)		300		60
	Linolová k. (g)			1,1	
	α-linolenová k. (mg)			210	
	Fruktooligosacharidy (g)				0,75
Hydroxymetylbutyrát (g)				0,55	

\* Obsažená vláknina ve Fortini Muti Fibre – sojové polysacharidy, inulin, oligofruktóza, rezistentní škrob, arabská guma a celulóza; Fresubin – inulin z čekanky



### ***Vzorky stolice pro experiment:***

Úkolem dětí (jejich rodičů) bylo umístit cca 1g stolice (odpovídá velikosti lískového oříšku) do uzavíratelné zkumavky s 9 ml bujónu složeného z: trypton (5 g/l), živný bujón č. 2 (5 g/l), kvasnicový extrakt (2,5 g/l; vše Oxoid, UK), L-cystein (0,5 g/l) a Tween 80 (1ml/l; vše Sigma Aldrich, USA). Zkumavka s bujónem byla doplněna skleněnými perlami pro snazší homogenizaci. Vzorek bylo třeba dodat do 3 hodin do laboratoře ke zpracování. Toto bylo bohužel problematické u vzorků z FN Motol, kdy docházelo k opožděnému předání, a prvotní provedené analýzy ukázaly, že tyto vzorky je nemožné zařadit do studie. Tudíž je v uvedené práci použita pouze skupina zdravých jedinců. Jednalo se o děti ve věku 5 až 18 let, u kterých v předchozích 3 měsících nebyla aplikována antibiotika. Veškeré vzorky byly získané na základě informovaného souhlasu.

### ***Založení experimentu:***

Nejprve bylo třeba vzorek stolice (FS) homogenizovat pomocí vortexu. Poté byl ze vzorku proveden rozbor (stanovení detekovaných skupin v 1 g vzorku). V ten samý čas byl vzorek stolice (vždy 1 ml) zaočkován do 9 ml enterální výživy (4 různé výše uvedené varianty). Enterální výživa byla před zaočkováním asepticky rozpipetována do sterilních zkumavek („Penicilinek“) a probublána pomocí CO<sub>2</sub> pro vytvoření anaerobních podmínek. Vzorky byly poté kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C za anaerobních podmínek (speciální box s vyvíječem anaerobních podmínek, Anaerobag – bioMérieux).

## **4.2 Detekce testovaných bakteriálních skupin ve stolici**

Ze vzorku stolice v médiu (po homogenizaci) byl odebrán injekční stříkačkou 1ml a použit na vytvoření ředící řady, od 1 x 10<sup>-1</sup> (původní vzorek) do 1 x 10<sup>-9</sup> – čísla ředění od 1 do 9.

### **4.2.1 Příprava médií**

Média pro celkové počty bakterií a pro bakterie rodu *Bifidobacterium* vychází ze základního modifikovaného agaru Wilkins – Chalgren (Oxoid). Agar (43,3 g/l) byl společně se sójovým peptonem (5 g/l), L-cysteinem (0,5 g/l) a tweenem (Polysorbate-80; 0,1 ml/l) rozmíchán v destilované vodě a v autoklávu při 120 °C vysterilován. Po uplynutí této doby byla média přemístěna do vodní lázně o teplotě 50 °C. Po vyrovnání teplot byla k agarům přidána antibiotika a další pro jejich selektivní úpravu.

Celkové počty anaerobních bakterií

CP; bez dalších úprav

Médium pro rod *Bifidobacterium*

BIF – MUP; mupirocin (200 mg/l), ledová kyselina octová (1 ml/l)

Jako médium pro rod *Lactobacillus* byl použit Rogosa agar (Oxoid). V tomto případě se agar rozmíchával dle uvedeného poměru (82 g/l) v destilované vodě a nechal se za stálého míchání

rozvařit. Po rozvaření byla do média přidána 98% kyselina octová (132 µl/100 ml média) a médium necháno dalších 5 minut ve vroucí vodě. Poté bylo přesunuto do vodní lázně o teplotě 50 °C.

TBX agar (Tryptone Bile X-Glucuronide Medium; Oxoid) byl dle uvedeného množství (TBX 36,6 g/l) rozmíchán v destilované vodě a v autoklávu při 120 °C vysterilován. Po sterilizaci byl přesunut do vodní lázně o teplotě 50 °C.

#### 4.2.2 Rozbor vzorků

Rozbor byl proveden pomocí deskové metody na Petriho miskách. Jednotlivá ředění byla očkovaná do Petriho misek, které byly označeny jak jednotlivými ředěními a čísly vzorků, tak typem agaru. Médii byly použity čtyři typy. Očkování jednotlivých ředění v případě CP, BIF – MUP, a LBC bylo provedeno tak, že se jednotlivá ředění nanasla do Petriho misek, až poté přelila médii a krouživým pohybem promíchala. V tomto případě bylo do každé misky (malé misky, průměr 60 mm) naočkováno 0,5 ml příslušného ředění. Misky pro laktobacily byly po zatuhnutí ještě jednou přelity (mikroaerofilní podmínky). V případě TBX bylo první připraveno médium, nalito do velké Petriho misky (průměr 90 mm) a na ztuhlém médiu se nátěrem přenášela jednotlivá ředění, v tomto případě 0,1 ml s následným rozetřením kličkou. Petriho misky pro CP, BIF – MUP a BIF – NOR byly kultivovány 48 h při 37 °C v anaerostatu s vyvíječem anaerobních podmínek (Anaerobag – bioMérieu), LBC byly kultivovány víčkem dolů s přístupem vzduchu 48 h při 37 °C a TBX s přístupem vzduchu po dobu 24 h při stejné teplotě, opět dnem vzhůru.

V tabulce č. 2 je uvedeno schéma rozboru, tedy, která ředění byla pro uvedené skupiny použita ke kultivaci.

Tabulka 2. Schéma rozboru

Číslo ředění>	2	3	4	5	6	7	8	9
CP								
BIF – MUP								
LBC								
TBX								

Po skončení kultivace byly jednotlivé Petriho misky opět rozloženy dle schématu (tabulka 2.) a pomocí počítačky kolonií byly zjištěny počty narostlých kolonií, které byly poté přepočítány dle vzorce níže na KTJ/ml.

### 4.3 Vyhodnocení počtu detekovaných bakterií

Při vyhodnocení rozboru byly pomocí digitálního počítadla spočítány narostlé kolonie (na počitatelných ředěních/ miskách). Konečné množství bakterií bylo vypočteno podle

následujícího vzorce (viz níže), výsledkem byl vyjádřen jako přesný počet kolonií tvořících jednotek v 1 g testovaného vzorku stolice nebo 1 ml/g enterální výživy kultivované se stolicí.

$$P = [(P1 + P2) / 11] * F \text{ (KTJ/g)}$$

P1, P2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných plotnách

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

#### **4.4 Detekce testovaných bakteriálních skupin v enterálních výživách kultivovaných se stolicí**

Vzorky stolice kultivované na enterální výživě bylo třeba zpracovat obdobným způsobem jako vzorky stolice. Po kultivaci bylo třeba všechny vzorky opět zhomogenizovat. Poté bylo z každé penicilinky odebráno po 1 ml a následně vytvořena ředící řada. Jelikož byl každý vzorek stolice kultivován na 4 různých enterálních výživách (varianty – A, B, C, D), tak byla pro každou variantu vytvořena ředící řada (opět 9 ředění). Samotný vzorek byl jako 0. ředění. Bylo použito stejné schéma rozboru jako je uvedeno v tabulce č. 2, jen zde byly vždy 4 varianty.

Dále byl postup identický jako v případě rozboru stolice.

#### **4.5 Statistické zpracování dat**

Test normality dat byl proveden pomocí Shapiro-Wilk W testu ( $P < 0,05$ ). Pro splnění všech podmínek testu byla použita Scheffeho metoda pro testování více hypotéz úpravou P-hodnot pomocí one-way ANOVA nebo Kruskal-Wallisova testu ( $P < 0,05$ ). Všechny statistické analýzy byly provedeny za pomoci programu STATISTICA (StatSoft, Česká republika). Statistické zpracování dat bylo provedeno Ing. Nikol Modráčkovou.

## 5 Výsledky

Celkem byly otestovány 4 enterální výživy různých značek, které se mezi sebou lišily v obsahu různých složek (podrobný popis složení je uveden v části „Metodika – získání a příprava vzorku“ v tabulce č. 1. Pro potřeby experimentu popsaného v této bakalářské práci nás zajímaly především rozdíly v obsahu a množství prebiotik (někdy výrobce označuje jako vlákninu, tabulka 1.). Fortini Multi Fibre (A) obsahoval sojové polysacharidy, inulin, oligofruktózu, rezistentní škrob, arabskou gumu a celulózu (v celkovém množství 1,5 g); Fresubin Energy Fibre (B) inulin z čekanky (2 g). Dalším významným obsaženým prebiotikem jsou fruktooligosacharidy, které ovšem obsahoval pouze jeden výrobek, a to Ensure Plus Advance (D) v množství 0,75 g. Renutryl Booster (C) byl bez jakékoli prebiotické složky. Složení základních složek a také vitamínů bylo podobné, jen zde byly rozdíly v množství. Například se lišilo množství přítomného vitamínu A, D a kyseliny listové. Nicméně, větší rozdíly byly, co se týče přítomnosti, u „ostatních složek“. Například linolovou a linolenovou kyselinu obsahoval pouze Renutryl Booster (C), hydroxymetylbutyrát pouze Ensure Plus Advance (D) a betakaroten Fresubin Energy Fibre (B) a Ensure Plus Advance (D).

### 5.1 Detekované počty kultivovatelných komenzálních bakterií

Počty kultivovatelných komenzálních bakterií přirozeně vyskytujících se ve vzorcích stolice ( $n = 10$ ), které byly kultivovány ve čtyřech různých EN, byly kvantifikovány pomocí deskové metody za použití selektivních médií, a elektivního média pro celkové počty anaerobních bakterií. Výsledné počty bakterií byly poměrně rozdílné, což bylo způsobeno interindividuálními rozdíly mezi vzorky stolice dárců (FS) a také kvůli detekčnímu limitu  $10^2$  KTJ/g (zejména pro *E. coli*).

Počty detekované na jednotlivých médiích u jednotlivých dárců v původním vzorku stolice a po jeho kultivaci na enterálních výživách jsou zobrazeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Detekované počty bakterií (log KTJ/g)

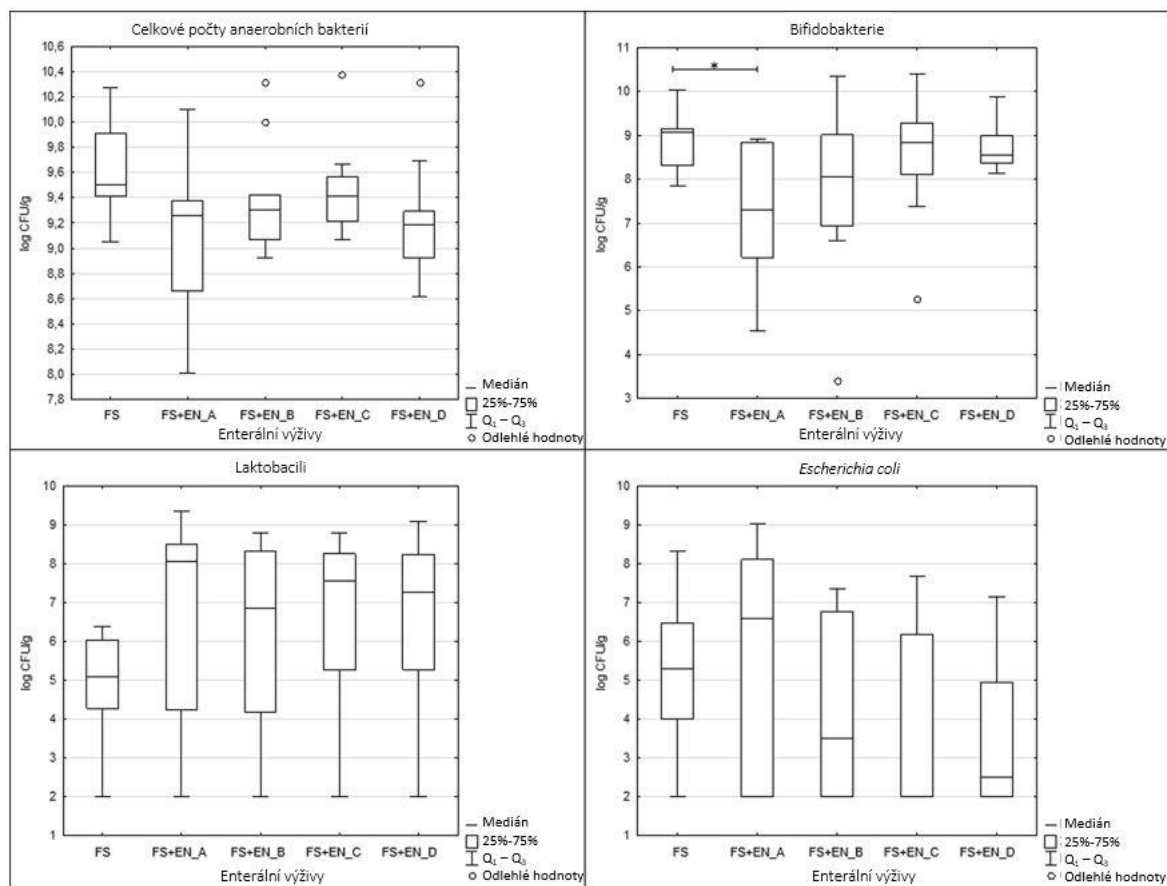
FS		Dárce										Průměr		SD	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
Médium	CP	9,89	9,49	9,52	9,30	9,95	9,43	10,27	9,05	9,41	9,91	<b>9,62</b>	<b>0,37</b>		
	MUP	7,86	9,16	8,32	9,10	9,42	9,07	10,04	8,07	9,13	8,38	<b>8,86</b>	<b>0,68</b>		
	ROG	4,28	5,45	4,85	6,04	6,39	5,08	5,12	6,34	4,03	nd	<b>4,96</b>	<b>1,31</b>		
	TBX	nd	6,76	8,32	4,53	6,06	4,00	6,47	nd	5,42	5,19	<b>5,08</b>	<b>2,02</b>		
FS+EN_A		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>		
Médium	CP	9,30	9,35	10,10	9,47	8,01	9,21	9,01	9,38	8,41	8,66	<b>9,09</b>	<b>0,60</b>		
	MUP	7,29	6,49	8,93	7,32	8,85	8,85	7,80	5,09	6,22	4,53	<b>7,14</b>	<b>1,56</b>		
	ROG	6,28	4,25	8,51	8,46	7,71	8,41	8,74	9,35	3,41	nd	<b>6,71</b>	<b>2,59</b>		
	TBX	nd	8,86	9,02	4,78	6,08	nd	7,08	nd	8,11	7,96	<b>6,21</b>	<b>2,74</b>		
FS+EN_B		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>		

<b>Médium</b>	<b>CP</b>	9,07	10,00	10,32	9,32	9,37	8,92	9,05	9,28	9,08	9,42	<b>9,38</b>	<b>0,45</b>
	<b>MUP</b>	6,94	6,60	10,36	7,03	9,01	8,83	9,01	8,90	3,41	7,31	<b>7,74</b>	<b>1,94</b>
	<b>ROG</b>	4,74	4,19	8,79	8,63	6,95	6,75	8,20	8,32	3,48	nd	<b>6,21</b>	<b>2,43</b>
	<b>TBX</b>	nd	6,77	7,37	5,00	nd	nd	7,16	nd	5,85	nd	<b>4,22</b>	<b>2,43</b>
<b>FS+EN_C</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>
<b>Médium</b>	<b>CP</b>	9,21	9,28	10,38	9,67	9,49	9,07	9,57	9,44	9,10	9,38	<b>9,46</b>	<b>0,38</b>
	<b>MUP</b>	8,10	8,67	10,39	9,07	9,37	9,02	9,29	5,27	8,28	7,38	<b>8,48</b>	<b>1,39</b>
	<b>ROG</b>	5,26	8,26	8,28	8,81	6,88	7,62	7,48	8,14	3,20	nd	<b>6,59</b>	<b>2,34</b>
	<b>TBX</b>	nd	4,19	7,67	nd	nd	nd	6,19	nd	6,41	nd	<b>3,65</b>	<b>2,28</b>
<b>FS+EN_D</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>
<b>Médium</b>	<b>CP</b>	8,61	9,21	10,32	9,16	8,81	9,69	8,92	9,29	8,95	9,24	<b>9,22</b>	<b>0,49</b>
	<b>MUP</b>	8,37	9,00	9,87	8,37	8,47	8,66	8,98	9,23	8,21	8,14	<b>8,73</b>	<b>0,54</b>
	<b>ROG</b>	5,28	8,33	7,32	8,25	6,69	7,89	7,23	9,10	3,00	nd	<b>6,51</b>	<b>2,36</b>
	<b>TBX</b>	nd	3,00	7,15	nd	4,96	nd	5,04	nd	4,86	nd	<b>3,50</b>	<b>1,86</b>

FS – vzorek stolice, EN – enterální výživa, A – Foritini Multi Fibre, B – Fresubin Energy Fibre, C – Renutryl Booster, D Ensure Plus Advance, CP – modifikovaný Wilkins-Chalgren pro celkové počty anaerobů, MUP – modifikovaný Wilkins-Chalgren + mupirocin pro bifidobakterie, ROG – Rogosa agar pro laktobacily, TBX – Tryptone Bile X-Glucuronide Medium (*Escherichia coli*), nd – nedetokováno <10<sup>2</sup> KTJ/g, SD – směrodatná odchylka

Uvedená data jsou také zobrazena v grafu na obrázku 6., kde jsou patrné i odlehlé hodnoty i výše uvedený staticky významný rozdíl v počtu bifidobakterií kultivovaných ve Fortini Multi Fibre (A).

Obrázek 6. Počty bakteriálních kolonií (log KTJ/g = CFU/g) u vzorků FS, FS + EN\_A, FS + EN\_B, FS + EN\_C, a FS + EN\_D v boxplotovém grafu; upraveno podle Modrackova et al. (2021)



Celkové počty anaerobních bakterií dosáhly více než  $10^9$  KTJ/g a u jednotlivých EN byly podobné i u původních FS. Stejný trend byl pozorován u dalších dvou detekovaných skupin. Lactobacily vykazovaly v průměru počty  $6,21 \pm 2,43$  až  $6,71 \pm 2,59$  log KTJ/g, což je téměř o 1,5 řádu vyšší než u FS. Průměrné množství detekovaných bakterií *E. coli* ve vzorcích stolice bylo okolo 5 log KTJ/g, nárůst *E. coli* u EN se pohyboval v rozmezí  $3,50 \pm 1,86$  až  $6,21 \pm 2,74$  log KTJ/g. Bifidobakterie byly detekovány v signifikantně nižších počtech  $7,14 \pm 1,56$  log KTJ/g u Fortini Multi Fibre při porovnání s původním FS  $8,86 \pm 0,68$  log KTJ/g. Ostatní EN nevykazovaly zlepšení růstu bifidobakterií a umožnily jim růst pouze v rozsahu  $10^7$ – $10^9$  KTJ/g.

## 6 Diskuze

Na lidi je momentálně pohlíženo jako na superorganismus, neboť naše mikrobiota se vyvíjí společně s námi a je ovlivňována velkým množstvím faktorů, díky kterým mění svoje složení a expresi genů (Ley et al. 2008). Mikrobiotu lze, díky znalostem těchto faktorů, modulovat (David et al. 2014). Zásahy mohou být dietetické i nedietetické. Tato práce se zaměřila na dietetickou modulaci mikrobioty, konkrétně prostřednictvím enterální výživy (EN). Cílem této práce bylo zjistit, zda rozdílné složení EN bude mít vliv na růst bakterií, a tedy zda by některá z testovaných EN nemohla zlepšit bakteriální profil hostitele prostřednictvím podpory probiotických skupin mikroorganismů jako jsou bifidobakterie a laktobacily. Komerční EN se liší ve složení, pro nás byl nejdůležitější rozdíl v obsahu prebiotických složek, které modulují mikrobiotu (Macfarlane et al. 2006). Aby látka mohla být označena za prebiotikum, je nutné, aby do střeva dorazila v nezměněné podobě – tedy byla nestravitelná, aby byla fermentovatelná střevními bakteriemi a aby měla pozitivní vliv na zdraví. Použité enterální výživy se v obsahu prebiotik velmi lišily. Fortini Multi fibre, který obsahuje sojové polysacharidy, inulin, oligofruktózu, rezistentní škrob, arabskou gumu a celulózu, Fresubin Energy Fibre inulin z čekanky, Ensure Plus Advance fruktooligosacharidy a Renutryl Booster neobsahuje žádné prebiotické složky, ale obsahuje linolovou a linolenovou kyselinu. Inulin a oligofruktóza mají pozitivní vliv na růst rodu *Bifidobacterium*, za současného snižování populací *E. coli* a *Clostridium* (Wang & Gibson 1993). Tyto dvě prebiotické složky jsou zatím nejlépe prozkoumané a zdá se, že mají skutečně všechny prebiotické účinky, zejména na bifidobakterie (Birkeland et al. 2020). Rezistentní škrob splňuje podmínku nestravitelnosti tím, že má škrobové molekuly obalené bílkoviny rostlinného matrixu a bílkoviny buněčné stěny, které jsou člověkem nestravitelné (Birt et al. 2013). Rezistentní škrob je opět metabolizován střevními bakteriemi na SCFA, zejména butyrát, který má vliv na udržování zdravé střevní bariéry (Robertson 2020). Propionát a acetát se dostávají vrátnicovou žílou do jater, kde jsou metabolizovány na glukózu, což má velmi pozitivní vliv na pacienty s podvýživou (je možné takto získat až 20 % energie navíc) a tedy i na pacienty s CD (Solař et al. 2010). Při výběru EN by tyto rozdíly měly být brány v potaz. Obsah rozpustné vlákniny může mít efekt na produkci SCFA a konzistenci stolice (Mizuno et al. 2020). Obohacování EN o prebiotické složky podporuje růst pozitivně působících bakterií, jako například bifidobakterií a tímto zvyšuje produkci acetátu (Whelan 2007). Enterální výživy jsou ideální médium pro růst bakterií (Whelan et al. 2001), podle Modráčkové et al. (2019) například pro zástupce rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Escherichia* v případě růstu v čisté kultuře. Na druhou stranu je známo, že prebiotické složky přidávané do EN mohou taktéž podporovat růst patogeních bakterií – jako například klostridií (Rada et al. 2008, Bunešová et al. 2012a). Podle našich výsledků byly bifidobakterie a lactobacilli detekované v FS dárců schopné růst v testovaných EN i s ohledem na ostatní vyskytující se bakterie. Dalším faktorem, který může mít vliv na složení střevní mikrobioty jsou vitamíny a jejich zastoupení v dietě. Například na vitamín D<sub>3</sub> existují studie, které předpokládají jeho pozitivní efekt na složení mikrobioty pacientů s CD (Bashir et al. 2016). Také suplementace vitamínu A dětem do dvou let zlepšila počty bifidobakterií (Huda et al. 2019). Počet studií zabývajících se vlivem vitamínů na střevní mikrobioty a vybrané bakteriální skupiny je zatím omezený.

Batch kultivace (jednorázová kultivace v uzavřeném systému) poskytuje příležitost, jak testovat prebiotika a další nutrienty na populacích bakterií, od jednoho bakteriálního druhu po komplexní střevní mikrobiotu (Bunešová et al. 2012b, Modrackova et al. 2019). *In vitro* kontinuální kultivace s imobilní střevní mikrobiotou, která dokáže mimikovat jak planktonní, tak biofilmový růst, je možné využít pro produkci kontrolované a stabilní „umělé“ střevní mikrobioty, s vysokou koncentrací bakteriálních buněk. Tato technologie má potenciální možné využití jako alternativa k fekální transplantaci (Bircher et al. 2018, Lacroix et al. 2015). Obě tyto metody kultivace bakterií mohou být použity k dalšímu výzkumu složek EN pro modulaci mikrobioty pacientů s CD.

V této bakalářské práci uvedené vzorky byly více analyzovány ve studii Modrackova et al. (2021). V dané studii byly dále sledovány vzniklé metabolity (tedy SCFA a meziprodukt laktát) a zastoupení jednotlivých vykultivovaných bakterií. Z SCFA byla konkrétně sledována množství acetátu, propionátu, formiátu, laktátu, a butyrátu. Jejich množství se lišilo mezi jednotlivými EN. V průměru nejvyšších hodnot dosahoval laktát a acetát, jakožto produkty bifidobakterií a laktobacilů. Hodnoty acetátu se u tří sledovaných EN téměř ztrojnásobily (konkrétně Fresubin Energy Fibre ( $142.32 \pm 53.31$  mM), Renutryl Booster ( $165.98 \pm 47.90$ ) a Ensure Plus Advance ( $145.22 \pm 63.82$  mM), u poslední EN (Fortini Multi Fibre) byla v porovnání s ostatními EN hodnota acetátu znatelně nižší ( $53.94 \pm 31.33$  mM). Toto zjištění koreluje s nižším množstvím bifidobakterií v FS kultivovaných ve Fortini Multi Fibre. U této EN se také ukázal opačný poměr acetát:laktát než u ostatních EN. Další hodnotou, která byla u Fortini Multi Fibre jedna z nejnižších, je hodnota butyrátu ( $10.45 \pm 15.70$  mM), nejnižší však byla u Ensure Plus Advance ( $7.01 \pm 11.49$  mM). Hodnoty propionátu byly naproti výše uvedeným hodnotám podobné u všech čtyř EN. Co se týče zastoupení jednotlivých bakterií, průměrně největší zastoupení měly kmeny Actinobacteria a Firmicutes (oba  $\approx 40.53\%$ ), následovaly Proteobacteria (5.98%) a Bacteroidetes (2.30%). Čeledi *Bifidobacteriaceae* (33.73%), *Enterobacteriaceae* (5.52%) a *Lactobacillaceae* (0.16%) byly dále analyzovány pro porovnání s hodnotami z kultivace a s obsahy SCFA. U EN Fresubin Energy Fibre byl pozorován největší nárůst *Bifidobacteriaceae* z 34 na 53 %, následoval jej Renutryl Booster (42 %). Naproti tomu u EN Fortini Multi Fibre byly bifidobakterie na pouhých 10 %. U Fresubin Energy Fibre a Ensure Plus Advance byly *Lactobacillaceae* téměř nedetekovatelné, zatímco u Fortini Multi Fibre a Renutryl Booster jejich zastoupení vzrostlo na 34 a 33 %. Přítomnost *Enterobacteriaceae* nebyla nijak zásadně ovlivněna žádnou z enterálních výživ. Je známo, že složení a diverzita střevního mikrobiomu jsou do jisté míry individuální (Johnson, 2020). Což potvrdila i studie Modrackova et al. (2021), kdy navrhuje individuální přístup při modulaci střevní mikrobioty a volbě enterální výživy.



## 7 Závěr

Cílem této práce bylo analyzovat pomocí kultivačních technik kvalitativní a kvantitativní mikrobiální složení fekálních vzorků kultivovaných na různých enterálních výživách (EN) *in vitro*. Zjistit tak, zda by rozdíl ve složení určitých komponent může mít vliv na složení střevního mikrobiomu pacientů s Crohnovou nemocí (CD).

Vzorky stolice dětí s CD byly sice nahrazeny vzorky kontrolní skupiny, tedy zdravých dětí, ale i tak se podařilo získat zajímavé výsledky, které naznačují to, že i drobné změny ve složení EN významně ovlivňují počty bifidobakterií, laktobacilů a *E. coli* po kultivaci *in vitro*. Obdobný výsledek lze očekávat i v případě kultivace vzorků od pacientů s CD. Navíc je z výsledků následné studie patrné, že složení fekální mikrobioty je velmi individuální, tudíž je třeba zvažovat možnosti personalizované terapie připravené pro daného pacienta. Také hypotéza bakalářské práce byla potvrzena. Výsledky ukazují, že rozdílné složení a množství prebiotických složek a vitamínů ovlivnilo počty kultivovaných bakterií v *in vitro* experimentu, a může mít vliv na kvantitu a druhové složení mikroorganismů ve vzorcích stolice konzumentů. Bylo by určitě zajímavé do budoucna tyto komponenty testovat v podobném *in vitro* modelu nebo modelu simulujícím podmínky střeva.

## 8 Literatura

- Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A. 2018, May 1. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Elsevier Ltd.
- Alatab S et al. 2020. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* **5**:17–30. Elsevier Ltd.
- Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown E, Finlay B. 2014. The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Frontiers in Immunology* **5**.
- 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. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. Available from [/pmc/articles/PMC4875045/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811111/) (accessed April 29, 2021).
- Belizário JE, Napolitano M. 2015a. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers Media S.A.*
- Belizário JE, Napolitano M. 2015b, October 6. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers Media S.A.* Available from [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) (accessed April 11, 2021).
- ben David Y et al. 2015. Ruminococcal cellulosome systems from rumen to human. *Environmental Microbiology* **17**:3407–3426. Blackwell Publishing Ltd.
- Bircher L, Schwab C, Geirnaert A, Lacroix C. 2018. Cryopreservation of artificial gut microbiota produced with *in vitro* fermentation technology. *Microbial Biotechnology* **11**:163–175. John Wiley and Sons Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12844> (accessed April 28, 2021).
- Birkeland E, Gharagozlian S, Kåre ·, Birkeland I, Valeur J, Måge I, Rud I, Aas A-M. 2020. Prebiotic effect of inulin-type fructans on faecal microbiota and short-chain fatty acids in type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *European Journal of Nutrition* **59**:3325–3338. Available from <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02282-5> (accessed April 28, 2021).
- Birt DF et al. 2013, November 1. Resistant starch: Promise for improving human health. *American Society for Nutrition*. Available from <https://academic.oup.com/advances/article/4/6/587/4595564> (accessed April 28, 2021).
- Bohatcová E. 2015. Enterální výživa pohledem farmaceuta. *Praktické lékařství* **11**:127–132.
- Bradley PH, Pollard KS. 2017. Proteobacteria explain significant functional variability in the human gut microbiome **5**:36.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Kňazovická V, Ročková Š, Geigerová M, Božik M. 2012a. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica* **57**:273–275. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-012-0123-8> (accessed April 28, 2021).
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Kňazovická V, Ročková Š, Geigerová M, Božik M. 2012b. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica* **57**:273–275. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-012-0123-8> (accessed April 28, 2021).
- Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-De Jong I, Ringel Y, Carroll I, de Vos WM, Salojärvi J, Satokari R. 2016. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME Journal* **10**:1002–1014.

- Clinton SK, Bostwick DG, Olson LM, Mangian HJ, Visek WJ. 1988. Effects of Ammonium Acetate and Sodium Cholate on N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced Colon Carcinogenesis of Rats. *Cancer Research* **48**.
- Critch J, Day AS, Otley A, King-Moore C, Teitelbaum JE, Shashidhar H. 2012. Use of Enteral Nutrition for the Control of Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **54**:298–305. Available from <https://journals.lww.com/00005176-201202000-00029> (accessed April 28, 2021).
- Cummings JH, Englyst HN. 1991. What is dietary fibre? *Trends in Food Science and Technology* **2**:99–103. Elsevier.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:443–459. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x> (accessed April 22, 2021).
- D'Argenio V, Salvatore F. 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* **451**:97–102. Elsevier B.V.
- Dasty M. 2012. Enterální výživa v klinické praxi. *Interni Medicina pro Praxi* **14**:152–156.
- David LA et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**:559–563. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nature12820> (accessed April 26, 2021).
- de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. 2016, December 1. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. Elsevier Ltd.
- de Filippo C, Cavalieri D, di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:14691–14696. National Academy of Sciences. Available from [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005963107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005963107) (accessed March 25, 2021).
- Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity* **32**:1720–1724. *Int J Obes (Lond)*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779823/> (accessed March 24, 2021).
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology* **44**:343–350.
- Flint HJ. 2006. The significance of prokaryote diversity in the human gastrointestinal tract. *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance: Published for the Society for General Microbiology*:65–90.
- Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999, March 1. Enterococci at the crossroads of food safety? Elsevier.
- Fric P. 2007. Probiotics and prebiotics - Renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine* **2**:237–270. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.2478/s11536-007-0031-5> (accessed April 6, 2021).
- Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Labois C, Cherbut C, Hoebler C. 2004. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **287**:1168–1174. American Physiological Society. Available from <http://www.ajpgi.org> (accessed April 13, 2021).

- Gevers D et al. 2014. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host and Microbe* **15**:382–392.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995, June 1. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. American Society for Nutrition. Available from <https://academic.oup.com/jn/article/125/6/1401/4730723> (accessed April 6, 2021).
- Grofová MZ. 2009. pro domácí použití **6**:169–171.
- Gschwind R, Fournier T, Kennedy S, Tsatsaris V, Cordier A-G, Barbut F, Butel M-J, Wydau-Dematteis S. 2020. Evidence for contamination as the origin for bacteria found in human placenta rather than a microbiota. *PLOS ONE* **15**:e0237232. Public Library of Science. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0237232> (accessed May 3, 2021).
- Huda MN, Ahmad SM, Kalanetra KM, Taft DH, Alam MJ, Khanam A, Raqib R, Underwood MA, Mills DA, Stephensen CB. 2019. Neonatal Vitamin A Supplementation and Vitamin A Status Are Associated with Gut Microbiome Composition in Bangladeshi Infants in Early Infancy and at 2 Years of Age. *Journal of Nutrition* **149**:1075–1088. Oxford University Press. Available from </pmc/articles/PMC6543205/> (accessed April 29, 2021).
- Hurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. 2008. Mode of Delivery – Effects on Gut Microbiota and Humoral Immunity. *Neonatology* **93**:236–240. Karger Publishers. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/111102> (accessed April 11, 2021).
- Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes and Development* **27**:701–718.
- Lacroix C, de Wouters T, Chassard C. 2015, April 1. Integrated multi-scale strategies to investigate nutritional compounds and their effect on the gut microbiota. Elsevier Ltd.
- Lagier JC et al. 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology* **1**:1–8. Nature Publishing Group. Available from [www.nature.com/naturemicrobiology](http://www.nature.com/naturemicrobiology) (accessed March 24, 2021).
- Levine A, Wine E. 2013. Effects of Enteral Nutrition on Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **19**:1322–1329. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/19/6/1322-1329/4603178> (accessed April 28, 2021).
- Ley RE et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**:1647–1651. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://science.sciencemag.org/content/320/5883/1647> (accessed April 26, 2021).
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:11070–11075. Proc Natl Acad Sci U S A. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16033867/> (accessed March 24, 2021).
- Liu J et al. 2017. Effect of Vitamin A supplementation on gut microbiota in children with autism spectrum disorders - A pilot study. *BMC Microbiology* **17**. BioMed Central Ltd. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28938872/> (accessed April 29, 2021).
- MACFARLANE S, MACFARLANE GT, CUMMINGS JH. 2006. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **24**:701–714. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2006.03042.x> (accessed April 13, 2021).
- Maladie de Crohn. (n.d.). Available from <https://www.aboutkidshealth.ca/fr/article?contentid=923&language=french> (accessed March 22, 2021).

- Martínez I et al. 2013. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME Journal* **7**:269–280. Nature Publishing Group. Available from [www.nature.com/ismej](http://www.nature.com/ismej) (accessed March 24, 2021).
- McDermott AJ, Huffnagle GB. 2014. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* **142**:24–31. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12231> (accessed December 30, 2019).
- Mgr M, Vrzalová D, Konečný MM, Ph D, Ehrmann J. 2011. Enterální a parenterální výživa u pacientů s nespecifickými střevními záněty **8**:337–338.
- Mizuno H, Bamba S, Abe N, Sasaki M. 2020. Effects of an alginate-containing variable-viscosity enteral nutrition formula on defecation, intestinal microbiota, and short-chain fatty acid production. *Journal of Functional Foods* **67**:103852. Elsevier Ltd.
- Modrackova N, Bunesova V, Vlkova E, Musilova S, Mrvikova I, Bronsky J, Copova I, Hradsky O, Nevoral J. 2019. Enteral Nutrition as a Growth Medium for Cultivable Commensal Bacteria and Its Effect on Their Quantity in the Stool of Children with Crohn's Disease. *Journal of Medicinal Food* **22**:810–816. Mary Ann Liebert Inc. Available from <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2019.0021> (accessed April 28, 2021).
- Morgan XC et al. 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology* **13**:1–18. BioMed Central. Available from <https://link.springer.com/articles/10.1186/gb-2012-13-9-r79> (accessed March 24, 2021).
- Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern DJ, König CC, Valiante V, Schroeckh V, Brakhage AA. 2015, April 20. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers Media S.A.* Available from [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) (accessed April 15, 2021).
- Ng KM et al. 2013. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* **502**:96–99.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**:511–521. American Academy of Pediatrics. Available from <https://pediatrics.aappublications.org/content/118/2/511> (accessed April 11, 2021).
- Rada V, Nevoral J, Trojanová I, Tománková E, Šmehilová M, Killer J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Anaerobe* **14**:205–208. Academic Press.
- Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews* **38**:996–1047. Blackwell Publishing Ltd. Available from [/pmc/articles/PMC4262072/](http://pmc/articles/PMC4262072/) (accessed March 24, 2021).
- Robertson MD. 2020. Prebiotics and type 2 diabetes: targeting the gut microbiota for improved glycaemic control? *Practical Diabetes* **37**:133–137. John Wiley and Sons Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pdi.2285> (accessed April 28, 2021).
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. 2018, February 1. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. Available from [/pmc/articles/PMC5847071/](http://pmc/articles/PMC5847071/) (accessed April 29, 2021).
- Rubio A, Pigneur B, Garnier-Lengliné H, Talbotec C, Schmitz J, Canioni D, Goulet O, Ruemmele FM. 2011. The efficacy of exclusive nutritional therapy in paediatric Crohn's disease, comparing fractionated oral vs. continuous enteral feeding. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **33**:1332–1339. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2011.04662.x> (accessed April 28, 2021).

- Ruiz PA, Hoffmann M, Szesny S, Blaut M, Haller D. 2005. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* **115**:441–450. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2005.02176.x> (accessed April 6, 2021).
- Saier Jr. MH, Mansour NM. 2005. Probiotics and Prebiotics in Human Health. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **10**:22–25. Karger Publishers. Available from <https://www.karger.com/Article/FullText/90345> (accessed April 6, 2021).
- Schäffler H, Herlemann DPR, Klinitzke P, Berlin P, Kreikemeyer B, Jaster R, Lamprecht G. 2018. Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's disease patients, but not in healthy controls. *Journal of Digestive Diseases* **19**:225–234. Blackwell Publishing. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29573237/> (accessed April 29, 2021).
- Schleifer K-H. 2009. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). Pages 19–1317 *Systematic Bacteriology*. Springer New York.
- Scott KP, Martin JC, Duncan SH, Flint HJ. 2014. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, *in vitro*. *FEMS Microbiology Ecology* **87**:30–40. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/1574-6941.12186> (accessed April 13, 2021).
- Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. 2012. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology* **13**:1–18. BioMed Central. Available from <https://link.springer.com/articles/10.1186/gb-2012-13-6-r42> (accessed April 11, 2021).
- Shin NR, Whon TW, Bae JW. 2015, September 1. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Elsevier Ltd.
- Solař MS, Karlova U, Střešovice ÚVN. 2010. Prebiotika a probiotika v klinické praxi **7**:14–17.
- Stiles ME, Holzapfel WH. 1997, April 29. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Elsevier.
- Taverniti V, Guglielmetti S. (n.d.). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept).
- Thursby E, Juge N. 2017, June 1. Introduction to the human gut microbiota. Portland Press Ltd. Available from </pmc/articles/PMC5433529/> (accessed March 22, 2021).
- Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, de Vos WM, Zoetendal EG. 2013. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME Journal* **7**:707–717. ISME J. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23190729/> (accessed March 24, 2021).
- Turnbaugh PJ et al. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**:480–484. Nature. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19043404/> (accessed March 24, 2021).
- Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2015, January 10. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: Champion colonizer of the infant gut. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/pr2014156> (accessed April 11, 2021).
- Urbaníková J. 2014. Enterální výživa. *Praktické lékařství* **10**:79–82.
- Vasiljevic T, Shah NP. 2008, July 1. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. Elsevier.

- Veiga M, Costa EM, Silva S, Pintado M. 2018. Impact of plant extracts upon human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*:1–14. Taylor & Francis. Available from <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1540969>.
- Walker AW, Duncan SH, Carol McWilliam Leitch E, Child MW, Flint HJ. 2005. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3692–3700. American Society for Microbiology. Available from <http://aem.asm.org/> (accessed April 22, 2021).
- Walsh CJ, Guinane CM, O’Toole PW, Cotter PD. 2014. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters* **588**:4120–4130. Elsevier B.V. Available from <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2014.03.035> (accessed April 21, 2021).
- Wang X, Gibson GR. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology* **75**:373–380. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02790.x> (accessed April 28, 2021).
- Wexler AG, Goodman AL. 2017. An insider’s perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nature Microbiology* **2**.
- Whelan K. 2007. Enteral-tube-feeding diarrhoea: Manipulating the colonic microbiota with probiotics and prebiotics - BAPEN Symposium 2 on “Pre- and probiotics.” Pages 299–306 *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press. Available from <https://doi.org/10.1017/S0029665107005551> (accessed April 26, 2021).
- Whelan K, Gibson GR, Judd PA, Taylor MA. 2001. The role of probiotics and prebiotics in the management of diarrhoea associated with enteral tube feeding. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **14**:423–433. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-277X.2001.00322.x> (accessed April 26, 2021).
- Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. 2006. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. Pages 235–243 *Journal of Clinical Gastroenterology*.
- Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, Belobrajdic DP, Feng QJ, Zhang W. 2020, February 1. Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: A narrative review. MDPI AG. Available from </pmc/articles/PMC7071260/> (accessed April 29, 2021).
- Yatsunencko T et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**:222. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. Available from <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- Zhang H et al. 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:2365–2370. Proc Natl Acad Sci U S A. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19164560/> (accessed March 24, 2021).





