

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**$^1\text{H}$  NMR biomarkery stravy v lidské stolici**

**Diplomová práce**

**Bc. Veronika Faltusová**

**Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "<sup>1</sup>H NMR biomarkery stravy v lidské stolici" 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. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za pomoc, vlídnost a cenné rady při zhotovení této diplomové práce. Děkuji také všem dobrovolníkům za ochotnou účast ve studii a své rodině za podporu.

# <sup>1</sup>H NMR biomarkery stravy v lidské stolici

## Souhrn

Pomocí pilotní otevřené jednoramenné nerandomizované intervenční studie provedené na sedmi dobrovolnících jsme zjišťovali, nakolik jednorázový příjem konkrétního pokrmu s vysokým obsahem vlákniny a polyfenolů nebo bílkovin změní profil fekálních metabolitů. Metabolomika stolice je progresivním nástrojem schopným odhalovat funkční fermentační vlastnosti mikrobiálního střevního osídlení jednotlivce, využívá se pro zkoumání vlivu mikrobioty na lidské zdraví. Znalosti, nakolik akutní příjem potravy několik hodin před odběrem přispějí k pochopení faktorů ovlivňujících metabolomiku stolice. Výsledky by mohly objasnit vliv stravy na lidské zdraví, neboť řada látek vznikajících v tlustém střevě, např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou absorbovány a vstupují do biochemických procesů v těle.

Zdraví dobrovolníci (průměrný věk 33 let) byli rekrutováni na základě dobrovolného informovaného souhlasu. Vzorky od všech subjektů byly odebírány na baseline bez intervence 2 dny po sobě. Poté jim byla v průběhu jednoho dne podána testovaná potravina, 2 porce čočkové polévky, a následně byly odebrány denně vzorky stolice. Po wash-out periodě (průměrně 7 dní, u každého jedince jinak dlouhé) byl cyklus zopakován s 5 kusy jablek.

Celkem bylo odebráno a analyzováno 70 vzorků, které byly měřeny metodou 500 MHz <sup>1</sup>H nukleární magnetické rezonanční spektroskopie s pulzní sekvencí 1d noesy. Získaná spektra byla vyhodnocena, zpracována a kvantifikována v programu Chenomx.

PCA analýza, Random Forest analýza a univariantní statistika, vzhledem k vysoké variabilitě mezi dárci, neukázaly významné rozdíly produkce metabolitů před a po intervenci. Byl ale pozorován u některých dárců po intervenci čočkovou polévkou vzrůst koncentrace acetátu, propionátu, 3-fenylpropionové kyseliny, isovalerátu, threoninu, glycerolu. Po intervenci jablky někteří jedinci měli ve vzorcích stolice zvýšený obsah malonátu, glukosy, methanolu, formiátu a threoninu. Profil metabolitů ve vzorcích byl specifický pro jednotlivé subjekty, Random Forest analýza dokázala spolehlivě predikovat dárce dle obsažených metabolitů ve stolici.

**Klíčová slova:** biomarkery, stolice, složení stravy, <sup>1</sup>H NMR, metabolomika

# **<sup>1</sup>H NMR Biomarkers of Diet in Human Stool**

## **Summary**

We conducted a open-label sible arm uncontrolled pilot intervention study with seven volunteers we investigated how a single intake of a specific meal high in fiber and polyphenols or proteins would change the profile of fecal metabolites. Stool metabolomics is a progressive tool able revealing the functional fermentation properties of an individual's microbial intestinal population. The findings are useful in understanding the effects of the microbiota on human health. Knowledge of how acute food intake a few hours before sampling will help to understand the factors increasing variation in stool metabolomics. The results could help to understand the impact of diet on human health. Many substances produced in the large intestine such as short-chain fatty acids and others are absorbed and enter biochemical processes in the body.

Healthy volunteers (average age 33) were recruited with voluntary informed consent. Samples from all subjects were taken on baseline without intervention for 2 consecutive days. The next day, they were given the test food - 2 servings of lentil soup and after that took 3 stool samples every day. After the wash-out period (average 7 days, different for everyone) the cycle was repeated with 5 apples.

A total of 70 samples were taken and analyzed. Samples were measured by 500 MHz <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy using a 1d noesy pulse sequence. The acquired spectra were evaluated, processed and quantified using the Chenomx software.

PCA analysis, Random Forest analysis and univariate statistics didn't show significant differences in metabolite production before intervention and after owing to a high variability between subjects. After lentil-soup intervention, some subjects showed an increas in the concentration of acetate, propionate, 3-phenylpropionic acid, isovalerate, threonine, glycerol. After apple intervention, some subjects had increased levels of malonate, glucose, methanol, formate, and threonine in stool samples. The profile of metabolites in the samples was specific to each subject, Random Forest analysis was able to reliably predict donors from stool samples.

**Keywords:** biomarkers, stool, diet composition, <sup>1</sup>H NMR, metabolomics

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Trávicí soustava</b> .....	<b>9</b>
3.1.1 Metabolismus živin.....	10
<b>3.2 Střevní mikrobiota</b> .....	<b>13</b>
3.2.1 Složení střevní mikrobioty.....	14
3.2.2 Mikrobiální metabolity .....	15
3.2.3 Působení mikrobioty na zdraví .....	17
3.2.4 Ovlivnění mikrobioty střev stravou .....	20
3.2.5 Funkce metabolitů mikrobioty.....	22
3.2.6 Osa střevo-mozek .....	24
<b>3.3 Složení stolice</b> .....	<b>24</b>
3.3.1 Biomarkery stravy ve stolici.....	25
<b>3.4 NMR</b> .....	<b>26</b>
3.4.1 Princip metody.....	26
3.4.2 Metabolomika stolice.....	26
<b>4 Metodika</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Demografie dobrovolníků</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 Strava v průběhu studie</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 Odběr vzorků</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4 Analýza vzorků</b> .....	<b>29</b>
4.4.1 Použité pomůcky, chemikálie, laboratorní a software vybavení .....	29
4.4.2 Příprava vzorků pro analýzu.....	30
4.4.3 Příprava pro NMR .....	30
4.4.4 Měření NMR.....	31
4.4.5 Stanovení sušiny .....	31
<b>4.5 Statistické vyhodnocení</b> .....	<b>31</b>
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 PCA analýza</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2 Test oboustranné rovnosti</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3 Random Forest analýza</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4 Koncentrace metabolitů ve vzorcích před a po intervenci</b> .....	<b>36</b>
<b>6 Diskuse</b> .....	<b>41</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>44</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>45</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>54</b>
<b>10 Samostatné přílohy</b> .....	<b>I</b>

# 1 Úvod

Stravovací návyky jsou pro člověka významným faktorem působící na zdraví. Zdraví je ovlivňováno i působením střevní mikrobioty, která je zase modifikována také volbou přijímaných potravin. Významná část našeho imunitního systému sídlí ve střevech a stav mikrobiomu je pro jeho správné fungování esenciální. Mikroorganismy osidlující tlusté střevo disponují metabolickou aktivitou, přičemž přeměňují nestrávené zbytky potravy dostávající se do distální části gastrointestinálního traktu – tlustého střeva. Velký význam má pro stav mikrobioty primární osídlení, které je utvářeno průchodem porodními cestami, ale daleko významnější pro jeho fungování je to, jaké podmínky mu hostitelský organismus vytváří. Zásadní vliv na mikrobiotu má volba konzumovaných potravin a látek přijímaných v potravinách (Zhang et al. 2018). Mikrobiotou vznikající metabolity jsou odrazem stravy. Metabolity mají schopnost procházet skrze stěnu střev, vstřebávat se do krevního oběhu a distribuovat po celém organismu. Z dlouhodobějšího hlediska má strava schopnost ovlivňovat i druhové zastoupení mikroorganismů a tím měnit výsledné vlastnosti mikrobioty s odlišnou prosperitou pro hostitelský organismus (Ramos & Martín 2021).

Mikrobiální osídlení střev svojí aktivitou ovlivňuje lidský fenotyp a má schopnost regulovat metabolické pochody. Kromě toho, že mikrobiota působí na hostitelský metabolismus, podílí se i na funkčnosti jeho imunity. Příkladem efektů, které díky našemu mikrobiálnímu osídlení střev probíhají, je ochrana vůči patogenům, bakteriální signalizace o lokálním či systémovém zánětu, pak i schopnost štěpit komplexní sacharidy, produkovat některé vitaminy a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, butyrát a propionát). Dále má mikrobiota efekt na modulaci nervového systému. Produkci metabolitů je střevní mikrobiota schopna interagovat s mozkem a ovlivňovat rozhodování. Z toho vyplývá přímý efekt mikrobiálního osídlení střev na rozsáhlou škálu funkcí v organismu, mezi něž patří ovlivnění chuťových preferencí, změny nálad i vznik depresí. Resorpce vznikajících metabolitů ze střev do krve tedy může přispívat ke zdraví-ovlivňujícím pochodům (Zhang et al. 2018; Silva et al. 2020).

Na přítomnost metabolitů ve střevním lumen má značný vliv konzumovaná strava, zastoupení některých látek lze zjistit z analýzy stolice. Právě metabolické analýzy fekálního materiálu zasluhují vyšší pozornost, výkaly totiž přichází do přímého kontaktu s tlustým střevem. Výhodou je neinvazivní získávání vzorků. Spolehlivou metodou pro měření je nukleární magnetická rezonance s vysokým rozlišením ( $^1\text{H}$  NMR), která dokáže popsat i kvantifikovat desítky metabolitů čili sledovat metabolický profil biologických vzorků i v jejich nativní formě. Z řady důvodů nachází metoda NMR uplatnění při sledování výskytu biomarkerů, a to hned v několika různých vědeckých odvětvích, pro poznání metaboliky je značným přínosem (Savorani et al. 2013; Karu et al. 2018).

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

Cílem práce je na malé studii změřit složení stolice u sedmi dobrovolníků na běžné stravě a následně sledování změny ve složení vzorků po intervenci stravou se zvýšeným obsahem polyfenolů, bílkovin nebo vlákniny.

V malé intervenční studii budou sledovány vzorky stolice dobrovolníků. Nejprve budou odebrány vzorky stolice při konzumu běžné stravy, dále budou odebrány vzorky po konzumaci dvou porcí čočkové polévky a v druhé části vyššího množství jablek (5 ks denně). U získaných vzorků bude analyzován profil přibližně 60 metabolitů na 500 MHz NMR s pomocí pulzní sekvence 1d noesy. Rozdílové metabolity budou kvantifikovány v programu Chenomx a statisticky vyhodnoceny pomocí necílové a cílové, vícerozměrné a klasické statistické analýzy.

### **Hypotéza**

Předpokládáme, že navýšením příjmu vlákniny se současným zvýšením bílkovin nebo polyfenolů ve stravě se projeví rozdílným zastoupením metabolitů ve střevním lumen a potažmo i ve stolici v porovnání s běžnou dietou.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Trávicí soustava

Trávení potravy je klíčové pro lidskou výživu a zdraví. Biologická dostupnost některých živin z přijímaných potravin je omezená. Právě proces trávení umožňuje značný podíl živin z potravinové struktury uvolnit, čímž umožní jejich absorpci do krevního řečiště, a tedy i jejich využitelnost. Jiné nutrienty zůstanou i přes působení trávicích procesů nedostupnými a bez možnosti absorpce. Kromě živinové dostupnosti a dostatečnosti má také význam rychlost jejich uvolňování, což sleduje například ukazatel glykemický index (Boland 2016). Mechanického rozmělnění potravy je dosaženo především v ústech a žaludku, zatímco enzymatické trávení a vstřebávání živin je lokalizováno zejména v tenkém a tlustém střevě (Guerra et al. 2012). Omezená stravitelnost některých živin z potravin může být způsobena různými strukturálními bariérami, například zapouzdření u rostlinných potravin. Možnou cestou, jak zpřístupnit živiny, je zpracování potravin tepelnou či mechanickou úpravou (Verkempinck et al. 2020).

Konzumaci potravin spolu se základními živinami přijímáme i řadu biologicky aktivních látek, které mají možnost mezi sebou vzájemně působit. Z důvodu současného příjmu hned několika účinných látek najednou je třeba brát v úvahu kombinovaný účinek látek a dle toho posuzovat bezpečnost potravin i její zdravotní rizika či benefity (Savorani et al. 2013).

Proces trávení potravy prostřednictvím lidského gastrointestinálního traktu začíná v ústech. **Orální mechanismy**, kterými je žvýkání a tvorba slin umožňují zpracovat potravu pevné konzistence do podoby vhodné k polknutí, také dochází k regulaci teploty (Li et al. 2020). Sliny významně přispívají ke schopnosti trávit potravu, denně jich je produkováno kolem 1 až 1,5 l, dle množství stimulačních podnětů. Hlavní slinné žlázy jsou příušní, podčelistní a podjazykové, uložené v dutině ústní. Sliny jsou tvořeny z 99,5 % vodou, řadou elektrolytů, jako je sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfát, hydrogenuhličitan a součástí je například i glukóza, močovina a jiné. Dále obsahují řadu enzymů a jiných proteinů, příkladem je imunoglobulin A, lysozym, laktoferin a glykoproteiny muciny (Minekus et al. 2014). Katalytická vlastnost byla popsána asi u třiceti enzymatických částic vyskytujících se ve slinách, zahrnuta je amyláza, lysozym, lipáza, fosfatáza a další. Enzymatická funkce slin má vliv mimo jiné i na chuť konzumovaných potravin a působí protektivně vůči zubnímu kazu. Potravinové částice, které byly rozžvýkány, jsou díky zvětšenému povrchu přístupnější pro efektivní působení enzymů. Vzniklý bolus potravin prochází dále do žaludku skrz hltan a jícnem s uplatněním peristaltických pohybů (Salles et al. 2010).

**Žaludek** má funkci především mechanicky mletí trávený materiál a slouží také jako dočasný rezervoár. Anatomie žaludku je popisovaná čtyřmi hlavními částmi – fundus, tělo, antrum a pylorus (Li et al. 2020). Rozložení do podoby menších částic tráveniny dochází i vlivem částečného spolupůsobení enzymatické hydrolýzy. Proximální část žaludku, kterou je fundus a tělo, má význam jako zásobník potravy a dochází v tomto úseku ke smísení bolusu se žaludeční šťávou. Prostředí v žaludku je kyselé, což je dáno vlivem přítomné kyseliny chlorovodíkové (HCl), která způsobuje pokles pH tráveniny až na hodnoty 1,5. Obsahem žaludeční šťávy jsou i enzymy – pepsin, lipázy. V žaludku tedy dochází k významné hydrolýze bílkovin vlivem nízkého pH a současného působení proteolytických enzymů. Distální část žaludku (antrum) poskytuje rozmělnění větších částic a promísení žaludečního obsahu.

Závěrečnou partií žaludku je svěrač pylorus, který funguje jako pumpa pro selektivní vyprázdnění malých částic (chymu) do dvanáctníku. Zároveň svěrač funguje jako filtr, který dokáže zachytit hrubší struktury, které je potřeba podrobit nadále intenzivní degradaci v žaludku. Rychlost vyprazdňování žaludku je pro trávení zásadní parametr, je ovlivnitelná biologickými faktory, složením a strukturou potravy (Guerra et al. 2012). Celková doba, za kterou dojde k úplnému vyprázdnění žaludku je přibližně 3-5 hodin od požití potravy. Pokud by se však jednalo o tekutinu s nízkým obsahem živin, pak doba zadržení v žaludku výrazně kratší, a naopak delší doba by byla v případě konzumace vysokoenergetické stravy. K ovlivnění rychlosti exkrece chymu dochází v důsledku změn hladiny glykémie. Při stavu hyperglykémie je zbržděna rychlost vstupu glukózy z žaludku do tenkého střeva, a naopak při hypoglykémii je proces vyprazdňování žaludku urychlen. Kontrola sytosti s dopadem na rychlost vyprazdňování žaludku je regulována zpětnou vazbou střeva a mozku, což nastává, pokud makronutrienty doputují do ilea nebo tlustého střeva a dojde k hormonální stimulaci, která způsobuje snížení rychlosti vyprazdňování žaludku a zvýšení sytosti. Dále je intenzita vyprazdňování žaludku ovlivnitelná i mírou fyzické aktivity a vliv má i pohlaví a věk (Li et al. 2020).

Kyselý chymus, vstupující do **tenkého střeva**, se dostává nejprve do části zvané duodenum, kde dochází k neutralizaci tráveniny reakcí hydrogenuhličitanu sodného. Tím se pH dostává přibližně na hodnoty 6,5 a v distálních částech ilea může hodnota vzrůst až na pH kolem 7,5, variabilita je dána dle typu jídla a rychlosti vyprazdňování žaludku. Význam pro trávení v tenkém střevě mají pankreatické enzymy a žluč, jenž jsou uvolňovány do duodena. Primární význam žluči je emulgace tuku a vznik směsných micel, které jsou rozpustné a mají schopnost napomáhat transportu lipofilních látek skrz střevní stěnu, čímž umožňují jejich absorpci (Minekus et al. 2014). Zneutralizované pH umožňuje působit trávicím enzymům, které jsou uvolňovány do vnitřního prostoru tenkého střeva, především sekrecí pankreatu. Pankreatická šťáva je složitou směsí proteáz, amyláz a lipáz, které se podílí na rozkladu makromolekul potravy. K intenzivnímu mechanickému promísení tráveniny s enzymy je dosaženo segmentačními pohyby střev. Aktivní peristaltikou dochází k posunu tráveniny do následujících úseků. Další část tenkého střeva tvoří jejunum a ileum, jenž mají význam především pro absorpci vody a živin skrz enterocyty klků, které tenkému střevu poskytují obrovskou absorpční plochu. Využity jsou transportní mechanismy jednoduché difúze, usnadněné difúze i aktivního transportu. Ileum je osazováno mikrobiotou, která je pro jednotlivé úseky odlišná.

Nevstřebané zbytky tráveniny z tenkého střeva se dále dostávají do **tlustého střeva**, jehož hlavní funkcí je vstřebávání vody, elektrolytů, žlučových solí. Lokální střevní mikroflóra má významné uplatnění ve fermentaci polysacharidů a bílkovin. Dále v těchto distálních částech gastrointestinálního traktu dochází k tvorbě, skladování a eliminaci stolice (Guerra et al. 2012).

### 3.1.1 Metabolismus živin

**Sacharidy** dle tradiční klasifikace na základě chemické struktury jsou děleny na mono-, oligo- a polysacharidy. Toto dělení však není klíčové kritérium pro klasifikaci dle dopadu na lidské zdraví. Jako vhodnější formu klasifikace by byl způsob dělení dle míry jejich schopnosti podléhat trávení a intenzity vstřebatelnosti v tenkém střevě. Takzvané glykemické sacharidy jsou schopné přispívat k sacharidové zásobě v těle. Druhou skupinou jsou nestravitelné

sacharidy bez možnosti absorpce. Dle typového zastoupení sacharidů dochází k ovlivnění glykemické odezvy. Glykemická odezva je také ovlivňována celkovým zastoupením makronutrientů v potravíně. Tuk a bílkoviny snižují glykemickou odezvu lineárně dle množství, přičemž bílkoviny mají asi trojnásobnou efektivitu oproti tuku. Tyto mechanismy jsou velmi komplexně regulovány a souvisí s rychlostí vyprazdňování žaludku (Giacco et al. 2016). Odlišný způsob trávení škrobu je také dán jeho formou, rozdílná je rychlost trávení mezi amylózu a amylopektinem. Pomaleji stravitelná je amylóza, kterou rozkládají střevní alfa-amylázy, zatímco rozklad amylopektinu se děje rychleji. Rychlejší štěpení amylopektinu je pravděpodobně dáno vyšším počtem neredukujících konců, které mohou být zkracovány (Rogers 2010; Giacco et al. 2016). Stravitelnost škrobu lze ovlivnit procesem tepelné úpravy, například při záhřevu uvařené čočky po dobu 12 hodin by došlo k významnému vzestupu glykemické odezvy a zvýšení stravitelnosti v porovnání s čočkou uvařenou za 20 minut bez dalšího tepelného opracování (Giacco et al. 2016). Vzestup glykémie po jídle nastává časně po požití a trvá přibližně hodinu. Zvýšená koncentrace glukózy v krevním oběhu je regulována hormonálně pomocí inzulínu (Li et al. 2020). Vysoké hladiny glukózy a inzulínu jsou zátěží pro lidské zdraví, jedná se o rizikový faktor poklesu inzulínové senzitivity a rozvoje diabetes mellitus 2. typu. Glukosa ve vysokých koncentracích může být také příčinou proliferace cévních buněk a je spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění (Mazzone et al. 2008).

**Vláknina** glykemickou odezvu výrazně zplošťuje a dokáže snižovat riziko onemocnění trávicího traktu i jiných chronických chorob. Lidský organismus neprodukuje enzymy pro její degradaci, a proto nedochází k jejímu trávení až na malé procento, které je substrátem pro fermentační procesy střevní mikrobioty (Rogers 2010). Jako vláknina je označována heterogenní skupina sloučenin, kterou lze klasifikovat různými způsoby jako je chemická struktura nebo rozpustnost (Dai & Chau 2017). Základem struktury dietní vlákniny je řetězec monosacharidů spojených prostřednictvím glykosidických vazeb. V některých případech je modifikována chemickými substituenty, příkladem jsou sulfátové nebo acetylové funkční skupiny. Jednotlivé typy vlákniny liší se velikostí molekuly a chemickým složením vykazují různé vlastnosti (Sonnenburg & Sonnenburg 2014). Dle chování ve vodě je vláknina rozdělována na rozpustnou a nerozpustnou. Konkrétně mezi nerozpustnou vlákninu patří celulóza, většina hemicelulóz a lignin. Hlavními zdroji nerozpustné vlákniny je celozrnné pečivo, otruby a zelenina. Vlákninou se schopností ve vodě bobtnat nebo rozpouštět se je skupina látek například gummy, pektiny, některé hemicelulózy a slizy. Rozpustná vláknina je obsažena například v ovoci, bohatým zdrojem jsou zejména citrusové plody a jablka, dále se vyskytuje v ovsu, ječmeni a luštěninách. Pozitivním efektem rozpustných složek vlákniny je podpora snižování hladiny cholesterolu v krvi. Potenciálním negativem je zpomalování průchodu tráveniny střevy (Rogers 2010). Vláknina má schopnost silně ovlivnit trávení, míru vstřebávání sacharidů z diety, a tedy i modulovat vzestup hladiny glykémie po jídle. Dietní vláknina způsobuje zpomalení vyprazdňování chymu z žaludku, což má za následek zbrzdění procesu trávení sacharidů a omezení rychlosti transportu glukózy skrz enterocyty. Dále je pozitivní funkcí vlákniny vliv na skladbu střevní mikrobioty a produkci mikrobiálních metabolitů. Tím je vysvětleno, proč strava bohatá na luštěniny, zeleninu, ovoce a celozrnné cereálie může mít výrazný vliv na snížení rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění, zejména u diabetických pacientů (Giacco et al. 2016).

Experimentálně bylo potvrzeno, že konzumace různých sacharidových potravin vyvolává u zdravých osob odlišné stavy glykémie. Byl sledován rozdíl glykemické odezvy po konzumaci shodné sacharidové nálože ve formě glukózy, celozrnného chleba a čočky. Výsledkem studie bylo potvrzení, že nejvyšší stavy glykémie vyvolá glukóza, naopak nejnižší výkyv glykémie byl zaznamenán u čočky a bílý chléb vykazovat střední glykemickou odpověď. Také se ukázalo, že kvantum obsažené vlákniny v potravině nemá přímý dopad na glykemický index. Obilná vláknina tudíž nemá tak významný efekt na snížení glykemické odezvy. Bylo pozorováno, že rozdíl v konzumaci bílého pečiva nebo těstovin není při porovnání s jejich celozrnnými alternativami nijak významný. Daleko vyšší schopnost regulace výkyvu glykémie má vláknina obsažená v luštěninách a ty se tedy vyznačují nízkým glykemickým indexem (Jenkins et al. 1981).

**Bílkoviny** jsou tráveny postupným štěpením komplexní molekuly na kratší peptidy a dále na jednotlivé aminokyseliny. Část bílkovin (10–15 %) je štěpena v žaludku, kde působí proteolytické enzymy pepsiny, jejichž aktivitu určuje pH prostředí. Žaludeční enzymy dokáží štěpit bílkoviny při pH 1,8 až 3,5. Vyšší proteolytické aktivity než pepsin dosahují enzymy trypsin a chymotrypsin, jejichž prekurzory jsou vylučované slinivkou spolu s dalšími prekurzory proteáz. Větší část bílkovin je tedy trávena v duodenu a částečně i v jejunu. Naštěpené aminokyseliny nebo krátké peptidy mohou být absorbovány buňkami enterocytů. Ukázalo se, že rychlost resorpce dipeptidů a tripeptidů do enterocytů je významnější než u samostatných aminokyselin, další proteolytické štěpení peptidů pak probíhá v buňkách (Rogers 2010).

**Tuky** jsou u dospělého člověka tráveny především v tenkém střevě a z části i v žaludku. První stupně štěpení tuků probíhají pravděpodobně při tvorbě kapiček emulze, čímž poskytují povrch umožňující absorpci lipáz. Významná část tuku ve stravě, především v průmyslově zpracovaných potravinách, je konzumována už v emulgovaném stavu. V neemulgované formě se tuky do organismu dostávají například jako kuchyňské oleje nebo viscerální tuk z masa. Usnadnění emulgace tuku v těle je podpořeno mechanickým působením úst a žaludku. V žaludku je štěpeno 5–30 % trávených tuků, produktem jsou diglyceridy a volné mastné kyseliny, které napomáhají snazší emulgaci tuku v žaludku. Uplatňující se enzym žaludeční lipáza má optimální aktivitu při pH 5,4, proto efektivně působí především během první hodiny trávení, kdy pH žaludku není extrémně kyselé. Při přechodu potravního bolusu ze žaludku do tenkého střeva se ke štěpení tuků přidává pankreatická lipáza, která produkuje volné mastné kyseliny a 2-monoglycerid, který může být dále úplně degradován na glycerol a samostatné mastné kyseliny (Golding & Wooster 2010). Pankreatická lipáza uvolňuje 50–70 % mastných kyselin z potravy (Bauer et al. 2005). Optimální podmínky pro působení pankreatické lipázy poskytuje přítomnost kolipázy a povrchově aktivních žlučových solí. Sekret žluči obsahuje žlučové kyseliny a fosfolipidy, které v nasyceném stavu zvyšují povrchovou aktivitu tráveniny. Směsné micely žlučových solí a fosfolipidů poskytují velkou solubilizační kapacitu pro hydrofobní látky, jako jsou vitaminy, cholesterol a steroly (Golding & Wooster 2010). Produkty lipolýzy jsou absorbovány buňkami střevní sliznice. Pro usnadnění jejich transportu je využíváno začlenění do směsných micel, které umožňují jejich pohyb skrz vodní vrstvu na povrchu sliznic (Bauer et al. 2005).

## 3.2 Střevní mikrobiota

Pojem mikrobiota je termín označující soubor všech mikroorganismů osidlující danou oblast, příkladem je střevo, ústa, kůže. Termín mikrobiom je definován jako soubor zahrnující i veškeré mikrobiální geny (Friese 2019). Mikroorganismy patřící do mikrobioty jsou bakterie, houby, archaea, viry i prvoci. Lidské tělo poskytuje hostitelské prostředí pro více než 100 bilionů mikroorganismů patřících do tisíců druhů, většinu z nich – více než 70 % obsazuje gastrointestinální trakt (GIT). Dále také kolonizují pokožku, ústa, respirační cesty a urogenitální trakt (Ramos & Martín 2021). GIT je místem, které mikroby preferují. Důvodem je vysoký obsah sloučenin, jež jsou pro ně využitelné jako živiny. Lidské střevo díky svému obrovskému povrchu poskytuje velkou plochu pro mikrobiální kolonizaci (Sekirov et al. 2010).

Vztah hostitelského organismu a mikrobů je realizován různými typy symbiózy, může se jednat o komenzalismus, mutualismus nebo parazitismus. Komunikace mezi symbiontem a hostitelem je realizována výměnou informací ve formě difuzních molekul. Tato metabolická výměna nabývá na významnosti zvláště u střevní mikrobioty, která svým počtem bakteriálních buněk převyšuje více než 10krát buňky hostitele. Některé konkrétní molekuly metabolické výměny jsou odpovědné za zprostředkování specifických a zásadních biologických interakcí systému (Rath & Dorrestein 2012). Komenzální mikroby, stejně jako patogenní, jsou schopné interagovat s imunitním systémem hostitele. Je však důležité, aby imunitní systém dokázal oddělit komenzály od patogenů a také byl schopen odolávat hyperimunitní odezvě vůči lumen, jež je zatíženo velkým množstvím mikroorganismů i dietních složek (Lin & Zhang 2017).

Mikrobiota každého člověka je individuální, rozmanitá a značně rozsáhlá. Biologická rozmanitost je poměrně křehká, může být narušována vlivem invaze oportunních druhů, což způsobuje ztrátu původních funkčních vlastností mikrobiomu. Předpokládalo se, že mikrobiota člověka je sestavována od okamžiku narození, kdy mikroby začínají soutěžit o volnou pozici pro kolonizaci povrchů vnitřního i vnějšího prostředí těla. Faktory, které tento proces mohou modulovat, je způsob narození, výživa, prostředí, vystavení organismu infekcím i expozice antibiotiky. Svůj vliv má i genetika, specifické taxony mikrobů jsou přenosné napříč generacemi (Sonnenburg & Sonnenburg 2019). Předpoklad, že k prvnímu kontaktu člověka s kolonizujícími bakteriemi dochází průchodem porodními cestami při porodu, je dnes vyvrácen. V současnosti přibývají důkazy o tom, že osidlování střev mikroby se děje už v děloze matky. To je poměrně šokující poznatek, protože plod a děloha matky byly považovány v optimálního stavu za ryze sterilní prostředí (Willyard 2018). Během porodu je kojeneček v bezprostředním kontaktu s vaginální mikroflórou matky, což nepochybně ovlivní jeho střevní mikrobiotu. Existují důkazy o sledování podobnosti mikrobioty dítěte a matky. Kojenci, kteří se však nenarodili přirozenou vaginální cestou, ale císařským řezem mají mikrobiotu odlišnou (Sekirov et al. 2010). Děti narozené císařským řezem jsou primárně kolonizovány mikroorganismy podobající se spíše kožní mikrobiotě matky. Takové počáteční osídlení mikroorganismy se postupem času vyvíjí a formuje, rozdíly se snižují. Je však dokázáno, že porod císařským řezem je spojen s pomalejší kolonizací specifickými bakteriálními taxony střev. Primární kolonizace se pravděpodobně podílí i na stavu střevní mikrobioty v dospělosti (Tamburini et al. 2016).

Genetické faktory mohou ovlivňovat střevní mikrobiotu pouze z 12 %, zatímco změna stravovacích návyků může modifikovat mikrobiom až z 57 % (Zhang et al. 2018). Děti do

jednoho roku si zachovávají jedinečnost týkající se složení střevní mikrobioty. Genetické a environmentální faktory mají podíl na formování mikrobioty (Palmer et al. 2007).

Bohatost a rozmanitost mikrobiální komunity je zásadní pro zdravotní stav, má ústřední funkce v hostitelském organismu. Modifikace mikrobioty je tedy možná a jsou za tímto účelem navrhovány terapeutické přístupy úpravy stravovacích návyků přijímaných živin, bioaktivních sloučenin i specifických potravin. Takové stravovací úpravy by vedly k modifikaci složení mikrobiomu a regulovaly dysbiózu střevních mikrobiálních komunit, např. způsobenou onemocněním (Ramos & Martín 2021). Mikrobiom GIT má velmi důležité postavení při zajišťování homeostázy imunitního systému hostitele po celou délku jeho života. Jednak mikrobiota působí přímými signály na imunitní systém a rovněž disponuje mechanismy ovlivňující propustnost střevní bariéry. Narušení integrity bariéry střev způsobuje změnu rychlosti prostupu metabolitů, bakterií i jiných přítomných substancí do krevního řečiště nebo epiteliálních tkání (van Treuren & Dodd 2020). Střevní mikrobiota velmi intenzivně komunikuje s naším imunitním systémem, centrálním nervovým systémem a metabolismem živin. S pochopením významnosti mikrobiomu pro lidské zdraví je ve snaze definovat rysy zdravé střevní mikrobioty a hledat možnosti, jak jeho rozvoj podpořit. V uplynulých letech se změnou životního stylu populace celosvětově došlo k výrazným modifikacím střevní mikrobioty. Značné změny, jejichž odvrácení je nyní často obtížně proveditelné, jsou dány například konzumací průmyslově zpracovaných potravin, přemírou sanitace prostředí, užíváním antibiotik. Omezená míra vystavování se mikrobům může, v souladu s principy hygienické hypotézy, vést k poruše funkce a regulace imunitních reakcí. To vede k zvýšenému riziku alergických reakcí a autoimunitních chorob (Sonnenburg & Sonnenburg 2019).

### 3.2.1 Složení střevní mikrobioty

Většina mikrobů (především bakterií) kolonizujících lidský gastrointestinální trakt sídlí v tlustém střevě (o hustotě  $0,9 \cdot 10^{11}$  bakterií/ml), pak v distální části tenkého střeva illeu ( $10^8$  bakterií/ml) a poměrně hojně osidlují i dutinu ústní ( $10^9$  bakterií/ml obsahují sliny a bukalní sliznice,  $10^{11}$  bakterií/ml zubní plak) (van Treuren & Dodd 2020). Mikrobiota tedy není homogenní co se týče počtu bakterií ale i bakteriálních skupin v jednotlivých úsecích GIT.

Dominantně střevní mikroflóru tvoří striktní anaeroby. V daleko menším zastoupení jsou přítomny i fakultativně anaerobní a aerobní mikroorganismy, kterých je asi o dva až tři řády méně než anaerobů. Počet bakteriálních druhů osidlujících lidské střevo je odhadován na množství 500 až 1000 různých zástupců. Analýzou více subjektů bylo naznačeno, že kolektivní lidská střevní mikroflóra by čítala více než 35 000 bakteriálních druhů (Sekirov et al. 2010).

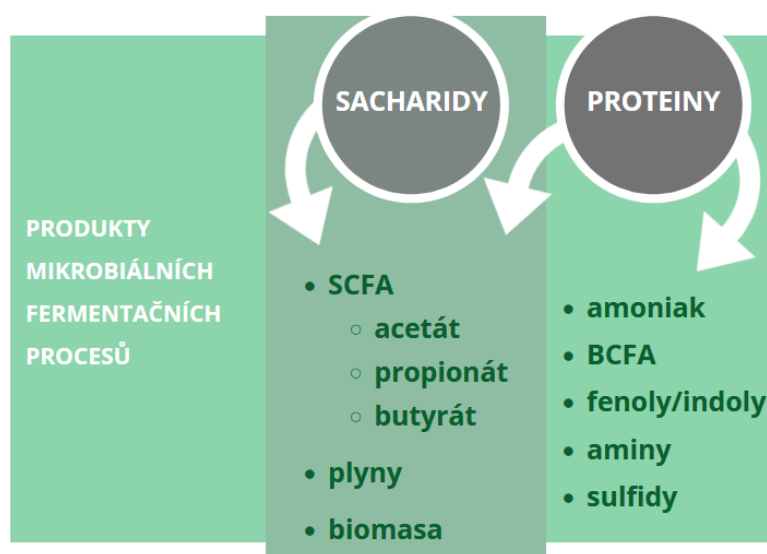
Tlusté střevo je za optimálního stavu osídlováno především bakteriálními kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, dále *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a jinými (Ruan et al. 2020). Přibližně 90 % mikrobioty je tvořeno kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. Hojně rody jmenovaných významně zastoupených kmenových skupin jsou pro *Bacteroidetes*: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, pro kmen *Firmicutes*: *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, dále *Actinobacteria*: *Collinsella*, *Bifidobacterium* a do kmenu *Proteobacteria* patří například *Escherichia* (van Treuren & Dodd 2020).

### 3.2.2 Mikrobiální metabolity

Střevní mikrobiota funguje jako metabolická síť ve střevech, produkty látkové přeměny – metabolity zastávají několik funkcí. Může docházet k vzájemnému ovlivnění mikrobů mezi sebou tím, že vyprodukovaný metabolit od jednoho mikroba slouží jako zdroj energie pro jiného mikroba, který vytvoří zase jiný produkt. Jiné metabolity slouží člověku jako zdroj energie či zdroj potřebných látek, což mohou být například i některé vitaminy (Pascale et al. 2018).

Lidské tělo lze považovat za ekosystém a jako jeho produkt lze pokládat lidské zdraví. Významné služby ekosystému poskytuje mimo jiné mikrobiota. V případě zachování mikrobiální hojnosti a rozmanitosti získává člověk od mikrobioty široké spektrum benefitů. Mikroorganismy svým metabolismem poskytují člověku živiny i energii z jinak pro něho nedostupných dietních substrátů. Metabolity podporují diferenciaci hostitelských tkání, mají imunologické funkce – stimulují imunitní systém a chrání hostitele před invazí patogeny (Costello et al. 2012). Mikrobiální metabolity mají také schopnost neurologické komunikace s hostitelem (Silva et al. 2020). Mikrobiota střev má v podstatě svůj vlastní menší ekosystém, který je ovlivňován fyzikálním, chemickým a biologickým prostředím (Prosser et al. 2007).

Mikrobiota disponuje enzymatickou vybaveností, což jí umožňuje metabolizovat dietní sacharidy, bílkoviny a omezeně tuky (LeBlanc et al. 2017). Významná je fermentace nestravitelných sacharidů, které komenzální bakterie metabolizují na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$  a mastné kyseliny s krátkých řetězcem (SCFA) – především acetát, propionát a butyrát (Patterson et al. 2014). Dalšími metabolity produkovanými komenzálními bakteriemi v tlustém střevě je sukcinát nebo kyselina kynurenová, které absorbují a využívají v gastrointestinálním traktu (Thorburn et al. 2014). Střevní mikrobiota je také schopna produkovat látky patřící mezi vitaminy. Někteří členové mikrobioty dokáží například z nestravitelných sacharidů produkovat folát. Dále mikrobiální biosyntetické pochody mohou poskytovat thiamin, riboflavin, niacin, kyselinu pantothenovou, pyridoxin, biotin, vitamín  $\text{B}_{12}$  a některé studie uvádí i produkci menachinonu – vitamínu  $\text{K}_2$  (Duda-Chodak et al. 2015). Hlavní metabolity produkované bakteriemi ve střevech vznikají fermentací sacharidů a bílkovin (Obrázek 1) (Scott et al. 2013).



Obrázek 1: Mikrobiální fermentační produkty sacharidů a proteinů, upraveno dle (Scott et al. 2013)

**Sacharidy** dostupné pro střevní mikrobiotu pochází z rostlinných i živočišných zdrojů ve stravě. K mikrobům v tlustém střevě se dostávají komplexní sacharidy, nikoli sacharidy jednoduché pocházející ze slazených nebo škrobových potravin, ty se vstřebávají převážně už v tenkém střevě (Sonnenburg & Sonnenburg 2014). Sacharidovými prebiotickými zdroji z potravy mohou být rezistentní škroby, neškrobové polysacharidy, oligosacharidy a výjimkou jsou i některé di- a monosacharidy, příkladem jsou cukerné alkoholy (Scott et al. 2013). Mikroby jsou vybaveni speciálními enzymy, které jim umožňují z polysacharidových zdrojů získávat energii i uhlíkaté komponenty. Enzymy se schopností štěpit komplexní sacharidové vazby jsou glykosidové hydrolázy a polysacharidové lyázy, produkty sekvenčních procesů jsou mono- a oligosacharidy. Obsah enzymů střevní mikrobioty může být více než 60 000 sacharidáz, což je množství několikanásobně převyšující glykosidové hydrolázy lidského genomu. Polysacharidové lyázy člověk bez mikrobioty střev není schopen produkovat (Sonnenburg & Sonnenburg 2014). Pozitivní prosperita mikrobů tlustého střeva je na dietárním příjmu vlákniny závislá. Strava obsahující vlákninu je pravděpodobně klíčovým determinantem dobré diverzity a funkčnosti mikrobioty (Zhang et al. 2018).

Výživové doporučení pro obyvatele České republiky udává, že pro dospělé osoby je vhodné navýšit denní příjem vlákniny na 30 g. Pro naplnění tohoto cíle je doporučováno zvýšit spotřebu zeleniny, ovoce i ořechů v celkovém množství 600 g za den v poměru ovoce, zeleniny 1:2. Dále je také doporučováno zvýšení spotřeby luštěnin a celozrnných výrobků (“Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky – Společnost pro výživu” 2012). Konzumací vlákniny může být předcházeno řadě zdravotních obtíží jako jsou kardiovaskulární onemocnění, cukrovka, metabolické nemoci, zánětlivé střevní syndromy, divertikulární choroby, obezita, kolorektální karcinom. Nerozpustná vláknina má například schopnost vázat a adsorbovat karcinogeny, mutageny, toxiny a tím zabránit jejich vstřebání do organismu a zamezit jejich škodlivým účinkům. Zvýšení příjmu vlákniny v dietě je tedy žádoucí z řady důvodů, proto je doporučováno navýšení spotřeby celozrnných výrobků, ovoce, zeleniny, ořechů a luštěnin (Soliman 2019). Množství produkovaných SCFA, jakožto hlavních produktů bakteriálního metabolismu, je dáno zejména obsahem dietní vlákniny. A nedostatek vlákniny může být příčinou řady zdravotních obtíží (Thorburn et al. 2014).

*In vitro* byly provedeny experimenty s enzymovou fermentační aktivitou zástupců majoritních taxonů střevních bakterií, a byly zjištěny rozdílné schopnosti degradace polysacharidů. Ukázalo se, že kmen *Firmicutes* disponuje daleko menším množstvím enzymů pro fermentaci glykanů než *Bacteroidetes* (Mahowald et al. 2009).

**Bílkoviny** se do tlustého střeva dostávají v množství asi 10 % z přijaté dávky, což představuje přibližně 12–18 g bílkovin denně (Scott et al. 2013). Místem fermentace bílkovin je distální úsek tračnicku. K tomuto procesu dochází až v okamžiku, kdy jsou mikrobiotou spotřebovány sacharidy. Fermentací bílkovin vznikají kromě pro hostitele prospěšných metabolitů SCFA i metabolity s potenciální toxicitou. Avšak testy toxicity těchto metabolitů byly prováděny především *in vitro*. Z bílkovin vznikají mikrobiálním metabolismem rozmanité produkty, jako je amoniak, aminy nebo fenoly (Windey et al. 2012). Dále se tvoří indoly, thioly, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>S (Macfarlane & Macfarlane 2012). Vznikající metabolity se dostávají do přímého kontaktu s buňkami sliznice, což umožňuje jejich přímou interakci. Studie popisují, že dlouhodobá vysoká konzumace masa je spojena s vyšší rizikovostí vzniku karcinomu distální části tlustého střeva, kde dochází právě k fermentaci bílkovin a vzniku metabolitů (Chao et al.

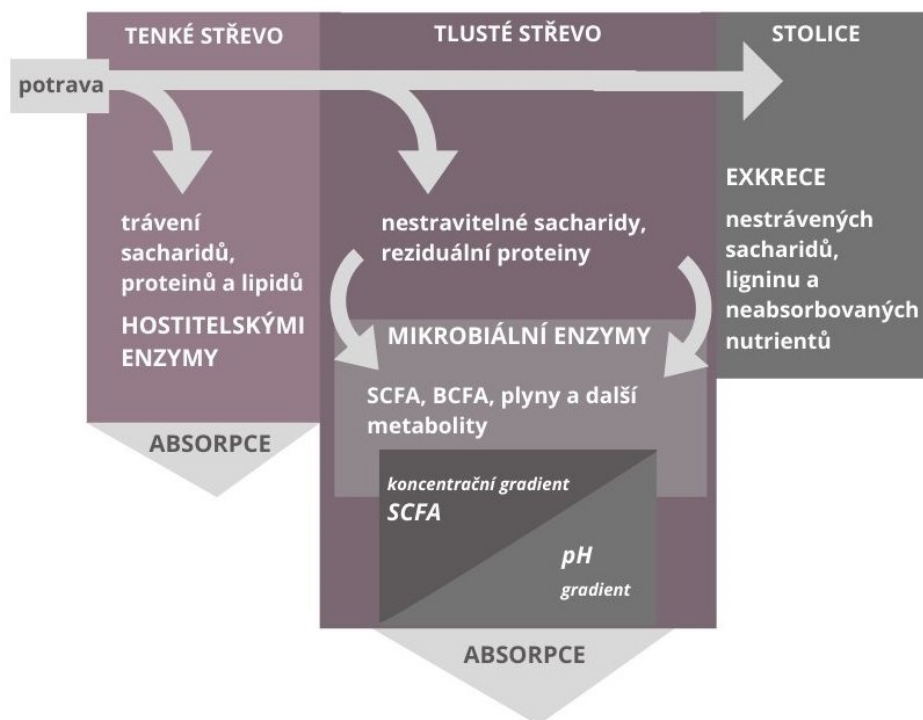


2005). Mimo nežádoucí metabolity vznikají mikrobiálním metabolismem produkty prospěšné pro hostitele – mastné kyseliny s krátkým řetězcem včetně mastných kyselin s rozvětveným řetězcem. SCFA jsou z mnoha aminokyselin produkovány redukční deaminací. Mikrobiálním metabolismem jsou produkovány látky jako je acetát, propionát a butyrát, které mají naopak ochranné efekty. Acetát může vznikat z glycinu, alaninu, threoninu, glutamátu, lysinu a kyseliny asparagové. Butyrát lze získat z kyseliny glutamové, lysinu a propionát z aminokyselin alaninu nebo threoninu (Blachier et al. 2007). Fermentací jednoduchých alifatických aminokyselin dochází především ke vzniku acetátu, propionátu a butyrátu. Naproti tomu aminokyseliny s větveným řetězcem bakterie tlustého střeva fermentují pomaleji a vznikají jako produkty větvené mastné kyseliny o jeden uhlík kratší než měla mateřská aminokyselina. Například fermentací valinu vzniká isobutyřát, z leucinu isovalerát a z isoleucinu vzniká 2-methylbutyrát. Aminokyseliny s aromatickým jádrem, kterými jsou tyrosin, fenylalanin a tryptofan jsou rozkládány na řadu fenolických a indolových sloučenin (Smith & Macfarlane 1997; Windey et al. 2012).

**Tuky** přijímané dietou jsou převážně vstřebávány už v tenkém střevě, ale část z nich se do kontaktu s mikrobiotou dostane. Ukázalo se, že část (7 %) mastných kyselin je vylučována stolicí (Scott et al. 2013). Metabolismus tuků je do jisté míry mikrobiotou ovlivnitelný. Mikrobiota může přímými i nepřímými mechanismy zasahovat i do metabolismu mastných kyselin a cholesterolu. Mikrobiálním metabolismem může být regulována vstřebatelnost. Množství absorbovaného cholesterolu je ovlivněno dávkou konzumovaného cholesterolu, rostlinných sterolů a obsahem vlákniny ve stravě. Dále je absorpce ovlivněna dobou průchodu tráveniny střeva a relativním poměrem mastných kyselin (Resta 2009). Metabolismus tuků hostitele může být ovlivněn i prostřednictvím signálních molekul produkováných střevními bakteriemi, které mohou působit na metabolismus jaterních lipidů, žluči nebo ovlivní resorpci cholesterolu či citlivost na inzulin. Střevní bakterie produkují, resp. modifikují žlučové kyseliny, které pak mohou působit na jaterní či systémový lipidový metabolismus. Další potenciální mechanismus, který může ovlivňovat metabolismus tuků, je bakteriální fermentace nestravitelných sacharidů (Ghazalpour et al. 2016). Mikrobiální zpracování žlučových kyselin má za následek jejich převedení do formy snazší pro fekální exkreci (Schoeler & Caesar 2019). Schematické znázornění osudu složek diety ve střevech je na obrázku 2 (Scott et al. 2013).

### 3.2.3 Působení mikrobioty na zdraví

I přes složitost, komplexnost a individuální vnímavost každého jedince s ohledem na faktory prostředí byly vypořádány jisté vzorce, které mikrobiotu GIT formují. Mikrobiota významně ovládá imunitní homeostázu hostitele po celou dobu jeho života. Kromě přímé imunitní signalizace dokážou mikroby měnit propustnost střevní bariéry, čímž je narušována integrita střevní stěny a v důsledku toho je ovlivněna rychlost vstupu metabolitů a bakterií do krevního řečiště nebo epiteliálních tkání. Další funkcí mikrobů je jejich metabolická aktivita. Bakterie GIT získávají pro vlastní potřebu živiny degradací komplexních polysacharidů, fermentací aminokyselin a vedlejším produktem jejich činnosti jsou metabolity se schopností modulovat procesy v hostitelském organismu (van Treuren & Dodd 2020).



Obrázek 2: Schematické znázornění procesu trávení živin ve střevech, upraveno dle (Scott et al. 2013)

Komunikace mezi mikrobiotou a imunitním systémem je velmi intenzivní. Husté bakteriální osídlení velké plochy střev je oddělené od tělesných tkání pouze tenkou vrstvou epitelu (10  $\mu\text{m}$ ). Invazi oportunních rezistentních bakterií do hostitelské tkáně by mohly být způsobeny vážné zdravotní obtíže včetně zánětu a sepse. Aby k tomu nedocházelo, imunitní systém byl adaptován pro zachování symbiotického vztahu mezi hostitelem a mikrobiotou (Hooper et al. 2012). Je nezbytné, aby imunitní systém byl schopen rozeznat a udržet prospěšnou rezidentní mikrobiotu, naopak identifikovat a zneškodnit patogenní druhy (McFall-Ngai 2007).

Metagenomickými studiemi bylo odhaleno, že lidská mikrobiota disponuje potenciálem generovat velkou řadu bioaktivních molekul. Příkladem významných molekul produkovaných bakteriemi je histamin, adrenalin nebo kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA). GABA působí na centrální nervovou soustavu, jako primární inhibiční neurotransmitter u savců, má i účinky na fyziologii, dokáže modulovat krevní tlak, ovlivňuje imunitní účinky, zvyšuje odolnost vůči stresu a podporuje produkci mikrobiální ATP. GABA může vznikat přeměnou z glutamátu působením enzymů hostitele i mikrobů (Pokusaeva et al. 2017).

Strava dokáže způsobit změny mikrobiálních komunit týkající se struktury i aktivity mikroorganismů střev. Především dlouhodobý stravovací směr má schopnost transformace mikrobioty s dopadem na rozvoj chronických onemocnění jako je například obezita, cukrovka a zánětlivá onemocnění střev. Během rozvoje společnosti spojeného se změnou stravovacích zvyklostí i životního stylu dochází k poklesu diverzity střevní mikrobioty. Objem a diverzita produkce mikrobiálních metabolitů se po generaci snižuje, což jsou aspekty přispívající též k chronickým nemocem (Zhang et al. 2018). Je známo, že nízká bakteriální diverzita a zánětlivá onemocnění střev spolu úzce souvisí, ale není už plně objasněno, zda je příčinou nebo důsledkem onemocnění. Protizánětlivé účinky jsou popisovány například u bakterie

*Faecalibacterium prausnitzii*, jejíž přítomnost je právě ovlivněna bakteriální bohatostí mikrobiomu. Preventivní úlohu vůči zánětlivým onemocněním poskytují metabolity mikrobioty interagující s imunitním systémem, hlavně se jedná o SCFA a metabolity tryptofanu (Thorburn et al. 2014). U řady nemocí bylo pozorováno, že jejich výskyt byl spojen se změněným charakterem mikrobioty (Youssef et al. 2018).

Střevní mikrobiota je relativně plastická a její modifikací druhového zastoupení lze řídit produkci metabolitů. Pro dosažení kýženého efektu - ovlivnění fyziologie hostitele pomocí mikrobiotou produkovaných molekul je v první řadě nezbytné porozumět faktorům ovlivňující dostupnost živin pro střevní mikrobiotu. Dále i procesu mikrobiálního metabolismu, který je ovlivňován biochemickými a genetickými faktory a zároveň mechanismům hostitelského metabolismu i eliminaci mikrobiálních metabolitů (van Treuren & Dodd 2020).

Vědecké důkazy sledující stav střevní mikroflóry u obézních jedinců (testováno zejména na myších) sledovaly charakteristické znaky. Většina výsledků testování ukazovala, že mikroflóra obézních jedinců obsahuje vyšší množství bakterií kmene *Firmicutes* a méně *Bacteroidetes*. To bylo potvrzeno i některými testy na myších, kdy skupina obézních myší byla srovnávána se skupinou štíhlých při podávání totožné stravy bohaté na polysacharidy s nízkým obsahem tuku. Studií bylo doloženo, že obézní se od štíhlých jedinců odlišují zmíněným rozdílným zastoupením bakteriálních kmenů. Také studie sledující fekální mikroflóru obézních lidí potvrzovaly stejný trend vyššího zastoupení *Firmicutes*. Ke zvyšování hladiny *Bacteroidetes* zřejmě dochází při redukcii tělesné hmotnosti, pravděpodobně se tak děje na základě změněného přísunu energie. Vliv živinového zastoupení stravy nebyl zpozorován (Giacco et al. 2016). Jiné studie sledující totožné parametry však zmíněnou korelaci vyvrátily, naopak výsledky naznačovaly u obézních jedinců vyšší podíl bakterií kmenu *Bacteroidetes*. Nelze tedy jednoznačně potvrdit závislost mezi složením střevní mikrobioty a projevem obezity. Daleko lepších výsledků dosahovaly testy, které sledovaly závislost mezi projevem obezity a metabolismem mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Experiment provedený u skupiny dobrovolníků se zastoupením osob obézních, s nadváhou a s normální hmotností vyhodnocoval rozdíly v koncentraci SCFA ve stolici. Vyhodnoceno bylo, že celkově vyšší množství SCFA mají obézní jedinci, konkrétně hojněji byl zastoupen propionát (Schwiertz et al. 2010).

Studie zpozorovaly kromě důležitosti mikrobioty pro lidské zdraví i její zranitelnost a cesty ochrany mikrobioty před poškozením. Například k přetvoření až decimaci střevní mikrobioty může dojít užíváním pouze jednoho cyklu antibiotik. Terapeutický potenciál zdravé mikrobioty popisují (bio)léčebné postupy s možností využití mikrobiální manipulace za účelem změny lidské fyziologie (Sonnenburg & Sonnenburg 2019). Pro porozumění etiologie a možnostem řešení zdravotních obtíží spojených s dysbiózou střevní mikrobioty je nezbytné charakterizovat stav optima, také odlišnosti mikrobioty zvyšující riziko onemocnění i mikrobiotu, jenž podněcuje nemoc (Sonnenburg & Sonnenburg 2014). Vzhledem k rozmanitosti stravy a různé funkční aktivitě mikrobioty každého jednotlivce je produkován rozlišný komplex metabolitů, jejichž složení by mohlo být potenciálně ovládáno podáváním personalizovaných terapeutik za účelem podpory lidského zdraví nebo léčby nemocí (van Treuren & Dodd 2020). Léčba onemocnění souvisejících s mikrobiotou by měla mimo jiné aspekty genotypu zohlednit i pohlaví jedince. Bylo zjištěno, že účinky individuální stravy na střevní mikrobiotu jsou u obratlovců závislé na pohlaví (Smith et al. 2013).

### 3.2.4 Ovlivnění mikrobioty střev stravou

Strava má značný vliv na složení střevní mikrobioty a se změnou stravy dochází ke změně mikrobiálního zastoupení. Modifikace mikrobioty má za následek změněnou produkci mikrobiálních metabolitů, které mají účinky na imunitní i zánětlivé reakce (Maslowski & MacKay 2011). Mikroby tlustého střeva jsou schopné jako zdroj živin využívat primárně rezistentní škrob, neškrobové polysacharidy, hostitelské glykany nebo bílkoviny z diety. Přednostně je uskutečňována fermentace škrobů a neškrobových polysacharidů, k čemuž dochází z velké části ve vzestupném tračníku a slepém střevu. Jakmile jsou zásoby škrobu vyčerpány dostávají se do popředí fermentační děje bílkovin a aminokyselin probíhající v sestupném tračníku. Při sníženém příjmu komplexních polysacharidů nebo v případě hladovění využívají mikroby jako polysacharidový zdroj potravy hostitelský hlen (van Treuren & Dodd 2020). Nežádoucím jevem by bylo ztenčení vrstvy hlenu, která za optimálního stavu působí jako nepropustná bariéra proti průniku bakterií do epitelu tlustého střeva. Z dlouhodobého hlediska by omezené množství střevního hlenu mohlo vést k rozvoji kolitidy (Johansson et al. 2014).

Volbou diety můžeme značně ovlivňovat své zdraví. Druhem konzumované stravy lze poměrně efektivně modifikovat složení střevní mikrobioty, které disponuje mechanismy modulující zdravotní stav osoby, což potvrzují četné studie. Mikrobiota je modifikovatelná rozsáhlou škálou dietních rysů, jako je makro- a mikronutrientové složení, množství a vlastnosti vlákniny nebo také strukturou stravy. Zdraví prospěšné jsou bakterie se schopností fermentace vlákniny, čímž produkují SCFA, které mohou být vstřebávány a transportovány portální žilou do jater. Proto by bylo vhodné volit charakter stravy takový, jenž bude mít schopnost podporovat funkci pro nás výhodných bakterií (Giacco et al. 2016). Bylo potvrzeno, že změnou skladby potravin lze způsobit změny mikrobiálního zastoupení, ale vyšší efekt než jednotlivé živiny mají dlouhodobé stravovací návyky. Interakce, ke kterým dochází ve vztahu mezi stravou a střevní mikrobiotou, je značně komplikovaný. Mikrobiální odezva dle složení stravy může vyvolat pozitivní či negativní vliv na zdraví. Některé mechanismy, které zprostředkovávají interakce střevních bakterií s dietními složkami, jsou dosud nepopsané. K pochopení probíhajících dějů do jisté míry přispívají *in vitro* studie na kultivovaných buňkách nebo na zvířecích modelech, ale daleko větším přínosem jsou studie na lidech. Poznání v této oblasti by bylo značným přínosem, protože by to umožňovalo optimalizovat zdraví každého člověka prostřednictvím uzpůsobené stravy s ohledem na jeho mikrobiální genom (Ramos & Martín 2021). Skladba střevní mikrobioty může ovlivňovat množství energie získané z potravy. Jakmile je narušena využitelnost energie z potravy, hrozí riziko narušení energetické bilance organismu, které může vést k výrazným změnám tělesné hmotnosti (Turnbaugh et al. 2006). K výkyvům tělesné hmotnosti může dojít i v důsledku hormonálních změn. Existují důkazy o tom, že SCFA mají schopnost ovlivňovat vyplavování hormonů sytosti pocházejících ze střev (Yu et al. 2019).

Jeden z příkladů sledování vlivu stravy na mikrobiotu byla studie, ve které byly sebrány vzorky stolice a záznamy stravy od 98 osob. S využitím rRNA sekvenování příští generace bylo charakterizováno bakteriální zastoupení. Ukázalo se, že dlouhodobé stravování bohaté na bílkoviny, doprovázené živočišnými tuky, bylo spojeno s vyšším výskytem bakterií rodu *Bacteroides*. Oproti tomu, rostlinná strava bohatá na sacharidy vedla k vyššímu

zastoupení rodu *Prevotella*. K ovlivnění skladby mikrobioty může docházet velmi časně, už během 24 hodin od zahájení změny diety (vysokotučné s nízkým obsahem vlákniny nebo nízkotučné s vysokým obsahem vlákniny) mohou být detekovány rozdíly bakteriálního zastoupení. Avšak kompletní transformaci enterotypové identity *Prevotella/Bacteroides* umožňuje pouze dlouhodobé udržování stravovacích návyků (Wu et al. 2011).

Fekální mikrobiota u dětí, které přirozeně dlouhodobě konzumovaly stravu bohatou na rostlinné polysacharidy, měla zvýšené hladiny *Bacteroidetes*, konkrétně hlavně rody *Prevotella* a *Xylanibacter*, výsledky byly porovnávány se skupinou konzumující západní typ stravy. *Prevotella* a *Xylanibacter* bakterie jsou schopné štěpit celulózu a xylany, výsledkem je produkce vyššího množství SCFA (Giacco et al. 2016). Africké děti žijící venkovským způsobem života s přirozeným vyšším příjmem vlákniny byly v několika studiích zaměřených na mikrobiom porovnávány s dětmi z USA. Pozoruhodným zjištěním bylo, že kromě vyšší bakteriální diverzity měly i rozdílný poměr *Prevotella* vůči *Bacteroides*, což souvisí s intenzivnější produkcí SCFA (Thorburn et al. 2014).

Kromě toho, že SCFA mají příznivý vliv na metabolismus glukózy a tuků, je pravděpodobná i jejich schopnost inhibovat růst potenciálních patogenů, kterými mohou být *Enterobacteriaceae*, například konkrétně *Shigella* spp. a *Escherichia* spp. A naopak strava může i selektivně stimulovat růst některých bakterií, zejména *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spp. Takto prospěšná je strava bohatá na oligosacharidy, inulin a oligofruktózu s níž je spojena zvýšená produkce SCFA (Giacco et al. 2016). Obyvatelé rozvojových zemí žijící se převážně rostlinnou stravou, mají mikrobiotu charakteristickou pro příjem vlákniny. Mikrobiota těchto lidí je bohatě enzymaticky vybavena pro rozklad sacharidů. U lidí žijících v industrializovaných oblastech, kteří mají často příjem vlákniny značně omezený, jsou tyto skupiny mikrobů odkázáni využívat jako záložní zdroj potravy hostitelský hlen (mucinovou vrstvu). Charakteristickou bakterií, která má schopnost využívat mucin, je *Akkermansia muciniphila* (z kmene *Verrucomicrobia*) (Sonnenburg & Sonnenburg 2019).

Rozmanitost mikrobioty mohou ovlivňovat složky konzumované potravy. Snížená mikrobiální rozmanitost se projevuje častějším výskytem obezity, diabetu druhého typu, kardiovaskulárních onemocnění, karcinomu a jiných zdravotních komplikací. Naopak jedinci disponující vysokým počtem genů mikrobiomu jsou často štíhlejší a jejich mikrobiota je uzpůsobena k intenzivnější produkci SCFA (le Chatelier et al. 2013). Osoby z nižší bohatosti mikrobiomu, dle referencí, do svého jídelníčku zařazují často méně ovoce, zeleniny i produktů rybolovu oproti jedincům s rozmanitou mikrobiotou. Dlouhodobými stravovacími návyky je možné ovlivnit genovou bohatost mikrobioty. Efekt stravovací změny s projevem změny mikrobioty byl pozorován například na studii obézních osob. Ve studii byla skupině jedinců po dobu 6 týdnů podávána nízkokalorická dieta s vyšším obsahem bílkovin, více vlákniny a nižším obsahem tuků. V tomto případě byla po změně jídelníčku zpozorována nejen redukce tělesné hmotnosti, ale především došlo k navýšení rozmanitosti střevních mikrobů. A kromě zvýšení mikrobiální rozmanitosti byly sledovány i jiné pozitivní projevy, příkladem bylo snížení zánětlivosti, pokles hladiny cholesterolu v krvi, zlepšení citlivosti na inzulin a další (Cotillard et al. 2013).

Dietární **polyfenoly** mají biologickou účinnost omezenou jejich dostupností, která je do značné míry definována stupněm jejich polymerace. Střevní mikrobiota je schopna částečně modulovat produkci, biologickou dostupnost a v konečném důsledku i biologickou aktivitu fenolických metabolitů. Je prokázáno, že pro lidské zdraví jsou polyfenoly přínosem, není však dosud plně objasněno, jaké interakce probíhají při kontaktu s mikrobiotou (Cardona et al. 2013). Účinky fenolických sloučenin na zdraví člověka jsou prostudovány na rozdíl od fenolických metabolitů, které jsou produkovány metabolismem střevní mikrobioty. Bioaktivní fenolické sloučeniny patří do rozsáhlé skupiny sekundárních metabolitů pocházejících z rostlinných potravin, zejména se jedná o zástupce flavonoidů a fytoestrogenů. Flavonoidů bylo dosud identifikováno kolem 4000 druhů, nacházejí se v potravinách, jako je zelenina, ovoce, bobule, čaj a víno. Z nutričního hlediska nepatří mezi nezbytné, ale mohou hrát významnou roli pro udržení dobrého zdraví a prevenci řady nemocí. V lidském organismu flavonoidy díky přítomnosti fenolických hydroxylových skupin působí jako antioxidanty. Mezi jejich vlastnosti patří dále i protizánětlivý účinek, působí proti propuknutí alergických a karcinogenních komplikací, brání také projevu hypertenze, artritidy a vykazují i antimikrobiální účinek (Puupponen-Pimiä et al. 2002).

### 3.2.5 Funkce metabolitů mikrobioty

Metabolity produkované střevní mikrobiotou jsou odrazem stravy jednotlivce, jejich koncentrace značně kolísají. Oproti tomu endogenní metabolity cirkulující v organismu jsou udržovány na poměrně konstantních hladinách, což je dáno přísnou kontrolou homeostázy a řízením biochemických drah produkce, eliminace nebo recyklace konkrétních molekul (van Treuren & Dodd 2020).

Metabolickou aktivitou střevní mikrobioty vznikají zmiňované mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA). Studiemi bylo potvrzeno, že SCFA, zejména acetát, propionát a butyrát mají schopnost působit na buněčné i molekulární úrovni. Množství SCFA v organismu, zejména nedostatek, může ovlivňovat patogenezí řady onemocnění autoimunitního, metabolického i neurologického charakteru (Tan et al. 2014).

S nedostatkem vlákniny a tedy i SCFA souvisí narušení střevní homeostázy, což může přispívat k rozvoji řady nemocí i alergickým a astmatickým potížím. Homeostáza střev i imunitní tolerance, je ovlivňována stavem mucinu na povrchu střeva, která separuje buňky epitelu od přímého kontaktu s bakteriemi (Thorburn et al. 2014). Hlenová vrstva působí jako ochrana gastrointestinálního traktu proti vysokému riziku mikrobiálního napadení i mechanickému a chemickému poškození. Bylo zjištěno, že právě SCFA dokážou podporovat buňky epitelu v sekreci hlenu (Willemsen et al. 2003). SCFA mají mimo to i význam při reparativních procesech střevní sliznice (Thorburn et al. 2014). Kromě posílení obranné bariéry střev patří mezi funkce SCFA inhibice karcinogeneze i zánětlivých procesů tlustého střeva a také snižují oxidační stres (Windey et al. 2012). Zvláště butyrát má svůj význam pro kolonocyty jakožto zdroj energie a také je popisováno jeho protektivní působení před kolorektálním karcinomem (Li et al. 2020).

Metabolity mohou uplatňovat svoje působení na imunitní systém v různých místech lidského organismu. Interakce GIT s imunitním systémem probíhá velmi intenzivně. Původně uvažovaným primárním místem, kde účinkují metabolity, bylo střevo buď prostřednictvím

integrity střevního epitelu nebo slizniční imunitou. Především v distálním tračníku dochází k významné fermentaci vlákniny přítomnými bakteriemi a vzniká značné množství acetátu, propionátu a butyrátu (o množství 40, 20, 20 nM). Některé metabolity, zejména acetát jsou distribuovány systémově a s imunitním systémem se mohou protnout prostřednictvím transportu krví nebo přes placentu k vyvíjejícímu se plodu (Thorburn et al. 2014). Bylo prokázáno, že například bakteriální rod *Bifidobacterium* má schopnost produkovat acetát a tím podporovat integritu střevního epitelu. Zvýšená produkce acetátu tedy vede k posílení obranné funkce buněk epitelu proti infekčním chorobám hostitele (Fukuda et al. 2011). Dále se SCFA významně podílí na udržování dobrého stavu střev a metabolismu hostitele tím, že ovlivňují střevní integritu pomocí schopnosti regulace pH v lumen (Blaak et al. 2020).

Jedním ze známých pozitivních působení SCFA na metabolismus je posílení mitochondriální aktivity a preventivní působení proti metabolickým poruchám. Zejména acetát a propionát svým působením může modulovat jaterní glukoneogenezi a lipogenezi prostřednictvím hormonální regulace i cestami genové exprese nebo dokonce mohou skrze signály sytosti hypotalamu snižovat chuť k jídlu. Většina SCFA, které jsou absorbovány, se dostávají přes portální žílu do jater. Z důvodu velmi vysoké metabolické clearance jater je koncentrace SCFA, která se dostane do krve asi 100krát menší než koncentrace v tlustém střevě a stolici (Giacco et al. 2016).

Pro udržení zdraví střev se vyvinul lokální adaptivní imunitní systém (Smith et al. 2013). Střeva lze pokládat zdravá a dobře fungující, jestliže dochází k přiměřené gastrointestinální sekreci, je umožněno dostatečné trávení potravin a vstřebání živin, minerálů i vody. Zároveň by měla být vylučována předvídatelná a pravidelná stolice vhodné konzistence. U zdravých střev je stav střevní mikroflóry je vyvážený, funkčnost střevní bariéry optimální, také je udržován stav pohody a nejsou přítomna gastrointestinální onemocnění (Blaak et al. 2020). V případě narušení homeostázy střev nastává vysoké riziko střevních zánětů a onemocnění. Proti nežádoucím zánětlivým projevům působí ve střevech regulační buňky imunitního systému T-lymfocyty (neboli  $T_{reg}$ ). Dostatečné zásoby  $T_{reg}$  v tlustém střevě dokážou tvořit ochranu před kolitidou a jinými nemocemi. Bylo zjištěno, že na zásobách  $T_{reg}$  buněk se podílí SCFA a z toho tedy vyplývá, že pokud podpoříme bakterie produkující SCFA, můžeme touto cestou regulovat zánět. Produkci SCFA v lumen tlustého střeva mohou zvyšovat například klostridie nebo bifidobakterie (Smith et al. 2013). Pro udržení nezápovědných stavů přispívají SCFA také skrze podporu sekrece imunoglobulinu A, který se rovněž podílí na udržování dobrého stavu střev.

Výsledky dostupných studií naznačují, že zvýšenou produkci SCFA lze považovat za zdraví přínosnou. K tomu, aby takové tvrzení mohlo být jednoznačně potvrzeno, bylo by potřeba provést dobře kontrolovanou dlouhodobou intervenční studii na lidech. Protože dosud byla většina studií prováděna především na zvířatech, dobře kontrolovaných důkazů na lidech není dostatek. Pro potvrzení předpokládaných interakcí metabolitů by bylo vhodné do studií zahrnout i sledování kinetiky a toku SCFA dle fenotypu, typu vlákniny a místa fermentace s ohledem na faktory utvářející mikrobiom jako se strava, fyzická aktivita nebo užívání léků (Blaak et al. 2020).

### 3.2.6 Osa střevo-mozek

Komunikace nervového systému s mikroorganismy v lumen je uskutečňována v obou směrech ve stavu zdraví i nemoci. Mozek má schopnost různými cestami ovlivňovat komenzální mikroorganismy. Nepřímé ovlivnění komenzálních mikroorganismů může mozek uskutečňovat prostřednictvím změn gastrointestinální motility, střevní permeability nebo sekreční intenzitou. K přímému ovlivnění gastrointestinální funkčnosti může docházet pomocí signálních molekul, které se uvolňují do lumen. Obousměrná interakce mozku a střev má za následek modulaci slizniční imunitní aktivity a viscerálních vjemů (př. bolest) (Rhee et al. 2009). Komplexní interakce vedou k udržení stavu žádoucí gastrointestinální homeostázy a dobrého trávení, ale i naopak mohou způsobovat afekty. Neurobiologické poznatky odhalily působení signálních systémů vedoucích se střev na motivaci, intuitivní rozhodování a jiné vyšší kognitivní funkce (Mayer 2011).

SCFA mají kromě lokálního působení ve střevech vliv i na periferní tkáně a interagují s mozkem (Silva et al. 2020). Například propionát má schopnost zvyšovat produkci leptinu. Leptin je hormon vznikající v adipocytech, který působením na mozek může regulovat energetickou homeostázu. Účinek leptinu spočívá v tom, že má schopnost ovlivňovat chuť k jídlu, zároveň napomáhá depleci lipidů z jater i periferních tkání a podílí se na procesu hubnutí. Nedostatek leptinu způsobuje hromadění tukové tkáně. U obézních jedinců je často problematický naopak nadbytek leptinu. Většina obézních (90–95 % případů) produkuje vysoké množství leptinu, ale organismus je k jeho působení již rezistentní (Fava et al. 2006).

Střevo a mozek jsou vysoce integrované systémy a jejich oboustranná komunikace probíhá především skrze autonomní nervový systém a osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Oblast mozku, která kontroluje střeva a je zodpovědná za kontrolu vnější i vnitřní homeostázy, je především limbický systém, kde může docházet k interakci mozku a těla (Jones et al. 2006). Komunikaci centrální nervové soustavy s mikroorganismy může zajišťovat nervus vagus pomocí modulace imunitního systému, skrze metabolismus tryptofanu nebo produkcí řady neurotransmiterů či metabolitů jako jsou SCFA s neuroaktivními vlastnostmi (Silva et al. 2020).

Prevenční nebo v některých případech i možnost řešení některých neurobiologických onemocnění mohou zajišťovat například polyfenoly přijímané ve stravě. Polyfenoly mohou mít užitečnou roli při nápravě nefunkčních interakcí osy mikrobiota-střevo-mozek. A uplatňují se v boji proti mozkovým poruchám mimo jiné i skrze schopnost modulace střevní mikrobioty (Serra et al. 2018).

### 3.3 Složení stolice

Fekální materiál obsahuje životaschopných buněk přibližně  $10^{11}$ – $10^{12}$ /g. Většina z nich je přítomností kyslíku usmrcena, protože se z velké části jedná o obligátní anaeroby. Jejich zastoupení je dáno mnoha faktory, jako je vliv hostitele (genetika, fyziologie trávení, vrozená i adaptivní imunita, strava, nemoci, užívání léků a antibiotik), mikrobiologické faktory (interakce prostřednictvím metabolitů, antagonistické působení, soutěž o živiny i místo k adhezi), vliv mají i environmentální faktory (Macfarlane & Macfarlane 2012). Bakterie kolonizující v tlustém střevě jsou ve značné míře vylučovány stolicí. Faktorem, který je určující pro jejich



přítomnost ve fekální hmotě je to, jak hluboko v povrchové vrstvě stěny tlustého střeva sídlí. Ve stolici se mohou nacházet například bakteriální druhy: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, členové *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus* (Swidsinski et al. 2005; Sekirov et al. 2010).

Bakteriální biomasa je primární složkou fekální hmoty a její součástí je i široká škála molekul různých velikostí. Přítomné molekuly jsou odrazem přijímaných živin, vliv na jejich zastoupení má také způsob trávení a vstřebávání živin v gastrointestinálním traktu či využitelnost látek střevními bakteriemi (Karu et al. 2018). Výkaly jsou tvořeny kolem 75 % vodou, množství se odvíjí od příjmu vlákniny. Nerozložitelná vláknina je schopna na sebe vázat vodu. S obsahem vlákniny ve stravě souvisí i doba průchodu střevy. A platí, že s kratší dobou průchodu roste podíl vody. Odchytky od běžného stavu mohou být způsobeny nemocí a ke kolísání dochází také s věkem (Rose et al. 2015). Sušina stolice se kromě bakteriální biomasy skládá z exfoliovaných buněk epitelu tlustého střeva, nestrávených zbytků potravy. Dále obsahuje makromolekuly zahrnující vlákninu, bílkoviny, DNA, mukopolysacharidy a jiné. Fekální metabolom je složen i z tisíce malých molekul - metabolitů, kterými jsou například cukry, organické kyseliny, aminokyseliny (Karu et al. 2018).

### 3.3.1 Biomarkery stravy ve stolici

Stolice může obsahovat řadu významných diagnostických a prediktivních biomarkerů jako je acetát, butyrát, propionát. Tyto mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou fermentační produkty mikrobiální metabolizace zejména sacharidů. S rostoucí koncentrací SCFA dochází v tlustém střevě k poklesu pH. Například z fruktooligosacharidů nebo inulinu mohou vznikat po mikrobiální fermentaci produkty, jako je formiát, L-laktát, acetát a z laktátu i acetátu může vznikat butyrát.

Fermentačními produkty bílkovin jsou částečně rovněž SCFA (acetát, propionát, butyrát), na jejichž produkci je využito asi 30 % proteinového substrátu. Dále z bílkovin mikrobiota produkuje rozvětvené mastné kyseliny, konkrétně izobutyát, 2-methylbutyrát a izovalerát. Jmenované BCFA jsou produktem metabolizace rozvětvených aminokyselin (valinu, izoleucinu, leucinu). Z aromatických aminokyselin mikrobiální deaminací vznikají fenolické sloučeniny, konkrétně *p*-kresol, fenylpropionát (vznikající z tyrosinu), fenyl acetát (z fenylalaninu), indol, propionát a indolacetát (z tryptofanu). Fenoly jsou schopné rychlé absorpce ve střevě a po jejich metabolizaci v játrech jsou vylučovány převážně jako *p*-kresol. Ze sirných aminokyselin i anorganické síry je produkován mikrobiotou sirovodík. Mimo jmenované sloučeniny vzniká metabolizací aminokyselin i amoniak, který je vylučován močí ve formě močoviny. Procesem dekarboxylace aminokyselin mohou vznikat aminy a z nich dále nežádoucí karcinogenní nitrosaminy, jejichž detekce ve stolici je také možná (Scott et al. 2013).

## 3.4 NMR

Metoda nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie využívá atomové jaderné vlastnosti a interakce k podrobnému popsání molekulárních struktur (Savorani et al. 2013). Analýza NMR je implementována v oblastech chemie, biologie i medicíny. NMR v praxi umožňuje kvantitativní stanovení malých molekul ve směsích i v jejich surové formě. Výhodou metabolomiky s NMR je možnost absolutní i relativní kvantifikace látek v biologických vzorcích. Metoda nachází uplatnění v širokém spektru analýz, mezi než patří stanovení toxicity metabolismu léčiv, metoda je vhodná i pro diagnostiku a pozorování patofyziologie onemocnění nebo sledování vlivu stresu či výživy. NMR lze dále využít pro analýzu metabolismu rostlin a bakterií nebo pro sledování interakcí buňky s virem (Bharti & Roy 2012).

### 3.4.1 Princip metody

Principem metody NMR je sledování spinových vlastností atomových jader při jejich vystavení vnějšímu magnetickému poli, což má za následek štěpení jejich energetických hladin v úměrnosti na velikosti magnetického pole (Savorani et al. 2013). Pro objasnění struktury malých molekul metoda sleduje intramolekulární a intermolekulární rezonance, což je zaznamenáno do protonového  $^1\text{H}$  NMR spektra, kde jsou zapsány chemické posuny a vazebné konstanty. Ke kvantifikaci metoda NMR vyžaduje referenční sloučeninu, aby byla schopna vypočítat koncentraci analytu. Referenční sloučeninou mohou být interní či externí standardy, jejich referenční signál by měl být dobře zřetelný a v ideálním případě singlet (Bharti & Roy 2012). Pro identifikaci sloučenin ve vzorku je využíváno porovnání změřeného NMR spektra se spektrální referenční knihovnou sestavenou z čistých sloučenin.

NMR kvantitativní metabolomické profilování má řadu významných předností (Wishart 2008). Výhodou  $^1\text{H}$  NMR oproti jiným kvantitativním analytickým metodám (plynové chromatografie nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie) je, že jednoduše dokáže stanovit sloučeniny ve směsích s přítomností nečistot o podobných fyzikálních vlastnostech. Výhodou je i dynamický rozsah týkající se koncentračních rozdílů molekul ve vzorcích. Dalšími pozitivy je krátká doba měření, nedestruktivní charakter (Bharti & Roy 2012). Naopak přední nevýhodou je nízká citlivost metody (Wishart 2008).

### 3.4.2 Metabolomika stolice

Metabolomika je oborem, který využívá pokročilé analytické techniky pro komplexní stanovení velkého počtu malých molekul (metabolitů) v široké škále biovzorků (Karu et al. 2018). Metabolom se sestává z primárních i sekundárních metabolitů (Verpoorte et al. 2007). Biomedicína pro svoji diagnostiku používá vzorky tkání, tkáňové extrakty nebo biologické tekutiny jako je plazma, sérum, moč, sliny, mozkomíšní mok. Získané výsledky takových analýz mohou poskytovat informace o orgánech nebo tkáních. Stolica patří také mezi biovzorky a dokáže informovat o komplexních interakcích rezidentní mikrobioty v gastrointestinálním traktu (Karu et al. 2018). Metabolomické analýzy fekálních vzorků nabývají za poslední roky na významu, protože bylo pochopeno, že mikrobiální ekologie spolu se střevní aktivitou jsou schopné ovlivnit lidský fenotyp a regulovat hostitelský metabolismus (Lamichhane et al. 2015).

Kvalita vzorků stolice určených pro metabolickou analýzu NMR, závisí na vlivu podmínek skladování. Vzorky, které jsou zmrazeny a posléze opět rozmrazeny, vykazují zvýšení obsahu rozvětvených a aromatických sloučenin, což je vysvětlováno uvolňováním mikrobiálního intracelulárního obsahu (Gratton et al. 2016). Při porovnání čerstvých vzorků se zmrazovanými bylo zjištěno, že kromě zvýšení hladiny aminokyselin dochází i ke zvýšení obsahu glukózy. Ideální by tedy pro stanovení metabolického profilu stolice bylo bezprostřední zpracování a analýza čerstvých vzorků přímo v místě odběru. Takové řešení je však velice komplikované a neobvyklé (Karu et al. 2018). Při studiu metaboliky NMR má zásadní vliv na výsledek příprava vzorku (Lamichhane et al. 2015). Například dle záměrů analýzy je vhodné zvolit druh extrakčního činidla, který nám poskytne dobré výsledky. Vodní extrakty jsou nejlepší pro sledování SCFA a malých organických molekul. Pro analýzu tuků a malých fenolových kyselin je vhodnější volbou extrakce methanolem.

Nutriční metabolika je schopna řešit problematiku výživy komplexně, což má výhodu například od genomické analýzy, kde jsou sledovány pouze jednotlivé geny. Lidský metabolom zahrnuje nejen metabolity vyprodukované buňkami či tkáněmi hostitele, ale součástí jsou i metabolity tvořené střevní mikrobiotou i pocházející z procesů trávení potravy nebo léčiv (Savorani et al. 2013). Měření nutričních metabolitů může poskytovat informace o výsledku dietních intervencí s cílem zajištění homeostázy exponovaných jedinců. Nutrimetabolické strategie monitorují příjem biomarkerů ve stravě a jejich metabolický dopad směřující k udržení zdraví či naopak rozvoji onemocnění (Llorach et al. 2012). První provedená metabolická <sup>1</sup>H NMR studie lidské stolice stanovila jako nejvýznamnější přítomné metabolity *n*-butyrát, propionát, acetát a glycerol (Savorani et al. 2013). Výčet některých sloučenin nalezených ve vzorcích stolice je uveden níže v tabulce 1 (Jaimes et al. 2021).

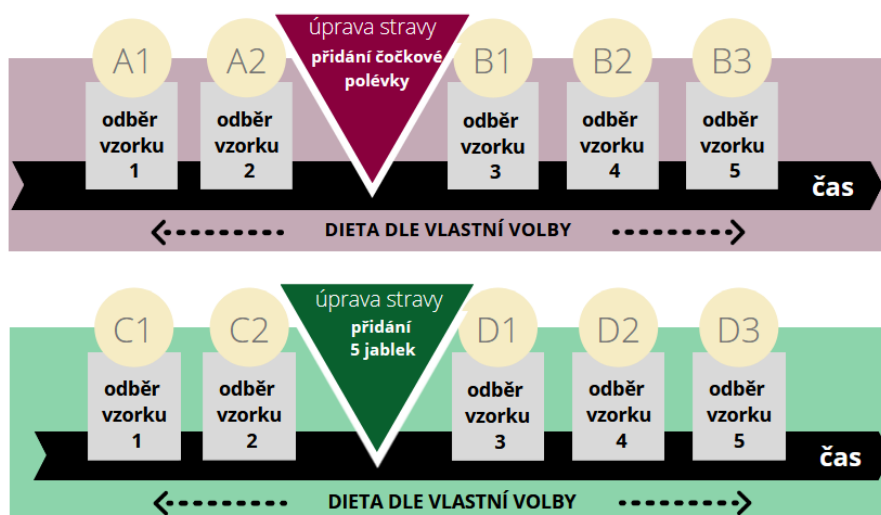
Tabulka 1 Látky stanovené <sup>1</sup>H NMR ve vzorcích lidské stolice (Jaimes et al. 2021)

Acetát	Fumarát	Leucin	Propionát
Alanin	Galaktóza	Lysin	Ribóza
Arabinóza	Glukóza	Malát	Serin
Aspartát	Glutamát	Malonát	Sukcinát
Butyrát	Glycerol	Methanol	Threonin
Kadaverin	Glycin	Methionin	Thymin
Cholin	Hypoxantin	Nikotinát	Tryptofan
Citrát	Isobutyrtát	O-Fosfoserin	Tyrosin
Kreatin	Izoleucin	<i>p</i> -Kresol	Uracil
Ethanol	Isopropanol	Fenylacetát	Valerát
Formiát	Izovalerát	Fenylalanin	Valin
Fukóza	Laktát	Prolin	Xylóza

Metabolomika pomocí <sup>1</sup>H NMR poskytuje dobré výsledky o obsahu metabolitů ve stolici. Změřit kompletně celý metabolom je však prakticky nemožné, protože mezi metabolity jsou značné rozdíly týkající se jejich chemické rozmanitosti, fyzikálně-chemických vlastností i velkého rozsahu koncentrací. Cílenou analýzou zaměřující se na kvantifikaci konkrétních významných metabolitů lze získat poměrně přesné a reprodukovatelné výsledky, které mohou poskytovat informaci o změně koncentrace metabolitů po dietním zásahu (Verbeke et al. 2015).

## 4 Metodika

Pro studii bylo osloveno 7 dobrovolníků, kteří poskytli vzorky stolice a podstoupili výživovou intervenci. Po odběru byly vzorky skladovány v domácích podmínkách s využitím mrazáku chladícího na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do chvíle, než byly transportovány do mrazáku v laboratoři. Úkolem dobrovolníků bylo nejprve ve dvou dnech odebrat vzorky stolice při jejich běžném stravovacím režimu. Poté jim byla podána dvakrát v jednom dni čočková polévka a následující tři dny bylo jejich úkolem odebírat vzorky. Stejný postup byl aplikován i na intervenci jablky. Dobrovolníci odebrali 2 vzorky před úpravou diety, pak v jednom dni měli zkonzumovat 5 kusů jablek a poté v následujících 3 dnech odebírat vzorky. Celkem bylo tedy získáno 70 vzorků. Mezi dvěma intervencemi byla wash-out perioda dlouhá průměrně 7 dní, ale každý jedinec ji měl nastavenou dle vlastních preferencí. Jednotlivé vzorky byly po odběru označeny příslušným kódem. Schématické zobrazení průběhu odběru vzorků je znázorněno na obrázku 3. Studie byla povolena etickou komisí při FN Královské vinohrady, č.j. LEK-VP/01/0/2019.



Obrázek 3: Schéma odběru vzorků

### 4.1 Demografie dobrovolníků

Od sedmi dobrovolníků české národnosti účastnících se studie byly získány informace o jejich pohlaví, věku, běžném stravovacím režimu i zdravotním stavu. Celkem se účastnily 4 ženy a 3 muži. Věkové rozložení bylo v mezích 17–51 let o průměrném stáří 33.

### 4.2 Strava v průběhu studie

V průběhu studie se subjekty stravovaly dle vlastních preferencí, žádný z nich nedržel speciální dietu. Třetí den byla dobrovolníkům podána čočková polévka o množství dvou porcí na osobu, konzumována byla k obědu a večeři. Polévka byla připravena pro všechny účastníky současně dle normované receptury (Příloha I). Po wash-out periodě byly v průběhu dalších třech dní odebírány vzorky bez zásahu do běžné stravy dobrovolníků. Druhá fáze studie probíhala obdobným způsobem, ale třetí den bylo místo čočkové polévky podáno každému subjektu 5 kusů jablek („Jablka červená, česká potravina“, 150 g/kus) v průběhu jednoho dne.

### 4.3 Odběr vzorků

Každá osoba po předchozí instruktáži o správném odběru prováděla odběr vzorku stolice sama v domácích podmínkách. Pro odběr každého vzorku byl použit jednorázový set běžně používaný ve zdravotnictví. Odběrová sada obsahovala:

- plastovou lahvičku se lžičkou určenou pro odběry tohoto typu,
- papírovou samolepící sběrnou plochu – TOKS – Lab Mark (CZ),
- nitrilové rukavice.

Množství odebraného vzorku mělo být přibližně 1 g, což odpovídá přibližně dávce, jenž pokryje celé naběrátko, které je součástí uzavíratelné zkumavky. Každý vzorek byl označen příslušným kódem a vždy co nejdříve zamrazen. Kódové označení jednotlivých vzorků bylo takové, aby bylo možné rozpoznat pořadí odebíraného vzorku a subjekt od něhož vzorek pochází. Zároveň bylo žádoucí, aby zůstal dárce anonymní. Od každého dobrovolníka bylo získáno celkem 5 + 5 vzorků. Po ukončení všech odběrů byly vzorky od dobrovolníků shromážděny a přepraveny na suchém ledu do mrazáku chladícího na teplotu -80 °C, kde byly skladovány až do doby analýzy.

### 4.4 Analýza vzorků

#### 4.4.1 Použité pomůcky, chemikálie, laboratorní a software vybavení

##### **Pomůcky pro analýzu**

- 1,5 ml mikrozkušavky (VWR, CZ)
- pipetovací špičky (Eppendorf, DE)
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7“ Standart series (Norell, NC, US)

##### **Použité chemikálie**

- ultračistá voda
- 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)-propionát-2,2,3,3-d<sub>4</sub>), 0,2% NaN<sub>3</sub> v 99% deuterium oxidu, pH 7,4 (všechny chemikálie Sigma-Aldrich (Merck, CZ)

##### **Laboratorní vybavení**

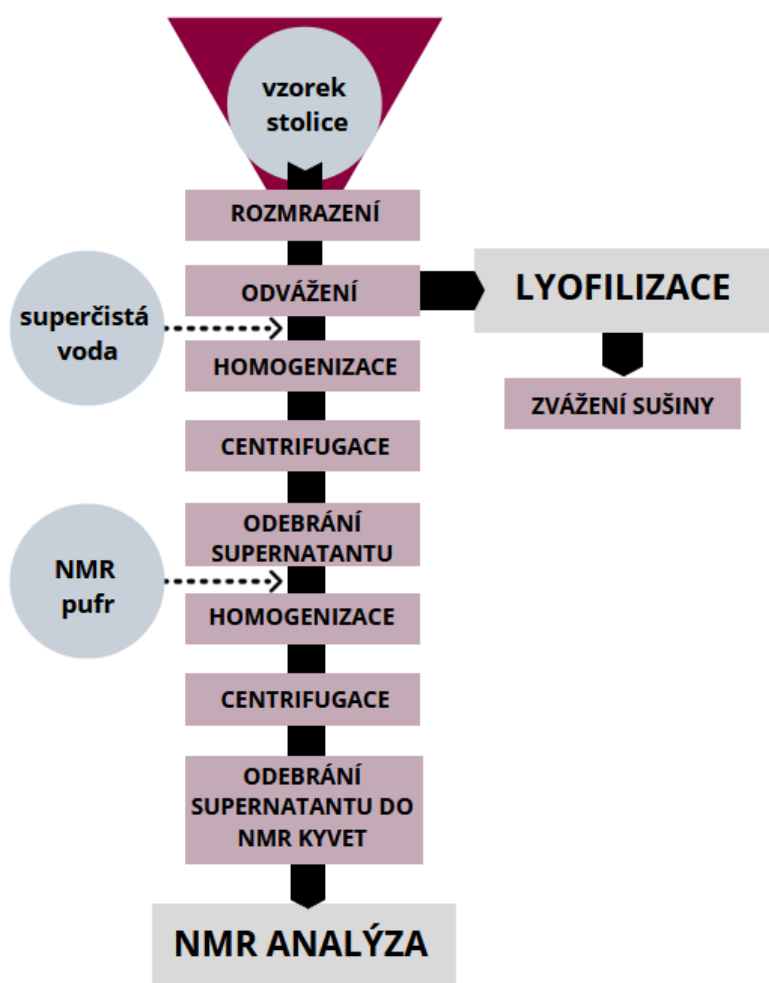
- Pipety Gilson 20–200 µl a 100–1000 µl (VWR, CZ)
- Ultra mikrováha Mettler Toledo XPR6UD5 (Mettler Toledo, CH)
- Digestor Merci (CZ)
- Třepačka Vortex HEAVY DUTY VORTEX (VWR, CZ)
- Centrifuga Rotanta 460R (Hettich Zentrifugen, DE)
- NMR spektrometr Avance III Bruker s <sup>1</sup>H o frekvenci 500,18 MHz (Bruker, DE)
- Laboratorní lyofilizátor L10-55 (Gregor Instruments, CZ)

##### **Software**

- Topspin 3.5 pl7 (Bruker, DE)
- Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx, CA)
- MNovia 12 (Mestrelab Research, ES)
- Metaboanalyst 4.0 - citace: (Pang et al. 2021)
- SPSS Statistics 25 (IBM, NY, US)

#### 4.4.2 Příprava vzorků pro analýzu

Postup přípravy vzorků k analýze je znázorněn na schématu níže (Obrázek 4). Pro přípravu k analýze byly vzorky postupně rozmrazovány při pokojové teplotě, aby nedošlo k nežádoucím změnám při delším setrvání v rozmrazeném stavu. Odvažování bylo prováděno do předem zvážených uzavíratelných mikrozkuvek. Vzorky byly vybírány v nahodilém pořadí. Z každého vzorku bylo třikrát odváženo 200 mg s přesností  $\pm 50$  mg a skutečná hodnota hmotnosti byla zaznamenána do laboratorního deníku. Celkem byly připraveny 3 kompletní sady vzorků s kódovým označením. První sada vzorků byla určena pro zpracování k měření NMR spektrometrem, druhá sada pro stanovení sušiny pomocí lyofilizace a třetí byla záložní sadou vzorků nadále uchovanou při  $-80$  °C.



Obrázek 4: Schéma postupu přípravy vzorků

#### 4.4.3 Příprava pro NMR

Vzorky pro přípravu a analýzu NMR byly rozděleny do menších sad, měření tedy probíhalo v několika fázích s aplikací stejného postupu práce. K jednotlivým odváženým vzorkům v mikrozkuvkách bylo přidáno pipetou 800  $\mu$ l ultračisté vody. Poté byly vzorky homogenizovány na třepačkách Vortex min. 10 sekund, následovala centrifugace při otáčkách 15000 rpm na 10 minut. Po centrifugaci byla odebrána pipetou oddělená vrstva supernatantu

v množství 585  $\mu\text{l}$  a převedena do čisté označené mikrozkušavky s předloženými 65  $\mu\text{l}$  NMR pufru (TSP 5mM, pH 7,4). Vzniklá směs byla opět homogenizována na Vortexu a zcentrifugována po dobu 10 minut. V případě, že se oddělil čirý supernatant, byl přepipetován v objemu 550  $\mu\text{l}$  do označených NMR kyvet. Pokud centrifugací nebylo dosaženo oddělení čirého roztoku, bylo nezbytné krok opakovat. Pipetování supernatantu do kyvet bylo prováděno pod úhlem 45° kvůli zabránění vzniku vzduchových bublin. Takto připravené vzorky v kyvetách byly připraveny pro měření NMR spektrometrem.

#### 4.4.4 Měření NMR

Pro analýzu vzorků byl použit NMR spektrometr Bruker Advance III s pulzní sekvencí *1d noesy*. Měření probíhalo při frekvenci 500,18 MHz a teplotě 298 K. Výsledná spektra byla získána ze 128 skenů se 32k datovými body a šířka spekter byla 14 ppm. Délka akvizice trvala 4 s, presaturace 1 s a čas směšování měl 100 ms. Zero-filling byl nastaven na 128k. Po změření byla získaná spektra upravena programem Topspin, kde byla aplikována Fourierova transformace, exponenciální amplifikace a manuální úpravou bylo dosaženo korekce baseline a fáze i reference na TSP signál (0,000 ppm). Látky ve spektrech byly kvantifikovány s pomocí u Chemomx Profiler, dle knihovny spekter, která je součástí programu. Ve spektrech byl celkem stanoven obsah 30 sloučenin.

#### 4.4.5 Stanovení sušiny

Pro výpočet skutečného obsahu změřených metabolitů ve stolici bylo potřeba stanovit podíl sušiny. Vzorky byly odváženy do mikrozkušavek obdobně jako pro analýzu NMR. Váženo bylo 200 mg vzorku, vždy byla odečtena přesná navážka a zaznamenána do laboratorního deníku. Každý vzorek byl označen příslušným kódem. Příprava vzorků probíhala na etapy a do okamžiku shromáždění všech vzorků byly skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro lyofilizaci byly zkumavky se vzorky otevřeny a vloženy do lyofilizátoru, který byl nastaven na teplotu  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí 24 hodin byly vzorky vyjmuty z lyofilizátoru a zváženy. Dle úbytku hmotnosti byl pro každý vzorek vypočten procentický podíl sušiny.

### 4.5 Statistické vyhodnocení

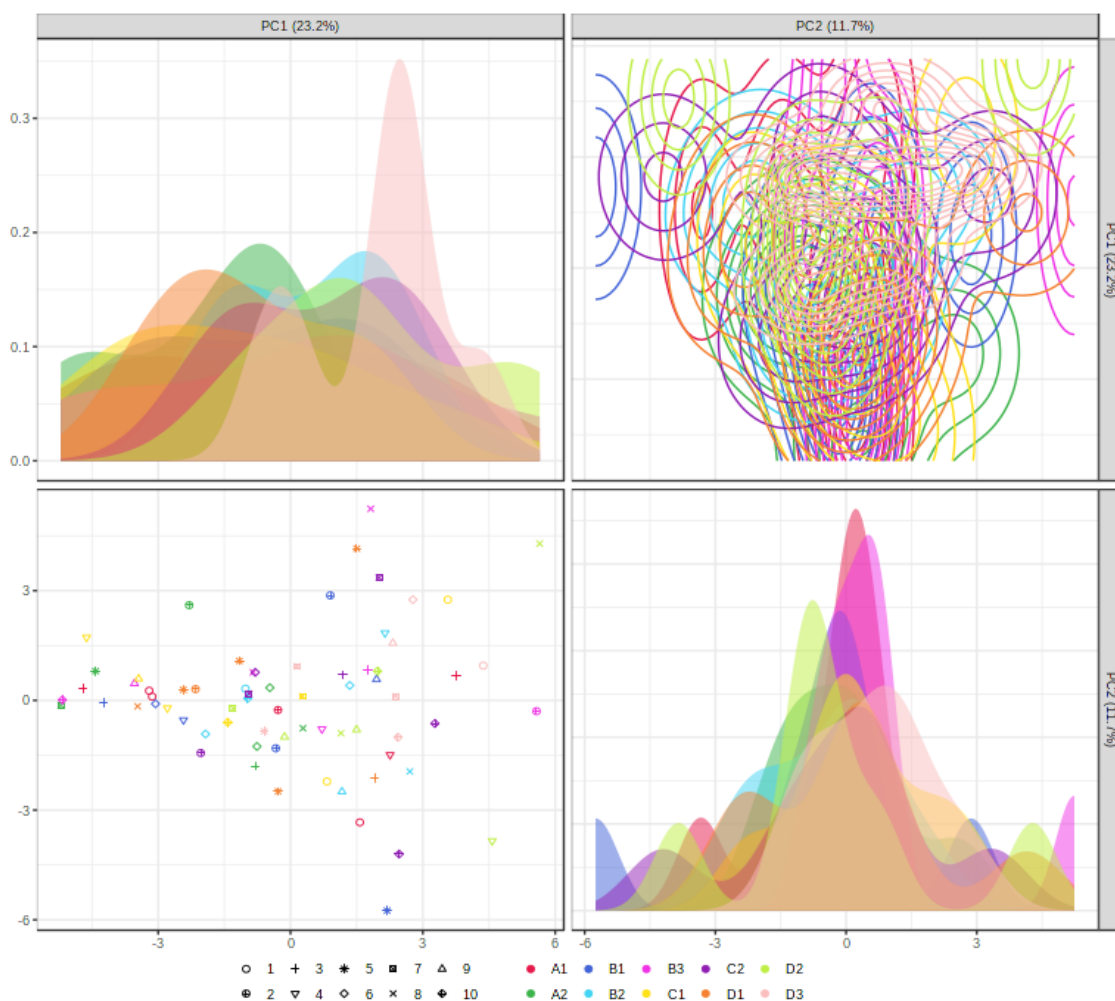
Získané hodnoty obsahu jednotlivých identifikovaných metabolitů byly nejprve upraveny. Data bylo nezbytné nejprve přepočíst dle obsahu sušiny, celkové navážky a dále normalizovat dle sumy. Před statistickým zpracováním vícerozměrnými metodami byla data logaritmičticky transformována, centrována na průměr a paretto-škálována.

Pro statistické vyhodnocení byla nejprve data zpracována v programu Metaboanalyst, kde byla vyhodnocena analýzou hlavních komponent (PCA). Dále byly výsledky hodnoceny testem oboustranné rovnosti dle závislosti na pořadí vzorků, k tomu sloužil program IBM SPSS Statistics. Vyhodnoceno bylo také pomocí Random Forest analýzy. Kromě statistických testovacích metod byly výsledky zpracovány do grafické podoby jako sloupcové, čárové a boxplot grafy.

## 5 Výsledky

### 5.1 PCA analýza

PCA analýza neukázala výraznou separaci vzorků dle intervenčních skupin, ale spíše podle dárců bez ohledu na intervenci.



Obrázek 5: Analýza hlavních komponent vzorků stolice z intervenční studie. Barevně jsou od sebe odlišeny vzorky dle časového rozvrhu odběru vzorků. A1, A2 jsou vzorky na baseline. B1, B2, B3 značí vzorky 1. 2., a 3. den po intervenci čočkovou polévkou, C1, C2 jsou vzorky na baseline a D1, D2, D3 vzorky 1., 2. a 3. den po intervenci jablky. Jednotlivé symboly odlišují dárce. Vícerozměrná statistická metoda ukazuje, že intervence nemění průkazně metabolický profil.

### 5.2 Test oboustranné rovnosti

T-test s Bonferoniho korekcí mezi jednotlivými intervenčními skupinami na hladině významnosti  $\alpha=0,05$  nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, které by dokázaly potvrdit efekt intervence (Tabulka 2). Hodnoty v jednom řádku s rozdílnými dolními indexy znamenají, že se jedná o signifikantně odlišný výskyt. Naopak shodné indexy znamenají nesignifikantní rozdíly obsahu metabolitů mezi vzorky.



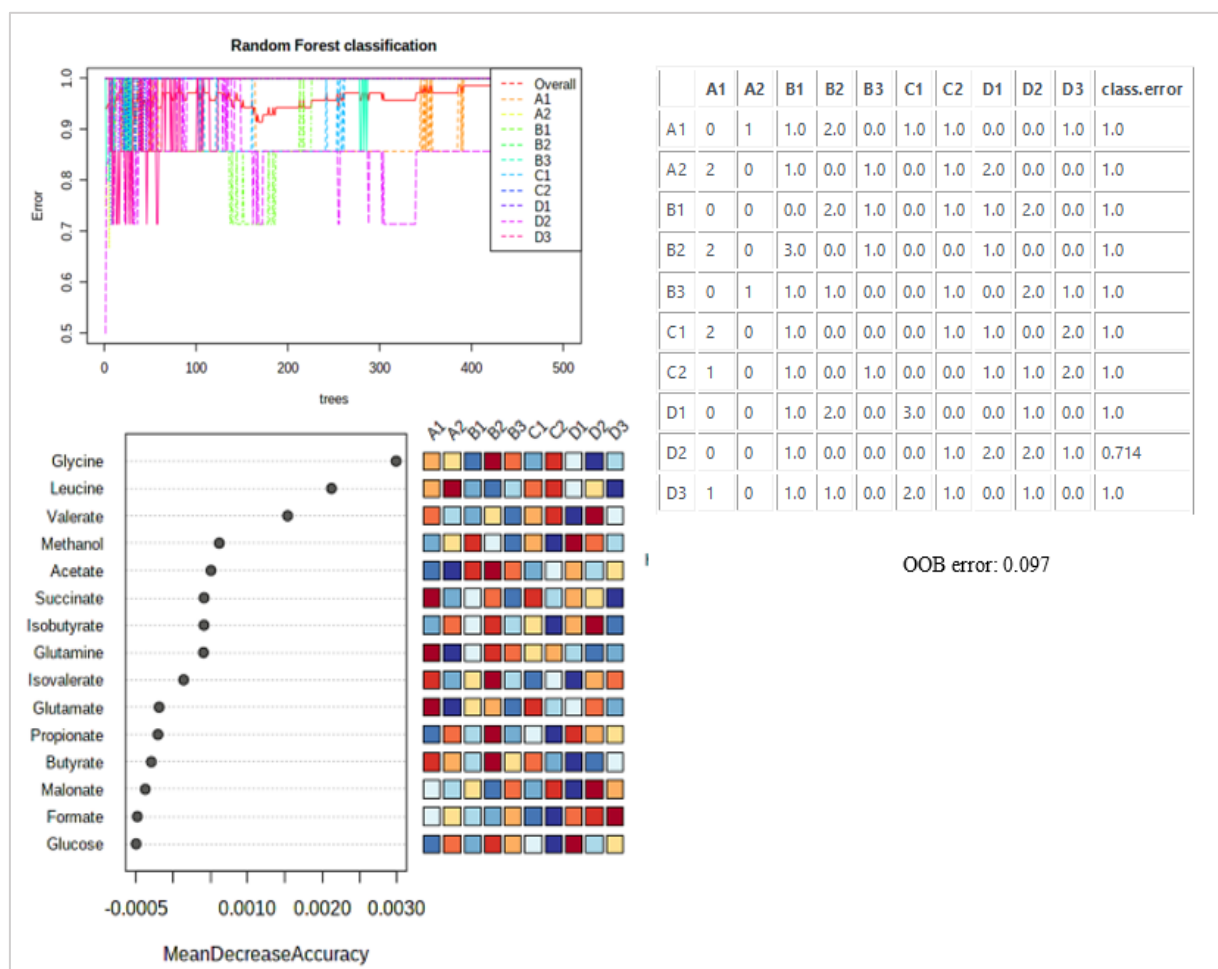
Tabulka 2: Výsledky analýzy - koncentrace metabolitů ve vzorcích stolice dle časového rozvrhu a statistické vyhodnocení oboustranného testu rovnosti. Shodné dolní indexy značí statisticky nevýznamný rozdíl mezi vzorky a rozdílné indexy značí odlišnost obsahu metabolitů ve vzorcích dle časového rozvrhu

Metabolity [mg/g čerstvé stolice]	vzorky odebírané dle časového rozvrhu									
	A1	A2	B1	B2	B3	C1	C2	D1	D2	D3
3-fenylpropionová kyselina	4.66 <sub>a</sub>	3.74 <sub>a</sub>	4.45 <sub>a</sub>	4.92 <sub>a</sub>	4.92 <sub>a</sub>	4.65 <sub>a</sub>	4.96 <sub>a</sub>	4.41 <sub>a</sub>	4.57 <sub>a</sub>	5.13 <sub>a</sub>
Acetát	20.02 <sub>a,b</sub>	19.12 <sub>a</sub>	27.96 <sub>a,b</sub>	30.55 <sub>b</sub>	26.86 <sub>a,b</sub>	20.12 <sub>a,b</sub>	25.11 <sub>a,b</sub>	26.42 <sub>a,b</sub>	22.52 <sub>a,b</sub>	26.11 <sub>a,b</sub>
Alanin	6.07 <sub>a</sub>	5.45 <sub>a</sub>	5.99 <sub>a</sub>	5.53 <sub>a</sub>	5.28 <sub>a</sub>	6.06 <sub>a</sub>	6.49 <sub>a</sub>	4.59 <sub>a</sub>	7.03 <sub>a</sub>	5.24 <sub>a</sub>
Aspartát	3.57 <sub>a</sub>	4.15 <sub>a</sub>	4.09 <sub>a</sub>	3.82 <sub>a</sub>	3.15 <sub>a</sub>	4.07 <sub>a</sub>	2.71 <sub>a</sub>	4.01 <sub>a</sub>	3.36 <sub>a</sub>	3.47 <sub>a</sub>
Butyrát	6.40 <sub>a</sub>	6.00 <sub>a</sub>	5.94 <sub>a</sub>	6.59 <sub>a</sub>	5.99 <sub>a</sub>	6.24 <sub>a</sub>	5.76 <sub>a</sub>	4.92 <sub>a</sub>	5.49 <sub>a</sub>	5.95 <sub>a</sub>
Ethanol	3.02 <sub>a</sub>	5.38 <sub>a</sub>	3.75 <sub>a</sub>	3.59 <sub>a</sub>	3.29 <sub>a</sub>	3.43 <sub>a</sub>	3.36 <sub>a</sub>	2.77 <sub>a</sub>	2.52 <sub>a</sub>	4.05 <sub>a</sub>
Formiát	0.33 <sub>a</sub>	0.34 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>	0.32 <sub>a</sub>	0.36 <sub>a</sub>	0.25 <sub>a</sub>	0.21 <sub>a</sub>	0.39 <sub>a</sub>	0.41 <sub>a</sub>	0.57 <sub>a</sub>
Fumarát	0.35 <sub>a</sub>	0.30 <sub>a</sub>	0.35 <sub>a</sub>	0.42 <sub>a</sub>	0.38 <sub>a</sub>	0.37 <sub>a</sub>	0.33 <sub>a</sub>	0.45 <sub>a</sub>	0.32 <sub>a</sub>	0.41 <sub>a</sub>
Glukóza	7.94 <sub>a</sub>	9.27 <sub>a</sub>	8.34 <sub>a</sub>	10.05 <sub>a</sub>	8.65 <sub>a</sub>	8.60 <sub>a</sub>	7.80 <sub>a</sub>	10.99 <sub>a</sub>	8.56 <sub>a</sub>	8.63 <sub>a</sub>
Glutamát	14.53 <sub>a</sub>	10.23 <sub>a</sub>	12.47 <sub>a</sub>	13.31 <sub>a</sub>	11.15 <sub>a</sub>	14.14 <sub>a</sub>	11.70 <sub>a</sub>	12.20 <sub>a</sub>	13.63 <sub>a</sub>	11.38 <sub>a</sub>
Glutamin	12.52 <sub>a</sub>	8.59 <sub>b</sub>	9.60 <sub>a,b</sub>	11.07 <sub>a,b</sub>	10.87 <sub>a,b</sub>	10.11 <sub>a,b</sub>	10.24 <sub>a,b</sub>	9.46 <sub>a,b</sub>	8.77 <sub>b</sub>	9.23 <sub>a,b</sub>
Glycerol	8.74 <sub>a,b</sub>	8.65 <sub>a,b</sub>	5.61 <sub>a,b</sub>	10.37 <sub>a</sub>	8.79 <sub>a,b</sub>	5.90 <sub>a,b</sub>	9.18 <sub>a,b</sub>	7.14 <sub>a,b</sub>	4.51 <sub>b</sub>	8.17 <sub>a,b</sub>
Glycin	3.35 <sub>a,b,c</sub>	3.17 <sub>a,b,c</sub>	1.59 <sub>a,c</sub>	4.10 <sub>b</sub>	3.47 <sub>a,b,c</sub>	2.37 <sub>a,b,c</sub>	3.64 <sub>a,b,c</sub>	2.93 <sub>a,b,c</sub>	1.29 <sub>c</sub>	2.78 <sub>a,b,c</sub>
Hypoxantin	1.46 <sub>a</sub>	1.75 <sub>a</sub>	1.14 <sub>a</sub>	1.44 <sub>a</sub>	1.55 <sub>a</sub>	1.46 <sub>a</sub>	1.47 <sub>a</sub>	1.59 <sub>a</sub>	1.71 <sub>a</sub>	1.47 <sub>a</sub>
Isobutyřát	5.31 <sub>a</sub>	6.25 <sub>a</sub>	5.57 <sub>a</sub>	6.60 <sub>a</sub>	5.33 <sub>a</sub>	5.90 <sub>a</sub>	4.70 <sub>a</sub>	6.24 <sub>a</sub>	6.62 <sub>a</sub>	5.29 <sub>a</sub>
Isovalerát	4.89 <sub>a,c,d,e,f,g</sub>	4.01 <sub>a,b</sub>	4.18 <sub>a,c,d,e,f,g</sub>	5.58 <sub>c</sub>	4.09 <sub>b,d</sub>	3.95 <sub>b,e</sub>	4.11 <sub>b,f</sub>	3.65 <sub>b,g</sub>	4.24 <sub>a,c,d,e,f,g</sub>	4.60 <sub>a,c,d,e,f,g</sub>
Leucin	8.63 <sub>a,b</sub>	10.46 <sub>a</sub>	7.87 <sub>a,b</sub>	7.79 <sub>a,b</sub>	8.00 <sub>a,b</sub>	8.96 <sub>a</sub>	10.11 <sub>a</sub>	8.15 <sub>a,b</sub>	8.54 <sub>a,b</sub>	5.36 <sub>b</sub>
Malát	7.91 <sub>a</sub>	10.36 <sub>a</sub>	9.67 <sub>a</sub>	7.33 <sub>a</sub>	10.41 <sub>a</sub>	11.99 <sub>a</sub>	7.67 <sub>a</sub>	9.27 <sub>a</sub>	13.57 <sub>a</sub>	7.54 <sub>a</sub>
Malonát	3.22 <sub>a,b</sub>	3.12 <sub>a,b</sub>	3.31 <sub>a,b</sub>	2.71 <sub>a</sub>	3.73 <sub>a,b</sub>	3.04 <sub>a,b</sub>	4.26 <sub>a,b</sub>	2.65 <sub>a</sub>	4.75 <sub>b</sub>	3.45 <sub>a,b</sub>
Methanol	0.52 <sub>a,b</sub>	0.73 <sub>a,b</sub>	0.83 <sub>a,b</sub>	0.69 <sub>a,b</sub>	0.48 <sub>a</sub>	0.76 <sub>a,b</sub>	0.46 <sub>a</sub>	0.90 <sub>b</sub>	0.77 <sub>a,b</sub>	0.67 <sub>a,b</sub>
Methionin	4.00 <sub>a</sub>	4.39 <sub>a</sub>	4.61 <sub>a</sub>	4.97 <sub>a</sub>	4.31 <sub>a</sub>	4.60 <sub>a</sub>	3.89 <sub>a</sub>	4.49 <sub>a</sub>	4.79 <sub>a</sub>	4.10 <sub>a</sub>
Kyselina fenylactová	4.12 <sub>a,b</sub>	3.25 <sub>a</sub>	3.04 <sub>a</sub>	3.95 <sub>a,b</sub>	3.67 <sub>a,b</sub>	3.51 <sub>a,b</sub>	4.66 <sub>a,b</sub>	3.07 <sub>a</sub>	4.04 <sub>a,b</sub>	5.16 <sub>b</sub>
Fenylalanin	2.91 <sub>a</sub>	3.01 <sub>a</sub>	2.71 <sub>a</sub>	2.20 <sub>a</sub>	2.33 <sub>a</sub>	2.86 <sub>a</sub>	1.73 <sub>a</sub>	2.18 <sub>a</sub>	2.60 <sub>a</sub>	2.70 <sub>a</sub>
Propionát	11.79 <sub>a</sub>	14.03 <sub>a,b</sub>	11.95 <sub>a</sub>	19.17 <sub>b</sub>	11.82 <sub>a</sub>	12.82 <sub>a,b</sub>	11.33 <sub>a</sub>	14.79 <sub>a,b</sub>	13.76 <sub>a,b</sub>	13.03 <sub>a,b</sub>
Sukcinát	1.50 <sub>a</sub>	0.92 <sub>a</sub>	1.26 <sub>a</sub>	1.39 <sub>a</sub>	0.87 <sub>a</sub>	1.50 <sub>a</sub>	0.97 <sub>a</sub>	1.30 <sub>a</sub>	1.30 <sub>a</sub>	0.82 <sub>a</sub>
Threonin	4.64 <sub>a,b</sub>	4.43 <sub>a,b</sub>	5.74 <sub>a,b</sub>	7.10 <sub>a</sub>	5.78 <sub>a,b</sub>	4.47 <sub>a,b</sub>	5.05 <sub>a,b</sub>	3.72 <sub>b</sub>	4.91 <sub>a,b</sub>	6.11 <sub>a,b</sub>
Tyrosin	2.36 <sub>a</sub>	1.78 <sub>a,b</sub>	1.54 <sub>b</sub>	1.74 <sub>a,b</sub>	1.46 <sub>b,c</sub>	1.37 <sub>b,d</sub>	1.48 <sub>b,e</sub>	1.62 <sub>b,f</sub>	1.66 <sub>a,b</sub>	1.89 <sub>a,b</sub>
Uracil	3.69 <sub>a</sub>	2.99 <sub>a,b</sub>	2.29 <sub>a,b</sub>	2.60 <sub>a,b</sub>	2.19 <sub>b</sub>	2.70 <sub>a,b</sub>	2.15 <sub>b,c</sub>	2.51 <sub>a,b</sub>	2.84 <sub>a,b</sub>	2.26 <sub>a,b</sub>
Valerát	10.45 <sub>a</sub>	9.62 <sub>a</sub>	9.11 <sub>a</sub>	10.13 <sub>a</sub>	8.68 <sub>a</sub>	10.16 <sub>a</sub>	10.57 <sub>a</sub>	7.86 <sub>a</sub>	10.69 <sub>a</sub>	9.86 <sub>a</sub>
Valin	8.23 <sub>a</sub>	9.29 <sub>a</sub>	8.75 <sub>a</sub>	8.80 <sub>a</sub>	8.24 <sub>a</sub>	7.80 <sub>a</sub>	7.91 <sub>a</sub>	6.67 <sub>a</sub>	9.20 <sub>a</sub>	7.84 <sub>a</sub>

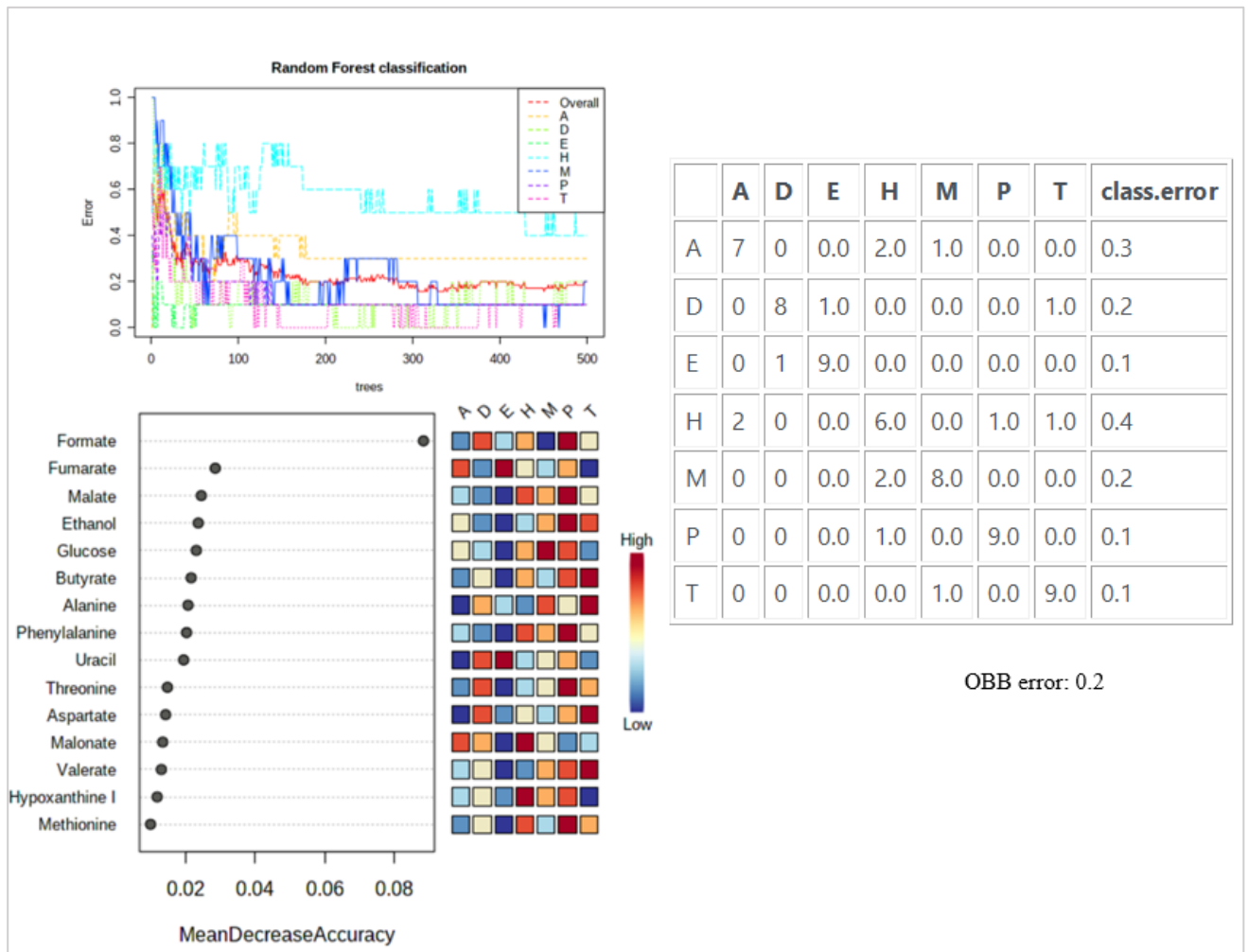
Poznámka: Hodnoty ve stejném řádku a podtabulce, které nesdílejí stejný dolní index, se významně liší při  $p < 0,05$  ve oboustranném testu rovnosti pro průměry sloupců. Testy předpokládají stejné odchylky.

## 5.3 Random Forest analýza

Výsledky Random Forest analýzy naznačují, že podobnost mezi vzorky byla jen dle jejich původu (dárce) nikoli dle jejich pořadí čili času odběru (Obrázek 6 a 7). Random Forest model při hodnocení vzorků dle času nebyl prediktivní. Vysoce prediktivní byl dle Random Forest vyhodnocen faktor subjektu s přesností až 90 %. Jako diskriminační proměnná byla v prvním případě pro stanovení predikce času glycin a dále leucin, valerát, methanol, acetát a jiné. Rozdílnost jednotlivých subjektů byla stanovena dle významných diskriminačních metabolitů, určující byl především formiát a dále fumarát, malát, ethanol, glukosa, butyrát, alanin, fenylalanin, uracil a další. Na rozdíl od první Random Forest klasifikace ve druhém případě docházelo s přibývajícím počtem decision trees (rozhodovacích stromů) k zpřesňování výsledků predikce.



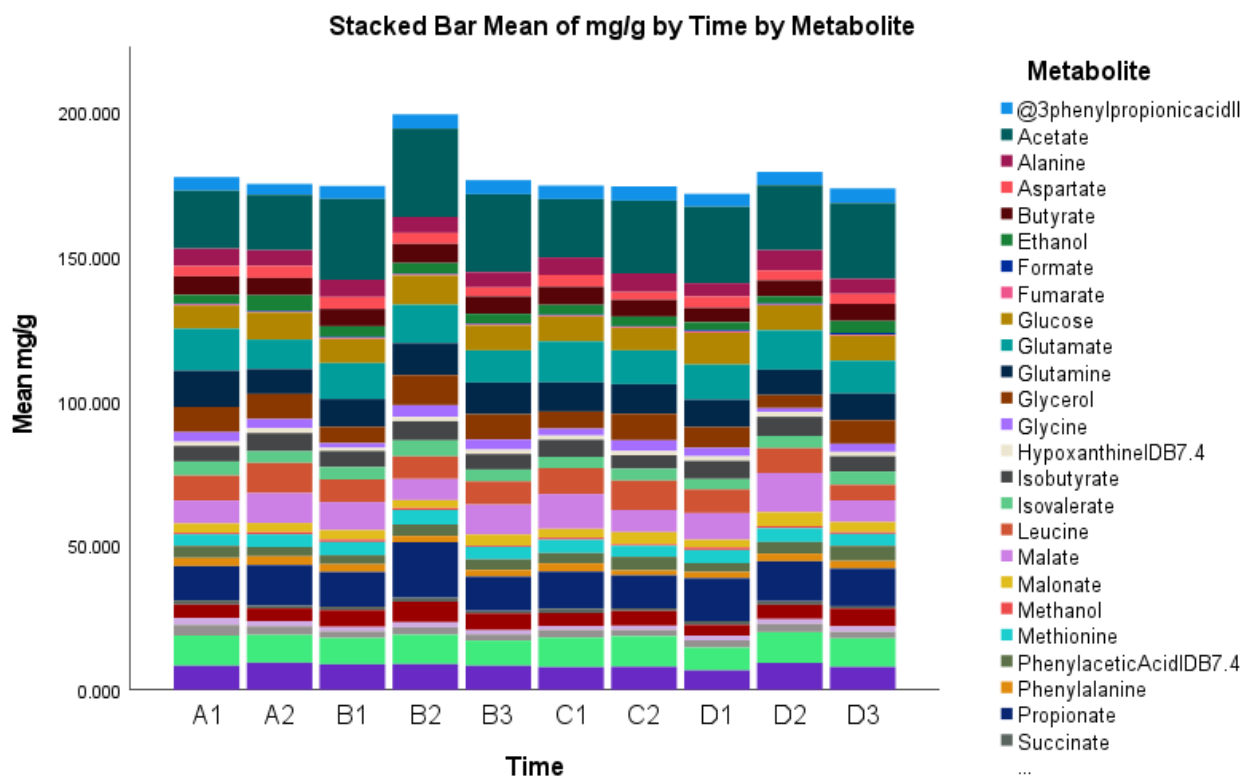
Obrázek 4: Random Forest predikce času odběru stolice (křivka učení, matice záměn ukazující přesnost predikce pro jednotlivé třídy a hlavní mean decrease gini). Model nebyl prediktivní pro čas odběru. A1, A2 jsou vzorky na baseline. B1, B2, B3 značí vzorky 1., 2., a 3. den po intervenci čočkovou polévkou, C1, C2 jsou vzorky na baseline a D1, D2, D3 vzorky 1., 2. a 3. den po intervenci jablky.



Obrázek 5: Random Forest predikce subjektu poskytujícího vzorek stolice (křivka učení, matice záměn ukazující přesnost predikce pro jednotlivé třídy a hlavní mean decrease gini). Model byl prediktivní pro subjekty. A1, A2 jsou vzorky na baseline. B1, B2, B3 značí vzorky 1. 2., a 3. den po intervenci čočkovou polévkou. C1, C2 jsou vzorky na baseline a D1, D2, D3 vzorky 1., 2. a 3. den po intervenci jablky.

## 5.4 Koncentrace metabolitů ve vzorcích před a po intervenci

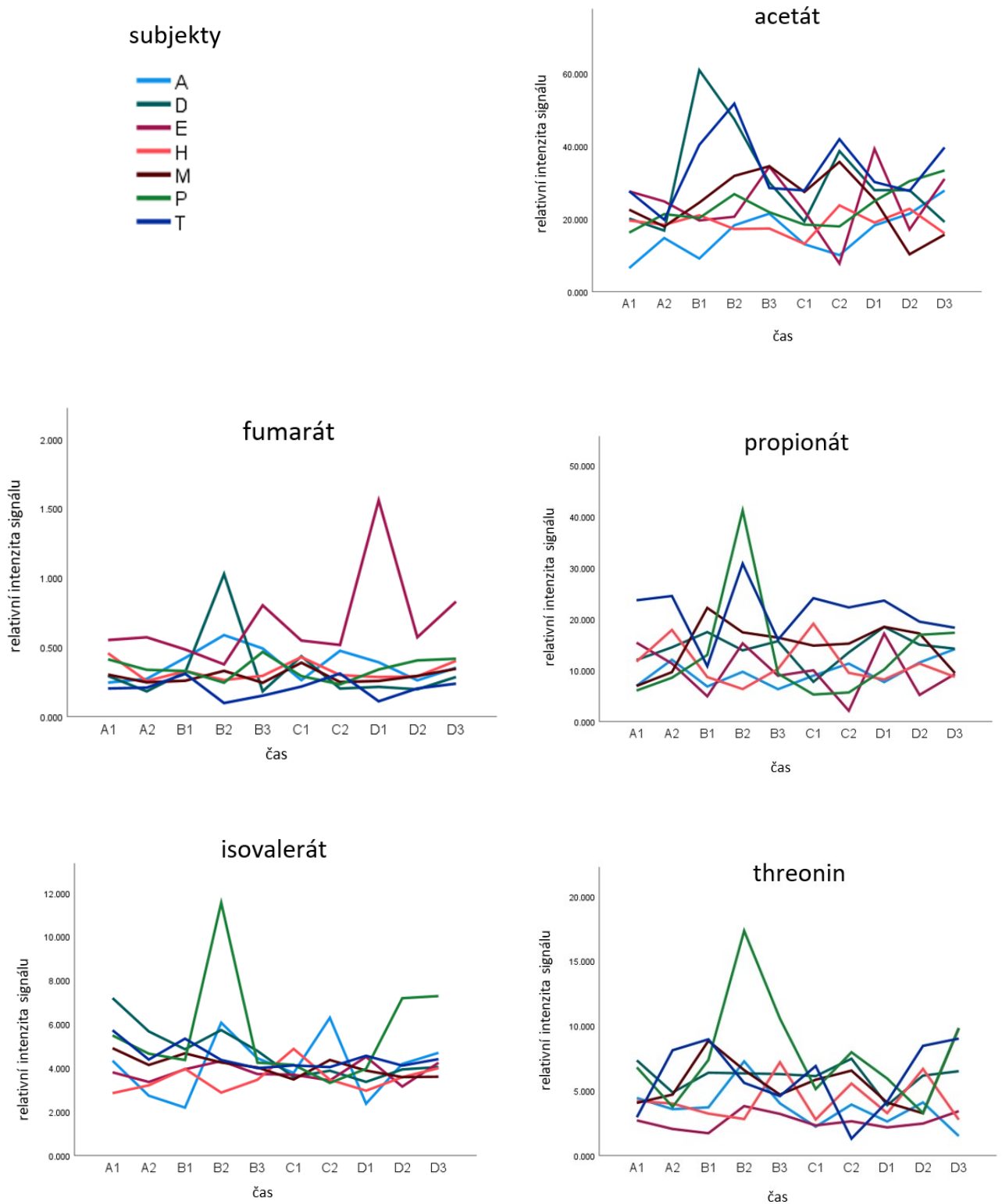
Ze složeného sloupcového grafu (Obrázek 8) je zřejmé, že druhý den od podání čočkové polévky i jablek došlo k celkovému mírnému zvýšení celkové abundance metabolitů.



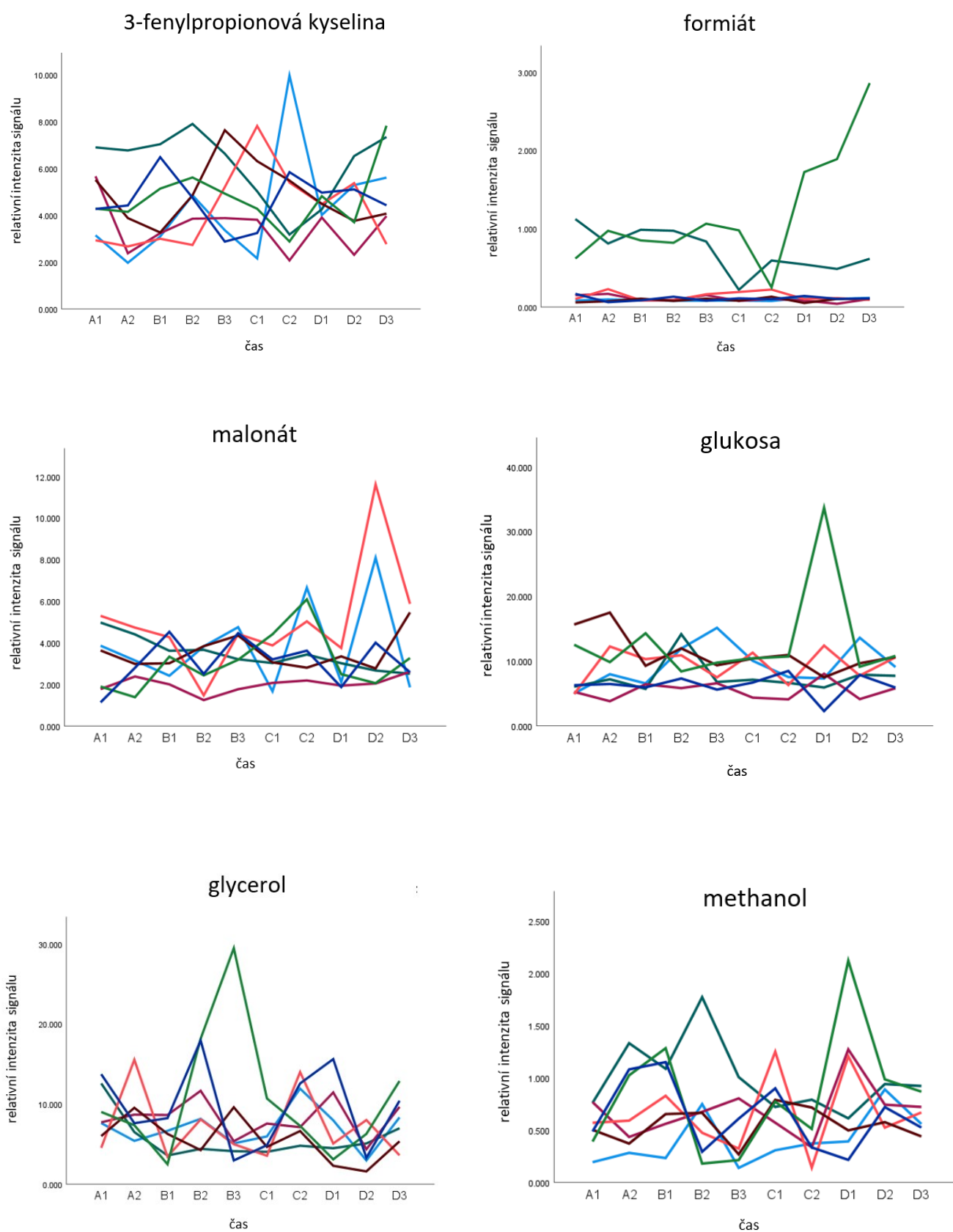
Obrázek 8: Koncentrace metabolitů (v mg/g vzorku čerstvé stolice) v průběhu studie. A1, A2 jsou vzorky na baseline. B1, B2, B3 značí vzorky 1., 2., a 3. den po intervenci čočkovou polévkou. C1, C2 jsou vzorky na baseline a D1, D2, D3 vzorky 1., 2. a 3. den po intervenci jablek. Barevně odlišená pole znázorňují zastoupení obsahu metabolitů ve vzorcích.

Z vybraných grafů (Obrázek 9, 10) je patrné, že jednotlivé subjekty neměly stejný průběh koncentrací metabolitů. U ojedinělých případů je patrné, že k nárůstu produkce jednotlivých metabolitů v čase po stravovací intervenci došlo. Po konzumaci čočkové polévky většinou druhý až třetí den bylo u některých subjektů patrné zvýšení koncentrace 3 - fenylpropionové kyseliny, acetátu, fumarátu, glycerolu, isovalerátu, methanolu, propionátu, threoninu. Zvýšení obsahu acetátu a threoninu po konzumaci čočkové polévky je patrné i z grafů boxplot (Obrázek 11). Intervencí jablek byl u některých jedinců zřejmý nárůst koncentrace formiátu, acetátu, fumarátu, glukózy a významněji malonátu a methanolu a dle boxplot je zřetelný zejména vzestup koncentrace formiátu.

## Koncentrace vybraných metabolitů před a po intervenci

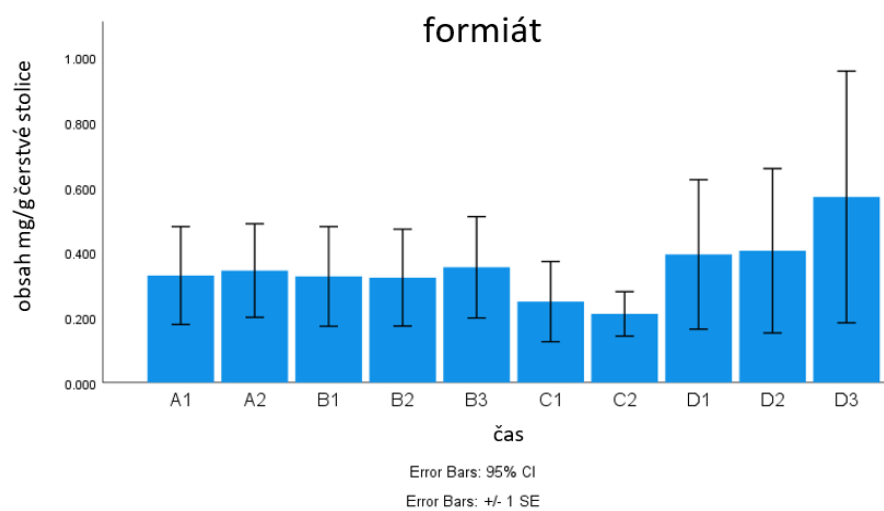
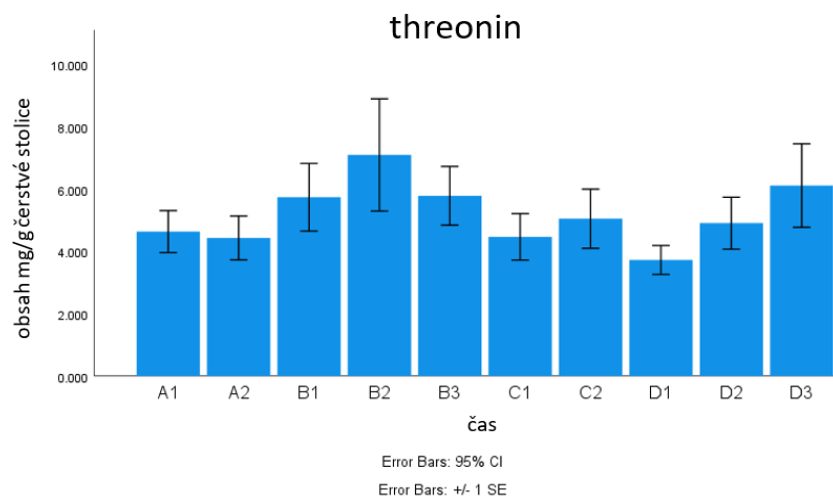
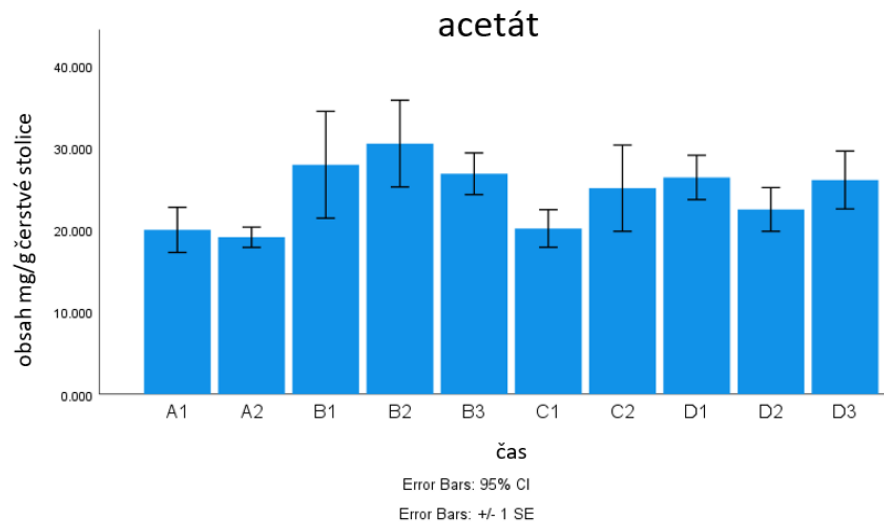


Obrázek 9: Grafické znázornění obsahu metabolitů ve vzorcích s barevným odlišením křivek pro jednotlivé subjekty, křivky grafů představují detekované množství metabolitu ve vzorcích odebraných dle časového rozvrhu. Vzorky A1, A2, C1 a C2 byly odebrány na baseline, vzorky B1, B2 a B3 byly odebrány po intervenci čočkovou polévkou, mezi odběry byly intervaly dlouhé přibližně 24 hodin. Jako D1, D2 a D3 jsou označeny vzorky získané po stravovací intervenci jablky.



Obrázek 10: Znárodnění obsahu metabolitů ve vzorcích s barevným odlišením křivek pro jednotlivé subjekty, křivky grafu představují detekované množství metabolitu ve vzorcích odebraných dle časového rozvrhu. Vzorky A1, A2, C1 a C2 byly odebrány na baseline, vzorky B1, B2 a B3 byly odebrány po intervenci čočkovou polévkou, mezi odběry byly intervaly dlouhé přibližně 24 hodin. Jako D1, D2 a D3 jsou označeny vzorky získané po stravovací intervenci jablky.

## Boxplot vyjádření průměrných hodnot obsahu metabolitů ve vzorcích stolice



Obrázek 11: Boxplot vyjádření průměrné koncentrace acetátu, threoninu a formiátu ve vzorcích, přičemž vzorky A1, A2, C1 a C2 byly odebrány na baseline, vzorky B1, B2 a B3 byly odebrány po intervenci čočkovou polévkou. Jako D1, D2 a D3 jsou označeny vzorky získané po stravovací intervenci jablky.

Z výše uvedených grafů (Obrázek 9 a 10) je patrné, že po intervenci čočkovou polévkou byla u některých respondentů výrazně zvýšená produkce acetátu. Boxplot (Obrázek 11) průměrných hodnot všech respondentů pro acetát naznačuje, že po intervenci čočkou došlo k mírnému vzestupu koncentrace už v čase B1, což znamená do 24 hodin od dietního zásahu a ve vzorcích odebraných do 48 hodin (čas B2) byla celková koncentrace acetátu vůbec nejvyšší za celou dobu. Další den v čase B3 lze pozorovat opět pokles koncentrace. Celkově nejvíce acetátu produkoval respondent D do 24 hodin od požití čočkové polévky a hled druhé nejvyšší hodnoty měl následující den respondent T. Po intervenci jablky není výkyv koncentrace acetátu tak zřetelný, ale mírné navýšení bylo stanoveno v čase D1 a dále minimálně 2 respondenti dosahovali maximální koncentrace v čase D3.

Nejvyšší obsah fumarátu ve vzorcích byl stanoven u subjektu E v čase D1 a minimálně u 3 osob je patrný vzestup koncentrace v čase B2. Sledováním koncentrace propionátu po intervenci čočkovou polévkou bylo detekováno jeho navýšení minimálně u třech respondentů v čase B2 a mírné zvýšení propionátu po intervenci jablky v čase D1 měla alespoň 1 osoba. Výrazného maxima produkovaného isovalerátu dosahoval v čase B2 respondent P a spolu s ním mírnější nárůst koncentrace měli alespoň i další 2 členové studie.

Dle boxplot grafů koncentrační průběh threoninu v čase zobrazuje křivku podobného tvaru jako acetát, avšak koncentrace threoninu jsou asi 4krát nižší než u acetátu. Velmi výrazná produkce threoninu byla detekována ve vzorcích subjektu P v čase B2 po intervenci čočkovou polévkou, také mírné navýšení koncentrace bylo patrné minimálně u dalších třech respondentů v časech B1, B2 a B3. Mírný vzestup koncentrace threoninu je pozorovatelný i po intervenci jablky a to zejména v čase D2.

Zvýšené koncentrace 3-fenylpropionové kyseliny po intervenci čočkovou polévkou byly detekovány ve vzorcích jedinců v časech B1, B2 i B3. Po stravovací intervenci jablky jsou také patrné u jednotlivých subjektů vzestupy koncentrací 3-fenylpropionové kyseliny. Při pozorování koncentračního průběhu 3-fenylpropionové kyseliny nelze jednoznačně určit v kterém čase je koncentrace výrazněji zvýšena, mezi vzorky jednotlivých osob jsou značné rozdíly a neshodují se časy, kdy došlo k nárůstu. Formiát byl ve výrazněji vyšších koncentracích detekován ve vzorcích respondentů A a P. K extrémnímu vzrůstu koncentrace došlo u vzorku P po stravovací zásahu jablky. Jedná se však o ojedinělý případ, vzorky ostatních osob podobného jevu nedosahovaly. A z boxplot grafu je zřejmé, že po celou délku studie není patrný výraznější výkyv koncentrace. Koncentrace malonátu byly maximální minimálně u 2 respondentů po intervenci jablky v čase D2 a u některých došlo k navýšení v čase D3. Zvýšení obsahu malonátu ve vzorcích stolice po konzumaci čočkové polévky nebylo tak výrazné, ale někteří jedinci dosahovali koncentračního maxima v čase B1 nebo B3. Glukosa po intervenci čočkou byla navýšena v ojedinělých případech v časech B1, B2 i B3. Výrazné koncentrační maxima glukosy bylo stanoveno u vzorku subjektu P v čase D1 po dietním zásahu jablky a dále vzorky minimálně dvou respondentů obsahovaly zvýšené množství glukosy v čase D1 a D2. Maxima obsahu glycerolu byla stanovena v čase B3 u vzorků alespoň 2 subjektů a dále výrazně zvýšená koncentrace byla detekována u jedné osoby v čase B2. Po intervenci jablky v čase D2 měly minimálně 2 osoby zvýšený obsah glycerolu ve vzorcích. Vysoký obsah methanolu byl stanoven u vzorku D v čase B2 a dále vzorky minimálně 2 subjektů měly vyšší koncentrace v čase B1. Po stravovací intervenci jablky minimálně 3 osoby dosahovaly maximální produkce methanolu v čase D1.



## 6 Diskuse

Studii bylo zjištěno, že k významné změně produkce metabolitů po jednorázovém navýšení stravy o dvě porce luštěninové polévky nebo pět kusů jablek nedojde. Přestože dle statistických výsledků není možné potvrdit vliv stravovací intervence na profil vznikajících metabolitů, lze v ojedinělých případech pozorovat vzrůst koncentrace metabolitů v závislosti na úpravě stravy. Ostatně poznatky studií za poslední roky také zpochybňují fakt, že by daná složka potravy dokázala vyvolat u všech konzumentů stejnou odezvu (Roager & Dragsted 2019). Výzkumy zabývající se působením dietních vzorců a konzumovaných potravin dosahují zatím pouze omezených výsledků. Prováděné analýzy jsou především zaměřovány na metabolismus jednotlivých živin a intervenčních studií na celých potravinách je jich dosud jen málo. Důvodem je snazší aplikace konkrétních izolovaných látek ve formě pilulek a sledování jejich působení, narozdíl od sledování metabolismu živin v potravinové matici. V celých potravinách totiž nelze opomenout interakce živin, které mohou způsobovat omezenost projevu biologické účinnosti látek (Bolte et al. 2021). Je jasné, že dlouhodobý stravovací směr ovlivňuje strukturu i aktivitu střevní mikrobioty. Daleko méně je však objasněno jakou rychlostí a reprodukovatelností je schopna mikrobiota zareagovat na krátkodobé změny makronutrientů. Ukazuje se, že zásadní dietní změna může vyvolat přechodný stav modifikace složení mikroorganismů, které je detekovatelné 24–48 hodin po intervenci. Krátkodobé dietní intervence však nevedou k trvalým změnám složení mikrobioty, po ukončení dietní intervence modifikace mikrobioty časně odezní (David et al. 2014).

Při sledování metabolomiky dle vzorků stolice je také nutno zohlednit fakt, že značný podíl metabolitů produkovaných střevní mikrobiotou je vstřebán skrz střevní sliznici a do stolice se tedy dostane jen malá část. Obsah metabolitů ve stolici bude tudíž předurčovat i propustnost střevního epitel daného jedince (Blaut et al. 2003). V naší studii lze při detailním sledování koncentračního průběhu metabolitů pozorovat kolísání množství metabolitů, což by potenciálně mohlo být odezvou stravovací intervence. Přestože dle statistické analýzy obsah metabolitů není predikovatelný v závislosti na stravovací intervenci, lze jisté trendy vzrůstu koncentrace pozorovat. Například v čase B2 minimálně u třech dárců vrcholil obsah propionátu a u jednoho dárce byl maximální obsah už předchozí den (B1), což může být ovlivněno rychlostí metabolismu jedince. Jedna ze studií sledující metabolity ve stolici 34 subjektů po dobu 17 dní se současným monitoringem celodenní stravy ukázala, že mikrobiota každé osoby může reagovat na podobné potraviny odlišně. Odezva mikrobioty na stravu byla tedy velmi individuální. A také se ukázalo, že pro zachování dobré stability mikrobioty je klíčové zajistit celkově vyšší pestrost konzumované stravy (Johnson et al. 2019).

Profil metabolitů ve vzorcích stolice jednotlivých subjektů byl odlišný. Z grafických zobrazení koncentračního průběhu pro jednotlivé subjekty potvrzuje, že každý jedinec dokáže reagovat na dietní změny jiným způsobem. Významnou roli v produkci metabolitů má samotný organismus. Nelze opomenout, že každý člověk disponuje jiným složením střevní mikrobioty. Na produkci metabolitů má vliv zejména diverzita mikrobů. Například fermentace vlákniny může být uskutečňována v takové míře, nakolik je přítomen klíčový druh mikrobů, jenž disponuje enzymatickou kapacitou pro metabolismus dietní složky. Na formování mikrobioty mají vliv zejména dlouhodobé stravovací návyky (Makki et al. 2018; Bolte et al. 2021). Zejména zvýšená konzumace vlákniny ve stravě dokáže způsobit modifikace složení

mikrobioty (Peredo-Lovillo et al. 2020). Metaanalýzy potvrzují, že dietní vzorce velmi významně souvisejí s převládajícími mikrobiálními skupinami, což ovlivní produkci metabolitů a v důsledku toho i některá onemocnění jedince (Bolte et al. 2021). Také bylo pozorováno, že dlouhodobá strava založená na zvýšeném příjmu živočišných tuků a bílkovin podporuje *Bacteroides*. Naopak *Prevotella* byla výrazněji zastoupená u lidí stravujících se víc rostlinnou převážně sacharidovou stravou. Kdy takovýto rozdíl složení střevní mikrobioty je možný pozorovat mezi skupinami populace žijících venkovským způsobem narozdíl od obyvatel industrializovaných oblastí (Makki et al. 2018). O působení mikrobioty na zdraví hostitele nelze pochybovat. To, jakým způsobem mikrobiota dokáže reagovat na přijímanou potravu je stále předmětem mnoha studií. Značným přínosem jsou například *in vitro* kultivační techniky spojené s metabolickou analýzou, kdy mohou být sledovány druhově specifické enzymatické aktivity mikrobiálních komunit na dietních substrátech (Krautkramer et al. 2021).

Změřený metabolický profil u jednotlivých vzorků stolice může být zkreslen vlivem zacházení se vzorky po odběru. V první řadě ideální pro studii metaboliky stolice by bylo provádět odběr vzorků v jednom místě a následně neprodleně je připravit pro analýzu i změřit. A pokud je nezbytné vzorky před analýzou zmrazit je vhodné je před tím homogenizovat. I přesto ve zmrazení a opětovném rozmrazení vzorků způsobí změnu ve složení metabolitů v porovnání s čerstvými vzorky (Karu et al. 2018). Vzhledem k tomu, že v této studii vzorky byly zmrazovány v domácích podmínkách, rychlost umístění do mrazáku nebyla vždy shodná a vzorky nebyly předem homogenizovány, lze předpokládat zkreslení výsledků vlivem uvedených faktorů. Hlavní metabolity, které od sebe navzájem odlišovaly subjekty byla koncentrace (formiátu) kyselina mravenčí, pak kyselina fumarová, jablečná, ethanol, glukosa. Formiát může být produktem fermentace sacharidových substrátů, například Bifidobakterie jej produkuje vedle acetátu a laktátu, přičemž laktát pak slouží jako fermentační substrát pro vznik butyrátu (Duncan et al. 2004). Formiát byl nejvíce obsažen ve vzorcích subjektu P a nejméně u subjektu M. Ke zvýšení jeho obsahu ve stolici mohlo dojít například právě vlivem delšího skladování vzorku za pokojové teploty. Kyselina mravenčí je totiž produktem degradace většiny metabolitů je pravděpodobné, že nevhodně nastavené podmínky skladování a manipulace se vzorky způsobily rozklad metabolitů a zvýšení její koncentrace. Dále teplotní výkyvy mohou způsobovat i nárůst koncentrace aminokyselin nebo glukózy (Karu et al. 2018). Ostatní stanovené metabolity ve vzorcích vykazují vyšší stabilitu a jejich obsah by tedy měl být odrazem profilu metabolitů vznikajících ve střevním lumen.

Po intervenci stravy čočkovou polévkou bylo u některých jedinců zaznamenáno, že došlo druhý až třetí den k zvýšené produkci acetátu a propionátu. Jeden z respondentů dosahoval maximální koncentrace následující den po stravovacím zásahu čočkovou polévkou, den po té dosáhl maximální koncentrace acetátu jiný respondent a třetí den od intervence je patrné, že zvýšené koncentrace acetátu vykazovaly minimálně dvě osoby. Maximální obsah propionátu ze vzorků celé studie byl stanoven minimálně u dvou respondentů a to po uplynutí necelých dvou dní od intervence čočkovou polévkou. Acetát a propionát jsou metabolity patří do skupiny SCFA a jejich působení přináší pro hostitelský organismus řadu benefitů. Primárně jsou mikrobiálním metabolismem produkovány z nestravitelných dietních polysacharidů, zejména vlákniny a jejich produkce je také navýšena metabolismem bílkovin. Luštěniny jakožto zdroj vlákniny i bílkovin mohou tedy podporovat produkci SCFA. Pozitivní působení na lidský organismus z mikrobiálních metabolitů mají právě zejména mastné kyseliny s krátkým

řetězcem a dále i tryptofan nebo organické kyseliny. Jejich účinky se uplatňují při kontrole patogenů, absorpci minerálů, kontrole hmotnost i obezity, udržení optimální imunitní odezvy, dále podporují dobrý stav střevní bariéry, působí na činnost mozku a působí jako ochrana proti nádorovým onemocněním (Peredo-Lovillo et al. 2020).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem vznikající fermentací ve střevech jsou z 95 % kombinace právě acetátu, propionátu a butyrátu. Koncentrace těchto tří SCFA je ve střevech v molárním poměru 60:20:20 (acetát, propionát, butyrát). Mikrobiotou produkováné SCFA jsou poměrně rychle a masivně absorbovány kolonocyty. Přibližně 95 % SCFA je vstřebáno v tlustém a slepém střevě a stolicí je tedy vyloučeno zbývajících 5 %. K tomu, aby bylo možné pochopit, jak strava ovlivní skrze produkci SCFA metabolismus hostitele, je potřeba detailního popisu toku metabolitů skrz střevní stěnu (den Besten et al. 2013). Přestože bylo pozorováno, že zvýšená konzumace vlákniny je spojena se zvýšenou produkcí SCFA, tak nelze uvádět jednoznačné závěry o lineární korelaci. Koncentrace SCFA je dána nejen denní dávkou, ale i typem vlákniny (den Besten et al. 2013). Vyšší koncentrace SCFA mohou mimo jiné přispívat i k vstřebatelnosti mikroživin. Modifikací mikrobioty skrze stravu lze docílit podpory vstřebávání některých minerálních látek i vitaminů (Duda-Chodak et al. 2015). Působení SCFA se v organismu odráží na mnoha místech. Mohou například ovlivňovat motilitu střev, sekreci, působí na imunitní buňky nebo vyvolají pocit sytosti. Konkrétně propionát ve střevním lumen způsobí pocit sytosti tím, že je metabolizován na glukózu (Koh et al. 2016).

Fermentace proteinů mikrobiotou se může podílet na zásobení organismu SCFA, ale v daleko vyšší míře jejich fermentační procesy produkují mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem. I tyto metabolity mohou dosahovat biologických účinků, přestože jsou jejich koncentrace nižší (Krautkramer et al. 2021). Mezi mikrobiální BCFA je řazen například isobutyrát, 2-methylbutyrát nebo isovalerát, jehož maximální koncentrace v naší studii byla zaznamenána minimálně u dvou osob po intervenci čočkovou polévkou (Koh et al. 2016).

Studiemi *in vitro* bylo vyzorováno, že konkrétní aminokyseliny jsou metabolizovány převážně na druh SCFA pro ně typický, například threonin je fermentován převážně na propionát (Rowland et al. 2018). Uvedené poznatky o metabolismu aminokyselin by mohly vysvětlovat zajímavost ve výsledcích naší studie. Po intervenci čočkovou polévkou byla u subjektu P vyhodnocena výrazně zvýšená koncentrace aminokyseliny threoninu a zároveň ve stejném vzorku byl stanoven i vysoký obsah propionátu. Potenciálně by tedy zvýšený obsah propionátu mohl souviset s vysokým přísunem threoninu jakožto metabolického substrátu pro jeho fermentaci.

Mezi detekovanými metabolity ve vzorcích stolice byl sledován také koncentrační průběh 3-fenylpropionové kyseliny, která může být mikrobiálním metabolitem dietních polyfenolů. Z důvodu špatné vstřebatelnosti se dietní polyfenoly dostávají až do tlustého střeva, kde mohou skrze interakce s mikrobiotou ovlivňovat biologické reakce. Fenolické metabolity rostlinných polyfenolů mohou podporovat zdraví jedince (Rowland et al. 2018). Konzumace stravy s obsahem polyfenolů jako je ovoce a zelenina přináší benefity pro zdraví jedince mimo jiné i prostřednictvím podpory prospěšných bakteriálních druhů a omezení patogenních (Duda-Chodak et al. 2015). V naší provedené studii bylo možné u některých subjektů pozorovat maximální koncentrace po intervenci čočkovou polévkou a u některých byla maxima vyhodnocena po intervenci jablky.

## 7 Závěr

Střevní mikrobiota má význam při trávení jídla a velmi úzce je spojena s působením na dobrý zdravotní stav jedince a zároveň je možným rizikovým faktorem řady onemocnění. Přestože je mikrobiota každého člověka rozdílná, tak jsou popsány určité korelace, které definují charakteristické rysy střevní mikrobioty v závislosti na stravě jednotlivce. Mikrobiální metabolity, které ve střevech vznikají jsou ovlivněny enzymatickou vybaveností mikrobioty a také závisí na dostupnosti fermentačního substrátu, což ovlivní volba konzumované stravy. Dostatek enzymů mikrobioty pro možnost produkce prospěšných metabolitů předurčuje zejména dostatečná diverzita mikrobiálních druhů, což je formováno zejména dlouhodobými stravovacími návyky s dostatkem zdrojů vlákniny (Roager & Dragsted 2019).

Vědecké poznatky popisující proces trávení potravy umožňují pochopit probíhající procesy a funkčnost GIT systému. Na základě těchto poznatků by mohly být vyvíjeny potravinářské produkty, které by přinášely zdravotní benefity pro člověka a vykazovaly specifickou funkčnost (Li et al. 2020). Výživa by pak mohla potenciálně dosáhnout posunutí na vyšší úroveň, kdy by objasnění interakce stravy a mikrobiomu umožnilo vytvářet individuální dietu a v důsledku toho zlepšovat zdraví každého jedince (Roager & Dragsted 2019).

Předmětem práce bylo zjistit, zda bude mít strava obohacená o dvě porce čočkové polévky nebo pět kusů jablek efekt na změnu profilu metabolitů produkovaných střevní mikrobiotou, jejichž obsah bude promítnut do složení stolice. Analýzou vzorků stolice metodou  $^1\text{H}$  NMR a následným vyhodnocením byly identifikovány mikrobiální metabolity stravy i jejich koncentrace. Statistické testování však nepotvrdilo průkazný význam stravovací intervence na modulaci profilu metabolitů. Ale sledováním koncentračního průběhu vybraných konkrétních metabolitů dle časového rozvrhu lze pozorovat tendence vzrůstu koncentrace po stravovacím zásahu.

Profil produkovaných metabolitů je v daleko vyšší míře definován konkrétním metabolismem organismu čili je predikovatelný dle osoby na rozdíl od významu jednorázové úpravy stravy. Zvýšený obsah konkrétních metabolitů po intervenci je možné pozorovat jen u vybraných jedinců. Důvodem bude pravděpodobně rozdílnost v metabolické aktivitě daného jedince na jehož funkci nese značný podíl i druhové složení střevní mikrobioty.

## 8 Literatura

- Bauer E, Jakob S, Mosenthin R. 2005. Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **18**:282–295. Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Available from <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.282> (accessed January 30, 2022).
- Bharti SK, Roy R. 2012. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **35**:5–26. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007> (accessed March 13, 2022).
- Blaak EE et al. 2020. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial Microbes* **11**:411–455. Wageningen Academic Publishers. Available from <https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/BM2020.0057> (accessed February 11, 2022).
- Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tomé D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* **33**:547–562. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-006-0477-9> (accessed March 7, 2022).
- Blaut M, Schoefer L, Braune A. 2003. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. Pages 79–87 *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. Hogrefe and Huber Publishers. Available from <https://econtent.hogrefe.com/doi/abs/10.1024/0300-9831.73.2.79> (accessed April 5, 2022).
- Boland M. 2016. Human digestion - a processing perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**:2275–2283. John Wiley and Sons Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.7601> (accessed January 27, 2022).
- Bolte LA et al. 2021. Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut* **70**:1287–1298. BMJ Publishing Group. Available from <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322670> (accessed April 4, 2022).
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**:1415–1422. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313000946> (accessed March 10, 2022).
- Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. 2005. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Journal of the American Medical Association* **293**:172–182. American Medical Association. Available from <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/200150> (accessed March 7, 2022).
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. 2012. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* **336**:1255–1262. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1224203> (accessed February 23, 2022).
- Cotillard A et al. 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**:585–588. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nature12480> (accessed March 5, 2022).

- Dai FJ, Chau CF. 2017. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**:37–42. Elsevier Taiwan LLC. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816301429> (accessed March 29, 2022).
- 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 7, 2022).
- den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* **54**:2325–2340. Elsevier. Available from [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)35124-5/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)35124-5/fulltext) (accessed April 7, 2022).
- Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition* **54**:325–341. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-015-0852-y> (accessed April 7, 2022).
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5810–5817. American Society for Microbiology . Available from <https://journals.asm.org/journal/aem> (accessed April 4, 2022).
- Fava F, Lovegrove JA, Gitau R, Jackson KG, Tuohy KM. 2006. The Gut Microbiota and Lipid Metabolism: Implications for Human Health and Coronary Heart Disease. *Current Medicinal Chemistry* **13**:3005–3021. Bentham Science Publishers Ltd. Available from <https://doi.org/10.2174/092986706778521814> (accessed March 9, 2022).
- Friese K. 2019. Mikrobiota und Mikrobiom. *Gynäkologie* **52**:8–9. Available from <https://doi.org/10.1007/s00129-018-4374-6> (accessed February 22, 2022).
- Fukuda S et al. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**:543–549. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nature09646> (accessed February 14, 2022).
- Ghazalpour A, Cespedes I, Bennett BJ, Allayee H. 2016. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* **27**:141–147. Lippincott Williams and Wilkins. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5125441/> (accessed March 9, 2022).
- Giacco R, Costabile G, Riccardi G. 2016. Metabolic effects of dietary carbohydrates: The importance of food digestion. *Food Research International* **88**:336–341. Elsevier Ltd. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915302350> (accessed January 29, 2022).
- Golding M, Wooster TJ. 2010. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **15**:90–101. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135902940900106X> (accessed January 30, 2022).

- Gratton J, Phetcharaburanin J, Mullish BH, Williams HRT, Thursz M, Nicholson JK, Holmes E, Marchesi JR, Li J v. 2016. Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces. *Analytical Chemistry* **88**:4661–4668. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.5b04159> (accessed March 11, 2022).
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* **30**:591–600. Elsevier Current Trends. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016777991200128X> (accessed January 28, 2022).
- Hooper L v., Littman DR, Macpherson AJ. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**:1268–1273. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1223490> (accessed February 23, 2022).
- Jaimes JD, Slavíčková A, Hurych J, Cinek O, Nichols B, Vodolánová L, Černý K, Havlík J. 2021. Stool metabolome-microbiota evaluation among children and adolescents with obesity, overweight, and normal-weight using 1H NMR and 16S rRNA gene profiling. *PLOS ONE* **16**:e0247378. Public Library of Science. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0247378> (accessed March 14, 2022).
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff D v. 1981. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition* **34**:362–366. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/ajcn/article/34/3/362/4692881> (accessed January 29, 2022).
- Johansson MEV et al. 2014. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**:281–291. Available from <https://gut.bmj.com/content/63/2/281.short> (accessed March 5, 2022).
- Johnson AJ et al. 2019. Daily Sampling Reveals Personalized Diet-Microbiome Associations in Humans. *Cell Host and Microbe* **25**:789-802.e5. Cell Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312819302501> (accessed April 7, 2022).
- Jones MP, Dillely JB, Drossman D, Crowell MD. 2006. Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroenterology and Motility* **18**:91–103. Blackwell Publishing Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2982.2005.00730.x> (accessed March 10, 2022).
- Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, Wine E, Wishart DS. 2018. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta* **1030**:1–24. Elsevier B.V. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267018306354> (accessed March 11, 2022).

- Koh A, de Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. 2016. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**:1332–1345. Cell Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741630592X> (accessed April 7, 2022).
- Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. 2021. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* **19**:77–94. Nature Research. Available from <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0438-4> (accessed April 6, 2022).
- Lamichhane S, Yde CC, Schmedes MS, Jensen HM, Meier S, Bertram HC. 2015. Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces. *Analytical Chemistry* **87**:5930–5937. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.analchem.5b00977> (accessed March 11, 2022).
- le Chatelier E et al. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**:541–546. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nature12506> (accessed March 5, 2022).
- LeBlanc JG, Chain F, Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Courau S, Langella P. 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories* **16**:79. BioMed Central Ltd. Available from <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0691-z> (accessed March 2, 2022).
- Li C, Yu W, Wu P, Chen XD. 2020. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* **96**:114–126. Elsevier Ltd. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419304959> (accessed January 27, 2022).
- Lin L, Zhang J. 2017. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology* **18**:1–25. BioMed Central Ltd. Available from <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12865-016-0187-3> (accessed March 2, 2022).
- Llorach R, Garcia-Aloy M, Tulipani S, Vazquez-Fresno R, Andres-Lacueva C. 2012. Nutrimental strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**:8797–8808. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf301142b> (accessed March 11, 2022).
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **95**:50–60. AOAC International. Available from <https://academic.oup.com/jaoac/article/95/1/50-60/5655139> (accessed March 9, 2022).
- Mahowald MA et al. 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:5859–5864. National Academy of Sciences. Available from <https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106> (accessed February 24, 2022).
- Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. 2018. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host and Microbe* **23**:705–715. Cell Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131281830266X> (accessed April 4, 2022).



- Maslowski KM, MacKay CR. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology* **12**:5–9. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/ni01111-5> (accessed March 10, 2022).
- Mayer EA. 2011. Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication. *Nature Reviews Neuroscience* **12**:453–466. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nrn3071> (accessed March 1, 2022).
- Mazzone T, Chait A, Plutzky J. 2008. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The Lancet* **371**:1800–1809. Elsevier B.V. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18502305/> (accessed January 28, 2022).
- McFall-Ngai M. 2007. Adaptive immunity: Care for the community. *Nature* **445**:153. Nature Publishing Group. Available from <https://doi.org/10.1038/445153a> (accessed February 23, 2022).
- Minekus M et al. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function* **5**:1113–1124. Available from [www.rsc.org/foodfunction](http://www.rsc.org/foodfunction) (accessed January 28, 2022).
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology* **5**:e177. Public Library of Science. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0050177> (accessed March 10, 2022).
- Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, Gauthier C, Jacques PÉ, Li S, Xia J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research* **49**:W388–W396. Oxford University Press. Available from <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382> (accessed March 31, 2022).
- Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzi L, Govoni S, Giustina A, Gazzaruso C. 2018. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine* **61**:357–371. Humana Press Inc. Available from <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5> (accessed March 2, 2022).
- Patterson E, Cryan JF, Fitzgerald GF, Ross RP, Dinan TG, Stanton C. 2014. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proceedings of the Nutrition Society* **760**:477–489. Cambridge University Press. Available from <https://doi.org/10.1017/S0029665114001426> (accessed March 2, 2022).
- Peredo-Lovillo A, Romero-Luna HE, Jiménez-Fernández M. 2020. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. *Food Research International* **136**:109473. Elsevier Ltd. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920304981> (accessed April 4, 2022).
- Pokusaeva K et al. 2017. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology & Motility* **29**:e12904. Blackwell Publishing Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nmo.12904> (accessed March 9, 2022).
- Prosser JI et al. 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* **5**:384–392. Nature Publishing Group. Available from <https://doi.org/10.1038/nrmicro1643> (accessed February 23, 2022).

- Puupponen-Pimiä R, Aura AM, Oksman-Caldentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K. 2002. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science and Technology* **13**:3–11. Elsevier Ltd. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402000201> (accessed March 10, 2022).
- Ramos S, Martín MÁ. 2021. Impact of diet on gut microbiota. *Current Opinion in Food Science* **37**:83–90. Elsevier Ltd. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799320300734?via%3Dihub>.
- Rath CM, Dorrestein PC. 2012. The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. *Current Opinion in Microbiology* **15**:147–154. Elsevier Current Trends. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411002189> (accessed February 4, 2022).
- Resta SC. 2009. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *The Journal of Physiology* **587**:4169–4174. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2009.176370> (accessed March 9, 2022).
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **6**:306–314. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2009.35> (accessed March 1, 2022).
- Roager HM, Dragsted LO. 2019. Diet-derived microbial metabolites in health and disease. *Nutrition Bulletin* **44**:216–227. Blackwell Publishing Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nbu.12396> (accessed April 6, 2022).
- Rogers K, editor. 2010. *The Digestive System*. Britannica Educational Publishing. Available from [https://books.google.cz/books?id=KcecAAAAQBAJ&dq=human+digestive+system+structure+and+function&lr=&hl=cs&source=gbp\\_navlinks\\_s](https://books.google.cz/books?id=KcecAAAAQBAJ&dq=human+digestive+system+structure+and+function&lr=&hl=cs&source=gbp_navlinks_s) (accessed January 28, 2022).
- Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. 2015. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **45**:1827–1879. Taylor and Francis Inc. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643389.2014.1000761> (accessed March 11, 2022).
- 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. *European Journal of Nutrition* **57**:1–24. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-017-1445-8> (accessed April 7, 2022).
- Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J. 2020. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences* **65**:695–705. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-020-06118-4> (accessed February 4, 2022).

- Salles C, Chagnon M-C, Feron G, Guichard E, Laboure H, Morzel M, Semon E, Tarrega A, Yven C. 2010. In-Mouth Mechanisms Leading to Flavor Release and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**:67–90. Taylor & Francis Group . Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390903044693> (accessed January 28, 2022).
- Savorani F, Rasmussen MA, Mikkelsen MS, Engelsen SB. 2013. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International* **54**:1131–1145. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912005480> (accessed March 11, 2022).
- Schoeler M, Caesar R. 2019. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **20**:461–472. Springer. Available from <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0> (accessed March 9, 2022).
- Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. 2010. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **18**:190–195. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2009.167> (accessed January 30, 2022).
- Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research* **69**:52–60. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661812002071?via%3Dihub> (accessed March 15, 2022).
- Sekirov I, Russell SL, Caetano L, Antunes M, Finlay BB. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* **90**:859–904. Available from <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00045.2009> (accessed February 14, 2022).
- Serra D, Almeida LM, Dinis TCP. 2018. Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis. *Trends in Food Science and Technology* **78**:224–233. Elsevier Ltd. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418301080> (accessed March 11, 2022).
- Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* **11**:25. Frontiers Media S.A. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00025/full> (accessed March 1, 2022).
- Smith EA, Macfarlane GT. 1997. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* **3**:327–337. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996497901219> (accessed March 10, 2022).
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science* **341**:569–573. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1241165> (accessed February 2, 2022).
- Soliman GA. 2019. Dietary Fiber, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *Nutrients* **11**:1155. MDPI AG. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/1155> (accessed March 10, 2022).

- Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. 2014. Starving our microbial self: The deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metabolism* **20**:779–786. Cell Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413114003118> (accessed February 10, 2022).
- Sonnenburg JL, Sonnenburg ED. 2019. Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science* **366**. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aaw9255> (accessed February 1, 2022).
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World Journal of Gastroenterology* **11**:1131–1140. Baishideng Publishing Group Co. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250702/> (accessed March 10, 2022).
- Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. 2016. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine* **22**:713–722. Available from <https://doi.org/10.1038/nm.4142> (accessed February 22, 2022).
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. 2014. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in Immunology* **121**:91–119. Academic Press Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9> (accessed March 10, 2022).
- Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. 2014. Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases. *Immunity* **40**:833–842. Cell Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761314001940> (accessed February 10, 2022).
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**:1027–1031. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nature05414> (accessed March 5, 2022).
- van Treuren W, Dodd D. 2020. Microbial Contribution to the Human Metabolome: Implications for Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **15**:345–369. Annual Reviews Inc. Available from <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-020117-043559> (accessed February 5, 2022).
- Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, Edwards CA, Franck A, Kleerebezem M, Nauta A, Raes J, van Tol EAF, Tuohy KM. 2015. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **28**:42–66. Cambridge University Press. Available from <https://doi.org/10.1017/S0954422415000037> (accessed April 12, 2022).
- Verkempinck S, Pallares Pallares A, Hendrickx M, Grauwet T. 2020. Processing as a tool to manage digestive barriers in plant-based foods: recent advances. *Current Opinion in Food Science* **35**:1–9. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.007> (accessed March 8, 2022).
- Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews* **6**:3–14. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-006-9031-3> (accessed March 13, 2022).

- Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky – Společnost pro výživu. 2012, April 16. Available from <https://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/> (accessed March 28, 2022).
- Willemsen LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF. 2003. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. *Gut* **52**:1442–1447. BMJ Publishing Group. Available from <https://gut.bmj.com/content/52/10/1442.abstract> (accessed February 14, 2022).
- Willyard C. 2018. Could baby's first bacteria take root before birth? *Nature* **553**. Available from <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&u=anon~9c0a5851&id=GALE|A523570879&v=2.1&it=r> (accessed February 22, 2022).
- Windey K, de Preter V, Verbeke K. 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**:184–196. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201100542> (accessed March 7, 2022).
- Wishart DS. 2008. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **27**:228–237. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001> (accessed March 13, 2022).
- Wu GD et al. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**:105–108. American Association for the Advancement of Science. Available from <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1208344> (accessed January 31, 2022).
- Youssef O et al. 2018. Stool Microbiota Composition Differs in Patients with Stomach, Colon, and Rectal Neoplasms. *Digestive Diseases and Sciences* **63**:2950–2958. Springer New York LLC. Available from <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5190-5> (accessed March 11, 2022).
- Yu Y, Raka F, Adeli K. 2019. The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Journal of Clinical Medicine* **8**:2227. MDPI. Available from <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/12/2227> (accessed March 7, 2022).
- Zhang N, Ju Z, Zuo T. 2018. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition* **51–52**:80–85. Elsevier Inc. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900718300212> (accessed February 2, 2022).

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

<sup>1</sup> H NMR	Protonová nukleární magnetická rezonance
ATP	Adenosintrifosfát
BCFA	Branched-chain fatty acid – mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem
CA	Kanada
CZ	Česká republika
DE	Německo
ES	Španělsko
GABA	Gama-aminomáselná kyselina
GIT	Gastrointestinální trakt
CH	Švýcarsko
NC, US	Severní Karolína, Spojené státy Americké
NY, US	New York, Spojené státy Americké
PCA	Analýza hlavních komponent
ppm	Parts per million – jedna miliontina
rDNA	Ribozomální deoxyribonukleová kyselina
rpm	Revolutions per minute – otáčky za minutu
SCFA	Short-chain fatty acids – mastné kyseliny s krátkým řetězcem
T <sub>reg</sub>	T lymfocyty
TSP	Pufř 3-(trimethylsilyl)propionát

## 10 Samostatné přílohy

### Příloha I

#### RECEPT NA LUŠTĚNINOVOU POLÉVKU

**Čočková polévka** (10 porcí) – 1 porce 0,33 l

*(pozn.: 2 porce/osobu a den - byla podávána 1 porce k obědu + 1 porce k večeři)*

#### Suroviny

- čočka 500 g
- sádlo 100 g
- cibule 85 g
- mouka hladká 120 g
- voda 2,7 l
- majoránka 0,3 g
- pepř mletý 0,3 g
- česnek 18 g
- sůl 30 g
- polévkové koření 20 g

#### Postup

Přebranou čočku pečlivě propláchneme, zalijeme dostatečným množstvím vody, uvedeme do varu a zvolna vaříme téměř doměkka a během vaření dle potřeby doléváme horkou vodou. Na tuku osmahneme dorůžova jemně nakrájenou cibuli, zasypeme prosátou moukou a připravíme světlou zasmažku. Za neustálého prošlehávání zasmažku zalijeme vlažnou vodou, uvedeme do varu, přidáme drcenou majoránku, pepř, česnek utřený se solí a pozvolna provaříme za občasného prošlehávání 20 minut. Do připraveného základu s kořením a česnekem přidáme uvařenou čočku a znovu krátce povaříme. Hotovou polévku dochutíme polévkovým kořením.

#### Charakter polévky:

čočkově nahnědlá polévka typické vůně a chuti po použitých surovinách a přísadách, hustší, s dostatečně uvařenou čočkou

Energetická hodnota: 860 kJ (dle normované receptury)