



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV VYBRANÝCH TYPŮ POTRAVIN NA ZMĚNY KOMPOZICE STŘEVNÍHO MIKROBIOMU

INFLUENCE OF SELECTED TYPES OF FOOD ON CHANGES IN THE COMPOSITION OF THE INTESTINAL
MICROBIOME

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Šantavý

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Petr Ryšávka

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1521/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Tomáš Šantavý**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **RNDr. Petr Ryšávka**

Název diplomové práce:

Vliv vybraných typů potravin na změny kompozice střevního mikrobiomu

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Charakterizace vybraných typů potravin z hlediska kompozice
- 3) Sledování vlivu vybraných potravin a stravování na střevní mikrobiom
- 4) Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Tomáš Šantavý
student(ka)

RNDr. Petr Ryšávka
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Práca sa zameriava na zistenie vplyvu vybraných typov potravín na zmeny kompozície črevného mikrobiómu. Zloženie stravy hrá dôležitú úlohu pri kontrole črevných mikrobiálnych populácií, vrátane prevencie a liečbe určitých ochorení. S cieľom vyhodnotiť vplyv dennej konzumácie ovocno-zeleninového smoothie na ľudský črevný mikrobióm boli porovnané zmeny v črevnom mikrobióme na začiatku a po 14 dňoch intervencie. Experimentálnej časti sa zúčastnilo 10 mužov a 10 žien vo veku 35-45 rokov, ktorí boli rovnomerne rozdelení do 2 skupín. Prvá skupina účastníkov konzumovala kombináciu zloženú z pomaranču, sušenej kurkumy a zázvoru. Druhá skupina konzumovala kombináciu zloženú z jablka, mrkvy a citrónovej šťavy. Na zistenie rozdielov v črevnom mikrobióme bola využitá izolácia DNA zo vzoriek stolice a následne kvantitatívna PCR metóda. Po 14-dňovej konzumácii ovocno-zeleninového smoothie boli pozorované určité zmeny kmeňov *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*. Po štatistickom vyhodnotení dosiahnutých výsledkov neboli rozdiely preukázateľné na štatisticky významnej hladine (p-hodnota > 0,05).

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Črevný mikrobióm, výživa, kompozícia, kvantitatívna PCR analýza

ABSTRACT

The master's thesis focuses on determining the influence of selected types of food on changes in the intestinal microbiome composition. Dietary composition plays an important role in controlling intestinal microbial populations, including the prevention and treatment of certain diseases. In order to evaluate the effect of daily consumption of fruit-vegetable smoothie on the human intestinal microbiome, changes in the intestinal microbiome at the beginning and after 14 days of intervention were compared. The experimental part was attended by 10 men and 10 women aged 35-45 years, who were evenly divided into 2 groups. The first group of participants consumed a combination of orange, dried turmeric and ginger. The second group consumed a combination of apple, carrot and lemon juice. DNA isolation from stool samples followed by a quantitative PCR method was used to detect differences in the intestinal microbiome. After 14 days of consumption of the fruit-vegetable smoothie, specific changes in the phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* were observed. After statistical evaluation of the obtained results, the differences were not detectable at a statistically significant level (p-value > 0.05).

KEYWORDS

Intestinal microbiome, nutrition, composition, quantitative PCR analysis

CITÁCIA

ŠANTAVÝ, Tomáš. *Vliv vybraných typů potravin na změny kompozice střevního mikrobiomu*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131506>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Ryšávka.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému “Vplyv vybraných typov potravín na zmeny kompozície črevného mikrobiómu” vypracoval samostatne pod vedením RNDr. Petra Ryšávku a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne odcitoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rád by som sa poďakoval vedúcemu mojej diplomovej práce RNDr. Petrovi Ryšávkovi za odborné vedenie a ochotu pri spracovaní diplomovej práce. Ďalej by som chcel poďakovať celému tímu spoločnosti Medi Pharma Vision, kde som mohol uskutočniť experimentálnu časť diplomovej práce, za pomoc a cenné rady. Veľké poďakovanie patrí taktiež prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., že mi umožnila pracovať na tejto téme práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ	7
	2.1 Črevný mikrobióm.....	7
	2.2 Faktory ovplyvňujúce črevný mikrobióm	10
	2.3 Faktory ovplyvňujúce homeostázu črevného mikrobiómu	12
	2.4 Vplyv stravy na črevný mikrobióm	18
	2.5 Typy stravovania a ich vplyv na mikrobióm	31
	2.6 Metódy analýzy črevného mikrobiómu	37
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	42
	3.1 Použité chemikálie a materiály	42
	3.2 Použité prístroje	42
	3.3 Charakterizácia účastníkov	42
	3.4 Kombinácie vybraných typov potravín	43
	3.5 Odber vzorky stolice.....	43
	3.6 Spracovanie a analýza	43
	3.7 Vyhodnotenie dát.....	47
4	VÝSLEDKY	48
	4.1 Charakterizácia účastníkov	48
	4.2 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	49
	4.3 Analýza črevného mikrobiómu	50
5	DISKUSIA	58
6	ZÁVER	60
7	LITERATÚRA	61
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	73

1 ÚVOD

Ľudské črevo je domovom desiatok miliónov mikroorganizmov, vrátane baktérií, vírusov, prvokov a húb, ktoré sa súhrnne nazývajú črevný mikrobióm. Kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes* spolu s rodmi *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* predstavujú až 90 % celkovej početnosti ľudského črevného mikrobiómu. Výskum črevného mikrobiómu sa na celom svete rýchlo rozširuje a prináša nové pohľady na ochorenia ľudí i zvierat. Črevný mikrobióm je potenciálnym terapeutickým nástrojom pre fyziologické poruchy, pretože jeho zmena môže formovať imunitný systém, chrániť pred patogénnymi mikroorganizmami a regulovať metabolizmus. Vzhľadom na jeho význam pre zdravie je udržanie rovnováhy zloženia mikrobiómu rozhodujúce, ale ovplyvňuje ju celý rad faktorov vrátane veku, genetiky, prostredia a stravovania. Jednotlivci majú navyše svoju vlastnú odlišnú kombináciu prevažujúcich a deficitných druhov baktérií. Tento interindividuálny rozdiel v zložení mikrobiálnej komunity môže nakoniec prispieť k rozdielom v metabolizme zložiek stravy a zdravotnom stave [1].

Zdravá výživa formuje zloženie črevného mikrobiómu, a tým ovplyvňuje interakcie hostiteľ-mikrób, ako aj homeostázu a chorobné procesy. Každá zložka potravy môže inak modulovať črevný mikrobióm, vďaka jeho vysokej variabilite [1].

Ovocie a zelenina si získavajú čoraz väčšiu pozornosť, kvôli svojim potenciálnym priaznivým účinkom, ktoré sa líšia v závislosti od ich štrukturálnych a fyzikálno-chemických vlastností. Rastlinné zložky sú dôležitými potravinami každodennej stravy a sú bohaté na vlákninu. Okrem toho sa za posledné desaťročie ukázalo, že konzumácia rastlín má podstatný vplyv na črevný mikrobióm a že strava bohatá na rastlinnú zložku môže vyvolať expanziu črevných baktérií, ktoré sú prospešné pre ľudskú fyziológiu a celkové zdravie. Vlastnosti rastlín podporujúce zdravie presahujú rámec poskytovania základných mikro- a makroživín a sú multimodálne, pretože tiež obsahujú fytochemikálie, ktoré fungujú ako antioxidanty, fytoestrogény a protizápalové látky. Analýza mikrobiómu zo vzoriek stolice môže poskytnúť nové dôkazy o porozumení vzťahu medzi príjmom ovocia, zeleniny a črevným mikrobiómom [2].

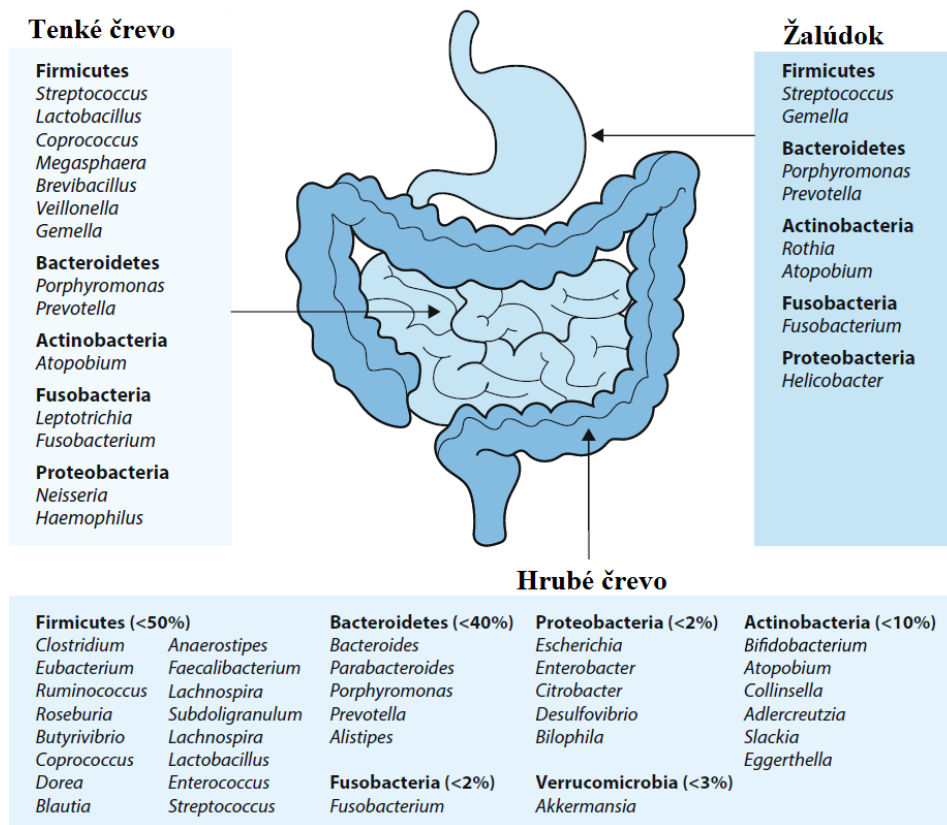
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Črevný mikrobióm

Ľudský gastrointestinálny trakt obsahuje bohaté a rozmanité mikrobiálne spoločenstvo, ktoré zhromažďuje viac ako 100 biliónov mikroorganizmov. Hustota bakteriálnych buniek v hrubom čreve bola odhadnutá na 10^{11} až 10^{12} na mililiter, čo robí hrubé črevo jedným z najhustejšie osídlených mikrobiálnych biotopov známych na Zemi. Črevný mikrobióm kóduje viac ako 3 milióny génov produkujúcich tisíce metabolitov, zatiaľ čo ľudský genóm pozostáva z približne 23 000 génov. Vedci sa už roky zaujímajú o črevný mikrobióm, ale jedným z hlavných problémov vo výskume je schopnosť kultivovať tieto mikroorganizmy. V posledných rokoch nové technológie umožnili výskumníkom fylogeneticky identifikovať a kvantifikovať zložky črevného mikrobiómu analýzou nukleových kyselín (DNA a RNA) priamo extrahovaných zo stolice. Väčšina týchto techník je založená na extrakcii DNA a amplifikácii 16S rRNA. 16S rRNA sekvenovanie sa stalo najužitočnejšou technikou na zvýraznenie diverzity a hojnosti mikrobiómu. Génové sekvencie 16S rRNA sa môžu využiť s polymerázovou reťazovou reakciou a metagenomickým sekvenovaním na charakterizáciu mikrobiálnych kmeňov. Metagenomické sekvenovanie celej mikrobiálnej DNA v komplexnej komunite má výhodu v hodnotení genetického potenciálu mikrobiálnej populácie [3, 4].

2.1.1 Zloženie črevného mikrobiómu

Črevný mikrobióm sa skladá z niekoľkých druhov mikroorganizmov, vrátane baktérií, kvasiniek a vírusov. Taxonomicky sú delené do kmeňov, tried, radov, čeľadí, rodov a druhov. Zastúpených je iba niekoľko kmeňov, ktoré predstavujú viac ako 160 druhov. Dominantnými črevnými kmeňmi sú *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*, pričom kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes* predstavujú 90 % črevného mikrobiómu. Kmeň *Firmicutes* sa skladá z viac ako 200 rôznych rodov ako sú *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Ruminococcus*. Ľudský črevný mikrobióm sa mení taxonomicky a funkčne v každej časti gastrointestinálneho traktu a podlieha zmenám u toho istého jedinca v dôsledku pôrodu, veku a faktorov prostredia, ako je napríklad použitie antibiotík. Tak isto sa mení aj medzi jednotlivcami, najčastejšie vplyvom indexu telesnej hmotnosti a vonkajšími faktormi, ako je životný štýl, cvičenie, etnicita a stravovanie [3, 4].



Obrázok 1: Hlavné bakteriálne kmene a rody vyskytujúce sa v rôznych častiach gastrointestinálneho traktu [5]

2.1.2 Funkcie črevného mikrobiómu

Pretože črevný mikrobióm kóduje podstatne väčší počet génov ako jeho ľudský hostiteľ, vyplýva z toho, že je schopný vykonávať rôzne metabolické funkcie, ktoré ľudia nie sú schopní vykonávať alebo sú schopní robiť iba v obmedzenom množstve. Črevné baktérie sú schopné produkovať rôzne vitamíny, syntetizovať všetky esenciálne a neesenciálne aminokyseliny, uskutočňovať biotransformáciu žlče a bojovať proti patogénom [6].

Systémový účinok mikrobiómu je sprostredkovaný mikrobiálnymi metabolitmi, ako sú mastné kyseliny s krátkym reťazcom (SCFA) a plyny sírovodík, amoniak, vodík, metán, oxid uhoľnatý a oxid uhličitý. SCFA sú produkované baktériami tráviacimi vlákninu. SCFA, ktoré obsahujú hlavne acetát, propionát a butyrát, sa vyrábajú za anaeróbných podmienok v hrubom čreve fermentáciou vlákniny z potravy. SCFA aktivujú receptory spojené s G proteínmi, ktoré sú prítomné na viacerých typoch buniek, vrátane črevných epitelových buniek, makrofágov, dendritických buniek a mastocytov. V dôsledku toho majú SCFA viacnásobné účinky na hostiteľa, vrátane pôsobenia ako zdroj energie, podpora homeostázy glukózy a energie, regulácia imunitných reakcií a zápalu, regulácia hormónov kontrolujúcich apetít, supresia tumor supresorových génov, regulácia centrálného a periférneho nervového systému [7].

Butyrát je hlavným zdrojom energie pre ľudské kolonocyty, môže indukovať apoptózu buniek rakoviny hrubého čreva a môže aktivovať črevnú glukoneogénu, čo má priaznivý vplyv na homeostázu glukózy a energie. Butyrát je nevyhnutný na to, aby epitelové bunky

konzumovali veľké množstvo kyslíka prostredníctvom β -oxidácie, čím sa vytvára stav hypoxie, ktorý udržiava rovnováhu kyslíka v čreve, čím bráni dysbióze črevného mikrobiómu [8].

Propionát sa prenáša do pečene, kde reguluje glukoneogénu a signalizáciu sýtosti prostredníctvom interakcie s črevnými receptormi mastných kyselín [8].

Acetát, najhojnejšia SCFA, je esenciálny metabolit pre rast ďalších baktérií, dostáva sa do periférnych tkanív, kde sa využíva v metabolizme cholesterolu a lipogenéze. Kontrolované štúdie ukazujú, že vyššia produkcia SCFA koreluje s nižšou obezitou vyvolanou stravou a so zníženou inzulínovou rezistenciou [8].

2.1.2.1 Imunitný systém

Vzájomný vzťah medzi hosťiteľom a mikrobiómom zahŕňa aj interakciu medzi mikrobiómom a imunitným systémom. Mukózný povrch v tráviacom trakte predstavuje hlavné rozhranie medzi imunitným systémom a mikroorganizmami. Schopnosť rozlíšiť komenzálne baktérie od patogénov sa považuje za hnaciu silu vývoja imunity. V dôsledku toho si imunitný systém a mikrobióm vyvinuli až vzájomný vzťah, navzájom sa regulujú a spolupracujú na vzájomnej podpore. Preukázalo sa, že 70-80 % imunitných buniek tela sa nachádza v čreve. U ľudí sa črevný mikrobióm podobný dospelému formuje do jedného až dvoch rokov od narodenia. Rôzne bakteriálne druhy v črevnom mikrobióme dokážu selektívne riadiť imunitný systém a vytvárať cytokíny. *Bacteroides fragilis* a niektoré druhy *Clostridia* riadia protizápalovú reakciu [9].

Črevná stena udáva primárne rozhranie medzi črevným mikrobiómom a prostredím hosťiteľa, vytvára črevnú bariéru. Izoluje, ale zároveň umožňuje žiaduce interakcie. Tvoria ju epitelové bunky čрева, mikroorganizmy na povrchu a hlien, ktorý produkujú. Po imunologickej stránke ju tvoria cytokíny, prtilátky a antimikrobiálne látky produkované epitelovými a imunitnými bunkami. Epitelové bunky rozpoznávajú mikrobiálne produkty prostredníctvom imunitných receptorov známych ako receptory rozpoznávajúce vzory (PRR). Aktivácia PRR umožňuje nastavenie epitelovej aktivity na základe signálov z mikrobiómu, čo upravuje antimikrobiálnu odpoveď na elimináciu patogénnych baktérií [10].

Najdôležitejšou molekulou zapojenou do interakcie imunitného systému a mikrobiómu je imunoglobulín A (IgA). IgA môže vytvárať ďalšiu bariéru, ktorá by zabraňovala potenciálne škodlivým interakciám s imunitným systémom. IgA podporuje vytvorenie vyváženého mikrobiómu regulovaním jeho zloženia, kontrolou mikrobiálnej génovej expresie, zvyšovaním diverzity a vzájomného pôsobenia medzi mikrobiómom a hosťiteľom. Mikrobióm zase ovplyvňuje jeho produkciu pomocou plazmatických buniek [11].

2.1.2.2 Črevno-mozgová os

Označuje neurologické a biochemické spojenie medzi črevným nervovým systémom a centrálnym nervovým systémom. Črevný mikrobióm má vplyv na imunitný systém, nervový systém, správanie, toleranciu stresu, náladu, úzkosť a depresie [12].

Vedci z Alabamskej univerzity v roku 2018 našli v mozgu ľudí baktérie kmeňov *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Bacteroidetes*, ktoré sa vyskytujú v črevách [13].

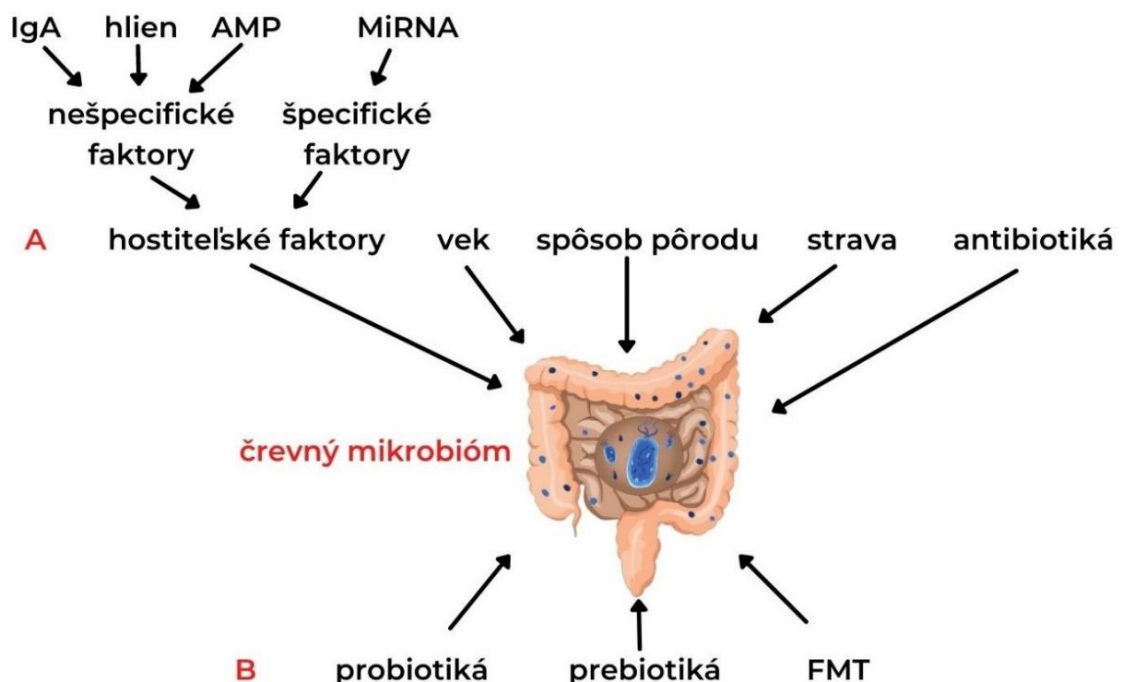
Mozog komunikuje s črevom dvomi odlišnými autonómnymi vetvami nervového systému, HPA os (hypothalamus-hypofýza-nadobličky) a os sympatického nervového systému

a nadobličiek, ktorá reguluje lymfatický systém čreva. Dôležité je pochopenie týchto obojstranných regulačných mechanizmov. Prvé príznaky zhoršenej funkcie mozgu môžu byť rozpoznateľné aj pri trávení, narušenou sekréciou pankreatických enzýmov, slabou aktivitou žlčníku, celkovým narušením rovnováhy a funkciou čriev. Komunikácia medzi mozgom a črevom môže tvoriť tzv. začarovaný kruh [12, 14].

Nepretržité zápalové ochorenie alebo nerovnováha čreva môže spôsobiť zhoršenie spojenia medzi enterocytmi na povrchu čreva a spôsobiť priepustnosť čriev. Podobne narušená funkcia mozgu alebo stresová hyperaktivita sympatického nervového systému podkopávajú funkciu blúdívého nervu. To zhoršuje funkciu imunitného systému a znižuje krvný obeh v čreve, čo zase zvyšuje rast škodlivých húb a baktérií v čreve. Môžu poškodiť povrchové tkanivo čreva, zhoršiť priepustnosť čriev a vyvolať syndróm priepustného čreva. Nepretržitý zápal systému nižšieho stupňa môže tiež zhoršovať priepustnosť čriev. To vedie k produkcii cytokínov v čreve. Vďaka priepustnosti čriev sú prenášajúce látky schopné preniknúť do krvného obehu a do mozgu cez hematoencefalickú bariéru. Zápal spôsobuje priepustnosť hematoencefalickej bariéry, ktorá následne aktivuje mozgové bunky spojivového tkaniva, tiež známe ako bunky mikroglie. Výsledkom je chronický zápalový stav mozgu, ktorý zhoršuje funkciu mozgu a môže spôsobiť úzkosť a depresiu [14, 15].

2.2 Faktory ovplyvňujúce črevný mikrobióm

Existuje niekoľko vnútorných a vonkajších faktorov, ktoré môžu mať vplyv na zloženie črevného mikrobiómu a nakoniec ovplyvniť naše zdravie.



Obrázok 2: Faktory ovplyvňujúce črevný mikrobióm a spôsoby jeho modulácie
 ((A) faktory ovplyvňujúce črevný mikrobióm, (B) spôsoby modulácie črevného mikrobiómu;
 AMP - antimikrobiálne peptidy; IgA - imunoglobulín A; miRNA - microRNA; FMT - transplantácia
 fekálneho mikrobiómu) [16]

2.2.1 Nešpecifické faktory

Hostiteľ si vyberá svoj vlastný črevný mikrobióm produkovaním niekoľkých molekulárnych signálov, ktoré riadia štruktúru povrchov kolonizovaných mikróbmi, a tak ovplyvňuje jeho zloženie. Tieto molekuly sú produkované črevnými epitelovými bunkami (IEC) a zahŕňajú hlien, antimikrobiálne peptidy (AMP) a IgA, ktoré môžu podporovať rast niektorých mikrobiálnych druhov a inhibovať rast iných [16].

Hlien v hrubom čreve udržuje mikróby ďaleko od IEC. Vonkajšia vrstva v hrubom čreve obsahuje rozpustné mucínové O-glykány, ktoré poskytujú zdroj živín a väzbové miesto pre črevný mikrobióm. Hlien a mucínové O-glykány hrajú kľúčovú rolu pre formovanie črevného mikrobiómu a pri výbere najvhodnejšieho mikrobiálneho druhu pre zdravie hostiteľa [16].

Aj keď v tenkom čreve nie je dostatok hlienu, AMP majú dôležitú úlohu pri formovaní črevného mikrobiómu. Črevný mikrobióm indukuje produkciu AMP Panethovými bunkami pomocou mechanizmu sprostredkovaného PRR. PRR sú aktivované rôznymi mikrobiálnymi zložkami, ako sú bičíky a lipopolysacharidy, v systéme ktorý sa nazýva molekulárny model spojený s mikróbom (MAMP). PRR-MAMP je významný pri podpore funkcie hlienovej bariéry a pri indukcii produkcie IgA, mucinových glykoproteínov a AMP. AMP sú vylučované pomocou IEC ako prvá obranná línia tela proti narušiteľom a tieto proteíny majú široký účinok, ktorý priamo ničí baktérie, vírusy, kvasinky, huby a dokonca aj rakovinové bunky. Sekrečný IgA je dominantným izotypom protilátok v slizničných sekrétoch a hrá zásadnú úlohu v obrane proti patogénnym mikroorganizmom. Dokonca aj v neprítomnosti infekcie, telo produkuje približne 4 gramy IgA denne, viac ako všetky ostatné kombinácie izotypov protilátok. Veľká časť z tohto IgA sa vylučuje do črevného lúmena, kde sa viaže na povrch špecifických baktérií v črevnom mikrobióme [16, 17].

2.2.2 Špecifické faktory

Ďalším hostiteľským faktorom sú miRNA, čo sú malé nekódujúce RNA, ktoré majú dĺžku 18 až 23 nukleotidov. MiRNA sa generujú v jadre a potom sa transportujú do cytoplazmy, aby sa dosiahlo umlčanie génov hybridizáciou s 3'netranslatovanou oblasťou cieľového génu a podporou mRNA degradácie alebo inhibície translácie. Zvyšujúce sa dôkazy ukazujú, že miRNA existujú extracelulárne a cirkulujú v telesných tekutinách. MiRNA sú potenciálne markery črevnej malignity a majú schopnosť ovplyvniť zloženie črevného mikrobiómu. Niektoré miRNA sú schopné vstúpiť do črevných bakteriálnych buniek, regulovať ich rast, génovú expresiu a tým ovplyvňovať reguláciu črevného mikrobiómu. Črevný mikrobióm môže byť formovaný podávaním fekálnych miRNA. Mikrobiálny profil príjemcu je po transplantácii fekálnej RNA podobný profilu darcu, čo naznačuje liečbu chorôb spojených s črevným mikrobiómom pomocou syntetickej špecifickej miRNA [16, 18].

2.3 Faktory ovplyvňujúce homeostázu črevného mikrobiómu

2.3.1 Spôsob pôrodu

Napriek možným niektorým bakteriálnym expozíciám pred pôrodom je plod stále relatívne sterilný, až kým nenarazí na prostredie mimo svojej matky. Pôrod predstavuje príležitosť na vystavenie širokému spektru mikróbov v životnom prostredí, vrátane materského mikrobiómu. Jedným z najdôležitejších spúšťačov rozvoja imunitného systému je vystavenie mikrobiálnym zložkám bezprostredne po narodení. Prechod dieťaťa cez pôrodný kanál pri vaginálnom pôrode, a teda aj pri kontakte s výkalmi matky a vaginálnym mikrobiómom, ovplyvňuje pri narodení zloženie črevného mikrobiómu dieťaťa. Dieťa narodené vaginálne získava bakteriálne spoločenstvá pripomínajúce vaginálny a fekálny mikrobióm svojej matky. Prvými kolonizátormi dojčenského čreva pri vaginálnom pôrode sú fakultatívne anaeróbne baktérie, ako sú rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Enterobacter*, nasledované anaeróbnymi, ako sú napríklad *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium*. Pôrod cisárskym rezom je spojený so zmenenou kolonizáciou čreva dojčaťa pri narodení, pravdepodobne preto, že dieťa nie je vystavené materskému mikrobiómu ako pri vaginálnom pôrode. Deti narodené cisárskym rezom majú bakteriálne spoločenstvá podobné tým, ktoré sa nachádzajú na povrchu pokožky a nemocničnom prostredí (napr. zdravotnícky personál, nemocničné povrchy, iní novorodenci). Črevný mikrobióm u dojčiat narodených cisárskym rezom je menej rozmanitý, pokiaľ ide o bakteriálne rody, je charakterizovaný neprítomnosťou rodov *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a zvýšenou prítomnosťou *Clostridium difficile*. Zvyšujúci sa počet dôkazov naznačuje, že deti narodené cisárskym rezom majú zvýšené riziko alergií a sú spojené s väčším rizikom vzniku obezity a cukrovky ako deti narodené vaginálne [19].

V prierezovej štúdii na vzorke 8900 čínskych detí vo veku 3 až 6 rokov sa 67,3 % narodilo cisárskym rezom a z toho 15,7 % bolo obézných. Cisársky pôrod bol významne spojený s rizikom nadváhy a rizikom obezity u predškolských detí [20].

Podobná štúdia na malej vzorke detí v predškolskom veku z Brazílie tiež ukázala, že miera prevalencie nadváhy a obezity bola 15,6 %, respektíve 12,9 %, v prípade 672 predškolských detí, ktoré sa narodili cisárskym rezom [21].

Niektoré štúdie nepodporujú príčinnú súvislosť medzi cisárskym rezom a detskou obezitou. Dôležitým faktorom v súvislosti s pôrodom cisárskym rezom a detskou obezitou bola váha matiek pred pôrodom, ktorú treba v týchto štúdiách zohľadniť v budúcnosti. Ďalšími faktormi, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky sú vzorka populácie a pohlavie dieťaťa [22, 23].

2.3.2 Dojčenská výživa

Dojčenská výživa je ďalším dôležitým faktorom na vytvorenie bakteriálnej komunity v čreve, pretože materské mlieko, nie je sterilné. Ľudské materské mlieko sa považuje za zdroj komenzálnych a potenciálnych probiotických baktérií, ktoré ovplyvňujú vývoj črevného mikrobiómu dojčiat. Ľudské materské mlieko obsahuje viac ako 700 druhov baktérií a v priemere obsahuje 10^6 bakteriálnych buniek/ml. V ľudskom mlieku prevládajú streptokoky a stafylokoky, ktoré dominujú v kožnom mikrobióme, preto mlieko môže obsahovať aj niektoré kožné baktérie. Baktérie prítomné v materskom mlieku, ako aj baktérie na matkinej pokožke, patria medzi prvé mikróby, ktoré vstupujú do tela dieťaťa, a mohli by hrať dôležitú úlohu v jeho

zdraví. Materské mlieko je tiež bohatým zdrojom IgA protilátok proti rôznym patogénom a niektoré dojčenské výživy obsahujúce probiotiká priaznivo ovplyvňujú imunitný systém dojčiat a črevný mikrobióm. Vo vzorkách kolostra prevládajú *Weissella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Lactococcus*, zatiaľ čo v mlieku odobratom po 1 a 6 mesiacoch významne vzrástli *Veillonella*, *Leptotrichia* a *Prevotella*. Štúdie naznačujú, že prenos mikrobiómu matiek na ich deti ovplyvňuje rast a vývoj dojčiat. Mlieko od obéznych matiek obsahuje odlišné, menej rozmanité baktérie a má viac prozápalové vlastnosti ako mlieko od matiek s normálnou hmotnosťou. Okrem toho materské mlieko matiek, ktoré rodili cisárskym rezom, obsahovalo baktérie odlišné od vzoriek mlieka od matiek, ktoré rodili vaginálnym pôrodom [24].

2.3.3 Genetika

Počet špecifických baktérií v črevnom mikrobióme je čiastočne ovplyvnený genetickým zložením hostiteľa spôsobmi, ktoré ovplyvňujú metabolizmus hostiteľa a v konečnom dôsledku môžu ovplyvniť zdravie. Členovia rodiny majú viac podobných mikrobiotických komunit ako neprepojení jednotlivci a črevný mikrobióm je podobnejší u jednovaječných dvojčiat ako u dvojvaječných. Bakteriálna čeľaď *Christensenellaceae* patrí medzi vysoko dedičné a vyskytuje sa častejšie u ľudí s nižším indexom telesnej hmotnosti (BMI). Navyše pri štúdií na myšiach, kde bola táto čeľaď fekálne transplantovaná, po 21 dňoch vážili menej, ako myši bez transplantácie. Nie sú ešte bohužiaľ dostatočné informácie týkajúceho sa celého genómu, ktoré by stanovovali špecifické gény a dráhy určujúce zloženie črevného mikrobiómu [24, 25].

2.3.4 Pohlavie

Rozdielne stravovacie reakcie zistené u žien v porovnaní s mužmi v niekoľkých štúdiách, spolu so skutočnosťou, že prevalencia niektorých imunitných chorôb sa líši medzi pohlaviami, zvýšili záujem o štúdium pohlaví ako nezávislého imunomodulačného faktora v mikrobiómových štúdiách. Ženské účastníčky zaznamenali väčšie posuny v hojnosti rodu *Bifidobacterium* po užití inulínu v porovnaní s mužmi. Prevalencia infekcií je vysoká u mužov, ale ženy sú zvyčajne náchylnejšie na rozvoj autoimunitných ochorení, ako je cukrovka typu 1 alebo reumatoidná artritída. Potenciálne faktory, ktoré môžu hrať dôležitú rolu v rozdieloch, zahŕňajú nielen genetiku a skutočnosť, že chromozóm X obsahuje vyšší počet génov podieľajúcich sa na imunite hostiteľa, ale aj rozdiely v dôsledku hladín hormónov a profilu črevného mikrobiómu. Najmä hormonálne zmeny, ku ktorým dochádza počas menštruačného cyklu, ovplyvňujú reakciu na stravu odlišným spôsobom, zatiaľ čo puberta a menopauza sú štádiá života charakterizované podstatnými hormonálnymi zmenami, ktoré môžu súvisieť s mikrobiómom. Jednou z životne dôležitých funkcií črevného mikrobiómu je regulácia hladín steroidných hormónov po menopauze, najmä hladín estrogénu, pomocou β -glukuronidázy a β -glukozidázových enzýmov. Štúdie na postmenopauzálnych ženách preukázali vyššiu hladinu kmeňa *Firmicutes* a nižšiu hladinu *Actinobacteria*, *Roseburia* a *Prevotella* v porovnaní s premenopauzálnymi ženami. Niektoré baktérie preukázali negatívnu súvislosť medzi hladinami sexuálnych hormónov, ako je *Prevotella* a estradiol [26].

2.3.5 Vek

Črevný mikrobióm v prvých rokoch života je pomerne dynamický, zmeny sa menia v závislosti od životného štýlu. Kolonizácia čriev sa začína pred narodením materským mikrobiómom, ktorý zase závisí od stravy matky, vaginálneho zdravia a vystaveniu antibiotikám alebo liekom. Črevný mikrobióm sa stáva stabilnejší a podobný profilu dospelých vo veku okolo 2,5 roka. Črevný mikrobióm zdravých dospelých ľudí sa vyznačuje vysokou stabilitou až do dosiahnutia vyššieho veku, životného štádia charakterizovaného poklesom bakteriálnej diverzity, vyššou hladinou prozápalových baktérií, ako sú *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacteria* a nižšou hladinou imunoregulačných baktérií, ako sú výrobcovia butyrátu. Zmena črevného mikrobiómu v tomto štádiu života súvisí s fyziologickými zmenami, súvisiacimi s vekom, ako je strata imunitnej funkčnosti, znížená pohyblivosť čriev alebo strata zubov [26].

2.3.6 Geografické faktory

Geografické faktory zahŕňajú genetické a kultúrne faktory rôznych populácií na celom svete a predstavujú jeden z hlavných faktorov zodpovedných za rozdiely v mikrobiálnej diverzite medzi dedinskými a mestskými populáciami. Jedným z najdôležitejších zistení je nižšia bakteriálna diverzita a strata bakteriálnych taxónov, ktoré sa podieľajú na spracovávaní vlákniny, v mestských populáciách, vrátane americkej a európskej skupiny ľudí, ale aj afrických populácií so západnejším životným štýlom, ako je napríklad africká populácia Bantu. Metagenomické štúdie odhalili odlišný bakteriálny profil u populácie ľudí Bantu v porovnaní s populáciou lovcov a zberačov BaAka (Pygmejovia), čo dokazuje zmena obživy. BaAka konzumujú vysoké množstvo vlákniny a listov, čo pravdepodobne ovplyvňuje aj obohatenie o fibrolytické bakteriálne taxóny, ako sú *Prevotella* alebo *Treponema*, ktoré sa nachádzajú v ich črevnom mikrobióme. Na druhej strane vyššie hladiny *Feacalibacterium* a *Lactobacillus* u populácie Bantu môžu odrážať vyššiu dostupnosť stráviteľných cukrov. Napriek týmto rozdielom bol črevný mikrobióm oboch populácií podobnejší ako mikrobióm západných obyvateľov [26].

Účinok stravy na črevný mikrobióm je zrejmý aj z pozorovania, že gény pre porfyranázu a agarázu sú špecifické pre japonský črevný mikrobióm a chýbajú v západnej populácií. Enzým porfyranáza rozkladá polysacharid prítomný v morských riasach zvaných nori. Mikrobióm obyvateľov Japonska, ktorí morské riasy konzumujú pravidelne, sa v priebehu vývoja prispôbil, aby dokázal využiť tento zdroj potravy. Pravdepodobne k tomu došlo pri jedení morských rias spolu s baktériami, ktoré žijú na riase. Tieto morské baktérie pri prechode hrubým črevom preniesli svoj genetický materiál na rezidentné baktérie a došlo k novej funkcii hrubého čreva u Japoncov [27].

Podobnosť v zložení črevného mikrobiómu (dominancia *Bacteroidetes* a *Firmicutes*) bola pozorovaná medzi ľuďmi, domácim dobytkom a šimpanzmi žijúcimi na rovnakom geografickom mieste [27].

Tradičná kultúra Inuitov je založená na love a zhromažďovaní potravy z prostredia. Arktické prostredie formovalo tradičnú inuitskú stravu, ktorá zahŕňa mnoho suchozemských a morských cicavcov, ako je karibu, pižmoň, tuleň, veľryba, a táto strava sa konzumovala stovky, ak nie tisíce rokov. Mäso sa často konzumuje surové, príležitostne mrazené, sušené alebo varené.

Konzumovali tiež niekoľko druhov rastlín a bobúľ (čučoriedky, černice, brusnice), ale väčšina (75 %) kalórií pochádzala zo živočíšneho tuku. S rastúcim prístupom k dovážaným potravinám v supermarketoch, populácia Inuitov v súčasnosti zažíva prechod na západnejšiu stravu. K tomuto prechodu prispieva aj globálne otepľovanie a zmena migračných modelov koristi. Nastali u nich veľké zmeny životného štýlu za posledných sto rokov, posun smerom k spracovaným potravinám z obchodov a odklon od tradičných potravín, čo vedie k nižšiemu príjmu mikroživín. Tento posun by mohol mať vplyv na črevný mikrobióm Inuitov a mať potenciálne zdravotné následky [28, 29].

Inuiti majú jedinečný súbor zdravotných rizík, z ktorých mnohé môžu modulovať mikrobióm. Pri porovnávaní črevného mikrobiómu Inuitov a Montrealčanov, výsledky ukázali podobné hodnoty z hľadiska zloženia a rozmanitosti, pravdepodobne kvôli zvyšujúcej sa prevalencii západnej stravy na severe. Zloženie a rozmanitosť črevného mikrobiómu nebola významne ovplyvnená vekom, pohlavím alebo BMI, hoci Inuiti mali v priemere vyššie BMI [28, 29].

2.3.7 Lieky

Rastúce dôkazy naznačujú, že mnoho neantibiotických liekov má vplyv na črevný mikrobióm, vrátane liekov používaných na liečbu cukrovky 2. typu. Metformín sa bežne používa na pomoc pri kontrole hyperglykémie, zvyšuje inzulínovú citlivosť buniek, oneskoruje absorpciu glukózy počas trávenia po jedle a má mnoho ďalších účinkov. Štúdie zistili, že podávanie metformínu mení zloženie mikrobiómu. Zmenený črevný mikrobióm môže byť príčinou vedľajšieho účinku lieku v tráviacom systéme a pravdepodobne ovplyvní antidiabetickú účinnosť lieku [24].

V roku 2019 vedci zistili z 271 liekov inkubovaných s črevnými mikróbmi sa 176 metabolizovalo do takej miery, že hladina lieku klesla o viac ako 20 % [30].

Štúdia z roku 2018 skúmala viac ako 1000 predávaných liekov proti 40 kmeňom ľudských črevných baktérií. Zistilo sa, že 24 % týchto liekov mala antibiotické účinky, hoci žiaden z nich sa nepredával ako antibiotikum [31].

Antibiotiká majú zásadný vplyv na črevný mikrobióm, jedno užitie antibiotík môže ovplyvniť až 30 % celkového črevného mikrobiómu a rozhodí rovnováhu na 6 mesiacov až 2 roky. Avšak antibiotiká sú nevyhnutné na patogénne baktérie v črevách ako sú *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*. V závislosti od bakteriálnej rovnováhy jedinca môže užitie antibiotík spôsobiť náchylnosť na hnačky, infekciu *Clostridium difficile*, ale aj nadmerný rast ďalších škodlivých baktérií. Taktiež netreba zabúdať na rezistenciu [32].

Širokospektrálne antibiotiká znižujú bakteriálnu diverzitu, zvyšujú početnosť niektorých baktérií, ktoré môžu byť použité oportúnnymi patogénmi a znižujú počet prospešných baktérií. Používanie širokospektrálnych antibiotík, ako je klindamycín, u dojčiat a malých detí má najdlhšie trvajúce účinky na zloženie črevného mikrobiómu. Včasná expozícia antibiotikami u novorodencov vedie k mikrobiálnej dysbióze, ktorá môže byť predispozičným faktorom zápalového ochorenia čriev [24].

2.3.8 Infekcie

Črevný mikrobióm ovplyvňuje vírusové a bakteriálne infekcie, ale zároveň, to platí aj naopak. Štúdia skúmajúca účinok enteropatogénnej infekcie *Citrobacter rodentium* na mikrobióm u myší, zistila, že určité bakteriálne skupiny v čreve sa menia v reakcii na infekciu *Citrobacter rodentium*, vrátane zníženia relatívneho množstva *Lactobacillus*. Štúdia u ľudí s *Clostridium difficile* a asymptomatickými nosičmi zistila, že obe skupiny mali zníženú mikrobiálnu bohatosť a diverzitu v porovnaní so zdravými jedincami. Infekcia *C. difficile* je typickým dôsledkom ťažkej dysbiózy v črevnom mikrobióme a lieči sa dlhodobým podávaním antibiotík. Pri odolávajúcich prípadoch infekcie touto baktériou sa pristupuje k fekálnej transplantácii. Transplantácia črevného mikrobiómu od zdravých darcov infikovaným pacientom zvyšuje mikrobiálnu bohatosť a diverzitu. V súčasnosti sa klinicky uplatňuje s vysokým percentom úspešnosti liečby [24, 33].

2.3.9 Fyzická aktivita

Pri pohľade na frekvenciu cvičenia, od žiadneho po denné, existuje korelácia medzi frekvenciou cvičenia a zvýšením výnimočne zdravého druhu *Faecalibacterium prausnitzii* a druhov z rodov *Oscillospira*, *Lachnospira* a *Coprococcus*, ktoré vysoko podporujú zdravie [34].

V štúdií porovnávajúcej elitných rugbyových hráčov oproti kontrolnej skupine majú hráči väčšiu diverzitu a vyšší výskyt 40 rôznych bakteriálnych taxónov, ako sedavá kontrolná skupina. Športovci mali tiež menšie množstvo druhov *Bacteroides* a *Lactobacillus*. Pozorované rozdiely v mikrobióme sú pravdepodobne spôsobené zvýšeným príjmom bielkovín u športovcov [35].

Ženám vo veku 18-40 rokov s BMI medzi 20-25 v roku 2016 boli analyzované rozdiely vo fekálnom mikrobióme. Aktívna skupina bola definovaná ako účasť na najmenej troch hodinách cvičenia týždenne. Tieto úrovne mierneho cvičenia oproti sedavej kontrolnej skupine ukázali významné zvýšenie niektorých taxónov, ktoré zahŕňajú bifidobaktérie a ešte výraznejšie zvýšenie *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* a *Roseburia hominis*. *F. prausnitzii* a *R. hominis* sú známi producenti butyrátu, zatiaľ čo *A. muciniphila* sa spája s nízkym indexom telesnej hmotnosti a so zlepšeným metabolickým zdravím [36].

Zvýšenie výkonu môže súvisieť s benefítmí SCFA, konkrétne butyrátu. V štúdií zdravých mladých dospelých ľudí vo veku 18-35 rokov, vedci zistili významnú koreláciu medzi VO_2 max a fekálnym butyrátom. Producenti butyrátu sú predovšetkým z radu *Clostridiales*, medzi ktoré patria mnohé kľúčové taxóny, ako napríklad druh *F. prausnitzii* a rody *Roseburia*, *Coprococcus* a *Ruminococcus* [37].

2.3.10 Spánok, stres a životné prostredie

Spánok slúži k znovunastoleniu rovnováhy v nervovom systéme tela a obzvlášť upokojujúci účinok na reakciu sympatickej nervovej sústavy „útok alebo útek“. Ak človek nemá dostatok spánku, reakcia „útok alebo útek“ sa aktivuje a spustí nadmerné vylučovanie kortizolu. Kortizol kultivuje patogénne bakteriálne kmene a zabraňuje užitočnému vstrebávaniu všetkých živín z potravy a spôsobuje gastrointestinálne problémy. Nedostatok spánku vedie k zmenám v zložení črevného mikrobiómu a jeho diverzita podporuje zdravší spánok. Štúdia z roku 2019 preukázala, že bohatosť kmeňov *Bacteroidetes* a *Firmicutes* pozitívne korelovala s účinnosťou spánku, zatiaľ čo iba *Bacteroidetes* negatívne korelovala s trvaním bdelosti behom spánku. Tieto dva kmene sa predtým spájali s kvalitou spánku u ľudí a existuje stále viac dôkazov, že členovia týchto kmeňov môžu modulovať cirkadiánnny rytmus a príjem potravy, pričom obidva tieto faktory ovplyvňujú kvalitu spánku. Narušenie prirodzeného cirkadiálneho rytmu vedie k mikrobiálnej dysbióze v čreve, ktorá môže mať zdravotné následky vrátane obezity, metabolického syndrómu či zápalového ochorenia čriev [38, 39].

Slovo stres má nejednoznačný význam, pretože sa používa v rôznych životných situáciách a môže mať pozitívny alebo negatívny význam. Stres ovplyvňuje nielen mozog, ale okrem iného aj imunitný systém a gastrointestinálny trakt prostredníctvom črevo-mozgovej osy. Črevný mikrobióm sa podieľa na celej rade stresových stavov, vrátane úzkosti, depresie a syndrómu dráždivého čreva, hoci je to do značnej miery založené na štúdiách na zvieratách alebo korelačnej analýze v populáciách pacientov. Chronický stres spôsobuje nielen trvalý zápal v tele, ale negatívne vplýva aj na zdravie čriev, kde uvoľňovaním hormónov súvisiacich so stresom dochádza k zmene povrchu čreva a môže viesť k dysbióze [40].

Taktiež toxíny, zahŕňajúce pesticídy, fajčenie a mnoho ďalších ovplyvňujú zloženie a optimálnu funkciu mikrobiómu s negatívnymi účinkami na zdravie človeka. Expozícia environmentálnych toxínov počas perinatálneho obdobia a raného detstva môže mať kritický vplyv na vývoj črevného mikrobiómu a súvisiace fyziologické funkcie hostiteľa závislé od mikrobiómu, ako je napríklad vývoj imunitného systému. Je potrebné vyhodnotiť vplyv dlhodobej expozície nízkych dávok environmentálnych toxínov na črevný mikrobióm [41].

2.4 Vplyv stravy na črevný mikrobióm

Strava zohráva obrovskú úlohu pri modulácii črevného mikrobiómu, ktorý ma obrovský vplyv na zdravie a dĺžku života. Zloženie mikrobiómu ovplyvňujú rôzne makronutrienty a úprava stravy, krátkodobé aj dlhodobé zmeny v strave môžu mať vplyv na mikrobiálne profily. Množstvo, druh a rovnováha hlavných potravinových makronutrientov (sacharidov, bielkovín a tukov) má veľký vplyv na mikrobióm hrubého čreva. Bakteriálne kmene čreva sa rýchlo menia pri každej úprave stravy. Štúdie na myšiach zistili, že po zmene stravy sa môže mikrobióm zmeniť cez noc. Podobné zmeny sa vyskytujú aj u ľudí, ale presný časový rozsah nie je v súčasnosti známy [32].

2.4.1 Bielkoviny

Bielkoviny v potrave sú jednou z najdôležitejších živín pre zrážanie krvi, rovnováhu tekutín, produkciu hormónov a enzýmov, zrak a opravu buniek. Črevný mikrobióm sa podieľa na metabolizme bielkovín, zohráva dôležitú úlohu vo vzťahu medzi využívaním živín a reakciou hostiteľa. Bielkoviny je možné hydrolyzovať proteázami a peptidázami, aby sa v čreve vytvorili aminokyseliny, peptidy a tripeptidy. Tieto tráviace produkty sú využívané určitými mikróbmami alebo absorbované do enterocytov v tenkom čreve. Je možné, že výmena aminokyselín medzi mikrobiómom a hostiteľom je v oboch smeroch. Mikrobióm účinkuje ako nevyhnutná súčasť recyklácie bielkovín a dusíka v tenkom čreve. Okrem toho nestrávené aminokyseliny obvykle nie sú absorbované kolonocytmi, ale fermentujú sa do mnohých bakteriálnych metabolitov alebo konečných produktov, ako sú SCFA, hydrogénsíran a amoniak. Spoločenstvá črevného mikrobiómu sú ovplyvňované zložkami bielkovín v potrave, konkrétne ich zdrojmi a koncentraciami v strave. Účinky bielkovín na črevný mikrobióm boli prvýkrát popísané v roku 1977. Kultivačná štúdia preukázala nižšie počty *Bifidobacterium adolescentis* a zvýšené počty *Bacteroides* a *Clostridia*, u subjektov konzumujúcich prevažne hovädzie mäso, v porovnaní s jedincami konzumujúcimi bezmäsitú stravu. Koncentrácia bielkovín v strave je navyše dôležitým faktorom pre zdravie hostiteľa. Ak bielkoviny v strave presahujú požiadavky, môže dôjsť k narušeniu homeostázy črevného mikrobiómu, čo môže mať za následok črevné poruchy, plytvanie zdrojmi dusíka a znečistenie životného prostredia [42, 43].

2.4.1.1 Zdroje bielkovín

Zdroje bielkovín majú hlavne rastlinný alebo živočíšny pôvod, pričom každý typ má jedinečnú stráviteľnosť a rôzne degradačné vzorce v závislosti od použitých mikróbov. Bakteriálne rody v hrubom čreve sa podieľajú na metabolizme bielkovín predovšetkým vrátane potenciálne patogénnych *Bacteroides*, *Coliform* a *Clostridium*. Inhibícia týchto potenciálnych patogénov je často spojená s obnovením rovnováhy mikroekosystému, znížením uvoľňovania enterotoxínov a nepriaznivých mikrobiálnych metabolitov. Bielkoviny pochádzajúce z rastlín, napríklad zo sóje a arašidov, sa bežne používajú pre ľudí a zvieratá. Majú však nízku stráviteľnosť dusíkatých látok vďaka antinutričným faktorom, ako sú glycín a β -konglycinín v sóji. Diéta obohatená o 20 % arašidových bielkovín zmenila diverzitu črevného mikrobiómu zvýšením rodu *Bifidobacterium* a znížením výskytu *Enterobacteria* a *Clostridium perfringens* u potkanov. Sója môže meniť zloženie črevného mikrobiómu so zvýšeným výskytom rodov

Escherichia a *Propionibacterium*. Naopak bielkoviny v strave pochádzajúce zo zvierat sa dajú ľahko stráviť baktériami v hrubom čreve s menším výskytom hnačiek vyvolaných výživou [43].

Väčšina štúdií uvádza pozitívnu koreláciu medzi spotrebou bielkovín a celkovou diverzitou mikrobiómu. Konzumácia srvátkového a hrachového bielkovinového koncentráту zvyšuje počet rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, zatiaľ čo srvátkový koncentrát navyše znižuje patogénne baktérie *Bacteroides fragilis* a *Clostridium perfringens*. Hrachový proteín zvyšuje hladiny SCFA v čreve. Naopak, bolo zaznamenané zvýšenie počtu anaeróbných baktérií odolných voči žlči, ako sú *Bacteroides*, *Alistipes* a *Bilophila*, pri zvýšenej spotrebe živočíšnych bielkovín. Jedna štúdia zistila, že subjekty so stravou s vysokým obsahom bielkovín a nízkym obsahom sacharidov znížili množstvo *Roseburia* a *Eubacterium rectale* a zároveň znížili obsah butyrátu v stolici [42].

Pacienti so zápalovým ochorením čriev (IBD) mali v stolici nižší počet rodu *Roseburia* a iných baktérií produkujúcich butyrát, ako zdraví jedinci. Zdraví jedinci majú napriek tomu v črevách desaťkrát hojnejšie zastúpenie *Eubacterium rectale*. Tieto črevné bakteriálne zmeny môžu byť zodpovedné za výsledky štúdie, že vysoký celkový príjem bielkovín, najmä živočíšnych, je spojený s významne vyšším rizikom IBD [42].

Niekoľko mikrobiálnych rodov, ktoré sú podporované príjmom červeného mäsa boli spojené so zvýšenými hladinami trimetylamín-N-oxidu (TMAO), ktorý zvyšuje riziko kardiovaskulárnych chorôb [42].

Fermentácia bielkovín vedie k rôznorodému metabolickému profilu. Hlavná cesta fermentácie aminokyselín v čreve je deaminácia, ktorá vedie k produkcii SCFA a amoniaku. Asi 30 % substrátu sa prevádza na acetát, propionát, butyrát a mastné kyseliny s rozvetveným reťazcom. Dekarboxylácia aminokyselín a peptidov vedie k tvorbe veľkého množstva amínov. Klostrídie, bifidobaktérie a bakteroidy sú spojené s produkciou amínov, možnými prekurzormi tvorby nitrozamínu, ktorý je karcinogénny. Fermentáciou aromatických aminokyselín vznikajú fenoly, indoly, kresoly, ktoré sú spojené s prozápalovým a karcinogénnym účinkom [42, 44].

2.4.2 Tuky

Črevný mikrobióm reguluje mnoho metabolických procesov v hostiteľovi, vrátane energetickej homeostázy, metabolizmu glukózy a lipidov. Metabolizmus lipidov zahŕňa biosyntézu a degradáciu lipidov, ako sú mastné kyseliny, triglyceridy a cholesterol. Voľné mastné kyseliny sa vytvárajú z lipidových prekurzorov pôsobením lipáz. Mastné kyseliny môžu mať antibakteriálnu aktivitu alebo môžu byť použité ako metabolické substráty črevnými baktériami, a tým ovplyvňovať profil črevného mikrobiómu a produkciu mikrobiálnych metabolitov. To môže ovplyvniť fyziológiu a zdravie hostiteľa. Obezita súvisí s dysreguláciou lipidového metabolizmu, čo môže mať za následok abnormálne hladiny lipidov v krvi, ektopické ukladanie lipidov a súvisiace metabolické ochorenia, ako je nealkoholické ochorenie pečene [45].

Ukázalo sa, že črevný mikrobióm sa líši medzi myšami kŕmenými stravou s vysokým alebo nízkym obsahom tuku a medzi stravou, ktorá obsahuje rovnaké množstvo tuku, ale z rôznych zdrojov. Porovnanie myší pri rôznych diétach (strava s nízkym obsahom tukov a diéty s vysokým obsahom nasýtených tukov, omega-6 PUFA alebo omega-3 PUFA) ukázalo, že diéty s obsahom nasýtených tukov alebo omega-6 PUFA vyvolali prírastok hmotnosti,

ale iba nasýtené tuky zvyšovali inzulínovú rezistenciu, permeabilitu hrubého čreva a zápal tukového tkaniva. U myši kŕmených izokalorickou stravou bohatou na omega-3 PUFA sa zvýšila diverzita a hojnosť *A. muciniphila*. Nielen zdroje tukov s veľkými rozdielmi v zložení lipidov, ale aj podobné zdroje tukov, môžu viesť k rozdielnemu zloženiu a funkcií črevného mikrobiómu. Mechanizmy, ktorými mastné kyseliny v strave ovplyvňujú črevnú mikroflóru, nie sú dobre definované. Aj keď sa väčšina spotrebovaných mastných kyselín vstrebáva v tenkom čreve, menšina prejde gastrointestinálnym traktom, a preto môže priamo modulovať zloženie hrubého čreva a črevného mikrobiómu. Mastné kyseliny majú široké spektrum antibakteriálnej aktivity, vrátane lýzy a solubilizácie bakteriálnych bunkových membrán a inhibície produkcie ATP. Antibakteriálne pôsobenie mastných kyselín ovplyvňuje dĺžka uhlíkového reťazca, nasýtenie a poloha dvojitej väzby. Vplyv mastných kyselín na črevný mikrobióm sa však neobmedzuje iba na antibiotické pôsobenie. Aj keď črevné anaeróby nemôžu produkovať energiu beta-oxidáciou, baktérie môžu metabolizovať mastné kyseliny inými cestami [45].

Množstvo tuku v strave vyvoláva u ľudí zvýšené cirkulujúce hladiny lipopolysacharidov pochádzajúcich z baktérií, pravdepodobne v dôsledku zvýšenej priepustnosti čreva. Strava s vysokým obsahom tuku oproti nízkemu obsahu vlákniny, znižuje koncentráciu SCFA v stolici, vrátane butyrátu a bifidobaktérií. Niekoľko štúdií na ľuďoch držiacich stravu s vysokým obsahom tuku preukázalo zvýšené zastúpenie kmeňa *Bacteroidetes*. Strava bohatá na nasýtené tuky zvýšila podiel *F. prausnitzii*. Vplyv tuku z potravy na črevný mikrobióm môže byť nepriamo sprostredkovaný žľčovými kyselinami. Strava s vysokým obsahom tukov navyše vedie k zvýšeniu sekrécie žlče a následnému vyššiemu množstvu žľčových kyselín v hrubom čreve. Hydrolázy žľčových solí môžu z primárnych žľčových kyselín odštiepiť zvyšky glycinu a taurínu a konvertovať ich na niekoľko sekundárnych žľčových kyselín. Sekundárne žľčové kyseliny, ktoré sú produkované dehydroxyláciou primárnych žľčových kyselín pomocou mikrobiómu, sú potenciálne karcinogény a podieľajú sa na ochoreniach tráviacej sústavy. Mikrobiálne gény kódujúce produkciu sekundárnej žľčovej kyseliny a fekálnu sekundárnu koncentráciu žľčovej kyseliny sa nenachádzali u Afroameričanov v porovnaní s pôvodnými Afričanmi v takom veľkom množstve, čo tiež ukazuje nižšie riziko rakoviny hrubého čreva a konečníka [42, 46].

Pri spojení fekálneho mikrobiómu s metabolizmom lipidov u ľudí, sa taxonómia a funkčné profily baktérií medzi obéznymi a štíhlymi subjektmi líšili, ale výsledky rôznych štúdií sú nekonzistentné, čiastočne kvôli zložitej povahe obezity, ale tiež preto, že na analýzu mikrobiómu boli použité rôzne metódy. Mnoho štúdií skúmalo súvislosť medzi črevným mikrobiómom a dyslipidémiou. Pri profilovaní metagenomických údajov od obéznych jedincov zistili, že znížené celkové bohatstvo mikrobiálnych génov bolo spojené so zvýšením celkového cholesterolu v sére a triglyceridov v sére u obéznych pacientov. Energeticky obmedzená intervencia v strave zvýšila bohatosť mikrobiálnych génov a znížila hladinu lipidov v sére. Podobný výskum ukázal vyššie triglyceridy a nižšie hladiny HDL u jedincov s nízkym počtom mikrobiálnych génov ako u osôb s vysokým počtom mikrobiálnych génov [45].

2.4.3 Sacharidy

Sacharidy sú pravdepodobne najviac študovanou zložkou potravy pre svoju schopnosť modifikovať črevný mikrobióm. Sacharidy sú hlavným zdrojom uhlíka a energie pre mikroorganizmy v mikrobióme. Spoločne majú obrovskú schopnosť hydrolyzovať veľké množstvo týchto živín, najmä komplexných polysacharidov. Existuje priamy dôkaz, že zmena množstva alebo typu sacharidov v období až štyroch týždňov má výrazný vplyv na zloženie mikrobiómu a jeho metabolických produktov u dospelých. Vyskytujú sa v dvoch formách, stráviteľnej a nestráviteľnej. Stráviteľné sacharidy sa enzymaticky degradujú v tenkom čreve a zahŕňajú škroby a jednoduché cukry, ako je glukóza, fruktóza, sacharóza a laktóza. Ľudia s vysokým príjmom jednoduchých cukrov vo forme ovocia mali zvýšený výskyt bifidobaktérií a nízky počet bakteroidov. Suplementácia laktózy zvyšovala fekálnu koncentráciu SCFA aj keď sa považuje za potenciálne gastrointestinálne dráždidlo [42, 44, 46].

Na rozdiel od stráviteľných sacharidov, nestráviteľné sacharidy môžeme rozdeliť na fermentovateľnú a nefermentovateľnú vlákninu. Fermentovateľná vláknina, ako je pektín, β -glukán, β -fruktán, inulín, oligosacharidy a niektoré rezistentné škroby, sú fermentované črevný mikrobiómom a produkujú užitočné látky [47].

Vplyv vysokosacharidových diét na metabolizmus hostiteľa závisí od glykemického indexu a glykemickej záťaže. Čím vyšší je glykemický index a záťaž v strave, tým viac sa zvyšuje riziko metabolických porúch, ako je cukrovka 2. typu a kardiovaskulárne ochorenia [47].

V štúdií porovnávajúcej črevný mikrobióm európskych detí s mikrobiómom afrických vidieckych detí v Burkina Faso mali vidiecke deti konzumujúce agrárnu stravu nižšie hladiny *Bacteroides*, hojnejšie zastúpenie *Prevotella* a *Xylanibacter*, vyššie mikrobiálne bohatstvo, biodiverzitu a zvýšené hladiny SCFA v porovnaní s mestskými deťmi v Taliansku. Je pozoruhodné, že v črevných traktoch detí z Burkina Faso sa nachádza oveľa menšie množstvo potenciálne patogénnych baktérií, ako sú *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* a *Klebsiella*, než v Európe. V neskorších štúdiách sa u detí v urbanizovaných oblastiach Burkina Faso našiel črevný mikrobióm prispôsobený západnej strave, čo naznačuje, že rozdiely v črevnom mikrobióme neboli spôsobené rozdielnou rasou. Tento vzorec bol tiež identifikovaný v inej medzikultúrnej štúdií, v ktorej porovnávali črevný mikrobióm obyvateľov Amazónie vo Venezuele, na vidieku v Malawi a metropolitných oblastiach USA, čo ukazuje, že strava bohatá na sacharidy má vplyv na zloženie mikrobiómu v porovnaní so západnou stravou bohatou na tuky a živočíšne bielkoviny. Posledné štúdie o mechanizmoch, ktorými mono- a disacharidy ovplyvňujú črevný mikrobióm, dospeli k záveru, že majú tendenciu zvyšovať počet *Bifidobacterium* a znižovať počet *Bacteroides*. Strava ľudí s niekoľkými polyolmi, vrátane maltitolu, laktitolu a izomaltu, viedla k zvýšenému relatívnemu množstvu *Bifidobacterium* a zníženiu *Bacteroides*. V inej štúdií malo pridanie laktózy k potrave za následok rovnaké bakteriálne posuny a zároveň zníženie rodu *Clostridium*. Ďalší výskum uviedol, že suplementácia laktózy tiež zvyšuje fekálne koncentrácie prospešných SCFA, pritom sa predpokladá, že laktóza potenciálne dráždi črevo [47].

2.4.3.1 Vlákna

Vlákna je neoddeliteľnou súčasťou zdravej výživy, má preventívne aj terapeutické účinky pri poruchách hrubého čreva a iných ochoreniach, vrátane kardiovaskulárnych chorôb, cukrovky 2. typu, obezity a niektorých foriem rakoviny. Výrazné posuny v bakteriálnej diverzite a produkcii mikrobiálnych konečných fermentačných produktov boli preukázané už za 24 hodín u ľudí, ktorí prešli z bohatej stravy na vlákninu (> 30 g/deň) na mäsovú stravu, ktorá je v podstate bez vlákniny. Prierezové štúdie ľudských populácií na celom svete ukazujú, že väčší príjem vlákniny v potrave je spojený so zvýšenou diverzitou črevného mikrobiómu. Nedostatočný príjem vlákniny môže prispieť k dysbióze mikrobiómu, čo vedie k použitiu črevných mucínov črevným mikrobiómom a následnej dysfunkcii črevnej bariéry. Vlákna sa môže použiť ako hlavný zdroj energie pre obligátne anaeróbne baktérie, ktorých fermentačná aktivita vedie k tvorbe SCFA, predovšetkým acetátu, propionátu a butyrátu. Tieto biologicky aktívne organické kyseliny majú značný vplyv na rôzne fyziologické procesy [46, 48].

Vlákna má v gastrointestinálnom trakte množstvo účinkov, vrátane regulácie chuti do jedla, stimulácie intestinálnej peristaltiky, poskytovaniu energie pre bunky epitelu hrubého čreva, kontroly pH hrubého čreva a podpory produkcie hlienu. Vlákna má vyššiu hodnotu nasýtenia ako stráviteľné komplexné sacharidy. V tenkom čreve môže rozpustná vlákna tlmiť postprandiálne glykemické a inzulínové reakcie, ktoré súvisia so znížením rýchlosti návratu hladu a následným príjmom energie. Okrem toho, väčšina rozpustnej vlákniny generuje vysoko viskózne črevné obsahy s gélovými vlastnosťami, ktoré môžu spomaliť vyprázdňovanie žalúdka a absorpciu v čreve. Nerozpustná vlákna sa môže viazať s vodou a znižovať črevný tranzitný čas. Nerozpustná vlákna tiež stimuluje motilitu čriev a má objemový efekt vo výkaloch, čím zmiernuje zápchu. Zvýšený objem stolice môže zriediť nebezpečné mikrobiálne metabolické produkty a uľahčiť ich odstránenie z hrubého čreva [2].

Vlákna má významný vplyv na zloženie a diverzitu črevného mikrobiómu. Spravidla sú to *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotella* a *Bifidobacterium spp.*, ktoré sa považujú za prospešné pre ľudské zdravie, zatiaľ čo *Escherichia coli* a *Enterococcus spp.* sú potenciálne patogény, v závislosti od podmienok. Vlákna z rôznych zdrojov majú preukázateľné účinky na črevný mikrobióm. Napríklad jablčný pektín zvýšil populáciu *Clostridiales* a znížil početnosť *Bacteroides spp.* v črevách potkanov, zatiaľ čo citrusový pektín zvyšoval početnosť *Bacteroidetes*. Ďalej inulín, vlákna z brokolice, zemiakov a rezistentný zemiakový škrob signifikantne zvýšili množstvo *Bacteroides*, *Prevotella* a *Porphyromonas*. Inulín a zemiakový škrob majú bifidogénne a butyrogénne účinky, súbežne zvyšujú *Bifidobacterium spp.* a obsah butyrátu. Selektívna stimulácia črevných *Bifidobacteria* a baktérií produkujúcich butyrát prostredníctvom fermentovateľnej vlákniny sú považované za prospešné pre zdravie hostiteľa [2].

Zložky črevného mikrobiómu majú špecializované enzýmy schopné štiepiť glykozidové väzby vlákniny, čím sa získajú oligosacharidy a monosacharidy. Rozklad komplexných vláknin (xylány, pektíny) na fermentovateľné monosacharidy vyžaduje synergickú aktivitu rôznych glykozidáz. Fermentácia vlákniny mikrobiómom hrubého čreva za anaeróbnych podmienok vedie k produkcii SCFA. Členovia kmeňov *Bacteroidetes* a *Firmicutes* sa špecializujú na využitie komplexných sacharidov a sú hlavnými producentmi SCFA. Tvorba SCFA si vyžaduje účasť rôznych bakteriálnych rodov a druhov prostredníctvom cross-feeding

mechanizmu. Mechanizmom cross-feeding môže byť využitie konečných metabolitov z daného mikroorganizmu iným mikroorganizmom. Napríklad *Bacteroides thetaiotaomicron* produkuje propionát a acetát, ktoré používa *Eubacterium halli* na výrobu butyrátu [2].

Ovocie a zelenina sú bohaté na fermentovateľnú vlákninu s prebiotickou aktivitou. Ľudské druhy *Bacteroides* sú schopné odbúravať rôznu rastlinnú vlákninu a komplexné polysacharidy, vrátane pektínu a xylánov z ovocia a zeleniny. V porovnaní s obilninami má vláknina z ovocia a zeleniny podstatne vyšší podiel rozpustnej vlákniny, ktorá vykazuje lepšiu fermentovateľnosť, konzistenciu a chuť, ako nerozpustná vláknina. Okrem toho môže byť rozpustná vláknina spojená s antioxidantnými zlúčeninami (karotenoidy, polyfenoly, vitamín C), ktoré podporujú zdravie a majú protizápalové, protinádorové a antiaterosklerózne účinky. Vláknina z ovocia a zeleniny obsahuje hlavne polysacharidy bunkovej steny, ich zloženie a štruktúra sa medzi rôznymi rastlinnými druhmi a tkanivami značne líši. Chemická štruktúra vlákniny je rozhodujúca pre reguláciu baktérií. Napríklad stimuláciu *F. prausnitzii* je možné dosiahnuť skôr vysoko metoxylovanými citrusovými pektínmi ako nízko metoxylovanými pektínmi [2, 49].

2.4.4 Prebiotiká

Prebiotiká sú nestráviteľné oligosacharidy, ktoré stimulujú rast alebo aktivitu určitej baktérie alebo skupiny baktérií v mikrobióme. Prebiotiká majú veľa pozitívnych účinkov na ľudské zdravie prostredníctvom stimulácie prospešných mikróbov, vrátane zlepšenia imunity hostiteľa, funkcie črevnej bariéry a súčasného znižovania potenciálne patogénnych baktérií. Predpokladaný mechanizmus účinku prebiotík je spôsobený prevažne nepriamymi účinkami. To zahŕňa pôsobenie ako zdroj paliva pre selektívne kvasenie rezidentnými zdraviu prospešnými mikroorganizmami gastrointestinálneho traktu, ktoré sú potrebné na ochranu proti patogénom alebo na zlepšenie funkcie črevnej bariéry, organizovanie imunitných odpovedí a ovplyvňovanie funkcií mozgu. Medzi najznámejšie prebiotiká patria galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS), inulín. Vyskytujú sa prirodzene v rôznych potravinách vrátane špargle, cesnaku, paradajok a banánov. Môžu sa tiež vyskytovať v materskom mlieku, ako substrát pre *Bifidobacterium*. Ukázalo sa, že prebiotiká stimulujú bifidogénne účinky materského mlieka, znižujú výskyt alergií a infekcií u dojčiat do 2 rokov. Prvé preukázateľné účinky konzumovaných prebiotík na črevný mikrobióm človeka boli v roku 1995. V štúdiách sa zvýšil podiel *Bifidobacterium* v reakcii na konzumáciu 15 g denne oligofruktózy alebo inulínu počas 15 dní, zatiaľ čo populácie *Bacteroides*, *Clostridia* a *Fusobacteria* sa znížili v reakcii na oligofruktózu a populácia grampozitívnych kokov sa znížila v reakcii na inulín. V iných štúdiách zameraných hlavne na klasické prebiotiká (inulín, GOS, FOS) sa relatívny výskyt črevných baktérií v kmeni *Actinobacteria* významne zvýšil po liečbe prebiotikami, k čomu prispel hlavne kmeň *Bifidobacterium*. Na úrovni rodu všetky štúdie zistili zvýšenie *Bifidobacterium* a väčšina štúdií tiež naznačila zvýšenie *Lactobacillus*. Populácie niektorých črevných baktérií sa po užití prebiotík znížili, pravdepodobne v dôsledku kompetitívnej inhibície iných kolonizujúcich druhov, ktoré prebiotiká prednostne fermentovali v čreve. Prebiotiká, ako je GOS, môžu mať priamy antimikrobiálny účinok tým, že sa držia väzobných miest baktérií na povrchu enterocytov a tak blokujú adhéziu patogénnych baktérií na črevné epitelové bunky. Konzumáciou prebiotík, ako je inulín, sa môže zvýšiť početnosť *F. prausnitzii*,

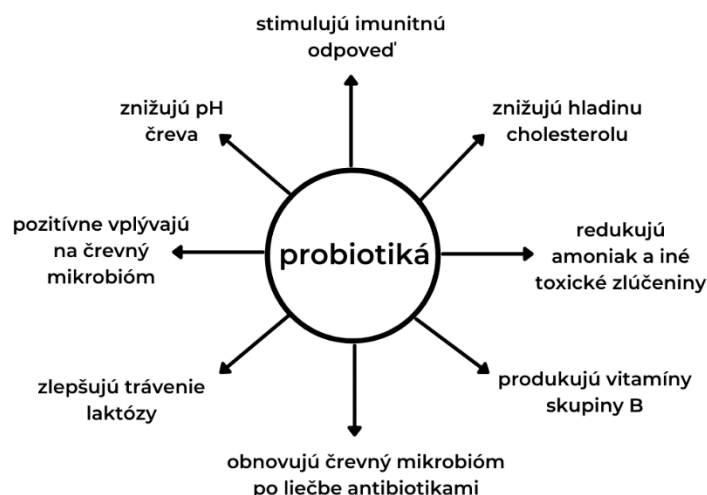
ktorá je hojným protizápalovým črevným druhom a zistil sa jej nedostatok u ľudí so zápalovým ochorením čriev [44, 50, 51].



Obrázok 3: Zdravotné benefity prebiotík [52]

2.4.5 Probiotiká

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie sú probiotiká definované ako „živé mikroorganizmy, ktoré pri podávaní v primeraných množstvách poskytujú hostiteľovi zdravotné výhody“. Väčšina probiotických kmeňov bola predstaviteľmi rodov baktérií mliečneho kvasenia *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, bežne sa však používajú aj iné bakteriálne a kvasinkové rody, ako *Escherichia* a *Saccharomyces*. Probiotiká môžu pozostávať z jedného druhu alebo z kombinácie niekoľkých druhov, buď ako kapsuly, prášky alebo ako súčasť jedla. Preukázal sa vo viacerých štúdiách ich vplyv na zloženie a funkciu črevného mikrobiómu. Produkujú antimikrobiálne látky alebo metabolické zlúčeniny, ktoré potláčajú rast iných mikroorganizmov alebo súťažia o receptory a väzobné miesta s inými črevnými mikróbmami na sliznici čreva. Probiotické rody *Lactobacillus* zvyšujú integritu črevnej bariéry, čo môže viesť k udržiavaniu imunitnej tolerancie, zníženej translokácií baktérií cez črevnú sliznicu a zabraňujú gastrointestinálnym infekciám ako je syndróm dráždivého čreva alebo zápalové ochorenie čriev. Probiotiká môžu navyše modulovať črevnú imunitu a zmeniť citlivosť črevného epitelu a imunitných buniek na mikróby v čreve. Okrem priameho ovplyvnenia zloženia črevného mikrobiómu, môžu probiotiká tiež modulovať globálnu metabolickú funkciu črevného mikrobiómu. Nové generácie probiotík, napríklad *Bacteroides spp.* a *A. muciniphila*, o ktorých je známe, že produkujú extracelulárne vezikuly, môžu prispievať k ich funkčnosti pri zmiernení zápalu a posilňovaní integrity epitelu [53, 54].



Obrázok 4: Probiotické mechanizmy v ľudskom tráviacom trakte [55]

2.4.6 Polyfenoly

Polyfenoly sú rastlinné sekundárne metabolity prítomné v mnohých častiach rastliny, vrátane kvetov, listov, dužiny, stoniek a koreňov. Vyrábajú sa z primárnych metabolitov a medziproduktov biosyntetickými cestami. Polyfenoly sa delia na taníny s vysokou molekulovou hmotnosťou a polyfenoly s nízkou molekulovou hmotnosťou. Taníny pozostávajú z hydrolyzovateľných tanínov (gallotaníny, ellagitaníny) a nehydrolyzovateľných kondenzovaných tanínov (proantokyanidíny). Polyfenoly s nízkou molekulovou hmotnosťou možno rozdeliť do niekoľkých podskupín, deriváty kyseliny fenolovej, flavonoidy, lignany, stilbény a kurkumíny. Polyfenoly, vrátane flavonoidov, môžu pôsobiť ako antioxidanty, pretože vo svojich štruktúrach obsahujú fenolové skupiny, ktoré poskytujú elektróny. Celkový príjem polyfenolov v potrave v tenkom čreve sa odhaduje na asi 10-15 %, preto sa veľká časť požitých polyfenolov transportuje do hrubého čreva, kde sú črevnými baktériami katabolizované na fenolové kyseliny. Polyfenoly majú na črevné baktérie účinky podporujúce rast. Aj keď molekulárne mechanizmy týchto prebiotických účinkov nie sú úplne objasnené, môžu byť čiastočne spojené s ich selektívnou antimikrobiálnou aktivitou proti patogénnym baktériám. Adhézia na črevný epitel a následná kolonizácia sa považujú za dôležité kritériá, aby probiotické baktérie uplatnili svoje fyziologické účinky na ľudské zdravie. Jablkové extrakty obsahujúce prokyanidín B2 a kyselinu chlorogénovú zvyšujú adhéziu k bunkám črevného epitelu *in vitro*. Quercetín a jeho glykozidy vykazujú najsilnejšiu aktivitu na zvýšenie bakteriálnej adhézie [56].

Ovocie a zelenina patria k najbežnejším zdrojom polyfenolov, ktoré majú *in vitro* rôzne fyziologické účinky, vrátane antioxidačných, imunomodulačných a antimikrobiálnych účinkov. Absorpcia polyfenolov v tenkom čreve je obmedzená a značné množstvo týchto polyfenolov sa nachádza v hrubom čreve. Tam baktérie hrubého čreva metabolizujú polyfenoly na menšie zlúčeniny, ktoré následne menia množstvo baktérií v črevnom mikrobióme. Stravovacie intervencie s polyfenolovými extraktmi a potravinami, vrátane polyfenolov z dealkoholizovaného červeného vína, kakaových flavanolov, quercetínu a hroznových

antokyánov, modulujú črevný mikrobióm znížením hojnosti kmeňa *Firmicutes* a zvýšením *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Verrucomicrobia* [49].

Každodenná konzumácia 400 ml ovocnej a zeleninovej šťavy (kel, brokolica, jablko, citrón) počas 3 týždňov viedla k zvýšeniu diverzity mikrobiómu, hlavne množstvo *Faecalibacterium*. Účastníci uprednostňovali stravu na základe mäsa a mali črevné problémy ako zápcha či hnačka. U dobrovoľníkov došlo na konci sledovaného obdobia k zníženiu telesnej hmotnosti bez ohľadu na pohlavie a k zlepšeniu črevných problémov [57].

Pri 3 dňovej diéte založenej na konzumácii iba ovocných a zeleninových štiav, došlo k významnému zníženiu kmeňa *Firmicutes* a zvýšeniu *Bacteroidetes* [49].

Výťažky z brusníc obsahujúce flavonoly, antokyány a proantokyandidíny zlepšujú homeostázu glukózy a lipidov u myší kŕmených stravou s vysokým obsahom tukov a sacharózy. Iba polymérne proantokyandidíny majú tendenciu znižovať pomer *Firmicutes/Bacteroidetes* a zvyšovať relatívny výskyt *A. muciniphila* a *Verrucomicrobia* u myší na rovnakej diéte [56].

Fenolové extrakty získané z ôsmich druhov bobulovín obsahujúcich antokyány, flavanoly, proantokyandidíny a ellagitaníny inhibujú množenie škodlivých baktérií, ako sú *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*, ale neovplyvňujú rast probiotickej baktérie *Lactobacillus rhamnosus*. Baktérie mliečneho kvasenia sa tiež mierne znižujú pôsobením ellagitanínu, zatiaľ čo sa výrazne zvyšuje rast bifidobaktérií. Kyselina tanínová z hroznových semien a výliskov vykazuje silné účinky podporujúce rast *Lactobacillus acidophilus* [56].

Placebom kontrolovaná intervenčná štúdia uskutočnená na zdravých mužoch, ktorí konzumovali polyfenoly červeného vína štyri týždne, zaznamenala nárast počtu *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides* a *Bifidobacterium* [58].

U zdravých dospelých ľudí konzumácia manga bohatého na gallotanín znížila fekálny endotoxín a zvýšila fekálne SCFA. Konzumácia extraktu z granátového jablka počas troch týždňov znížila u obéznych jedincov plazmatický lipopolysacharid viažuci proteín, ukazovateľ metabolickej endotoxémie. Táto zmena bola spojená s moduláciou *Faecalibacterium*, *Odoribacter* a *Parvimonas*. Extrakt z granátového jablka bohatého na ellagitanín moduloval expresiu génov súvisiacich s kontrolou bunkového cyklu a apoptózou, ktoré sú pri rakovine hrubého čreva dysregulované [58, 59].

2.4.6.1 Flavonoidy

Flavonoidy sú bioaktívne látky, patriace do triedy polyfenolových fytochemikálií s antioxidantnými a protizápalovými vlastnosťami. Ovocie, zelenina, orechy, strukoviny a zelený čaj sú bohaté na flavonoidy. Profily polyfenolov a flavonoidov sa medzi jednotlivými potravinami značne líšia. Faktory pred zberom a po zbere (napr. genotyp rastlín, spracovanie, skladovanie) dramaticky ovplyvňujú obsah flavonoidov v potravinách. Po konzumácii sú flavonoidy extenzívne metabolizované črevnou mikrofórou a hosťiteľskými tkanivami. Tieto metabolity sú zmesi pôvodných molekúl a nižších fenolových látok s rôznym stupňom hydroxylácie, glukuronidácie, sulfatácie a metylácie. Metabolizmus flavonoidov vykazuje medzi jednotlivcami značné rozdiely. Schopnosť jedinca produkovať špecifický profil metabolitu flavonoidov má dôsledky na imunitné funkcie. Flavonoidy a metabolity flavonoidov

môžu formovať črevný mikrobióm inhibíciou rastu rôznych patogénov a zvyšovaním prospešných rodov, ako sú *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ktoré môžu zlepšiť zdravie čriev znížením produkcie endotoxínov, zvýšením premeny primárnych na sekundárne žľčové kyseliny, udržiavaním črevnej imunitnej homeostázy a podporou vstrebávania živín. Štúdie vplyvu potravinových flavonoidov u ľudí sú pomerne zriedkavé a sú založené hlavne na jednotlivých druhoch flavonoidov. Potvrdzujúce údaje zo štúdií u ľudí sú obmedzené, ale predbežné štúdie s resveratrolom, kurkumínom, zeleným čajom a čučoriedkami na liečbu ulceróznej kolitídy dopadli sľubne. Perorálny príjem quercetínu a rutínu významne zvýšil počet baktérií *Eubacterium ramulus* u ľudí. Konzumácia nápoja s vysokým obsahom kakaa s obsahom flavanolu počas 4 týždňov významne zvýšila populáciu bifidobaktérií a laktobacilov vo výkaloch a významne znížila počet klostrídií [58, 59].

2.4.7 Vitamíny

Vitamíny sú organické zlúčeniny, ktorú sú nevyhnutné vo veľmi malom množstve na podporu normálnej fyziologickej funkcie. Často plnia rôzne úlohy v tele, jednou z najdôležitejších je úloha kofaktorov pre enzýmy. Strava je primárnym zdrojom vitamínov, pretože naše telá ich nemôžu syntetizovať tak, aby vyhovovali našim denným potrebám, ale niektoré vitamíny, najmä vitamín K a vitamíny skupiny B, sú syntetizované črevným mikrobiómom. Ľudia konzumujú jednotlivé alebo multivitaminové doplnky, ktoré poskytujú veľmi vysoké dávky konkrétnych vitamínov. Následne môže minimálna absorpcia týchto vitamínov v črevách modulovať hojnosť a rozmanitosť črevného mikrobiómu [60].

Vitamín A, vitamín rozpustných v tukoch, bol označený ako adjuvantná liečba infekčných chorôb a má potenciálny terapeutický účinok na deti s poruchou autistického spektra, pravdepodobne zmenou črevného mikrobiómu. Rozmanitosť črevného mikrobiómu sa významne líšila u detí s pretrvávajúcou hnačkou, ktorých hladina vitamínu A sa výrazne líšila. Suplementácia vitamínom A u myší znižovala úmrtnosť aj chorobnosť spojenú s infekčnými gastrointestinálnymi ochoreniami. V pilotnej štúdií podávanie vitamínu A zlepšilo zdravotný stav pravdepodobne kvôli významnému zvýšeniu populácií *Bacteroidetes*, *Bacteroidales* a zníženiu pomeru F/B u detí s poruchou autistického spektra. Dostatočný príjem vitamínu A v dojčenskom veku môže navyše ovplyvniť zdravie aj v neskoršom veku, podporovaním tvorby zdravého mikrobiómu. Suplementácia 50 000 IU vitamínu A u dojčiat v rannom alebo neskoršom období dojčenia zvýšila početnosť *Bifidobacterium* a *Akkermansia*, ale neovplyvnila množstvo *Proteobacteria* [60].

Vitamíny skupiny B sú súborom ôsmich vo vode rozpustných vitamínov nevyhnutných pre rôzne metabolické procesy. Aj keď sa vitamíny skupiny B nachádzajú v mnohých potravinách, ľahko sú znižované najmä alkoholom a varením. Niektoré vitamíny B podporujú bakteriálnu kolonizáciu, modulujú bakteriálnu virulenciu a zúčastňujú sa na patogénnych interakciách s hostiteľom. Predpokladá sa, že všetky *Fusobacteria* a viac ako 90 % *Bacteroidetes* sú producentmi vitamínu B12. Podobne môže byť vitamín B6 produkovaný *Bacteroidetes* a je využívaný hlavne ako kofaktor mnohých biologických reakcií spojených s imunitnou odpoveďou hostiteľa. Experimenty na zvieratách a klinické štúdie na ľuďoch preukázali, že vitamín B6 podporuje rast *Bacteroides* [60].

Vitamín C je najdôležitejším vo vode rozpustným antioxidantom v ľudskom tele. Na rozdiel od iných vo vode rozpustných vitamínov nemôže byť vitamín C u ľudí syntetizovaný, ale musí byť získaný z potravy absorpciou v čreve. Redoxný stav by mohol silne modulovať črevný mikrobióm. Príjem vitamínu C pozitívne koreloval s *Firmicutes* a negatívne súvisel s *Bacteroidetes* pri hodnotení malej skupiny dospelých ľudí s cystickou fibrózou. Štúdia na odstavených prasiatkach potvrdila antioxidačnú kapacitu vitamínu C pri zachytávaní voľných radikálov a obnove črevného mikrobiómu, zvyšovaním počtu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a znižovaním počtu *E. coli* [60].

Klinické štúdie zahŕňajúce suplementáciu vitamínom D preukázali pozitívne zdravotné výsledky, ktoré pomáhajú ľuďom udržiavať zdravie a predchádzať chronickým ochoreniam, a následné zmeny v mikrobióme môžu byť významným mechanizmom. Vitamín D sa podieľa na procese syntézy neurotransmiterov, rovnováhe vápnika a chráni nervové bunky svojimi antioxidačnými účinkami. V randomizovanej kontrolovanej štúdií, týždenná suplementácia vitamínom D (50 000 IU) počas 12 mesiacov, zvýšila fekálne hladiny SCFA a hojnosť rodov produkujúcich SCFA. Suplementácia vitamínu D3 má taktiež pozitívny vplyv na črevný mikrobióm u pacientov s cystickou fibrózou tým, že zvyšuje prospešné baktérie rodu *Lactococcus* a znižuje oportúnne baktérie [60].

Vitamín E, ktorý je známy pre svoje antioxidačné účinky sa bežne nachádza v mnohých potravinárskych výrobkoch. Chráni pred poškodením mukózneho tkaniva chemoterapiou, prírodné antioxidanty môžu regulovať zloženie črevného mikrobiómu zachytávaním nadmerných voľných radikálov a podporou bunkových imunitných interakcií. V štúdií uskutočnenej na tehotných ženách v druhom trimestri sa ukázalo, že vyšší príjem vitamínu E bol spojený s poklesom *Proteobacteria*, *Firmicutes* a zvýšením počtu *Bacteroidetes*. Tento výsledok bol viackrát preukázaný na myších modeloch [60].

2.4.8 Minerály a stopové prvky

Minerály a stopové prvky sú základnými mikroživinami pre ľudský metabolizmus a uskutočňujú aktívnu interakciu s črevným mikrobiómom. V literatúre je akútny nedostatok, ktorý skúma úlohu minerálov a stopových prvkov pri modulácii črevného mikrobiómu. Suplementácia vápnika, horčíka, fosforu, selénu a zinku však ukázala, že môžu existovať nejaké malé účinky, ktoré podporujú prospešné črevné baktérie, medzi ktoré patria *Akkermansia*, *Bifidobacterium* a *Ruminococcus* [60].

Epidemiologické údaje naznačujú, že vysoký príjem vápnika súvisí s nižšou prevalenciou obezity. Vysoký príjem vápnika viedol k zmenám v črevnom mikrobióme v intervenčnej štúdií na zdravých ľuďoch, ktorí prijímali 1000 mg denne počas ôsmich týždňov. Zvýšený počet *Clostridium XVIII* vo vzorkách stolice mužov nebol klasifikovaný ako prospešný alebo škodlivý, pretože je to nekultivovateľná baktéria. U modelu myši viedol zvýšený príjem vápnika k zvýšeniu počtu *Bifidobacterium* a pomeru *Bacteroides/Prevotella* [60].

Suplementácia železa u dojčiat s nedostatkom železa moduluje škodlivé a potenciálne patogénne baktérie. Suplementácia jódu vedie k zníženiu hojnosti *F. prausnitzii* a suplementácia selénu vedie k zníženiu hojnosti *Dorea* a *Mucisprillum* [60].

2.4.9 Prídavné látky

Potravinárske prídavné látky sú látky bežne používané pri spracovaní potravín na zvýšenie trvanlivosti, zlepšenie kvality a chuti zabalených potravín. Prídavné látky sa tiež môžu použiť ako stabilizátory, farbivá alebo plnidlá a ich prítomnosť je často označovaná písmenom E. Väčšina potravinárskych prídavných látok, ktoré sú v súčasnosti na trhu bola schválená pred 50 rokmi po neprimeraných experimentoch *in vitro* a *in vivo*. Toto zastarané hodnotenie bezpečnosti spolu so zvýšením objemu trhu s prídavnými látkami v potravinách naznačuje potrebu ďalšieho posúdenia možných škodlivých účinkov týchto látok na ľudské zdravie, najmä u osôb s intestinálnymi, systémovými poruchami alebo zvýšenou náchylnosťou k patogénnym stavom. Mnoho predklinických štúdií v poslednej dobe dáva do súvislosti zvýšenú a dlhodobú konzumáciu prídavných látok v potravinách s vývojom a progresiou rôznych foriem kolitídy, kolorektálneho karcinómu a metabolického syndrómu, ktorý sa vyznačuje zvýšenou adipozitou, dysglykémiou a nízkym stupňom črevného zápalu [61].

2.4.9.1 Umelé sladidlá

Umelé sladidlá sú jedným z najbežnejšie používaných potravinárskych prídavných látok na svete. Kvôli nízkym alebo dokonca žiadnym kalóriám, nízkym nákladom a schopnosti produkovať vyššiu sladkosť ako stolový cukor sa umelé sladidlá čoraz viac zavádzajú do potravín a nápojov ako náhrady cukru. Medzi bežne používané schválené umelé sladidlá na použitie v potravinách patrí acesulfám draselný, aspartam, sacharín, sukralóza, cyklamát a neotam. Konzumácia umelých sladidiel môže znížiť rozmanitosť črevného mikrobiómu a zhoršiť metabolizmus glukózy, čo vedie ku glukózovej intolerancii u hlodavcov. Myši kŕmené sacharínom mali črevnú dysbiózu so zvýšením *Bacteroidetes* a znížením *Lactobacillus reuteri*. U ľudí konzumácia sacharínu narušila homeostázu glukózy u niektorých, ale nie u všetkých účastníkov. Prenatálna expozícia sukralózou a acesulfámom draselným zmenila zloženie mikrobiómu aj súvisiace metabolity myšičích mláďat, čo viedlo k narušeniu ich pečenevých detoxikačných mechanizmov. Je však potrebné vykonať rozsiahle a randomizované klinické skúšky na ľuďoch, aby sa úplne objasnil vplyv umelých sladidiel na ľudský črevný mikrobióm a zdravie [42, 61, 62].

2.4.9.2 Emulgátory

Emulgátory sú povrchovo aktívne činidlá, ktoré slúžia ako hranica medzi dvoma nemiešateľnými kvapalinami, ako je olej/voda a umožňuje ich miešanie do stabilných emulzií. Môžu pomôcť vylepšiť textúru a chuť jedla, zvýšiť stabilitu produktu a predĺžiť trvanlivosť. Niektoré emulgátory sú prirodzene prítomné v potravinách, ako je povrchovo aktívny proteín kazeín a iné sú syntetizované z prirodzene sa vyskytujúcich zlúčenín, ako je karboxymetylcelulóza (CMC) a polysorbát. V posledných rokoch pribúdajúce štúdie ukazujú, že potravinové emulgátory môžu pôsobiť na črevný mikrobióm, spôsobiť črevné zápaly a podporovať metabolický syndróm [62].

Črevný mikrobióm môže fermentovať CMC na SCFA, ako je kyselina mliečna, kyselina jantárová, kyselina mravčia a iné, čo môže súvisieť s vývojom metabolického syndrómu, ale konkrétny vzťah nie je stále jasný. Jedným z mechanizmov, ako CMC spôsobuje zmeny v zložení črevného mikrobiómu a schopnosť vyvolať črevný zápal je, že CMC môže priamo

poškodiť vrstvu hlienu, čo vedie k zmenám v črevnej sliznici a následnému zápalu. Ďalším potenciálnym mechanizmom je, že CMC indukuje zvýšenie expresie bioaktívneho bičíka, čo zase zvyšuje schopnosť baktérií preniknúť cez hlien, a tým podporuje premnoženie črevných baktérií a mení funkčné vlastnosti črevného mikrobiómu [62].

Emulgátory CMC a polysorbát môžu priamo meniť mikrobióm, zvyšovať ich schopnosť prenikať vrstvu hlienu, ovplyvňovať signálne dráhy bunkovej proliferácie, apoptózy a viesť k črevnému zápalu a narušeniu metabolickej homeostázy. Tieto zistenia sú potvrdené u hlodavcov a u ľudí je potrebné ďalšie skúmanie [62].

2.4.9.3 Konzervačné látky

Potravinárske konzervačné látky sú syntetické alebo prírodné látky, ktoré môžu zabrániť nežiadúcim zmenám potravín spôsobených oxidáciou, aktivitou enzýmov a rastom mikroorganizmov. Syntetické potravinárske konzervanty ako sú siričitany, benzoáty, sorbany a dusitany, sú široko používané a všeobecne sa považujú za bezpečné pri konzumácii. Stále existujú určité nejasnosti a obavy, týkajúce sa zdravotných účinkov, nerozvážneho a dlhodobého používania. Celkovo by syntetické konzervanty mohli viesť k zníženiu črevnej mikrobiálnej diverzity, zníženiu *Clostridiales* a zvýšeniu *Proteobacteria*. V porovnaní so syntetickými konzervantmi spôsobuje prírodný konzervant nízku hlavne redukciu grampozitívnych baktérií a môžu inhibovať určité patogénne baktérie v črevnom trakte [62].

2.4.9.4 Esenciálne oleje

Esenciálne oleje sú zložité prírodné zmesi terpénov, terpenoidov, iných aromatických a alifatických zložiek extrahovaných extrakciou organickými rozpúšťadlami alebo destiláciou vodnou parou z tkanív alebo sekrétov rôznych častí korenia a bylín. Esenciálne oleje sa často používajú ako ochucovadlá, ale tiež vykazujú širokospektrálne antibakteriálne účinky. Pri skúmaní 21 esenciálnych olejov bolo zistené, že 18 z nich má antimikrobiálnu aktivitu proti najmenej jednej z baktérií *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Niektoré esenciálne oleje sa do potravín pridávajú ako konzervačné látky alebo antioxidanty, napríklad tymianový olej (tymol), škoricový olej (cinnamaldehyd) a klinčekový olej (eugenol). Zmes cinnamaldehydu a tymolu mala pozitívny vplyv na črevný mikrobióm monogastričných zvierat, pričom sa efektívne zamerala na škodlivé baktérie, ako je *E. coli* a *Salmonella*, bez toho, aby ovplyvnila užitočné baktérie v čreve. Ďalšie oleje podporovali rast črevných symbiotických baktérií, ako napríklad *Bifidobacterium spp.* a *F. prausnitzii* do istej miery a majú potenciál ako adjuvantné lieky na chemoterapiu pri rakovine hrubého čreva [62].

2.4.10 Alkoholické nápoje

Škodlivé účinky alkoholu na zdravie sú všeobecne známe. Požívanie alkoholu súvisí s niekoľkými patológiami zápalového stavu, ako sú ochorenia pečene, čriev a duševné ochorenia. Jedným z navrhovaných mechanizmov týkajúcich sa príjmu alkoholu s rozvojom zápalových ochorení je črevná dysbióza. Pre črevnú mikroflóru alkoholikov je skutočne charakteristické bohaté zastúpenie *Proteobacteria* a nízka hladina *Bacteroidetes* v porovnaní so zdravými jedincami. Ďalším typickým znakom u alkoholických osôb sú zvýšené hladiny

plazmatického endotoxínu a prozápalových cytokínov, ktoré odrážajú poškodenie črevnej bariéry. Črevná permeabilita sprostredkováva interakcie medzi črevným mikrobiómom a imunitnými bunkami podporou prozápalových alebo protizápalových reakcií. Alkoholici s vysokou permeabilitou majú skutočne veľké zníženie celkového bakteriálneho objemu a čelade *Ruminococcaceae*, ako aj vyššie hladiny *Lachnospiraceae* a *Blautia* v porovnaní s alkoholikmi s nízkou črevnou permeabilitou a zdravou kontrolnou skupinou. Skupina alkoholikov zahŕňala aktívnych ako aj abstinujúcich alkoholikov (> 1 mesiac), čo naznačuje, že dysbióza je dlhodobá. Počas abstinencie od alkoholu nastalo zvýšenie rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, čo môže hrať dôležitú úlohu pri obnove črevnej permeability [26].

Väčšina štúdií o konzumácii alkoholu sa uskutočňuje na ľuďoch, zatiaľ čo dôkazy o účinkoch miernej konzumácie alkoholu na zdravie pochádzajú hlavne z epidemiologických štúdií. Mierna konzumácia alkoholu, nie je spojená so škodlivými účinkami na zdravie, ale dokonca s neutrálnymi alebo pozitívnymi účinkami na zdravie aj na črevný mikrobióm, ako je to v prípade červeného vína. V týchto prípadoch hrá dôležitú úlohu obsah ďalších zložiek, ako napríklad polyfenoly alebo vláknina. Pivo pozostáva z prebiotckej vlákniny a obsahuje tiež bohatý profil polyfenolov (katechíny, fenolové kyseliny) a flavonoidov. Jediná intervenčná štúdia skúmajúca účinky piva na črevný mikrobióm zdravých dospelých osôb zistila, že nealkoholické pivo zmenilo zloženie mikrobiómu vo väčšej miere ako alkoholické pivo. Najmä hladiny *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a niekoľkých bakteriálnych rodov boli vyššie po užití nealkoholického piva. Červené víno je najviac obohatené o veľké množstvo polyfenolov a je najštudovanejším alkoholickým nápojom u zdravých dospelých osôb. Observačná štúdia s jednou dávkou vodky neodhalila žiadne zmeny v hlavných analyzovaných bakteriálnych skupinách, ani v indexoch diverzity nameraných 4 hodiny po konzumácii, čo naznačuje, že jedna dávka etanolu nie je dostatočná na zmenu črevného mikrobiómu [26].

2.5 Typy stravovania a ich vplyv na mikrobióm

2.5.1 Prerušované hladovanie

Prerušované hladovanie je spôsob stravovania, ktorý strieda obdobia pôstu a jedenia. Tento stravovací návyk neurčuje to, ktoré potraviny by sa mali jesť, ale kedy by sa mali. Bežné spôsoby prerušovaného hladovania zahŕňajú 16 až 20 hodinové pôsty a 4 až 8 hodinové okná na jedenie. Je podstatné počas pôstovania neprijímať žiadne kalórie, povolené je len piť vodu, čiernu kávu alebo čierny čaj. Z pohľadu ľudskej evolúcie sa ľudia vyvinuli, aby boli schopní fungovať bez jedla dlhší čas.

Pri pôste v tele nastávajú procesy na bunkovej a molekulárnej úrovni, kedy telo upravuje hladiny hormónov, bunky iniciujú dôležité opravné procesy a menia expresiu génov. Hladovanie podporuje protizápalové cytokíny a bunkovú autofágiu, ktorá podnecuje hojenie. Hladiny ľudského rastového hormónu sa zvyšujú až 5 násobne, citlivosť na inzulín sa zvyšuje a hladiny inzulínu dramaticky klesajú, čo môže zabezpečiť zníženie nadváhy a ochranu pred cukrovkou 2. typu [63, 64, 65].

Pôst chráni črevo pred negatívnymi účinkami stresu, ako je napríklad zápal. Pôst aktivuje cAMP, ktorý ďalej aktivuje gény, ktoré podporujú integritu a silu črevného epitelu. Kognitívne prínosy pôstu zlepšujú náladu, odolnosť voči stresu a tá chráni pred syndrómom priepustného čreva [66].

Štúdie na ľuďoch sú väčšinou vykonávané pri ramadánskom pôste, ktorý trvá od svitania do západu slnka približne 12 hodín. Metaanalýza metabolického zdravia a biomarkerov ukázala určitý prínos v hladinách LDL cholesterolu a glukózy nalačno [67].

V štúdií, ktorá sledovala priamo spojenie ramadánskeho pôstu a vplyvu na mikrobióm, naznačuje zvýšené množstvo *A. muciniphila* (faktor metabolického zdravia) na konci ramadánskeho pôstu (približne mesiac). Mnohé ďalšie štúdie preukazujú spätný účinok po návrate na obvyklú stravu, preto sú potrebné dlhodobé štúdie o mikrobióme a jeho zlepšenia v populácií. Ramadánsky pôst nie je vhodný na štúdiu o vplyvu pôstovania na mikrobióm, pretože nie je vhodným stravovacím návykom, kvôli cirkadiánnemu rytmu [68].

V nedávnej štúdií na zdravých, mladých mužoch aplikovali prerušované hladovanie s 16 hodinovým pôstom po dobu 25 dní. Pôstovanie zvýšilo diverzitu a bohatosť črevného mikrobiómu na rôznych úrovniach. Aktivácia SIRT1 (sirtuin 1) a zvýšená hladina HDL cholesterolu pozitívne korelovali so zvýšením mikrobiálnej diverzity. Výsledky uvádzajú aj zvýšený počet baktérií *Bacteroidia* a *Bacteroidetes*, ktoré na zvieracích modeloch boli priamo spojené s úbytkom hmotnosti. Nízke zastúpenie kmeňa *Bacteroidetes* zvýšilo rozvoj zápalových stavov vrátane obezity, aterosklerózy, neurodegeneratívnych chorôb a cukrovky. Črevný mikrobióm má cirkadiánnu rytmus a pomáha fungovať aj hostiteľskému cirkadiánnemu rytmu. V tomto smere bola nájdená významná pozitívna korelácia BMAL1 (transkripčný aktivátorový proteín, ktorý tvorí jadrovú zložku cirkadiánnych hodín) s *Prevotella* a *Bacteroidia*, SIRT1 s *Prevotellaceae*, *Bacteroidia* a *Dialister*. Na základe tejto štúdie by mohlo byť prerušované hladovanie bezpečným liečebným prostriedkom na prevenciu metabolických chorôb súvisiacich s dyslipidémiou a zvýšenou funkciou pečene, zatiaľ čo reguluje cirkadiánnu rytmus spojený s moduláciou črevného mikrobiómu [69].

2.5.2 Ketogénna strava

Ketogénna strava je nízkosacharidová strava s vysokým obsahom tuku a relatívne zvýšeným podielom bielkovín. Ketogénna strava nebola vyvinutá ako prostriedok na chudnutie, ale v roku 1921 ju Russel Wilder začal využívať na liečbu epilepsie. Stravovanie pozostáva zo 60-80 % tukov, 20-30 % bielkovín a <10 % sacharidov. Vzhľadom k jej popularite sa dnes využíva na dosiahnutie rôznych cieľov od chudnutia až po liečbu neurologických ochorení [70].

Radikálnym znížením príjmu sacharidov (zvyčajne < 50 g/deň) po niekoľkých dňoch sa zásoby glukózy stávajú nedostatočnými pre oxidáciu tukov dodávaním oxalacetátu v Krebsovom cykle, ale aj pre dodávanie glukózy do centrálného nervového systému (CNS). CNS nemôže používať voľné mastné kyseliny ako zdroj výživy, pretože nie sú schopné prejsť cez hemoencefalickú bariéru a po 3 až 4 dňoch je nútený nájsť alternatívny zdroj energie, ktorým sú ketóny. Ketónové látky (acetón, acetoacetát, β -hydroxybutyrát) sa vyrábajú v pečeni rozkladom tukov. Ketóza je fyziologický mechanizmus, pri ktorom dosahuje ketonémia maximálne hladiny 7-8 mmol/l (nejde vyššie, pretože CNS ketóny efektívne využíva) a nedochádza k zníženiu pH krvi [71].

O vplyve ketogénnej stravy na črevný mikrobióm sa vie zatiaľ veľmi málo. V štúdií z roku 2018 skúmali súvislosť črevného mikrobiómu a záchvatom u myší. Zistilo sa, že myši do štyroch dní od začiatku výživy mali významné zmeny v črevnej bakteriálnej taxonómii. Baktérie *A. muciniphila* a *Parabacteriodes sp.* boli významne zvýšené, čo viedlo k zníženej

produkcii γ -glutamyl transpeptidázy črevným mikrobiómom. Tento enzým katalyzuje prenos funkčných skupín γ -glutamylu z molekúl ako je glutatión na akceptor, ktorým môže byť aminokyselina tvoriaca glutamát. V ďalšej štúdií na myšiach došlo k zníženiu celkovej diverzity mikrobiómu v dôsledku nedostatok sacharidov v strave, ale mali nižšie riziko vzniku Alzheimerovej choroby, vďaka zvýšeniu *A. muciniphila* a *Lactobacillus*. Taktiež boli zredukované prozápalové mikróby, ako sú *Desulfovibrio* a *Turicibacter*. Pri štúdií vplyvu na mikrobióm u autistických myší dospeli znova k zníženiu celkovej diverzity baktérií a zlepšeniu pomeru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes*. Znížený pomer je bežný pri poruchách autistického spektra a jeho zlepšenie dokázalo zosilniť behaviorálne symptómy [72, 73].

Pri roztrúsenej skleróze bolo opísané spojenie medzi mikrobiómom a ketogénnou stravou. Spoločným atribútom sklerózy je poškodenie a postihnutie „bio-fermentačnej funkcie hrubého čreva“. Fermentačný proces, ktorý umožňuje produkciu prospešných vedľajších produktov ako SFCA, je narušený, takže dysbiotické baktérie hrubého čreva fermentujú potraviny na nebezpečné zlúčeniny ovplyvňujúce organizmus. Ketogénna strava u pacientov úplne obnovila mikrobiálnu biofermentatívnu hmotu a normalizovala koncentráciu mikrobiómu v hrubom čreve [72].

Štúdia zameraná na deti s epilepsiou, preukázala u pacientov s epilepsiou pred začatím liečby nerovnováhu črevného mikrobiómu. Autori zistili vyššie množstvo patogénnych proteobaktérií (*Escherichia*, *Salmonella* a *Vibrio*), ktoré sa významne znížili po liečbe ketogénnou stravou a zvýšením *Bacteroidetes* u zdravých jedincov aj u pacientov. *Bacteroides spp.* je úzko spojený s trávením a metabolizmom živín s vysokým obsahom tuku a reguláciou sekrécie interleukínov 6-17 v dendritických bunkách, čo súvisí so záchvatmi u epileptických pacientov. Ketogénna strava by mohla tieto príznaky zmierniť zmenami v diverzite mikrobiómu [72, 73].

2.5.3 Vegánska strava

Vegánska strava sa v posledných rokoch stáva veľmi populárnou u ľudí z etických, environmentálnych alebo zdravotných dôvodov. Vegánska strava je založená výlučne na rastlinných potravinách, čo zvyšuje riziko nedostatku niektorých živín. Naopak ich strava je bohatá na vlákninu, polyfenoly, antioxidanty a iné mikronutrienty obsiahnuté v rastlinnej strave. Vegáni sa vyhýbajú konzumácii akýchkoľvek živočíšnych potravín, ako aj potravín obsahujúcich zložky pochádzajúce zo zvierat (včelie produkty, srvátka, živočíšny vitamín D3 a iné). Ak je správne nastavená, vrátane minerálov a vitamínov, môže viesť k zdravotným benefitom, ako je nižší index telesnej hmotnosti hladiny cukru v krvi, riziko vysokého krvného tlaku, riziko zlej funkcie obličiek a mnoho ďalších [74, 75].

Štúdie na vplyv mikrobiómu zvyčajne porovnávajú rozdiely medzi vegánskou, lakto-ovo-vegetariánskou a všežravou stravou. V roku 1987 najskôr porovnávali vegánsku stravu s lakto-ovo-vegetariánskou a zmiešanou západnou stravou po dobu 20 dní u 12 mužov. Zistili, že fekálne laktobacily a enterokoky boli najnižšie vo vegánskej strave a koncentrácie fekálnych žľových kyselín boli tiež nízke vo vegánskej a lakto-ovo-vegetariánskej strave. Toto bola prvá štúdia, ktorá preukázala odlišné zloženie fekálnej flóry vo vegánskej strave [76].

V roku 2012 bola uskutočnená rozsiahla štúdia, ktorá zahŕňala 144 vegetariánov, 105 vegánov a 249 všežravcov ako kontrolu. Mikrobiálne počty *Bacteroides*, *Bifidobacterium*,

E. coli a *Enterobacteriaceae* boli významne nižšie vo vegánskej skupine ako u všežravcov. Štúdia ďalej naznačila, že vegáni konzumujú viac sacharidov a vlákniny ako všežravci. PH stolice bolo nižšie u vegánov (pH = 6,3 ± 0,8) ako u všežravcov (pH = 6,9 ± 0,8). Kyslé prostredie ďalej nebolo vhodné pre rast *E. coli* a *Enterobacteriaceae*. To môže vysvetľovať, prečo je počet baktérií *E. coli* a *Enterobacteriaceae* nízky u vegánov. Mnoho ďalších štúdií sa zameralo črevné mikrobiálne profily s použitím molekulárnych techník, taktiež zaznamenali rozdiely v pomeroch baktérií u vegánov a všežravcov, čo dokazuje vplyv na črevný mikrobióm a jeho zmenu [76].

Rastlinná strava sa javí ako prospešná pre ľudské zdravie tým, že podporuje rozvoj rozmanitejšieho črevného mikrobiómu alebo dokonca distribúciu rôznych druhov. Zistila sa pozitívna súvislosť medzi alfa-diverzitou alebo miestnym mikrobiálnym bohatstvom pri dlhodobom príjme ovocia a zeleniny. Na základe výskumu Martinez a kol. zabezpečilo pridanie celozrnného jačmeňa a hnedej ryže zvýšenie diverzity mikrobiómu. Vegáni a vegetariáni majú významne vyššie počty určitých *Bacteroidetes* v porovnaní s všežravcami. Vlákna najčastejšie zvyšuje baktérie mliečneho kvasenia, ako napr. *Ruminococcus*, *E. rectale*, *Roseburia* a znižuje *Clostridium* a *Enterococcus*. Krátkodobý diétny zásah so zvýšeným príjmom vlákniny mal za následok mierne, ale signifikantné zníženie diverzity. Vedci naznačujú, že toto zníženie by mohlo byť výsledkom rýchlej zmeny stravovania, ktorá mala za následok dočasné narušenie zloženia mikrobiómu. Polyfenoly, vyskytujúce sa v rastlinnej strave, zvyšujú rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, ktoré poskytujú antipatogénne a protizápalové účinky [77].

Štúdia so šiestimi obéznyimi ľuďmi s cukrovkou 2. typu a/alebo hypertenziou na vegánskej strave po dobu 1 mesiaca zaznamenala v črevnom mikrobióme znížený pomer *Firmicutes* ku *Bacteroidetes*. To naznačuje, že vegánska strava vedie k zníženiu pathobiontov (za normálnych okolností neškodný mikroorganizmus, ale pri dysbióze môže podporovať rozvoj zápalových alebo iných ochorení) ako je *Enterobacteriaceae*. Spôsobilo to zníženie zápalového markeru, fekálneho lipokalínu-2, ktorý súvisí s toleranciou glukózy a metabolizmom lipidov [77].

Vegánska strava znižuje riziko kardiovaskulárnych chorôb ovplyvňovaním črevného mikrobiómu. Mechanizmus spočíva v tom, že metabolizmus črevného mikrobiómu premieňa L-karnitín, ktorý je bohato zastúpený v červenom mäse, na TMAO. TMAO jeden z metabolitov lipidového fosfatidylcholínu podporuje aterosklerózu. U vegánov a vegetariánov boli zaznamenané významne nižšie hladiny TMAO. Ďalšia analýza vzoriek stolice ukázala niektoré rozdiely bakteriálnych druhov u všežravcov v porovnaní s vegánmi, ktoré súviseli s hladinami TMAO v plazme a s tým spojené riziko aterosklerózy [76].

Výskum zahŕňajúci 53 pacientov s reumatoidnou artritídou zaznamenal významné zmeny mikrobiómu pri prechode na vegánsku stravu po dobu jedného roka. Mikrobióm sa u pacientov s vysokým a nízkym zlepšením odlišovala, čo naznačuje vplyv ochorenia. Ďalšia randomizovaná štúdia používajúca nevarenú vegánsku stravu potvrdila zníženú aktivitu ochorenia a zmeny v mikrobióme v skupine s vegánskou stravou [76].

Súčasnú štúdiu majú určité obmedzenia, pretože chýbajú údaje o mikrobióme po pokračovaní alebo ukončení vegánskej stravy. Zloženie mikrobiómu sa môže zmeniť po krátkodobej strave, ale s dlhodobou stravou sú spojené aj iné enterotypové druhy [76].

2.5.4 Paleo strava

Paleo strava je navrhnutá tak, aby pripomínala to, čo pred tisíckami rokov jedli naši predkovia lovci a zberači. Aj keď nie je možné presne vedieť, čo ľudskí predkovia jedli v rôznych častiach sveta, vedci sa domnievajú, že ich strava pozostávala z potravín v prírodnom stave (nespracované). Paleo strava zahŕňa obmedzenie akýchkoľvek potravín, ktoré neboli vtedy dostupné, vrátane spracovaných potravín, zŕn, strukovín, mliečnych výrobkov, umelých sladidiel a pridaného cukru. Namiesto toho sa odporúča jesť mäso, ryby, vajcia, ovocie, zelenina, orechy, semená, bylinky a korenie. Dodržiavaním tejto stravy a fyzického aktívneho života mali lovci a zberači pravdepodobne oveľa nižšie choroby z nezdravého životného štýlu, ako je obezita, cukrovka a srdcové ochorenia. Viaceré štúdie naznačujú, že táto strava môže viesť k výraznému zníženiu hmotnosti, celkového a LDL cholesterolu, hladiny cukru v krvi a zlepšenie citlivosti na inzulín [78, 79].

Analýza fekálnych metabolómov lovcov-zberačov Hadza z Tanzánie, ktorá by mala odzrkadľovať náš starý črevný mikrobióm pred zahrnutím lepku, ukázala hlavné rozdiely v mikrobiálnom zložení a črevných metabolitov v porovnaní s Talianmi žijúcimi v mestách. V období dažďov sa odobrali vzorky stolice členov Hadza, kedy je dominantná rastlinná strava (hľuzy, baobab, med) a mäso zo zveriny je zriedkavé. Väčšina hľúz obsahuje vysoký obsah vody a nestráviteľnej vlákniny, ktorá sa počas žuvania vyplúva. Hadza strava je obohatená o monosacharidy, škrob, bielkoviny a s nízkym obsahom tuku. Črevný mikrobióm z Hadzy vykazoval vyššiu mikrobiálnu diverzitu a bohatosť v porovnaní s talianskou kontrolnou skupinou. U Hadzy dominujú kmene *Firmicutes* (72 %), *Bacteroidetes* (17 %), *Proteobacteria* (6 %) a *Spirochaetes* (3 %). Najmä vysoké podiely *Proteobacteria* a *Spirochaetes* sa výrazne líšia od veľmi nízkych hladín v talianskej kontrolnej skupine. Rod *Prevotella* a *Treponema* majú schopnosť degradácie xylanu a kmene *Firmicutes* tiež obsahujú niekoľko druhov degradujúcich vlákninu [80].

V prierezovej štúdií na Austrálčanoch, zaznamenali pri dodržiavaní dlhodobej paleolitickej stravy výrazne vyššie koncentrácie TMAO v sére, ale iba u tých, ktorí striktne stravu dodržiavali. V mikrobióme bol vyšší výskyt producenta trimetylamínu *Clostridium hathewayi*, ktorý patrí do rodu *Hungatella* [81].

Moderná paleolitická strava v porovnaní so stredomorskou stravou v Taliansku, napriek silnému geografickému účinku na štruktúru črevného mikrobiómu ukázala vysoký stupeň diverzity, ktorý sa približuje tradičným populáciám. Mikrobióm jednotlivcov vykazoval určité zvláštnosti, vrátane vysokého relatívneho množstva žĺc tolerujúcich mikroorganizmov [82].

2.5.5 Stredomorská strava

Stredomorská strava je založená na tradičných potravinách, ktoré ľudia používali v krajinách ako Taliansko a Grécko už v roku 1960. Jej popularita je vo viacerých krajinách, vzhľadom na flexibilitu, zdravotné výhody a má dlhoročnú povest' jedného z najzdravších stravovacích návykov. Základom stravovacej pyramídy je ovocie, zelenina, celozrnné obilniny, ryby, strukoviny, zemiaky, orechy a semien. Hlavným používaným tukom je extra panenský olivový olej a ľudia tiež konzumujú mierne množstvá červeného vína, hydiny, mliečnych výrobkov a vajec. Veľmi nízky majú obsah červeného mäsa, nasýtených tukov a pridaného cukru. Viaceré štúdie naznačujú, že znižuje riziko kardiovaskulárnych chorôb, zápal, hladiny cukru v krvi, riziko cukrovky 2. typu a pomáha pri chudnutí. Bohužiaľ neexistuje žiadny správny spôsob, ako sledovať stredomorskú stravu, pretože okolo Stredozemného mora je veľa krajín a ľudia v rôznych oblastiach môžu jesť rôzne potraviny [83].

Zložky stredomorskej stravy úzko interagujú s črevným mikrobiómom v mechanizmoch ako je prospešná modulácia črevného mikrobiómu, znížená metabolická endotoxémia (znížená expresia črevných proteínov a zvýšená permeabilita bariéry) potlačením rastu gramnegatívnych baktérií a zlepšenie integrity črevnej bariéry a sekrécie hlienu. Ľudia na tejto strave majú nižšie hladiny TMAO, ktoré je produkované črevnými baktériami z cholínu a L-karnitínu, nachádzajúce sa prevažne v červenom mäse, vajciach, syre. Väčší príjem vlákniny podporuje črevnú moduláciu, takisto aj rastlinná strava zvyšuje diverzitu a bohatosť mikrobiómu. Jediní s prevažne rastlinnou stredomorskou stravou mali zvýšené hladiny SCFA, *Prevotella* a niektorými *Firmicutes* degradujúcimi vlákninu [84].

U ľudí, ktorí konzumovali menej živočíšnych bielkovín a mali vyššie skóre stredomorskej stravy, sa zistila vyššia prítomnosť *Bacteroidetes* a nižší pomer *Firmicutes* ku *Bacteroidetes*. Vysoký pomer súvisí s cukrovkou 2. typu, obezitou a syndróm dráždivého čreva. Ľudia, ktorí menej dodržiavali stravu, mali vyššie hladiny *Streptococcaceae*, najmä baktérií rodu *Streptococcus* [85].

Najnovšia štúdia publikovaná v žurnále BMJ profilovala črevný mikrobióm u 612 jedincov v piatich európskych krajinách (Anglicko, Francúzsko, Holandsko, Taliansko, Poľsko) pred a po podaní 12 mesačnej stredomorskej stravy starším osobám vo veku 65-79 rokov. Dodržiavanie stravy bolo spojené do špecifickými zmenami mikrobiómu. Analýza mikrobiálnych metabolitov ukázala, že zmena mikrobiómu modulovaného stravou bola spojená so zvýšením produkcie SCFA, nižšou produkciou sekundárnych žľových kyselín, p-krezolov, etanolu a oxidu uhličitého [86].

2.5.6 Bezlepková strava

Celiakia je autoimunitné ochorenie, pri ktorom lepok vyvoláva črevné zápal. V 60. rokoch bola bezlepková strava uznaná ako potenciálna liečba obnovujúca normálnu črevnú sliznicu u pacientov s celiakiou. Pri študovaní črevného mikrobiómu zdravých jedincov, ktorí dodržiavali bezlepkovú stravu počas jedného mesiaca, bol preukázaný pokles *Bifidobacterium*, *Clostridium lituseburense* a *F. prausnitzii* a zvýšenie počtu *Enterobacteriaceae* a *E. coli*. Ďalšia štúdia na zdravých jedincoch po dodržiavaní bezlepkovej stravy počas jedného mesiaca, takisto preukázala zníženie *Bifidobacterium*, *B. longum*, *Lactobacillus* a zvýšenie počtu *Enterobacteriaceae* a *E. coli*. Aj keď väčšina týchto štúdií má významné obmedzenia, vrátane

malej veľkosti vzorky, pokles prospešných baktérií je preukázaný, čo vedie k zníženiu produkcie SCFA a ich priaznivých metabolických a imunitných účinkov na hostiteľa. Dlhodobá bezlepková strava by mohla predstavovať premennú, ktorá by mala byť braná do úvahy u liečených pacientov s celiakiou, kvôli možným účinkom na zdravie čriev a zlepšeniu symptómov celiakie. Avšak nárast škodlivých druhov, ako sú *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* demonštrovali vo viacerých štúdiách, ktoré by mohli ovplyvniť mikrobiálne profily a dlhodobú homeostázu črevnej sliznice zdravých osôb [87].

2.5.7 Strava s nízkym obsahom FODMAP

Termín FODMAP je označenie skupiny vysoko fermentovateľných, ale slabo absorbovaných sacharidov a polyolov. V posledných rokoch sa táto alternatívna strava zviditeľnila u lekárov, najmä pre jej použitie ako možnosti liečby pri IBD a IBS. Obmedzenie FODMAP v strave človeka pomáha zmierniť príznaky (nadúvanie, bolesti brucha, hnačky) u pacientov s IBS, avšak pri IBD neboli hlásené žiadne účinky na zápal. U pacientov s IBS na strave s nízkym obsahom FODMAP boli preukázané podobné koncentrácie SCFA so znížením celkového množstva baktérií na 47 % v porovnaní s obvyklou stravou. Niekoľko štúdií ukázalo pokles *Clostridium*, *Propionibacteriaceae*, *Bifidobacterium* a zvýšenie pomeru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* v strave s nízkym obsahom FODMAP v porovnaní s kontrolnou skupinou. Diéta s nízkym obsahom FODMAP by skutočne mohla viesť k zníženiu potenciálnych prebiotík (FOS a GOS), čo by viedlo k zníženiu prospešných baktérií a fermentačných účinkov. Integrácia strava s nízkym obsahom FODMAP s probiotikami pôsobí proti nerovnováhe črevného mikrobiómu a najmä obnovuje hladiny *Bifidobacterium*. Každé probiotikum môže mať odlišné vlastnosti, vrátane variabilných účinkov na cytokíny a hostiteľskú mikroflóru. Sú potrebné väčšie štúdie, aby sa lepšie pochopil potenciálny prínos doplnkov probiotík a dlhodobých účinkov stravy s nízkym obsahom FODMAP na zloženie črevného mikrobiómu [87].

2.6 Metódy analýzy črevného mikrobiómu

V poslednom desaťročí bol zaznamenaný obrovský pokrok v používaní genómového sekvenovania spolu s výpočtovými technikami na dešifrovanie ľudského mikrobiómu. Tieto nástroje sú potrebné kvôli veľkej informačnej hustote mikrobiómu [88].

2.6.1 Odber vzorky na analýzu

Prvý krok k štúdiu mikrobiómu zahŕňa odber stabilizovaných vzoriek mikrobiálnej biomasy, ktoré sa použijú a analyzujú v rôznych testoch. Črevný mikrobióm sa najčastejšie odoberá zo stolice, ktorá dobre predstavuje mikrobiálne spoločenstvo hrubého čreva a v menšej miere tenkého čreva. Stolica sa dá ľahko získať na odber vzoriek, má extrémnu mikrobiálnu hustotu, minimálnu ľudskú genetickú kontamináciu a obsahuje materiál, ktorý je možné analyzovať rôznymi molekulárnymi technikami. Aj keď stolica nie je homogénna, vo všeobecnosti sú rozdiely medzi celou stolicou a malou vzorkou stolice malé v porovnaní s jednotlivcami. Pretože vlastnosti mikróbov sa môžu rýchlo meniť s podmienkami prostredia (náhle zníženie teploty, vystavenie vzduchu) je dôležité podniknúť kroky na uchovanie vzoriek, napríklad okamžitým zmrazením alebo použiť rôzne laboratórne protokoly a komerčné súpravy na ich

fixáciu. Zo vzoriek zmrazenej stolice je možné kultivovať veľa mikroorganizmov, zatiaľ čo fixačné činidlá väčšinou bránia kultivácií a nemusia byť kompatibilné s vykonaním niektorých molekulárnych testov v neskoršom čase. Fixačné činidlá však umožňujú pohodlný odber a prepravu vzoriek. V klinickom prostredí sú bežné slizničné biopsie, ktoré poskytujú presnejšie a biogeograficky rozlíšené snímky mikrobiálnej komunity, ale je náročnejšie ich získať a môžu sa testovať iba pomocou technológií, ktoré nie sú ovplyvnené prítomnosťou ľudských buniek vo vzorke. Možné sú aj iné typy vzoriek, ako sú rektálne výtery, ale sú menej študované, pokiaľ ide o konzistenciu protokolu a zastúpenie v komunite [88, 89].

2.6.2 Modelové organizmy

Poznatky o mikrobióme, jeho interakciách s ľudskými hosťiteľmi a ich chemickým prostredím je možné získať alebo vylepšiť použitím rôznych nehumánnych modelových systémov. Aj keď žiadny nehumánny modelový systém úplne nerekapituluje všetky aspekty ľudského mikrobiómu, každý z nich má silné stránky, ktoré je možné selektívne využiť na riešenie vedeckých otázok, na ktoré by bolo ťažké alebo nemožné odpovedať, iba na samotných štúdiách na ľuďoch. Celkovo nehumánne modely poskytujú cenné príležitosti na získanie poznatkov o molekulárnych dráhach, fyziologických procesoch, hosťiteľských mikrobiálnych genotypoch a stimuloch, ktoré môžu byť relevantné pre ľudský mikrobióm a zdravie [89].

Zvieracie modely sa používajú na vyšetrenie ľudského mikrobiómu z niekoľkých dôvodov. Po prvé, je oveľa jednoduchšie experimentovať so zvieracími modelmi ako s ľudskými subjektmi. Štúdie na zvieratách umožňujú dôkladnú kontrolu experimentálnych premenných, škálovateľnosti a reprodukovateľnosti, ktorá je v štúdiách na ľuďoch často nemožná. Po druhé, ekologické a fyziologické vlastnosti zvieracieho tela sú veľmi zložené, dynamické a nemožno ich komplexne rekapitulovať *in vitro* alebo na silikónových modeloch. Spoločný pôvod ľudí a iných zvierat nakoniec viedol k zachovaniu mnohých genomických, molekulárnych, bunkových a fyziologických vlastností v líniiach zvierat a umožňuje extrapoláciu mnohých nálezov zo štúdií na zvieratách na človeka. Výhody použitia zvieracích modelov sú vyvážené dôležitými upozorneniami. Aj keď výhrady môžu obmedziť význam zvieracích modelov na pochopenie niektorých aspektov ľudského mikrobiómu, zvieracie modely sú dôležité v širšej oblasti vedy o mikrobióme. Na štúdium mikrobiómov na zvieracích modeloch je možné použiť niekoľko základných experimentálnych stratégií. Zvieratá sa môžu použiť na testovanie či zloženie a funkcia mikrobiómu koreluje s takými premennými, ako je vek hosťiteľa, genotyp hosťiteľa, strava a chemické alebo iné experimentálne expozície. Pokusy sa zvyčajne uskutočňujú na laboratórnych alebo divokých zvieratách, ktoré sú kolonizované komplexnými mikrobiálnymi spoločenstvami. Zvieratá sa môžu použiť na štúdium účinkov prítomnosti alebo zloženia mikrobiómu na fenotypy hosťiteľa. Na testovanie toho, či zloženie mikrobiómu prispieva k hosťiteľským fenotypom, je možné zvieratá s intaktným mikrobiómom liečiť širokospektrálnymi antibiotikami, aby sa znížila početnosť mikróbov a zmenilo zloženie spoločenstva. Jedná sa o relatívne lacný a rýchly spôsob, ako narušiť mikrobióm. Ďalším lacným a rýchlym prístupom na testovanie účinku konkrétnej mikrobiálnej komunity alebo kmeňa je jeho zavedenie priamo do bežne chovaných zvierat, ktoré sú už kolonizované mikrobiómom. Avšak zavedenie mikroorganizmov, ktoré

konkurujú už existujúcemu mikrobiómu a zabezpečujú stabilnú kolonizáciu, malo nízku úspešnosť a viedlo k značným rozdielom v experimentálnych výsledkoch [89].

Štúdium priamych interakcií medzi ľudským črevným mikrobiómom hostiteľským tkanivom je náročné. Mnoho účinkov črevného mikrobiómu sa prejavuje na konkrétnych miestach v čreve, časom sa pravdepodobne menia. Kvôli tomu nie sú vzorky stolice dostačujúce a merania *in situ* pri dostatočne vysokom časovom a priestorovom rozlíšení, nie sú v súčasnosti u ľudí možné. Pokrok v technikách mikrofabricácie a mikrofluidikách, uľahčil vývoj systémov črevo na čipe, ktoré možno použiť na biologické analýzy. Systémy, ktoré užšie reprezentujú 3D štruktúru a fyziologické mikroprostredie natívnych tkanív, je možné vytvoriť začlenením živých buniek do týchto mikrofluidných platforiem. Takéto mikrofyziologické systémy sa považujú za ďalšiu generáciu nástrojov *in vitro* schopných vytvárať *in vivo* podobné fyziologicky významné mikroprostredia potrebné pre 3D tkanivovú kultúru, ako aj tkanivové bariéry, napr. schopnosť monitorovať biologické reakcie buniek a tkanív na zmeny v homeostáze prístroja. Systémy črevo na čipe ponúkajú novú a výkonnú platformu *in vitro* na štúdium fyziológie, patológie a farmakológie ľudských čriev. Tieto systémy pomôžu pokročiť v porozumení a liečbe prevládajúcich chorôb, ako sú zápalové ochorenia čriev a kolorektálny karcinóm. Použitie kmeňových buniek získaných od pacienta v týchto systémoch môže tiež prispieť k rozvoju personalizovanej medicíny a technológií skríningu liekov [90, 91].

2.6.3 Kultivačné metódy

Počiatkové štúdie využívali tradičné techniky bakteriálnej kultivácie, po ktorých nasledovala fenotypizácia kultivovaných baktérií pomocou morfológických a biochemických charakteristík. Avšak veľká časť baktérií v čreve je anaeróbna, preto často neprežijú postupy používané na získavanie vzoriek z gastrointestinálneho traktu alebo na transport do laboratória a skladovanie. Rôzne mikroorganizmy prítomné v ľudskom čreve sa líšia svojou tendenciou rásť v kultúre. Výsledky relatívneho množstva rôznych baktérií v lúmene čreva odvodené pomocou techník založených na kultivácii, sú teda výrazne skreslené v prospech aeróbných organizmov, ktoré ľahko rastú v kultúre *in vitro*, pričom im chýbajú anaeróbne baktérie. Tieto techniky tiež výrazne podceňujú rozmanitosť baktérií v črevnom lúminálnom obsahu, a preto je ich užitočnosť pri štúdiu zmien v profile črevného mikrobiómu obmedzená. Tieto techniky nikdy nezískali dostatočnú pozornosť na štúdium črevného mikrobiómu a ich použitie bolo obmedzené na štúdium jednotlivých kultivovateľných bakteriálnych skupín v konkrétnych klinických situáciách. Na prekonanie týchto obmedzení kultivačných techník a s vývojom techník na štúdium bakteriálneho genomického materiálu na konci 20. storočia bolo vyvinutých niekoľko molekulárnych prístupov, v ktorých boli identifikované rôzne bakteriálne druhy na základe sekvencií ich 16S ribozomálnej RNA [92].

2.6.4 Bakteriálna 16S rRNA

Každá živá bunka obsahuje ribozómy, ktoré sú zložené z dvoch podjednotiek, jednej veľkej a jednej malej. Malá ribozomálna podjednotka obsahuje molekulu RNA, ktorá má veľkosť 16S v prípade prokaryotických buniek, vrátane baktérií a 18S v prípade eukaryotických buniek. Tieto malé molekuly RNA sú kódované bakteriálnym genómom. Bakteriálna 16S

rRNA je dlhá asi 1 500 nukleotidov, s určitými variáciami medzi druhmi. Niekoľko úsekov tohto génu je vysoko prítomných vo všetkých bakteriálnych skupinách. Tieto konštantné sekvencie sú rozptýlené s oblasťami, ktoré vykazujú výrazné variácie, hypervariabilné oblasti. Zmeny nukleotidových sekvencií v týchto hypervariabilných oblastiach odrážajú evolučnú divergenciu baktérií a preto tieto sekvencie poskytujú spoľahlivú metódu identifikácie a fylogenetkej klasifikácie bakteriálnych druhov. Metódy bakteriálnej identifikácie založené na nukleotidových sekvenciách v týchto oblastiach majú výhodu v tom, že nepotrebujú predchádzajúcu bakteriálnu kultiváciu a môžu detegovať baktérie, ktoré sú kultivovateľné, ako aj tie, ktoré dobre nerastú. Ak sa tieto metódy používajú na bakteriálne zmesi, ich výsledky poskytujú relatívne nezaujaté hodnotenie relatívneho množstva rôznych bakteriálnych skupín bez ohľadu na ich schopnosť rastu a rýchlosť rastu v kultúre. Molekulárne techniky, ktoré boli pôvodne vyvinuté, mohli využiť iba rozdiely v dĺžke a veľkosti variácií v nukleotidových sekvenciách týchto hypervariabilných oblastí v rôznych bakteriálnych druhoch. Avšak rýchly vývoj v technológii sekvenovania nukleových kyselín viedol k tomu, že vysoko výkonné multiparalelné sekvenovanie sa stalo široko dostupným [92].

2.6.5 Nesequenčné molekulárne metódy

V týchto metódach sa bakteriálna nukleová kyselina extrahuje zo vzorky, ktorá sa má analyzovať, po ktorej nasleduje amplifikácia buď celej dĺžky génu 16S rRNA, alebo segmentu tohto génu, ktorý obsahuje jednu alebo viac vybraných hypervariabilných oblastí. To je možné uskutočniť pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s univerzálnymi primermi zodpovedajúcimi konštantným oblastiam v bakteriálnom genóme lemujúcim celý 16S rRNA gén alebo jeho vybrané hypervariabilné oblasti. Výsledná amplifikovaná zmes génov 16S rRNA alebo jej hypervariabilných fragmentov zo všetkých baktérií obsiahnutých vo vzorke sa potom môže rozdeliť pomocou jednej z niekoľkých techník. Hlavnou nevýhodou týchto metód je obmedzené rozlíšenie bakteriálnych skupín. To vyplýva zo skutočnosti, že rozdiely v dĺžke a tiež v sekvenciách 16S rRNA génu od úzko príbuzných bakteriálnych skupín sú relatívne malé, čo vylučuje ich separáciu. Taktiež chýbajú bakteriálne skupiny prítomné v malom množstve. Preto boli tieto metódy v priebehu času nahradené postupmi sekvenovania novej generácie [92].

2.6.6 Metódy sekvenovania génov 16S rRNA

Tradičná Sangerova technika pre sekvenovanie nukleových kyselín vyžaduje ako východiskový materiál relatívne čistú DNA a poskytuje iba jednu sekvenciu na experiment. Preto nebolo možné pomocou tejto techniky sekvenovať vzorky obsahujúce zmes príbuzných nukleových kyselín, s výnimkou klonovania každej z týchto molekúl nukleových kyselín do samostatných vektorov a sekvenovania každého klonu, čo je veľmi zdĺhavé a nákladné. Pretože mikrobióm obsahuje zmes baktérií s trochu odlišným genomickým materiálom, nebolo možné ich pomocou tejto techniky sekvenovať. Niekoľko novších technológií sekvenovania umožnilo masívne paralelné sekvenovanie, tj. súčasné sekvenovanie každej molekuly obsiahnutej v zmesi DNA, napríklad tej, ktorá je izolovaná zo vzorky mikrobiómu. Tieto generujú veľké množstvo dát, pričom počet sekvencií z každého exemplára často dosahuje niekoľko miliónov, čo predstavuje náročnú analýzu a všeobecne poskytujú oveľa kratšie dĺžky čítania, ako boli možné

zo Sangerovho sekvenovania. Niekoľko výpočtových softvérových nástrojov a vysoký výpočtový výkon umožňujú spájanie veľkého počtu nukleotidových sekvencií do veľkej databázy. Sekvenovanie génu 16S rRNA alebo jeho segmentov je výkonnou technikou. Má však nevýhodu, že stanovenie baktérií prítomných vo vzorke je založené na asociácii rôznych sekvencií oblasti 16S rRNA génu študovaných s konkrétnymi bakteriálnymi taxónmi, ktorá nie je dokonalá. Metóda je obmedzená na analýzu taxónov, pre ktoré sú informačné sekvencie zahrnuté v referenčných databázach 16S rRNA. Chyby počas sekvenovania môžu navyše brániť presnému priradeniu druhov. Dôležitejšie je, že táto metóda poskytuje informácie iba o taxonomickom zložení študovaných vzoriek, ale nemôže priamo hodnotiť biologické funkcie mikrobiálnych spoločenstiev, ktoré tieto vzorky predstavujú [92].

2.6.7 Shotgun metagenómové sekvenovanie

Metóda spočíva v sekvenovaní všetkého genómového materiálu prítomného vo vzorke bez použitia akejkoľvek kultivačnej metódy namiesto iba génu 16S rRNA. Výhodou metódy je poskytovanie informácií o metabolických schopnostiach mikrobiómu prítomného v konkrétnej vzorke. Pri tejto technike sa DNA extrahuje zo všetkých buniek v mikrobiálnom spoločenstve, ktorá sa rozštiepi na malé fragmenty, ktoré sa nezávisle sekvenujú pomocou techniky sekvenovania novej generácie na získanie informácií o celom mikrobióme alebo metagenóme. Poskytuje to niekoľko miliónov sekvencií, ktoré patria do rôznych pozícií na genómoch rôznych baktérií, ako aj hostiteľskej DNA, prítomných vo východiskovej vzorke. Tieto hodnoty teda obsahujú sekvencie nielen taxonomicky-informatívnych 16S rRNA génov pre baktérie obsiahnuté vo vzorke, ale aj sekvencie zodpovedajúce kódujúcim oblastiam pre enzýmy, ktoré slúžia kritickým biologickým funkciám a sú obsiahnuté v bakteriálnej komunite. Metagenomické sekvenčné údaje poskytujú príležitosť súčasne preskúmať dva rôzne aspekty mikrobiálnej komunity, ktoré baktérie obsahujú. Čítania, ktoré jedinečne mapujú susedné miesta v referenčnom genóme sa potom zhromaždia a vytvoria kontigy alebo súvislé úseky DNA na rekonštrukciu čiastočného alebo kompletného konceptu mikrobiálnych genómov. Kontigy sa využívajú na identifikáciu génových rodín do ktorých patria. Analýzou množstva kontigov pre konkrétnu génovú rodinu alebo pre všetky gény v konkrétnej časti je možné získať pomerne presný odhad celkových funkčných schopností všetkých baktérií prítomných v komunite [92].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie a materiály

- Elučný tlmiači roztok TopElute Fluid (Qiagen)
- Etanol 96 % (Penta Chemicals)
- FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics)
- Gul'ôčky Zr/Si, Ø 0,1 mm (BioSpec Products)
- Lyofilizované primery 0,1 mM (Generi Biotech)
- MgCl₂ 25 mM (New England BioLabs)
- Odberová sada (Probione)
- Proteináza K, 600 mAU·ml⁻¹ (Qiagen)
- Tesniaci fólia pre PCR Opti-Seal Optical Disposable Adhesive (BIOplastic BV)
- Tlmiace roztoky PW1, C3, C4, AW1, AW2, ATE (Qiagen)

3.2 Použité prístroje

- Automatická jednokanálová pipeta Calibra (Socorex)
- Automatická osemkanálová pipeta Multimate+ (HTL)
- Centrifúga Mega Star 600 (VWR)
- Homogenizátor Bioprep-24 (Hangzhou Allsheng Instruments)
- Izolátor QIAcube HT (Qiagen)
- Magnetické miešadlo s ohrevom HotPlate Stirrer (Benchmark Scientific)
- Real-Time PCR LightCycler 480 II (Roche Diagnostics)
- Spektrometer SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

3.3 Charakterizácia účastníkov

Pre experimentálnu časť bolo vybraných dvadsať zdravých mužov a žien vo veku od 35 do 45 rokov s vlastným stravovaním. Účasť v experimentálnej časti bola dobrovoľná a vybraní účastníci dostali pridelený kód, kvôli ich anonymizácii. Účastníci boli vybraní na základe splnených uvedených podmienok:

- za posledné 3 mesiace neužívali antibiotiká alebo kortikosteroidy,
- nefajčiari,
- netrpeli gastrointestinálnymi problémami,
- mesiac pred experimentom neužívali laxatíva, lieky proti hnačke a drogy,
- nekonzumovali pravidelne alkoholické nápoje, vrátane piva a vína,
- týždeň pred experimentom nekonzumovali probiotiká (nezahŕňa bežné potraviny, ako mliečne alebo fermentované výrobky).

Z účastníkov boli vylúčené tehotné alebo dojčiace ženy. Stanovené podmienky museli účastníci dodržiavať aj počas experimentu. Účastníci boli požiadaní, aby pokračovali vo svojej obvyklej strave. Do experimentu boli prijatí iba asymptomatický jedinci, ktorí konzumovali denne menej ako 3 porcie ovocia alebo zeleniny. Prijatí účastníci podpísali informovaný súhlas o spracovaní ich výsledkov a obdržali dotazník s otázkami, ktoré sledovali ich telesnú hmotnosť pred a po skončení intervencie, výšku a vek.

3.4 Kombinácie vybraných typov potravín

Účastníci boli rozdelení na 2 skupiny po 10 účastníkov. V zastúpení každej skupiny bolo 5 mužov a 5 žien. Obe skupiny zaradili do svojho jedálneho lístka ovocno-zeleninové smoothie, ktoré konzumovali jedenkrát denne v nestanovenom čase, aby nedošlo k narušeniu ich stravovacích návykov. Voľba smoothie bola na základe podkladov, aby účastníci celú zvolenú kombináciu užívali naraz a došlo k rovnomernému rozprestretiu živín. Výber potravín do kombinácie A bol zvolený na základe potencionalne bohatého zastúpenia polyfenolov a prebiotckej vlákniny, ktoré majú pozitívne účinky na ľudské zdravie a črevný mikrobióm. Pri kombinácii B bolo naopak prihliadané na typicky označovaný prebiotický druh plodiny (jablko, mrkva), ktoré sú bežne konzumované ľuďmi. Zloženie a hmotnosti jednotlivých kombinácií potravín sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Vybrané kombinácie potravín a ich hmotnosti

Kombinácia A	Kombinácia B
230 g pomaranč	80 g mrkva
15 g zázvor	150 g jablko
2,5 g sušená kurkuma	15 g šťavy z citrónu
247,5 g celkovo	245 g celkovo

Všetky hmotnosti sú uvedené v pripravenom stave na konzumáciu, to znamená bez kôry a semien, iba jablko bolo používané aj so šupou. Použité potraviny boli zakúpené v bežných obchodných reťazcoch a pestované konvenčným spôsobom.

3.5 Odber vzorky stolice

Od každého účastníka boli odobraté dve vzorky stolice, na začiatku a na konci experimentu po 14. dňoch intervencie. Odbery uskutočnil každý účastník samostatne pomocou odberovej sady a návodu na použitie. Každá odberová sada sa skladala z jednorazových rukavíc, papierového návleku na toaletu a odbernej nádoby spolu s lopatkou na vzorku. Odobraná vzorka bola veľkosti lieskového orechu. Vďaka odberovej sade bolo zabezpečené, že stolica sa nedostala do kontaktu s vodou, močom, toaletným papierom alebo iným materiálom, ktorý by mohol kontaminovať vzorku. Po odobratí vzorky bola vzorka umiestnená do odberovej nádoby a umiestnená do mrazničky až do vyzdvihnutia vzoriek na laboratórnu analýzu. Vzorky boli celý čas prepravované v chladiacom boxe s ľadom, aby nedošlo k ich rozmrazeniu.

3.6 Spracovanie a analýza

V experimentálnej časti bolo analyzovaných 40 vzoriek stolice, ktoré boli spracované v spoločnosti Medi Pharma Vision v Brne. Pri analýze všetkých vzoriek bol zachovaný štandardný operačný postup.

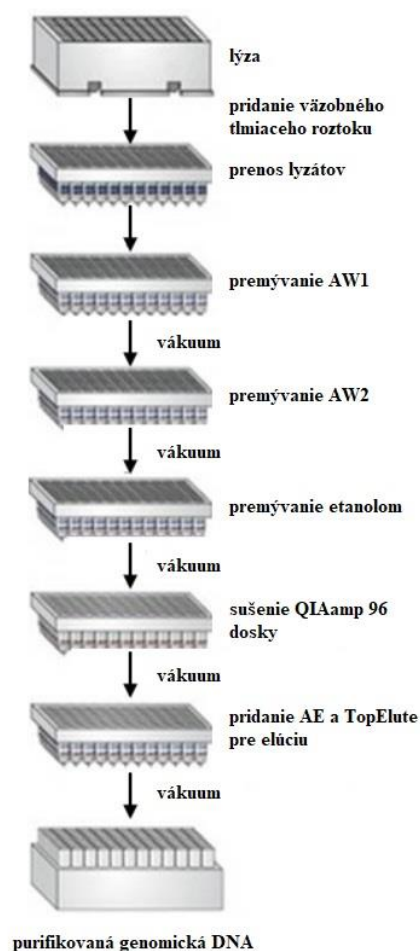
3.6.1 Príprava vzoriek

Pred samotnou izoláciou bolo požadované vykonať účinnú lýzu a homogenizáciu vzoriek, aby došlo k narušeniu plazmatickej membrány a následnému uvoľneniu prítomného genetického materiálu. Všetky vzorky a použité činidlá boli pred použitím aklimatizované pri

laborátornej teplote (20-25 °C). Na dno Eppendorfovej skúmavky boli vložené guľôčky Zr/Si s priemerom 0,1 mm, kvôli lepšej homogenizácii a mechanickému rozrušeniu. Po aklimatizovaní bola odobraná vzorka stolice z odberovej sady pomocou laborátornej špachtle do predpripravenej Eppendorfovej skúmavky, pričom odobraná hmotnosť činila 150 mg. Hmotnosť odobratej vzorky bola kontrolovaná pomocou presných váh s rozlíšením 0,001 g. Zároveň bol zahriaty tlmiači roztok PW1 na 60 °C po dobu 10 minút na magnetickom miešadle s ohrevom. Po zahriatí bola skontrolovaná neprítomnosť zrazeniny v tlmiačom roztoku. K vzorke bolo napipetované 650 µl zahriateho tlmiačeho roztoku PW1 pomocou jednonáložovej automatickej pipety. Pre lepšiu homogenizáciu bola vzorka umiestnená do homogenizátora po dobu 45 sekúnd s rýchlosťou 7 m·s⁻¹. Následne bola vzorka vložená do centrifúgy na 60 sekúnd pri 17 850 otáčkach za minútu. Po centrifugácii bola skontrolovaná neprítomnosť viditeľných častíc a bolo odpipetované 400 µl supernatantu do nových Eppendorfových skúmaviek. K supernatantu bolo napipetované 150 µl tlmiačeho roztoku, prebehla krátka homogenizácia a bol pozorovaný zákal. Následne bola vzorka inkubovaná 5 minút pri 4 °C v chladničke. Po inkubácii bola vzorka znovu centrifugovaná s rovnakými parametrami, následne bolo odpipetované 300 µl supernatantu do S-bloku ku ktorému bolo napipetované 20 µl Proteinázy K s aktivitou 600 mAU·ml⁻¹, ktorá zabezpečila účinnú lýzu vzoriek. Lyzát v S-bloku bol premiešaný a inkubovaný 10 minút pri laborátornej teplote.

3.6.2 Izolácia DNA

Izolácia bakteriálnej DNA z ľudskej stolice bola vykonaná na prístroji QIAcube HT pomocou softvéru QIAcube HT Prep Manager a protokolu QIAamp 96 PowerFecal. S-blok s lyzátmi vzoriek bol vložený do prístroja a pomocou softvéru boli vyznačené príslušné polohy. Izolátor pracuje s krokmi vákua, počas ktorého sa DNA selektívne viaže na membránu QIAamp pri prechode kontaminantov. Zvyšné kontaminanty a inhibítory enzýmov sú odstránené v troch premývacích krokoch. Čistá DNA je eluovaná vo vákuu v jednom kroku v tlmivom roztoku ATE. Zisk DNA z membrány QIAamp sa zvyšuje elučným tlmivým roztokom TopElute, ktorý umožňuje použitie stabilného a vysokého vákua a má za následok rovnaké objemy eluátu. Jednotlivé procesné kroky izolátora sú znázornené na Obrázku 5. Pri izolácii 40 vzoriek bolo napipetované do izolátora 22,3 ml tlmiačeho roztoku AW1 do polohy A1, 23,0 ml 96 % etanolu do polohy B2, 4,2 ml tlmiačeho roztoku ATE do polohy 4, 26,5 ml tlmiačeho roztoku AW2 do polohy 1 a 1,6 ml TopElute do polohy 3. Pred spustením bol pridaný odpadný kôš na použité špičky.



Obrázok 5: Ilustrácia procesu izolácie a purifikácie izolátorom QIAcube HT

3.6.3 Stanovenie čistoty a koncentrácie DNA

K stanoveniu čistoty a následnej koncentrácie DNA bol využitý spektrofotometer SPECTROstar Nano, ktorým sa stanovovalo naraz 16 vzoriek. Vzorky boli napipetované na nízkoobjemovú mikrotitračnú doštičku osemkanálovou automatickou pipetou o objeme 8 μ l. Pre akceptovanie stanovenej čistoty DNA musel byť pomer absorbancií A_{260}/A_{280} v rozmedzí 1,7-2,2. Následne bol výsledok merania prevedený na výslednú koncentráciu.

3.6.4 PCR analýza

Pre stanovenie množstva DNA jednotlivých bakteriálnych kmeňov a rodov vo vzorkách bol využitý prístroj qPCR LightCycler 480 II od spoločnosti Roche. Ako forward a reverse primery boli použité autorské primery spoločnosti Medi Pharma Vision, ich sekvencie sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Sekvencie použitých forward a reverse primerov

Sekvencia	Názov
5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'	Uni Eubacteria F
5' GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC 3'	Uni Eubacteria R
5' AGCAGTAGGGAATCTTCCA 3'	Lactobacillus spp. F
5' CACCGCTACACATGGAG 3'	Lactobacillus spp. R
5' CGCGTCYGGTGTGAAAG 3'	Bifidobacteria spp. F
5' CCCACATCCAGCATCCA 3'	Bifidobacteria spp. R
5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'	Eub518
5' GTACTGAGACACGGACCA 3'	Cfb319
5' GTCAGCTCGTGTCTGTA 3'	Firm-primer-F
5' CCATTGTAKYACGTGTGT 3'	Firm-primer-R

Do Eppendorfovej skúmavky bolo napipetované 200 μl Milli-Q H_2O a požadovaný objem vzorky podľa vypočítanej koncentrácie, aby výsledná koncentrácia vzorky bola $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pre PCR analýzu bola pripravená reakčná zmes, master mix, ktorá sa skladala pre jednu jamku z 4,8 μl Milli-Q H_2O , 0,1 μl forward primer, 0,1 μl reverse primer, 0,5 μl 25 mM MgCl_2 a 2,5 μl SYBR Green Master. Prídavok MgCl_2 zvyšuje aktivitu DNA polymerázy, čo zvyšuje rýchlosť amplifikácie DNA. Reakčná zmes bola pripravovaná v skúmavke obalenej alobalom (ochrana pred svetlom) na ľadovej triešti. Pri príprave reakčnej zmesi bola najskôr napipetovaná Milli-Q H_2O a MgCl_2 , následne primery, ktoré boli premiešané na vortexe a nakoniec SYBR Green Master.

Pri plnení PCR dosky boli najskôr zvolené pozície do ktorých bolo napipetované 8 μl pripravenej reakčnej zmesi, pričom pipetovanie prebiehalo v duplikátoch. Do určených pozícií bolo následne pridané 2 μl nariedeného vzorku na požadovanú koncentráciu. Pipetovacie špičky boli vždy vymieňané pri oboch krokoch, aby sa zabránilo kontaminácií a znehodnoteniu výsledkov. Naplnená doska bola zalepená tesniacou fóliou pre PCR a vložená do chladiacej centrifúgy na 5 minút pri 1200g a 4 °C. Po centrifugácii bola doska vložená do qPCR prístroja LightCycler 480 II a spustený program Light Cyclyer SW, kde boli nastavené parametre jednotlivých krokov programu PCR reakcie, ktoré sú uvedené v Tabuľke 3. Prístroj LightCycler 480 II využíva vlastný software v ktorom sa programuje PCR reakcia a taktiež prebieha následná analýza. Pri tejto práci bola zvolená automatická funkcia analýzy absolútnej kvantifikácie „Absolute Quantification/2nd Derivative Max“ s nastavením „High Sensitivity“.

Tabuľka 3: Zloženie PCR reakcie

Krok	Parametre kroku	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	95 °C, 300 s	1
amplifikácia	95 °C, 10 s	45
	60 °C, 10 s	
	72 °C, 10 s	
chladenie	40 °C, 30 s	1

3.7 Vyhodnotenie dát

Pre výpočet relatívnej početnosti (v) jednotlivých kmeňov a rodov v analyzovaných vzorkách bol použitý vzťah (1):

$$v = \frac{2^{CqUNI}}{2^{CqSP}} \cdot 100, \quad (1)$$

kde $CqUNI$ označuje číslo cyklu, v ktorom došlo k detekovateľnej amplifikácii daného vzorku pri použití Uni Eubacteria primeru a $CqSP$ je číslo cyklu, v ktorom došlo k detekovateľnej amplifikácii daného vzorku pri použití ostatných jednotlivých primerov pre určené bakteriálne kmene a rody.

Štatistické vyhodnotenie a grafická interpretácia dát boli vykonané v tabuľkovom editore Microsoft Office Excel 2019 a v analytickom programe Statistica. Určenie vzťahu distribúcie dát bolo vykonané pomocou testov normality, pričom na základe ich výsledkov bolo určené použitie parametrických alebo neparametrických metód testovania hypotéz. Ako parametrická metóda bol využitý párový t-test a pri neparametrickej distribúcii dát bol využitý Wilcoxonov signed-rank test pri 5 % hladine významnosti. Pred vyhodnotením bola stanovená nulová (H_0) a alternatívna (H_1) hypotéza. Za štatisticky významné výsledky boli považované výsledky, ktorých p-hodnota neprekročila hranicu významnosti $\alpha = 0,05$.

- H_0 = Pri porovnávaní výsledkov vzoriek 1. a 2. odberu nie je významný štatistický rozdiel.
- H_1 = Pri porovnávaní výsledkov vzoriek 1. a 2. odberu je významný štatistický rozdiel.

Hodnoty kvantitatívnych charakteristík boli graficky znázornené pomocou škatuľových grafov. Pri hodnotení všetkých premenných súčasne bol využitý viacrozmerný štatistický model analýzy hlavných komponentov (PCA) vo forme diferenciálnej analýzy.

4 VÝSLEDKY

V rámci diplomovej práce bolo analyzovaných 40 vzoriek ľudskej stolice. Cieľom práce bolo zistiť aký vplyv bude mať daná intervencia na črevný mikrobióm, pričom bolo predpokladané signifikantné zníženie percentuálneho zastúpenia kmeňa *Firmicutes*, pomeru kmeňov *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, zvýšenie percentuálneho zastúpenie kmeňa *Bacteroidetes* a rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* po 14 dňovej intervencii, spočívajúcej v konzumácii kombinácií ovocia a zeleniny vo forme smoothie. Domnienka bola určená na základe predchádzajúcich výskumov, ktorých závery hovoria o zmenách početnosti spomenutých kmeňov a rodov po konzumácii ovocia a zeleniny.

4.1 Charakterizácia účastníkov

Výskumu sa zúčastnilo 20 účastníkov, v zložení 10 mužov a 10 žien. Vek účastníkov bol stanovený v rozpätí od 35 do 45 rokov. Všetci účastníci pili zvolenú kombináciu smoothie po dobu 2 týždňov. Telesná hmotnosť pri kombinácii A klesla v priemere iba o 30 g a pri kombinácii B o 110 g čo sú veľmi zanedbateľné rozdiely. Index telesnej hmotnosti (BMI) priemerne klesol o taktiež zanedbateľné rozdiely u oboch kombinácií. Tieto rozdiely mohli byť spôsobené napr. iba vplyvom tekutín, ale určite sa nedá povedať, že by účastníci prišli o telesný tuk. Všetky získané parametre od účastníkov sú uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4: Priemerné hodnoty účastníkov

Kombinácia	Vek	Výška [cm]	Váha		BMI	
			1. odber [kg]	2. odber [kg]	1. odber [kg·m ²]	2. odber [kg·m ²]
A	39,7 ± 4	174,8 ± 11	84,90 ± 14,5	84,87 ± 14,9	27,57 ± 2,5	27,55 ± 2,5
B	42,3 ± 4	171,6 ± 12	81,10 ± 13,2	80,99 ± 13,4	26,27 ± 2,5	26,22 ± 2,5

4.2 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia a čistota DNA izolovaná z ľudskej stolice bola stanovená spektrofotometricky pomocou SPECTROstar Nano. Čistota vzoriek bola odčítaná z pomeru absorbancií A_{260}/A_{280} a koncentrácia DNA bola stanovená z hodnoty absorbancie pri 260 nm. Koncentrácia a čistota každého vzorku je uvedená v Tabuľke 5.

Tabuľka 5: Hodnoty pomeru absorbancií a výsledné koncentrácie analyzovaných vzoriek

Vzorka	c DNA [ng/μl]	$A_{260/280}$ [-]
1	49,19	2,12
2	77,71	1,99
3	87,72	2,03
4	63,92	2,11
5	76,81	2,05
6	69,53	2,07
7	141,07	1,88
8	92,15	2,05
9	85,17	1,97
10	66,27	1,97
11	106,48	1,94
12	94,93	1,94
13	99,06	1,95
14	86,39	1,99
15	93,7	1,96
16	119,82	1,92
17	132,47	1,87
18	107,85	1,91
19	86,48	1,97
20	111,81	1,95
21	80,53	1,99
22	80,53	2,01
23	105,63	1,98
24	80,79	2,1
25	124,89	1,89
26	176,38	1,86
27	109,64	1,9
28	219,89	1,83
29	139,29	1,88
30	145,83	1,88
31	99,28	1,94
32	83,16	1,97
33	105,66	1,9
34	124,53	1,89
35	85,24	1,95
36	88,3	1,98
37	107,47	1,92
38	156,95	1,86
39	55,64	2,12
40	125,18	1,91

4.3 Analýza črevného mikrobiómu

V celkovej výskumnej vzorke boli detekované 2 bakteriálne kmene (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*) a dva bakteriálne rody (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), ktorých relatívna početnosť predstavuje až 90 % črevného mikrobiómu [3].

Do analýzy bolo zahrnutých všetkých 40 vzoriek. Výsledky analýzy vyjadrenej v relatívnych početnostiach pre jednotlivé kombinácie a všetkých účastníkov, pred a po skončení intervencie je možné vidieť v Tabuľke 6, kde v stĺpci vzorka sú číslami uvedený účastníci, písmená A/B určujú dodržiavanú kombináciu a M/Z udáva pohlavie účastníkov.

Tabuľka 6: Percentuálne zastúpenie bakteriálnych kmeňov a rodov vo vzorkách stolice pred a po skončení intervencie

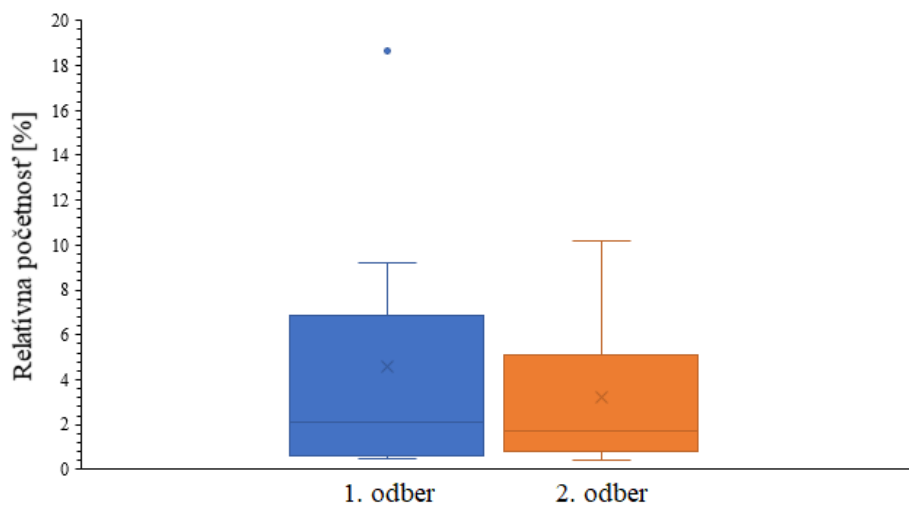
Vzorka	<i>Bifidobacterium</i> [%]		<i>Lactobacillus</i> [%]		<i>Firmicutes</i> [%]		<i>Bacteroidetes</i> [%]		Pomer F/B [%]	
	1. odber	2. odber	1. odber	2. odber	1. odber	2. odber	1. odber	2. odber	1. odber	2. odber
1_A_M	4,902	1,887	0,198	0,007	38,195	52,352	18,910	23,182	2,020	2,258
2_A_M	0,655	0,392	0,012	0,004	45,450	58,693	23,065	26,687	1,971	2,199
3_A_M	6,055	4,833	0,011	0,005	41,943	31,837	24,779	17,520	1,693	1,817
4_A_M	1,242	0,845	0,005	0,002	36,068	47,360	21,676	25,488	1,664	1,858
5_A_M	0,464	1,345	0,013	0,027	46,997	52,711	28,811	24,233	1,631	2,175
6_A_Z	1,053	1,505	0,010	0,004	38,574	42,890	23,268	25,695	1,658	1,669
7_A_Z	2,913	4,439	0,033	0,014	32,706	48,421	26,383	27,677	1,240	1,749
8_A_Z	18,652	10,154	0,062	0,005	40,809	43,950	22,272	24,143	1,832	1,820
9_A_Z	9,177	5,999	0,083	0,204	37,393	44,989	26,449	26,568	1,414	1,693
10_A_Z	0,579	0,729	0,004	0,000	53,875	44,304	28,613	29,200	1,883	1,517
11_B_M	17,581	13,719	0,002	0,001	41,280	35,418	22,519	15,589	1,833	2,272
12_B_M	2,405	2,567	0,001	0,015	36,772	28,590	18,101	20,422	2,031	1,400
13_B_M	3,897	1,080	0,116	0,026	62,589	61,399	26,402	29,806	2,371	2,060
14_B_M	2,444	0,327	0,044	0,007	44,876	59,344	26,280	20,556	1,708	2,887
15_B_M	1,943	7,412	0,002	0,004	43,892	61,529	19,401	27,670	2,262	2,224
16_B_Z	9,830	7,940	0,006	0,004	41,799	60,989	22,294	25,589	1,875	2,383
17_B_Z	14,058	11,083	0,010	0,079	37,043	46,712	26,766	29,061	1,384	1,607
18_B_Z	2,154	6,710	0,001	0,008	44,168	48,181	27,001	29,432	1,636	1,637
19_B_Z	2,224	2,106	0,090	0,052	49,114	49,649	27,989	34,979	1,755	1,419
20_B_Z	3,389	2,764	0,002	0,002	38,215	38,561	25,665	23,720	1,489	1,626

4.3.1 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium*, patriaci do kmeňa *Actinobacteria*, je dominantnou veličinou v čreve zdravých dojčených detí, zatiaľ čo v dospelosti sú hladiny nižšie, ale relatívne stabilné, pričom v starobe klesajú. Trendy opakovane pozorujú pokles rodu *Bifidobacterium* u staršej populácie, čo potvrdzujú viaceré štúdie využívajúce rôzne technológie. Tento pokles bol spojený so znížením adhézie na črevnú sliznicu, ale nie je jasné, či je to spôsobené zmenami v mikrobióme alebo v štruktúre hlienu [93].

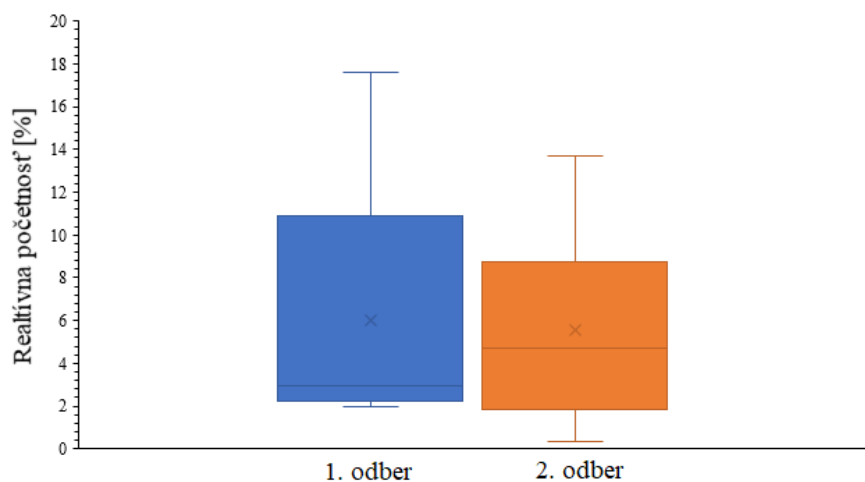
Pri oboch kombináciách bola pozorovaná vysoká variabilita relatívnej početnosti rodu *Bifidobacterium*, pred aj po skončení 14-dňovej intervencie. V zdravom črevnom mikrobióme by sa mal relatívny počet rodu *Bifidobacterium* pohybovať od 4 až 6 % v danej vekovej kategórii [93].

Pri kombinácii A bolo toto rozmedzie splnené počas 1. odberu, kde hodnota činila 4,6 %, ale pri druhom odbere táto hodnota bola iba 3,2 %. Dosahtnutie rozmedzia pri prvom odbere bolo spojené s nadmerným relatívnym zastúpením rodu *Bifidobacterium* u jedného účastníka, ktorý mal hodnotu až 18,7 %. Podľa relatívneho percentuálneho zastúpenia rodu *Bifidobacterium* bol pri kombinácii A zaznamenaný pokles o 1,36 %, ale rozdiel nebol potvrdený na štatisticky významnej hladine (p -hodnota > 0,05).



Obrázok 6: Porovnanie zastúpenia rodu *Bifidobacterium* pri konzumácii kombinácie A

Pri kombinácii B bolo stanovené rozmedzie splnené pri oboch odberoch, ale tiež to bolo spojené s vysokou distribúciou hodnôt, kedy až relatívne dvaja účastníci mali hodnotu vyššiu ako 14. Podľa relatívneho percentuálneho zastúpenia rodu *Bifidobacterium* bol pri kombinácii B zaznamenaný pokles o 0,42 %, ale tento malý rozdiel nebol potvrdený na štatisticky významnej hladine (p -hodnota > 0,05).

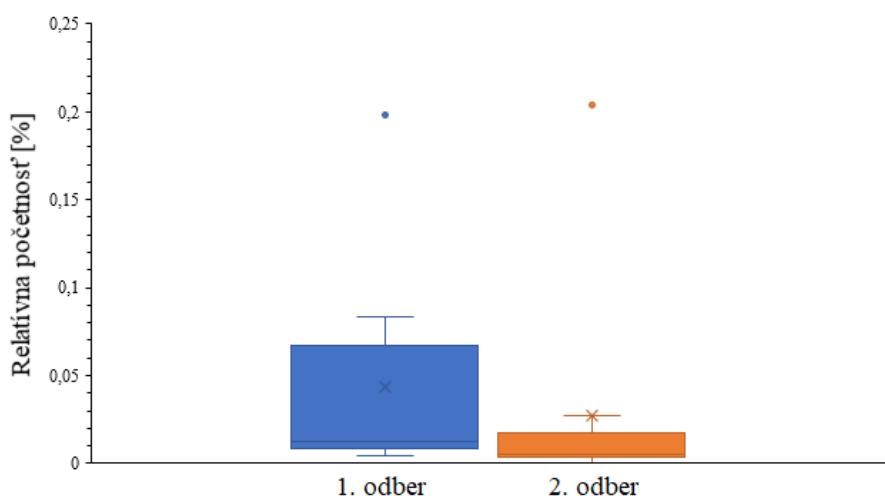


Obrázok 7: Porovnanie zastúpenia rodu *Bifidobacterium* pri konzumácii kombinácie B

4.3.2 Rod *Lactobacillus*

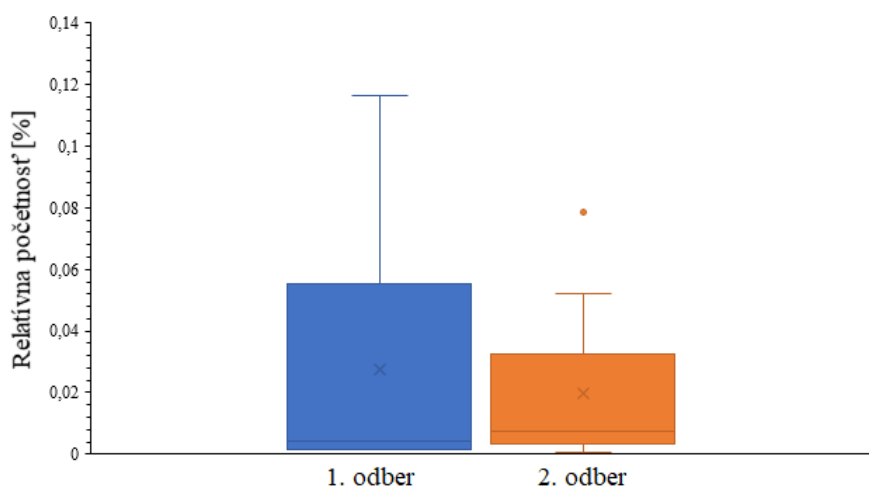
Baktérie rodu *Lactobacillus*, patriace do kmeňa *Firmicutes*, sú jedným z najbežnejšie používaných probiotických rodov v širokej škále zložiek potravy, pri prevencii chronických zápalových ochorení a zlepšovaní zdravia. U priemerne zdravého človeka by sa malo očakávať relatívna početnosť rodu *Lactobacillus* na úrovni 0,1 % [94].

V kombinácii A boli priemerné hodnoty relatívnej početnosti rodu *Lactobacillus* pri prvom odbere na úrovni $0,043 \pm 0,06$ % a pri druhom odbere na úrovni $0,027 \pm 0,06$ %. Vysoké odchýlky sú spôsobené vysokou variabilitou relatívnej početnosti rodu *Lactobacillus* u účastníkov, čo môže vidieť na Obrázku 8, kde pri oboch odberoch bola zaznamenaná vysoká hodnota u jedného z účastníkov.



Obrázok 8: Porovnanie zastúpenia rodu *Lactobacillus* pri konzumácii kombinácie A

Pri kombinácii B boli výsledky ďaleko pod touto úrovňou, pričom iba jeden účastník sa dokázal priblížiť k tejto hranici a to hodnotou 0,116 %. Pri prvom odbere bola priemerná hodnota relatívnej početnosti rodu *Lactobacillus* na úrovni $0,027 \pm 0,04$ % a pri druhom odbere na úrovni $0,019 \pm 0,03$ %. Vysoké odchýlky sú spôsobené vysokou variabilitou relatívnej početnosti rodu *Lactobacillus* u účastníkov.



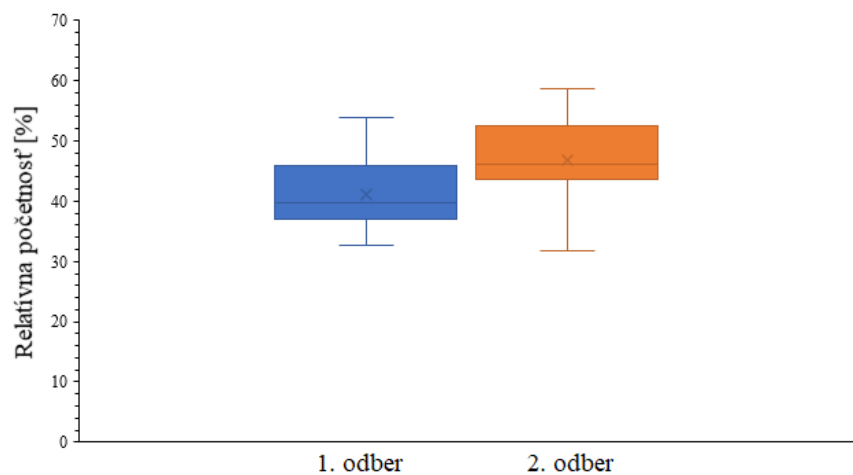
Obrázok 9: Porovnanie zastúpenia rodu *Lactobacillus* pri konzumácii kombinácie B

Pri porovnaní vstupných a výstupných odberov oboch kombinácií nebol taktiež pozorovaný štatisticky významný rozdiel (p -hodnota $> 0,05$) aj keď percentuálne zastúpenie naznačovalo zníženie rodu *Lactobacillus*, u kombinácie A o 0,016 % a u kombinácie B o 0,008 %.

4.3.3 Kmeň *Firmicutes*

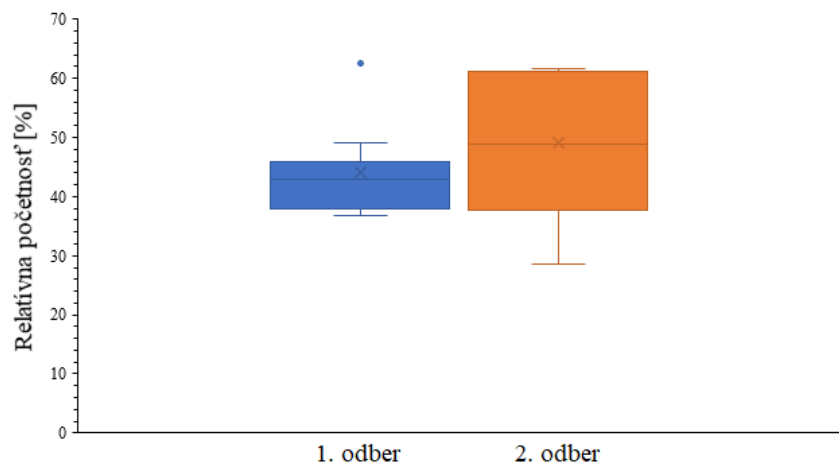
Kmeň *Firmicutes* tvorí najväčšiu časť ľudského črevného mikrobiómu, pričom má dôležitú úlohu pri degradácii komplexných sacharidov rastlinného pôvodu a pozitívne koreluje s príjmom tuku [95].

V zdravom črevnom mikrobióme by mal tento kmeň dominovať, pričom jeho relatívna početnosť by sa mala pohybovať do 50 % [5]. V prípade kombinácie A bola priemerná relatívna početnosť tohto kmeňa pri prvom odbere na úrovni $41,20 \pm 6,2$ % a pri druhom odbere $46,75 \pm 7,2$ %. Z výsledkov bol zaznamenaný rast o 5,55 % pri kombinácii A, ale tento rozdiel nebol potvrdený na štatisticky významnej hladine (p -hodnota $> 0,05$).



Obrázok 10: Porovnanie zastúpenia kmeňa *Firmicutes* pri konzumácii kombinácie A

Pri kombinácii B bola relatívna početnosť kmeňa *Firmicutes* pri prvom odbere dosiahla hodnoty $43,98 \pm 7,6$ %, pri druhom odbere bola zaznamenaná hodnota $49,04 \pm 11,9$ %. Nárast o 5,06 % priemernej relatívnej početnosti kmeňa *Firmicutes* pri kombinácii B, nebol taktiež potvrdený na štatisticky významnej hladine (p -hodnota $> 0,05$).



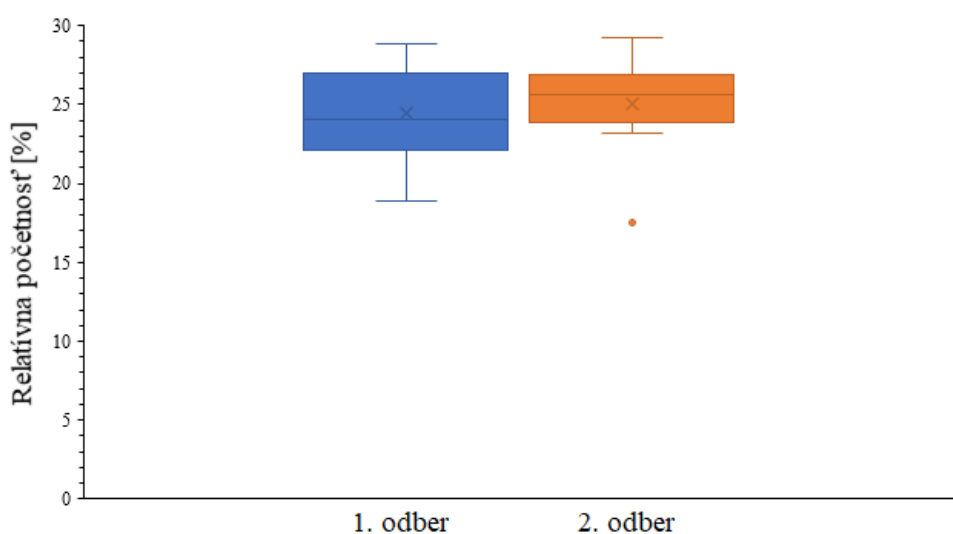
Obrázok 11: Porovnanie zastúpenia kmeňa *Firmicutes* pri konzumácii kombinácie B

4.3.4 Kmeň *Bacteroidetes*

Kmeň *Bacteroidetes*, patrí medzi najviac zastúpené kmene ľudského črevného mikrobiómu a je pozitívne spájaný s konzumáciou ovocia a zeleniny, ale negatívne s príjmom tuku ako podielom celkovej energie.

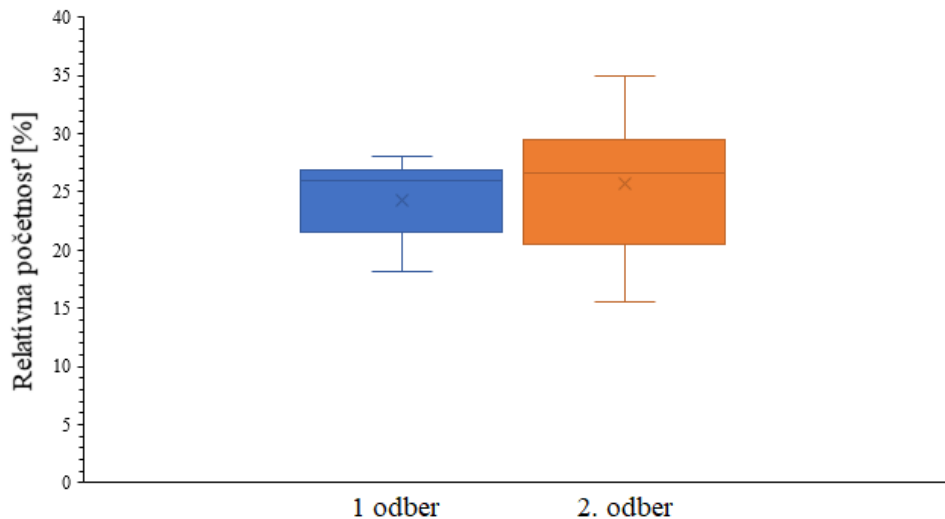
V zdravom črevnom mikrobióme by mal byť tento kmeň druhým najzastúpanejším, pričom jeho relatívna hojnosť by sa mala pohybovať do 40 % [5].

Pri kombinácii A bola priemerná hodnota oveľa nižšia ako stanovená hodnota, u prvého odberu činila $24,42 \pm 3,2$ % a u druhého odberu bola $25,04 \pm 3,2$ %. Nízke dosiahnuté hodnoty u účastníkov pri oboch odberoch boli pravdepodobne spôsobené nedostatkom ovocia a zeleniny v strave, na základe čoho bol zaznamenaný mierny rast kmeňa *Bacteroidetes* po intervencii ovocno-zeleninovým smoothie, ktorý pri kombinácii A činil 0,62 %, ale tento rozdiel nebol dosiahnutý na štatisticky významnej hladine (p -hodnota $> 0,05$).



Obrázok 12: Porovnanie zastúpenia kmeňa *Bacteroidetes* pri konzumácii kombinácie A

V prípade kombinácie B boli hodnoty odberov na podobných úrovniach, pri prvom odbere bola hodnota priemernej relatívnej početnosti kmeňa *Bacteroidetes* $24,24 \pm 3,4$ % a po druhom odbere sa táto hodnota pozitívne posunula na $25,68 \pm 5,7$ %, čo znamená nárast o 1,44 %. Bohužiaľ ani tento pozitívny rozdiel nebol zaznamenaný na štatisticky významnej hladine (p -hodnota $> 0,05$).

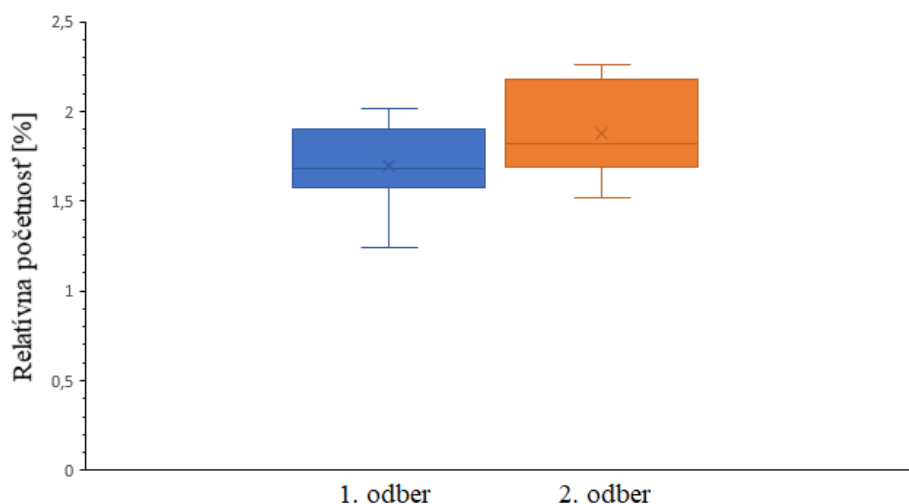


Obrázok 13: Porovnanie zastúpenia kmeňa *Bacteroidetes* pri konzumácii kombinácie B

4.3.5 Pomer *Firmicutes* ku *Bacteroidetes*

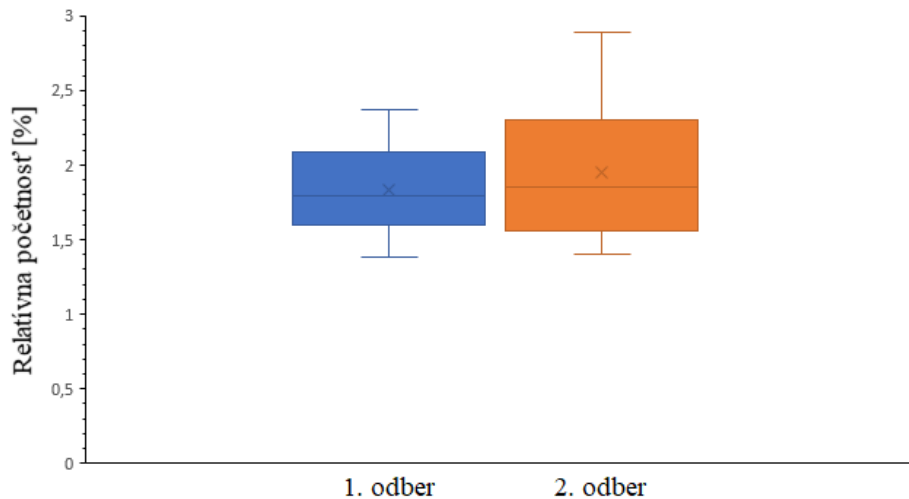
Pomer *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* sa všeobecne považuje za významne dôležitý v zložení ľudského črevného mikrobiómu a podlieha nárastu od narodenia do dospelosti, pričom s pribúdajúcim vekom sa ďalej mení. Zvýšený pomer je pozorovaný u obéznych alebo vysoko fyzicky aktívnych jedincov, pričom dopad týchto individuálnych rozdielov nie je známy. U zdravého jedinca s priemernou pohybovou aktivitou by sa tento pomer mal pohybovať v rozmedzí od 1,25 do 1,65 [96].

V ani jednej skupine účastníkov nebol žiadny vysoko aktívny športovec, preto je možné vychádzať zo stanoveného pomeru. V prípade kombinácie A bola hodnota pomeru $1,70 \pm 0,2$ pri prvom odbere a v druhom odbere pomer činil $1,88 \pm 0,3$, čo znamená nárast o 9,57 %. Pri kombinácii A možno sledovať nárast pomeru, vzhľadom k tomu, že bol sledovaný oveľa vyšší nárast kmeňa *Firmicutes* ako kmeňa *Bacteroidetes*.



Obrázok 14: Porovnanie zastúpenia pomeru kmeňov *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* pri konzumácii kombinácie A

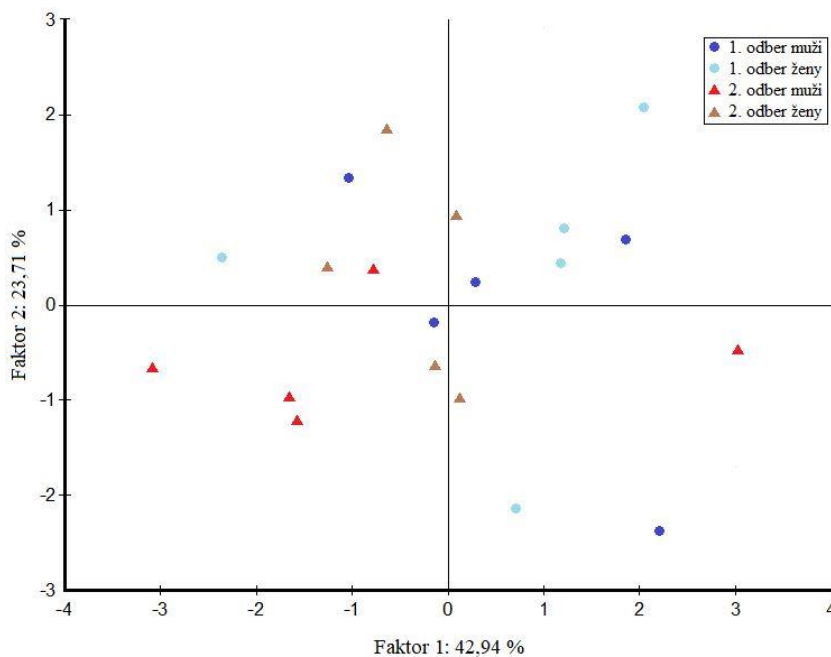
U kombinácie B bola hodnota pomeru kmeňov *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* $1,83 \pm 0,3$ pri prvom odbere a v prípade druhého odberu $1,95 \pm 0,5$, čo znamená nárast o 6,15 %. Nižšie percento nárastu bolo spôsobené nižším nárastom kmeňa *Firmicutes* a o niečo vyšším nárastom kmeňa *Bacteroidetes*. Výsledky porovnania vstupného a výstupného odberu pomerov kmeňov u oboch kombinácií neboli preukázateľné na štatisticky významnej hladine (p-hodnota > 0,05).

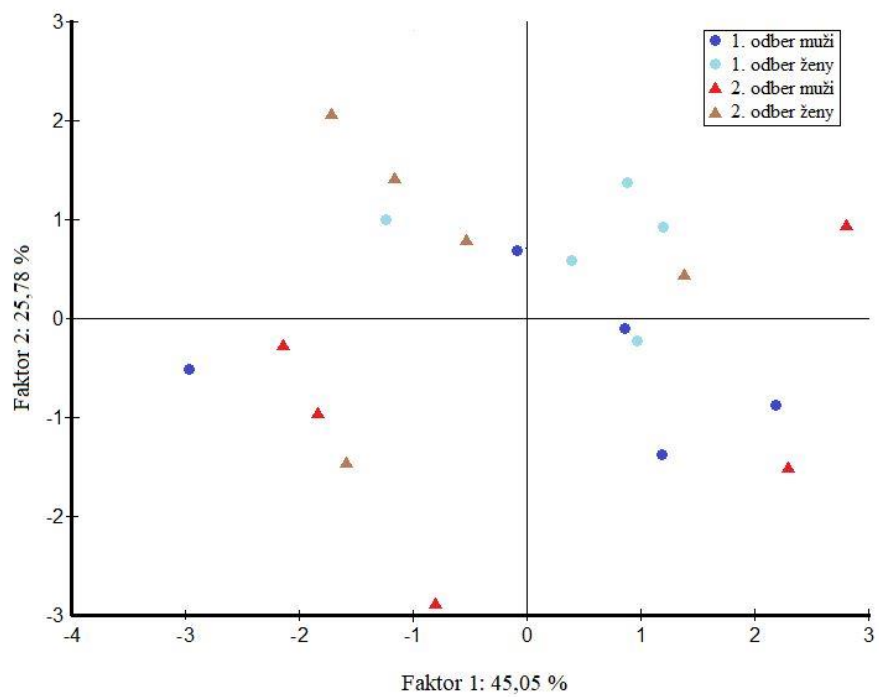


Obrázok 15: Porovnanie zastúpenia pomeru kmeňov *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* pri konzumácii kombinácie B

4.3.6 Analýza hlavných komponentov – PCA

Do analýzy hlavných komponentov (PCA) boli zahrnuté všetky pozorované bakteriálne kmene a rody vzoriek jednotlivých kombinácií, pričom bola pridaná premenná pohlavie. Na obrázkoch 16 a 17 nie je možné vidieť rovnomerné rozdelenie skupín na prvý a druhý odber, na základe čoho bolo možné preukázať štatisticky nevýznamný rozdiel v testovaných skupinách.





Obrázok 17: Výsledok PCA pri kombinácii B na určenie vzťahu medzi prvým a druhým odberom

5 DISKUSIA

Dosiahnuté výsledky poskytujú pohľad na vplyv konzumácie ovocno-zeleninového smoothie na zmeny v črevnom mikrobióme u dvoch skupín účastníkov. Kombinácia A, ktorá bola potenciálne bohatá na polyfenoly, nepreukázala žiadny štatisticky významný rozdiel na zmenu črevného mikrobiómu počas 14-dňovej intervencie, čo je v rozpore s niekoľkými výsledkami štúdií. Aj keď bolo zaznamenané mierne zvýšenie kmeňa *Bacteroidetes* o 0,62 %, rozdiel nebol preukázateľný na štatisticky významnej hladine. Prospešné vlastnosti polyfenolov na črevný mikrobióm sú popísané v teoretickej časti diplomovej práce. Očakávané zmeny v črevnom mikrobióme účinkom polyfenolov bolo na základe štúdie, kde iba 5-10 % celkových polyfenolov sa absorbuje priamo cez žalúdok a tenké črevo, preto väčšina pozitívnych polyfenolov sa dostane do hrubého čreva, kde sú metabolizované baktériami [97]. Analýza štúdií jednotlivých zložiek kombinácie A je taktiež v rozpore s nasledujúcimi štúdiami. V kontrolovanej klinickej štúdií Lima a kol. konzumácia pomarančovej šťavy jedenkrát denne, po dobu 60 dní, zvýšila populáciu *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.* oproti kontrolnej skupine [98]. Štúdia Duque a kol. pomocou simulátora ľudského črevného mikrobiómu potvrdila tieto výsledky, pretože taktiež pozorovali nárast populácie *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.*, ale iba po 14 dňoch príjmu pomarančovej šťavy, čo naznačovalo, že pomarančová šťava má selektívny a prebiotický účinok na črevný mikrobióm [99]. Kurkumín, jeden z hlavných kurkuminoidov obsiahnutých v kurkume, sa prednostne akumuluje v gastrointestinálnom trakte po perorálnom podaní, preto sa predpokladá, že môže uplatniť svoj regulačný účinok moduláciou mikrobiálnej hojnosti, rozmanitosti a zloženia črevného mikrobiómu. Výskum Perona a kol. potvrdil intestinálnu absorpciu zložiek kurkumy a metabolickú aktivitu črevného mikrobiómu po konzumácii sušeného štandardizovaného extraktu kurkumy po dobu 28 dní [100]. Výsledky Peterson a kol. taktiež potvrdili vplyv kurkumy na črevný mikrobióm, kde došlo k priemernému nárastu o 69 % detegovaných bakteriálnych druhov, oproti kontrolnej skupine, po užívaní tabliet s extraktom kurkumy a piperínom po dobu 8 týždňov [101]. Štúdie na laboratórnych zvieratách, najmä hlodavcoch, rovnako potvrdzujú pozitívny účinok kurkumy na črevný mikrobióm, konkrétne bolo zaznamenané signifikantné zvýšenie zastúpenia rodov *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, a zároveň zníženie počtu patogénnych baktérií [102]. Výskumná skupina Wanga a kol. potvrdila vyššiu hladinu rodu *Bacteroidetes* v porovnaní s kontrolnou skupinou pri užívaní závorovej šťavy počas 7 dní a ďalšie pozitívne korelácie v zložení črevného mikrobiómu [103]. Pri simulačnom modeli črevného mikrobiómu *in vitro* bolo pozorované významné zvýšenie zastúpenia rodu *Bifidobacterium* [104]. Nedostatočne preukázateľné výsledky v kombinácii A mohli byť ovplyvnené absenciou piperínu, alkaloidu čierneho korenia, ktorý významne zvyšuje biologickú dostupnosť kurkumínu [105].

Kombinácia B s typicky prebiotickými plodinami, taktiež nepreukázala štatisticky významné rozdiely po 14-dňovej intervencii, ale určité rozdiely boli sledované. Jablko so šupou, ako hlavná plodina kombinácie B, má nielen prebiotické vlastnosti vďaka jablčnému pektínu, ale podľa Wasserman a spol. aj probiotické vlastnosti, pretože jedno jablko celkovo obsahovalo asi 100 miliónov baktérií, čo naznačuje vplyv na črevný mikrobióm [106]. Pri konzumácii kombinácie B, došlo k pozitívnej zmene pri kmeni *Bacteroidetes*, ale nie na štatisticky významnej hladine. Štúdia skúmajúca účinky jablka na ľudský črevný mikrobióm,

pri konzumácii 2 jablák denne počas 14 dní, významne zvýšila rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, čo je taktiež v rozpore s dosiahnutými výsledkami [107]. Pri štúdií extraktu z mrkvy *in vitro* pomocou simulátoru ľudského črevného mikrobiómu potvrdili rast niekoľkých prospešných baktérií, ale tieto výsledky nemôžeme interpretovať na ľudí [108]. Mrkva obsahuje vitamín A, ktorý sprostredkováva rovnováhu medzi imunitným systémom a črevnými baktériami, preto sa tiež javí ako kandidát na ovplyvnenie zloženia črevného mikrobiómu, ale toto tvrdenie bolo preukázané iba na myšiach, preto sú potrebné ďalšie štúdie [60]. Flavonoidy obsiahnuté v citrónovej šťave by mali viesť k zmenám v črevnom mikrobióme, ale ich obsah v kombinácii B bol neznámy, preto nemôžeme usúdiť, aký veľký vplyv by mal byť dosiahnutý. Štúdie vplyvu flavonoidov na ľuďoch, obsiahnutých v citrusových plodoch, sú dostupné iba v spomínaných štúdiách o pomarančových šťavách, kde ale bol taktiež neznámy obsah flavonoidov.

Vyšší príjem ovocia a zeleniny je spájaný so zvýšením hojnosti črevného mikrobiómu [59]. Efekt krátkodobej intervencie trvajúcej 2 týždne podľa výskumov nemusí stačiť na ovplyvnenie zloženia [109], čo sa potvrdilo aj v tomto prípade. Nedá sa presne predpokladať aká dlhá časová intervencia by bola správna, pretože zmeny môžu byť rýchle (do 24 hodín) pri dostatočne extrémnom zásahu do stravovania [110]. Aj keď bol zaznamenaný mierny pokles bakteriálnych rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, bez štatisticky významnej hladiny, môže to odrážať šokové účinky relatívne rýchlej zmeny v spektre prichádzajúcich živín, čo môže prechodne narušiť črevný mikrobióm. Účastníci pred experimentom nemali vo svojej strave dostatok vlákniny a fytochemikálií, preto mohol nastať tento stresový stav, ktorý zapríčinil štatisticky nevýznamné rozdiely. Rozsah, v akom črevný mikrobióm reaguje na zásahy v strave sa u jednotlivých osôb líši, preto niektorí účastníci zaznamenali väčšie zmeny ako ostatní.

U oboch kombinácií boli pozorované hodnoty BMI nad 25, pred aj po intervenciách, čo sa dá klasifikovať ako mierna nadváha. Väčšina štúdií zaznamenala, že pomer *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* je významne vyšší u obéznych jedincov alebo u vysoko fyzicky aktívnych jedincov. Toto tvrdenie bolo potvrdené aj dosiahnutými výsledkami, kde pri oboch kombináciách a zároveň oboch odberoch, vzájomné pomery prevyšovali definované rozmedzie u zdravých jedincov, pričom skupiny neobsahovali vysoko aktívnych športovcov.

Štúdie, ale poskytujú ťažko porovnateľné údaje, pretože používajú rôzne dávky, formulácie a iné súbory jedincov. Ako limitáciu experimentu možno považovať vysokú interindividuálnu variabilitu črevného mikrobiómu, pretože každý jedinec má špecifický črevný mikrobióm, ktorý je ovplyvnený množstvom špecifických a nešpecifických faktorov, preto je nemožné dosiahnuť ľudský homogénny súbor jedincov.

Ďalšou limitáciou by mohla byť malá vzorka ľudí ($n = 10$) pri oboch kombináciách, pretože existuje veľké množstvo rozdielov medzi jednotlivcami, ktoré nie sú riadené stravou. Minimalizovať vplyv interindividuálnej variability by bolo možné zvýšením počtu účastníkov zapojených do experimentu.

Vplyv konvenčne alebo organicky pestovaných plodín možno považovať tiež za limitáciu aj keď štúdie nenaznačujú, že organicky pestované plodiny by mali odlišný výživový profil, ale mali by nižšiu expozíciu pesticídmi, ktoré majú preukázateľne negatívny efekt na črevný mikrobióm [106].

6 ZÁVER

V experimentálnej časti diplomovej práce bol overený vplyv konzumácie vybraných typov potravín na kompozíciu črevného mikrobiómu. Cieľom bolo porovnať bakteriálne zastúpenie kmeňov *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* pred a po 14-dňovej intervencii, pozostávajúcej z konzumácie vybraných typov potravín, ktoré boli rozdelené do dvoch kombinácií. Zvolenou metódou úpravy potravín bolo smoothie, ktoré si získava stále väčšiu popularitu a živiny mohli byť rovnomerne roz distribuované. Pri návrhu témy bolo vychádzané z aktuálnych poznatkov štúdií, ktorých výsledky potvrdzovali vplyv konzumácie ovocia a zeleniny na kompozíciu črevného mikrobiómu. Výsledky diplomovej práce, ale preukázali, že 14-dňová intervencia ovocno-zeleninovým smoothie viedla k určitým zmenám v črevnom mikrobióme u výskumnej vzorky, ale rozdiely neboli potvrdené na štatisticky významnej hladine (p -hodnota $> 0,05$).

Vplyv rôznych typov potravín na zloženie črevného mikrobiómu z pohľadu ľudských *in vivo* štúdií je pomerne málo preskúmaná oblasť. Sú potrebné ďalšie štúdie na ľuďoch, ktoré by zohľadňovali viaceré faktory vplývajúce na zloženie črevného mikrobiómu s cieľom lepšie preskúmať vzťah medzi potravinami a mikrobiómom. Umožnilo by to lepšie pochopiť zložité interakcie medzi črevným mikrobiómom a zložkami stravy, čo by poskytlo lepšie pochopenie terapeutických účinkov rôznych potravín. V blízkej budúcnosti by rozsiahli výskum mohol umožniť definovať črevný mikrobióm ako biomarker mnohých ochorení a použitie rôznych typov potravín ako možných látok na liečbu črevnej dysbiózy a pridružených ochorení.

7 LITERATÚRA

- [1] KHO, Zhi Y. a Sunil K. LAL. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01835
- [2] CUI, Jiefen, Yunhe LIAN, Chengying ZHAO, Hengjun DU, Yanhui HAN, Wei GAO, Hang XIAO a Jinkai ZHENG. Dietary Fibers from Fruits and Vegetables and Their Health Benefits via Modulation of Gut Microbiota. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2019, 18(5), 1514-1532 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12489
- [3] RINNINELLA, Emanuele, Pauline RAOUL, Marco CINTONI, Francesco FRANCESCHI, Giacinto MIGGIANO, Antonio GASBARRINI a Maria MELE. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* [online]. 2019, 7(1). DOI: 10.3390/microorganisms7010014. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>
- [4] SHREINER, Andrew B., John Y. KAO a Vincent B. YOUNG. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology* [online]. 2015, 31(1), 69-75. DOI: 10.1097/MOG.000000000000139. ISSN 0267-1379. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001574-201501000-00012>
- [5] HALLER, Dirk, ed. *The Gut Microbiome in Health and Disease* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-90545-7. ISBN 978-3-319-90544-0.
- [6] BULL, Matthew a Nigel PLUMMER, 2014. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative Medicine* [online]. 13(6), 17-22. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566439/>
- [7] MOHAJERI, M. Hasan, Robert J. M. BRUMMER, Robert A. RASTALL, Rinse K. WEERSMA, Hermie J. M. HARMSSEN, Marijke FAAS a Manfred EGGERSDORFER. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition* [online]. 2018, 57(S1), 1-14. DOI: 10.1007/s00394-018-1703-4. ISSN 1436-6207. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-018-1703-4>
- [8] VALDES, Ana M, Jens WALTER, Eran SEGAL a Tim D SPECTOR. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* [online]. DOI: 10.1136/bmj.k2179. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.k2179>
- [9] BELKAID, Yasmine a Timothy W. HAND. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* [online]. 2014, 157(1), 121-141. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414003456>

- [10] TAKIISHI, Tatiana, Camila Ideli Morales FENERO a Niels Olsen Saraiva CÂMARA. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* [online]. 2017, 5(4). DOI: 10.1080/21688370.2017.1373208. ISSN 2168-8370. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21688370.2017.1373208>
- [11] BUNKER, Jeffrey J. a Albert BENDELAC. IgA Responses to Microbiota. *Immunity* [online]. 2018, 49(2), 211-224. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.08.011. ISSN 10747613. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318303510>
- [12] CARABOTTI, Marilia a Annunziata SCIROCCO, 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* [online]. 28(2), 203-209. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367209/>
- [13] GIAU, Vo, Si WU, Angelo JAMERLAN, Seong AN, SangYun KIM a John HULME. Gut Microbiota and Their Neuroinflammatory Implications in Alzheimer's Disease. *Nutrients* [online]. 2018, 10(11). DOI: 10.3390/nu10111765. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1765>
- [14] MARTIN, Clair R., Vadim OSADCHIY, Amir KALANI a Emeran A. MAYER. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2018, 6(2), 133-148. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003. ISSN 2352345X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352345X18300602>
- [15] OSADCHIY, Vadim, Clair R. MARTIN a Emeran A. MAYER. The Gut–Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2019, 17(2), 322-332. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.10.002. ISSN 15423565. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356518310814>
- [16] HASAN, Nihal a Hongyi YANG. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* [online]. 2019, 7. DOI: 10.7717/peerj.7502. ISSN 2167-8359. Dostupné z: <https://peerj.com/articles/7502>
- [17] CATANZARO, Jason R., Juliet D. STRAUSS, Agata BIELECKA, Anthony F. PORTO, Francis M. LOBO, Andrea URBAN, Whitman B. SCHOFIELD a Noah W. PALM. IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Scientific Reports* [online]. 2019, 9(1). DOI: 10.1038/s41598-019-49923-2. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-49923-2>
- [18] LIU, Shirong, Andre Pires DA CUNHA, Rafael M. REZENDE, et al. The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host & Microbe* [online]. 2016, 19(1), 32-43. DOI: 10.1016/j.chom.2015.12.005. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312815004977>

- [19] ISHIGURO, Edward, Natasha HASKEY a Kristina CAMPBELL, 2018. *GUT MICROBIOTA Interactive Effects On Nutrition And Health*. 1. Academic Press. ISBN 978-0128105412.
- [20] RUTAYISIRE, Erigene, Xiaoyan WU, Kun HUANG, Shuman TAO, Yunxiao CHEN a Fangbiao TAO. Cesarean section may increase the risk of both overweight and obesity in preschool children. *BMC Pregnancy and Childbirth* [online]. 2016, 16(1). DOI: 10.1186/s12884-016-1131-5. ISSN 1471-2393. Dostupné z: <http://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-016-1131-5>
- [21] PORTELA, Daniel S, Tatiana O VIEIRA, Sheila MA MATOS, Nelson F DE OLIVEIRA a Graciete O VIEIRA. Maternal obesity, environmental factors, cesarean delivery and breastfeeding as determinants of overweight and obesity in children: results from a cohort. *BMC Pregnancy and Childbirth* [online]. 2015, 15(1). DOI: 10.1186/s12884-015-0518-z. ISSN 1471-2393. Dostupné z: <http://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-015-0518-z>
- [22] FLEMMING, K., C. G. WOOLCOTT, A. C. ALLEN, P. J. VEUGELERS a S. KUHLE. The association between caesarean section and childhood obesity revisited: a cohort study. *Archives of Disease in Childhood* [online]. 2013, 98(7), 526-532. DOI: 10.1136/archdischild-2012-303459. ISSN 0003-9888. Dostupné z: <http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/archdischild-2012-303459>
- [23] PEI, Zhengcun, Joachim HEINRICH, Elaine FUERTES, et al. Cesarean Delivery and Risk of Childhood Obesity. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2014, 164(5), 1068-1073.e2. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.12.044. ISSN 00223476. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347613015904>
- [24] WEN, Li a Andrew DUFFY. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *The Journal of Nutrition* [online]. 2017, 147(7), 1468S-1475S. DOI: 10.3945/jn.116.240754. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/147/7/1468S-1475S/4743654>
- [25] GOODRICH, Julia K., Jillian L. WATERS, Angela C. POOLE, et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* [online]. 2014, 159(4), 789-799. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.053. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012410>
- [26] REDONDO-USEROS, Noemí, Esther NOVA, Natalia GONZÁLEZ-ZANCADA, Ligia E. DÍAZ, Sonia GÓMEZ-MARTÍNEZ a Ascensión MARCOS. Microbiota and Lifestyle: A Special Focus on Diet. *Nutrients* [online]. 2020, 12(6). ISSN 2072-6643. Dostupné z: [doi:10.3390/nu12061776](https://doi.org/10.3390/nu12061776)
- [27] GUPTA, Vinod K., Sandip PAUL a Chitra DUTTA. Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8. ISSN 1664-302X. Dostupné z: [doi:10.3389/fmicb.2017.01162](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162)

- [28] DUBOIS, Geneviève, Catherine GIRARD, François-Joseph LAPOINTE a B. Jesse SHAPIRO. The Inuit gut microbiome is dynamic over time and shaped by traditional foods. *Microbiome* [online]. 2017, 5(1). ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-017-0370-7
- [29] GIRARD, Catherine, Nicolas TROMAS, Marc AMYOT, B. Jesse SHAPIRO a Rosa KRAJMALNIK-BROWN. Gut Microbiome of the Canadian Arctic Inuit. *MSphere* [online]. 2017, 2(1), mSphere.00297-16. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00297-16
- [30] ZIMMERMANN, Michael, Maria ZIMMERMANN-KOGADEEVA, Rebekka WEGMANN a Andrew L. GOODMAN. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* [online]. 2019, 570(7762), 462-467. DOI: 10.1038/s41586-019-1291-3. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1291-3>
- [31] MAIER, Lisa, Mihaela PRUTEANU, Michael KUHN, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* [online]. 2018, 555(7698), 623-628. DOI: 10.1038/nature25979. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature25979>
- [32] SOVIJÄRVI, Olli, Teemu ARINA a Jaakko HALMETOJA, 2019. *Biohacker's Handbook: Upgrade Yourself and Unleash Your Inner Potential*. 2. Biohacker Center. ISBN 978-9527241165.
- [33] TANNOCK, Gerald W., ed. *Understanding the Gut Microbiota* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2017. DOI: 10.1002/9781118801413. ISBN 9781118801413.
- [34] MACH, Núria a Dolors FUSTER-BOTELLA. Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Journal of Sport and Health Science* [online]. 2017, 6(2), 179-197. DOI: 10.1016/j.jshs.2016.05.001. ISSN 20952546. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095254616300163>
- [35] CLARKE, Siobhan F, Eileen F MURPHY, Orla O'SULLIVAN, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* [online]. 2014, 63(12), 1913-1920. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306541. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-306541>
- [36] BRESSA, Carlo, María BAILÉN-ANDRINO, Jennifer PÉREZ-SANTIAGO, et al. Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0171352. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171352>
- [37] ESTAKI, Mehrbod, Jason PITHER, Peter BAUMEISTER, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* [online]. 2016, 4(1). DOI: 10.1186/s40168-016-0189-7. ISSN 2049-2618. Dostupné z: <http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-016-0189-7>

- [38] SMITH, Robert P., Cole EASSON, Sarah M. LYLE, et al. Gut microbiome diversity is associated with sleep physiology in humans. *PLOS ONE* [online]. 2019, 14(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0222394. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0222394>
- [39] VOIGT, Robin M., Christopher B. FORSYTH, Stefan J. GREEN, et al. Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0097500. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0097500>
- [40] FOSTER, Jane A., Linda RINAMAN a John F. CRYAN. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of Stress* [online]. 2017, 7, 124-136. DOI: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001. ISSN 23522895. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352289516300509>
- [41] CLAUS, Sandrine P, Hervé GUILLOU a Sandrine ELLERO-SIMATOS. Erratum: The gut microbiota. *Npj Biofilms and Microbiomes* [online]. 2017, 3(1). DOI: 10.1038/npjbiofilms.2017.1. ISSN 2055-5008. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/npjbiofilms20171>
- [42] SINGH, Rasnik K., Hsin-Wen CHANG, Di YAN, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2017, 15(1). DOI: 10.1186/s12967-017-1175-y. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1175-y>
- [43] ZHAO, Jianfei, Xiaoya ZHANG, Hongbin LIU, Michael A. BROWN a Shiyang QIAO. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Current Protein & Peptide Science* [online]. 2018, 20(2), 145-154. ISSN 13892037. Dostupné z: doi:10.2174/1389203719666180514145437
- [44] SCOTT, Karen P., Silvia W. GRATZ, Paul O. SHERIDAN, Harry J. FLINT a Sylvia H. DUNCAN. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research* [online]. 2013, 69(1), 52-60. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.10.020. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661812002071>
- [45] SCHOELER, Marc a Robert CAESAR. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [online]. 2019, 20(4), 461-472. ISSN 1389-9155. Dostupné z: doi:10.1007/s11154-019-09512-0
- [46] CONLON, Michael a Anthony BIRD. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* [online]. 2015, 7(1), 17-44. DOI: 10.3390/nu7010017. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/1/17>
- [47] SEO, Ye Seul, Hye-Bin LEE, Yoonsook KIM a Ho-Young PARK. Dietary Carbohydrate Constituents Related to Gut Dysbiosis and Health. *Microorganisms* [online]. 2020, 8(3). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8030427

- [48] HOLSCHER, Hannah D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* [online]. 2017, 8(2), 172-184. DOI: 10.1080/19490976.2017.1290756. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2017.1290756>
- [49] HENNING, Susanne M., Jieping YANG, Paul SHAO, et al. Health benefit of vegetable/fruit juice-based diet: Role of microbiome. *Scientific Reports* [online]. 2017, 7(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-02200-6
- [50] HYLAND, Niall a Catherine STANTON, 2016. *The Gut-Brain Axis*. 1. Academic Press. ISBN 9780128025444.
- [51] MIQDADY, Mohamad, Jihad AL MISTARIHI, Amer AZAZ a David RAWAT. Prebiotics in the Infant Microbiome: The Past, Present, and Future. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* [online]. 2020, 23(1). DOI: 10.5223/pghn.2020.23.1.1. ISSN 2234-8646. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5223/pghn.2020.23.1.1>
- [52] WATSON, Ronald a Victor PREEDY, 2016. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. 1. Academic Press. ISBN 978-0-12-802189-7.
- [53] HEMARAJATA, Peera a James VERSALOVIC. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* [online]. 2012, 6(1), 39-51. DOI: 10.1177/1756283X12459294. ISSN 1756-283X. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756283X12459294>
- [54] WOSINSKA, Laura, Paul D. COTTER, Orla O'SULLIVAN a Caitriona GUINANE. The Potential Impact of Probiotics on the Gut Microbiome of Athletes. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10). DOI: 10.3390/nu11102270. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2270>
- [55] MOCANU, Gabriel-Danut a Elisabeta BOTEZ. Milk and Dairy Products: Vectors to Create Probiotic Products. RIGOBELLO, Everlon, ed. *Probiotics* [online]. InTech, 2012, 2012-10-03 [cit. 2021-5-6]. ISBN 978-953-51-0776-7. Dostupné z: doi:10.5772/50044
- [56] KAWABATA, Kyuichi, Yasukiyo YOSHIOKA a Junji TERAOKA. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* [online]. 2019, 24(2). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24020370
- [57] CHOI, Yoon Jin, Dong Ho LEE, Hyun Soo KIM a Yoon-Keun KIM. An exploratory study on the effect of daily fruits and vegetable juice on human gut microbiota. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2018, 27(5), 1377-1386. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-018-0372-7
- [58] PEI, Ruisong, Xiaocao LIU a Bradley BOLLING. Flavonoids and gut health. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2020, 61, 153-159. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2019.12.018

- [59] KLINDER, Annett, Qing SHEN, Susanne HEPPEL, Julie A. LOVEGROVE, Ian ROWLAND a Kieran M. TUOHY. Impact of increasing fruit and vegetables and flavonoid intake on the human gut microbiota. *Food & Function* [online]. 2016, 7(4), 1788-1796. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C5FO01096A
- [60] YANG, LIANG, BALAKRISHNAN, BELOBRAJDIC, FENG a ZHANG. Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients* [online]. 2020, 12(2). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12020381
- [61] LAUDISI, STOLFI a MONTELEONE. Impact of Food Additives on Gut Homeostasis. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11102334
- [62] CAO, Yu, Hongli LIU, Ningbo QIN, Xiaomeng REN, Beiwei ZHU a Xiaodong XIA. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 99, 295-310. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.03.006
- [63] NOLDE, Janis Marc, Jana LAUPENMÜHLEN, Arkan AL-ZUBAIDI, Marcus HELDMANN, Thomas F. MÜNTE, Kamila JAUCH-CHARA a Domenico TRICÒ. Endocrine responses and food intake in fasted individuals under the influence of glucose ingestion. *PLOS ONE* [online]. 2019, 14(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0211514. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0211514>
- [64] ALIREZAEI, Mehrdad, Christopher C. KEMBALL, Claudia T. FLYNN, Malcolm R. WOOD, J. Lindsay WHITTON a William B. KIOSSES. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* [online]. 2014, 6(6), 702-710. DOI: 10.4161/auto.6.6.12376. ISSN 1554-8627. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.6.6.12376>
- [65] PATTERSON, Ruth E., Gail A. LAUGHLIN, Andrea Z. LACROIX, et al. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* [online]. 2015, 115(8), 1203-1212. DOI: 10.1016/j.jand.2015.02.018. ISSN 22122672. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212267215002051>
- [66] LAND, Siim, 2019. *Metabolic Autophagy* [online]. 1. nezávisle. ISBN 9781790686391.
- [67] KUL, Seval, Esen SAVAŞ, Zeynel Abidin ÖZTÜRK a Güldam KARADAĞ. Does Ramadan Fasting Alter Body Weight and Blood Lipids and Fasting Blood Glucose in a Healthy Population? A Meta-analysis. *Journal of Religion and Health* [online]. 2014, 53(3), 929-942. DOI: 10.1007/s10943-013-9687-0. ISSN 0022-4197. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10943-013-9687-0>
- [68] KARAKAN, Tarkan. Intermittent fasting and gut microbiota. *The Turkish Journal of Gastroenterology* [online]. 2020, 30(12), 1008-1008. DOI: 10.5152/tjg.2019.101219. ISSN 13004948. Dostupné z: turkjgastroenterol.org/en/intermittent-fasting-and-gut-microbiota-135838
- [69] ZEB, Falak, Xiaoyue WU, Lijun CHEN, et al. Effect of time-restricted feeding on metabolic risk and circadian rhythm associated with gut microbiome in healthy

- males. *British Journal of Nutrition* [online]. 2020, 123(11), 1216-1226. DOI: 10.1017/S0007114519003428. ISSN 0007-1145. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114519003428/type/journal_article
- [70] PAOLI, Antonio. Ketogenic Diet for Obesity: Friend or Foe? *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2014, 11(2), 2092-2107. DOI: 10.3390/ijerph110202092. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/2/2092>
- [71] SHILPA, Joshi a Viswanathan MOHAN. Ketogenic diets: Boon or bane? *Indian Journal of Medical Research* [online]. 2018, 148(3). DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1666_18. ISSN 0971-5916. Dostupné z: <http://www.ijmr.org.in/text.asp?2018/148/3/251/245289>
- [72] PAOLI, Antonio, Laura MANCINI, Antonino BIANCO, Ewan THOMAS, João Felipe MOTA a Fabio PICCINI. Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? *Genes* [online]. 2019, 10(7). DOI: 10.3390/genes10070534. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/7/534>
- [73] CABRERA-MULERO, Amanda, Alberto TINAHONES, Borja BANDERA, Isabel MORENO-INDIAS, Manuel MACÍAS-GONZÁLEZ a Francisco J. TINAHONES. Keto microbiota: A powerful contributor to host disease recovery. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* [online]. 2019, 20(4), 415-425. DOI: 10.1007/s11154-019-09518-8. ISSN 1389-9155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11154-019-09518-8>
- [74] MEDAWAR, Evelyn, Sebastian HUHNS, Arno VILLRINGER a A. VERONICA WITTE. The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review. *Translational Psychiatry* [online]. 2019, 9(1). DOI: 10.1038/s41398-019-0552-0. ISSN 2158-3188. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41398-019-0552-0>
- [75] APPLEBY, Paul N. a Timothy J. KEY. The long-term health of vegetarians and vegans. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 2016, 75(3), 287-293. DOI: 10.1017/S0029665115004334. ISSN 0029-6651. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665115004334/type/journal_article
- [76] WONG, Ming-Wun, Chih-Hsun YI, Tso-Tsai LIU, Wei-Yi LEI, Jui-Sheng HUNG, Chin-Lon LIN, Shinn-Zong LIN a Chien-Lin CHEN. Impact of vegan diets on gut microbiota: An update on the clinical implications. *Tzu Chi Medical Journal* [online]. 2018, 30(4). DOI: 10.4103/tcmj.tcmj_21_18. ISSN 1016-3190. Dostupné z: <http://www.tcmjmed.com/text.asp?2018/30/4/200/232610>
- [77] TOMOVA, Aleksandra, Igor BUKOVSKY, Emilie REMBERT, Willy YONAS, Jihad ALWARITH, Neal D. BARNARD a Hana KAHLEOVA. The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition* [online]. 2019, 6. DOI: 10.3389/fnut.2019.00047. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2019.00047/full>

- [78] KLONOFF, David C. The Beneficial Effects of a Paleolithic Diet on Type 2 Diabetes and other Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Journal of Diabetes Science and Technology* [online]. 2009, 3(6), 1229-1233. DOI: 10.1177/193229680900300601. ISSN 1932-2968. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/193229680900300601>
- [79] MANHEIMER, Eric W, Esther J VAN ZUUREN, Zbys FEDOROWICZ a Hanno PIJL. Paleolithic nutrition for metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2015, 102(4), 922-932. DOI: 10.3945/ajcn.115.113613. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/102/4/922/4564680>
- [80] ZOPF, Yurdagül, Dejan RELJIC a Walburga DIETERICH. Dietary Effects on Microbiota—New Trends with Gluten-Free or Paleo Diet. *Medical Sciences* [online]. 2018, 6(4). DOI: 10.3390/medsci6040092. ISSN 2076-3271. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-3271/6/4/92>
- [81] GENONI, Angela, Claus T. CHRISTOPHERSEN, Johnny LO, Megan COGHLAN, Mary C. BOYCE, Anthony R. BIRD, Philippa LYONS-WALL a Amanda DEVINE. Long-term Paleolithic diet is associated with lower resistant starch intake, different gut microbiota composition and increased serum TMAO concentrations. *European Journal of Nutrition* [online]. DOI: 10.1007/s00394-019-02036-y. ISSN 1436-6207. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-019-02036-y>
- [82] BARONE, Monica, Silvia TURRONI, Simone RAMPELLI, et al. Gut microbiome response to a modern Paleolithic diet in a Western lifestyle context. *PLOS ONE* [online]. 2019, 14(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0220619. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220619>
- [83] LĂCĂTUȘU, Cristina-Mihaela, Elena-Daniela GRIGORESCU, Mariana FLORIA, Alina ONOFRIESCU a Bogdan-Mircea MIHAI. The Mediterranean Diet: From an Environment-Driven Food Culture to an Emerging Medical Prescription. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2019, 16(6). DOI: 10.3390/ijerph16060942. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/6/942>
- [84] DE FILIPPIS, Francesca, Nicoletta PELLEGRINI, Lucia VANNINI, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* [online]. 2016, 65(11), 1812-1821. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309957. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-309957>
- [85] GARCIA-MANTRANA, Izaskun, Marta SELMA-ROYO, Cristina ALCANTARA a María C. COLLADO. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00890. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00890/full>

- [86] GHOSH, Tarini Shankar, Simone RAMPELLI, Ian B JEFFERY, et al. Mediterranean diet intervention alters the gut microbiome in older people reducing frailty and improving health status: the NU-AGE 1-year dietary intervention across five European countries. *Gut* [online]. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319654. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2019-319654>
- [87] RINNINELLA, CINTONI, RAOUL, et al. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11102393
- [88] ALLABAND, Celeste, Daniel MCDONALD, Yoshiki VÁZQUEZ-BAEZA, et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2019, 17(2), 218-230. ISSN 15423565. Dostupné z: doi:10.1016/j.cgh.2018.09.017
- [89] Environmental Chemicals, the Human Microbiome, and Health Risk [online]. Washington, D.C: National Academies Press, 2018. ISBN 978-0-309-46869-5. Dostupné z: doi:10.17226/24960
- [90] SHANAHAN, Fergus. The host–microbe interface within the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* [online]. 2002, 16(6), 915-931. ISSN 15216918. Dostupné z: doi:10.1053/bega.2002.0342
- [91] ASHAMMAKHI, Nureddin, Rohollah NASIRI, Natan Roberto de BARROS, et al. Gut-on-a-chip: Current progress and future opportunities. *Biomaterials* [online]. 2020, 255. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120196
- [92] SARANGI, Aditya N., Amit GOEL a Rakesh AGGARWAL. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* [online]. 2019, 9(1), 62-73. ISSN 09736883. Dostupné z: doi:10.1016/j.jceh.2018.04.016
- [93] ARBOLEYA, Silvia, Claire WATKINS, Catherine STANTON a R. Paul ROSS. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, 7 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01204
- [94] GHOSH, Tarini Shankar, Jerome ARNOUX a Paul W. O'TOOLE. Metagenomic analysis reveals distinct patterns of gut lactobacillus prevalence, abundance, and geographical variation in health and disease. *Gut Microbes* [online]. 2020, 12(1) [cit. 2021-5-6]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2020.1822729
- [95] DEERING, Kane E., Amanda DEVINE, Therese A. O'SULLIVAN, Johnny LO, Mary C. BOYCE a Claus T. CHRISTOPHERSEN. Characterizing the Composition of the Pediatric Gut Microbiome: A Systematic Review. *Nutrients* [online]. 2020, 12(1) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12010016
- [96] MAGNE, Fabien, Martin GOTTELAND, Lea GAUTHIER, Alejandra ZAZUETA, Susana PESOA, Paola NAVARRETE a Ramadass BALAMURUGAN. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients?

- Nutrients* [online]. 2020, **12**(5) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12051474
- [97] CARDONA, Fernando, Cristina ANDRÉS-LACUEVA, Sara TULIPANI, Francisco J. TINAHONES a María Isabel QUEIPO-ORTUÑO. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2013, **24**(8), 1415-1422 [cit. 2021-5-6]. ISSN 09552863. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnutbio.2013.05.001
- [98] LIMA, Ana Carolina Delgado, Clara CECATTI, Melaine Priscila FIDÉLIX, Maria Angela Tallarico ADORNO, Isabel Kimiko SAKAMOTO, Thais Borges CESAR a Katia SIVIERI. Effect of Daily Consumption of Orange Juice on the Levels of Blood Glucose, Lipids, and Gut Microbiota Metabolites: Controlled Clinical Trials. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2019, **22**(2), 202-210 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1096-620X. Dostupné z: doi:10.1089/jmf.2018.0080
- [99] DUQUE, Ana Luiza Rocha Faria, Magali MONTEIRO, Maria Angela Tallarico ADORNO, Isabel Kimiko SAKAMOTO a Katia SIVIERI. An exploratory study on the influence of orange juice on gut microbiota using a dynamic colonic model. *Food Research International* [online]. 2016, **84**, 160-169 [cit. 2021-5-6]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2016.03.028
- [100] PERON, Gregorio, Stefania SUT, Simone DAL BEN, Dario VOINOVICH a Stefano DALL'ACQUA. Untargeted UPLC-MS metabolomics reveals multiple changes of urine composition in healthy adult volunteers after consumption of curcuma longa L. extract. *Food Research International* [online]. 2020, 127 [cit. 2021-5-6]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2019.108730
- [101] PETERSON, Christine T., Alexandra R. VAUGHN, Vandana SHARMA, Deepak CHOPRA, Paul J. MILLS, Scott N. PETERSON a Raja K. SIVAMANI. Effects of Turmeric and Curcumin Dietary Supplementation on Human Gut Microbiota: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* [online]. 2018, 23 [cit. 2021-5-6]. ISSN 2515-690X. Dostupné z: doi:10.1177/2515690X18790725
- [102] SHEN, Liang, Lu LIU a Hong-Fang JI. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. *Food & Nutrition Research* [online]. 2017, 61(1) [cit. 2021-5-6]. ISSN 1654-6628. Dostupné z: doi:10.1080/16546628.2017.1361780
- [103] WANG, Xiaolong, Dan ZHANG, Haiqiang JIANG, et al. Gut Microbiota Variation With Short-Term Intake of Ginger Juice on Human Health. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, 11 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.576061
- [104] WANG, Jing, Yong CHEN, Xiaosong HU, Fengqin FENG, Luyun CAI a Fang CHEN. Assessing the Effects of Ginger Extract on Polyphenol Profiles and the Subsequent Impact on the Fecal Microbiota by Simulating Digestion and Fermentation In Vitro.

- Nutrients [online]. 2020, 12(10) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12103194
- [105] HEWLINGS, Susan a Douglas KALMAN. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods* [online]. 2017, 6(10) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods6100092
- [106] WASSERMANN, Birgit, Henry MÜLLER a Gabriele BERG. An Apple a Day: Which Bacteria Do We Eat With Organic and Conventional Apples? *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, 10 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.01629
- [107] SHINOHARA, Kenji, Yuji OHASHI, Koh KAWASUMI, Atsushi TERADA a Tomohiko FUJISAWA. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* [online]. 2010, 16(5), 510-515 [cit. 2021-5-6]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2010.03.005
- [108] VAN DEN ABBEELE, Pieter, Lynn VERSTREPEN, Jonas GHYSELINCK, Ruud ALBERS, Massimo MARZORATI a Annick MERCENIER. A Novel Non-Digestible, Carrot-Derived Polysaccharide (cRG-I) Selectively Modulates the Human Gut Microbiota while Promoting Gut Barrier Integrity: An Integrated In Vitro Approach. *Nutrients* [online]. 2020, 12(7) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12071917
- [109] DAVID, Lawrence A., Corinne F. MAURICE, Rachel N. CARMODY, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* [online]. 2014, 505(7484), 559-563 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12820
- [110] LEEMING, Emily R, Abigail J JOHNSON, Tim D SPECTOR a Caroline I LE ROY. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* [online]. 2019, 11(12) [cit. 2021-5-6]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11122862

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

3D	trojrozmerný (three-dimensional)
ATP	adenozíntrifosfát c(adenosine triphosphate)
AMP	antimikrobiálne peptidy (antimicrobial peptides)
BMAL1	transkripčný aktivátorový proteín (transcriptional activator protein)
BMI	index telesnej hmotnosti (body mass index)
CNS	centrálny nervový systém (central nervous system)
CMC	karboxymetylcelulóza (carboxymethyl cellulose)
CVD	kardiovaskulárne ochorenie (cardiovascular disease)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FMT	transplantácia fekálneho mikrobiómu (fecal microbiota transplantation)
FODMAP	fermentovateľné oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly (fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols)
FOS	fruktooligosacharidy (fructooligosaccharides)
GOS	galaktooligosacharidy (galactooligosaccharides)
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou (high density lipoprotein)
IBD	zápalové ochorenie čriev (inflammatory bowel disease)
IBS	syndróm dráždivého čreva (irritable bowel syndrome)
IEC	črevné epitelové bunky (intestinal epithelial cells)
IgA	imunoglobulín A (immunoglobulin A)
IU	medzinárodná jednotka (international unit)
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
MAMP	molekulárny model spojený s mikróbom (microbe-associated molecular pattern)
miRNA	mikroRNA (microRNA)
PCA	analýza hlavných komponentov (principal component analysis)
PRR	receptory rozoznávajúce vzory (pattern recognition receptors)
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
SCFA	mastné kyseliny s krátkym reťazcom (short chain fatty acids)
SIRT1	sirtuin 1 (sirtuine 1)
TMAO	trimetylamin-N-oxid (trimethylamine N-oxide)