

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Pavlína Hucková

Interakce myricetinu s lidskou střevní mikroflórou

Interactions of myricetin with human gut microflora

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 6. 2020

.....

Abstrakt

Střevní mikrobiom přispívá k funkci imunitního systému. Nachází se v něm velké množství mikroorganismů, které na sebe navzájem působí a tím ovlivňují i hostitele. V současné době je směřována pozornost ke zkoumání vlivu střevního mikrobiomu na hostitele, ale také na vliv cizorodých látek na mikrobiom. Cizorodé látky mohou ovlivňovat jeho složení a následný mikrobiální metabolismus. U pacientů s Crohnovou chorobou bylo zjištěno, že mají nižší bakteriální zastoupení prospěšných bakterií. Proto je vhodné prozkoumat střevní mikrobiom těchto pacientů, a tak podrobněji pochopit vliv bakterií na průběh onemocnění a na použitou medikaci.

Metodou RP-HPLC byly analyzovány odebrané fekální vzorky (B, C, D), které byly inkubované v čase 0, 3 a 6 hodin. Inkubace probíhala s přidavkem myricetinu v McDougallově pufru a BHI médiu. Analýzou bylo zjištěno, že ve fekálních vzorcích probíhá během inkubace degradace myricetinu bez ohledu na použité médium. Ve fekálním vzorku B probíhá degradace myricetinu rychleji v BHI médiu, než v McD. pufru. Ve fekálních vzorcích C a D je degradace v obou médiích podobná. Z těchto výsledků nelze usoudit, které médium je pro bakterie vhodnější. V žádném z analyzovaných vzorků nebyl nalezen metabolit dihydromyricetin.

V dalších experimentech byly odebrané fekální vzorky (B, C, D) inkubovány v čase 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s přidavkem a bez přidavku myricetinu v McDougallově pufru a BHI médiu. Poté byly amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce a následně analyzovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (PCR-DGGE) ve spojení s metodou sekvenování nové generace (NGS). Mezi fekálními vzorky inkubovanými v McD. pufru nebyla metodou PCR-DGGE pozorována velká změna v bakteriálním zastoupení. Fekální vzorky, které byly inkubované v BHI médiu vykazují rozdíly především v inkubačních časech 24 a 72 hodin. Metodou PCR-DGGE a následným sekvenováním bylo zjištěno, že se ve fekálním vzorku B a D vyskytuje bakterie *Faecalibacterium prausnitzii*. Kromě běžných rodů byly nalezeny také bakterie rodu *Prevotella*. Metodou NGS byly pozorovány změny v bakteriálním zastoupení mezi použitými médii. Ve vzorcích byly také nalezeny bakterie rodu *Prevotella*.

Klíčová slova: střevní mikrobiom, myricetin, Crohnova choroba, degradace, metabolismus

Abstract

The intestinal microbiome contributes in immune system function. It contains a large number of microorganisms that interact with each other and thus affect the host. Currently, attention is being directed towards investigating the influence of the intestinal microbiome on hosts, but also on foreign substances. Foreign substances may influence its composition and subsequent microbial metabolism. Crohn's disease patients have been found to have lower bacterial representation of beneficial bacteria. Therefore it is appropriate to examine the intestinal microbiome of these patients and so understand in greater detail the influence of bacteria on the course of the disease progression and on the medication used.

The RP-HPLC method were analysed the faecal samples collected (B, C, D), which were incubated at 0, 3 and 6 hours. The incubation took place the addition of myricetin in the McDougall buffer and BHI medium. The analysis was found that myricetin degradation takes place in faecal samples during incubation, regardless of the medium used. In the faecal sample B, degradation of myricetin occurs faster in the BHI medium than in the McDougall's buffer. In faecal samples C and D, degradation is similar in both media. From these results, it is impossible to judge which medium is more suitable for bacteria. The metabolite dihydromyricetin was not found in any of the analysed samples.

In further experiments, faecal samples collected (B, C, D) were incubated at a time of 0, 3, 6, 24 and 72 hours with and without the addition of myricetin in McDougall's buffer and BHI medium. They were then amplified by polymerase chain reaction method and subsequently analysed by denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in conjunction with the new generation sequencing method (NGS). Among the faecal samples incubated in the McDougall's buffer, no large change in bacterial representation was observed by the PCR-DGGE method. Faecal samples that were incubated in the BHI medium show differences primarily in incubation times of 24 and 72 hours. *Faecalibacterium prausnitzii* was found to be present in faecal sample B and D by PCR-DGGE method and subsequent sequencing. In addition to common genera, *Prevotella* bacteria have also been found. Changes in bacterial diversity among the media used were also observed by the NGS method. *Prevotella* bacteria were also found in the samples.

Keywords: intestinal microbiome, myricetin, Crohn's disease, degradation, metabolism

[IN CZECH]

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení a připomínky k diplomové práci během jejího zpracování. Dále bych ráda poděkovala kolektivu Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i., zejména Ing. Jakubovi Mrázkovi, PhD., Ing. Haně Bartoňové a Ing. Chahrazed Mekadim, MSc., PhD. za spolupráci, pomoc při experimentální činnosti a zpracování výsledků.

Obsah

Seznam zkratek	10
1 Teoretický úvod	12
1.1 Střevní mikrobiom	12
1.1.1 Složení střevního mikrobiomu	13
1.1.2 Funkce střevního mikrobiomu	15
1.2 Zánětlivá střevní onemocnění	16
1.2.1 Crohnova choroba	17
1.2.1.1 Klasifikace a hodnocení aktivity Crohnovy choroby	17
1.2.1.2 Diagnostika	19
1.2.1.3 Léčba	20
1.2.1.4 Mikrobiom pacientů s Crohnovou chorobou	21
1.2.2 Vzájemný vliv střevního mikrobiomu a cizorodých látek	22
1.3 Flavonoidní látky	23
1.3.1 Výskyt flavonoidů a jejich metabolismus střevním mikrobiomem	24
1.3.2 Flavonoidy a zánětlivé onemocnění	26
1.3.3 Myricetin	27
2 Cíl práce	29
3 Materiál a metody	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Použité chemikálie	30
3.1.2 Použité přístroje	32
3.2 Metody	34
3.2.1 Příprava inkubačních médií	34
3.2.1.1 Příprava fekálních vzorků pro zjištění degradace myricetinu	36
3.2.1.2 Příprava fekálních vzorků pro zjištění vlivu myricetinu na střevní mikrobiom	36

3.2.2	Postup extrakce myricetinu z kultivačních zkumavek.....	37
3.2.3	Metoda HPLC na reverzní fázi	37
3.2.4	Postup izolace bakteriální DNA	38
3.2.5	Denaturační gradientová gelová elektroforéza a metoda PCR.....	39
3.2.5.1	Metoda PCR	39
3.2.5.2	Metoda DGGE.....	41
3.2.5.3	Příprava vzorků pro Sangerovo sekvenování	43
3.2.6	Sekvenování nové generace.....	45
3.2.6.1	Příprava amplikonů V4-V5 16S rRNA	45
3.2.6.2	Příprava knihovny	47
3.2.6.3	Příprava sekvenačního templátu, sekvenování a analýza dat	52
4	Výsledky	54
4.1	Degradace myricetinu střevním mikrobiomem.....	54
4.1.1	Analýza kultivovaných vzorků s myricetinem	55
4.2	Vliv flavonoidů na bakteriální diverzitu zkoumaný metodou DGGE	58
4.3	Bakteriální profil určený metodou DGGE	61
4.4	Určení vlivu flavonoidů na střevní mikrobiom zkoumaný metodou NGS	63
5	Diskuze	73
6	Souhrn.....	81
	Seznam použité literatury	82
	Příloha 1: Zkrácený protokol Ion PGM TM Hi-Q TM View Kit	94
	Příloha 2: Zkrácený protokol Ion PGM TM Hi-Q TM View Sequencing Kit	101
	Příloha 3: Procentuální zastoupení všech bakteriálních druhů ve fekálních vzorcích s přidavkem myricetinu a bez přidavku myricetinu.....	107
	Příloha 4: Sloupcové grafy bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích.....	115
	Příloha 5: Tabulka procentuálního zastoupení nejvýznamnějších bakteriálních druhů ve fekálních vzorcích B, C, D.....	117
	Příloha 6: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: médium.....	119

Příloha 7: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: médium.....	120
Příloha 8: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: fekální vzorek	121
Příloha 9: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: fekální vzorek.....	122
Příloha 10: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: čas inkubace	123
Příloha 11: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: čas inkubace	124
Příloha 12: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: přídavek.....	125

Seznam zkratek

ASCA	protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BHI	BHI médium (z angl. „brain-heart infusion“)
CD	Crohnova choroba (z angl. „Crohn’s disease“)
CDAI	index Crohnovy choroby
COX	cyklooxygenasa
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“)
DHM	dihydromyricetin
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
FMT	fekální transplantace (z angl. „faecal microbiota transplantation“)
HBI	Harvey-Bradshawův index
CHLXZ	chlorzoxazon
IBD	zánětlivá střevní onemocnění (z angl. „inflammatory bowel disease“)
McD.	McDougallův pufr
MYR	myricetin
NGS	sekvenování nové generace (z angl. „next generation sequencing“)
NFT	neurofibrilární klubka
NK	negativní kontrola – vzorky bez přídavku MYR

OTU	počet operačních taxonomických jednotek (z angl. „operational taxonomic unit“)
pANCA	cytoplasmatické perinukleární protilátky proti antigenu
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)
PCoA	analýza hlavních koordinát (z angl. „principal coordinate analysis“)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. „reverse phase high-performance liquid chromatography“)
SCFAs	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. „short-chain fatty acids“)
STD	standardní vzorky DNA
TAE	tris-acetátový pufr
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová (z angl. „trifluoroacetic acid“)
TNF	tumor nekrotický faktor
UC	Ulcerózní kolitida (z angl. „ulcerative colitis“)

1 Teoretický úvod

Existují různé druhy mikroorganismů, které osidlují lidský organismus. Mikroorganismy se vyskytují na kůži, ve vlasech, ústech, močovém měchýři nebo v dýchacích cestách. Mikroorganismy střevní mikroflóry přitahují v dnešní době velkou pozornost výzkumníků z celé řady oborů. Mikrobiomem lidského střeva se nezabývají jen mikrobiologové, ale v současnosti také biochemici, imunologové a obezitologové. Zvyšující se počet studií ukazuje, že střevní mikrobiom může mít souvislost s obezitou, diabetem mellitus, zánětlivým onemocněním střev nebo s rakovinou. Vědci se zaměřují na klíčové mechanismy probíhající v gastrointestinálním traktu a snaží se identifikovat doposud neznámé bakterie.

1.1 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom, nebo také střevní mikroflóra je soubor mikroorganismů, který se nachází v intestinální části. Termín mikrobiom nahrazuje v dnešní době pojem mikroflóra, protože ta nezohledňuje např. archea, viry a houby, které jsou nedílnou součástí střev [1]. Nejvíce zastoupené ve střevním mikrobiomu jsou bakterie. Existuje 300 až 500 bakteriálních druhů a ty obsahují přibližně 2 miliony genů. Počet mikrobiálních buněk v trávicím traktu je asi desetkrát vyšší než eukaryotických buněk lidského těla, pokud se nepočítají erytrocyty [2].

Mikroby obsažené v trávicím traktu příznivě prospívají správnému fungování trávení a imunitního systému. Rovnováha mezi zdravím a nemocí je velmi slabá, protože závisí na vlivu prostředí, ve kterém žijeme. S přibývajícím zájmem o střevní mikrobiom došlo ke spojení onemocnění se složením střevního mikrobiomu. Tento příčinný vztah je popsán např. u zánětlivých střevních onemocnění, syndromu dráždivého tračníku, obezity, diabetu mellitu, nebo u alergií [3]–[6]. Studie z velké části probíhají na lidech, nebo myších [7].

Osídlování lidského organismu bylo vždy spojováno s tím, že se novorozenec jako první dostává do kontaktu s mikroorganismy při porodu. Toto tvrzení je poslední dobou vyvraceno. Studie ukazují, že plod se do kontaktu s mikroorganismy dostává už v těle matky a placenta nezajišťuje úplné sterilní prostředí [8]. Hlavní fáze osídlování novorozence mikroorganismy nastává až při porodu. Dítě, které přichází na svět vaginálně, se nejčastěji dostane do kontaktu s bakteriemi rodu *Lactobacillus*

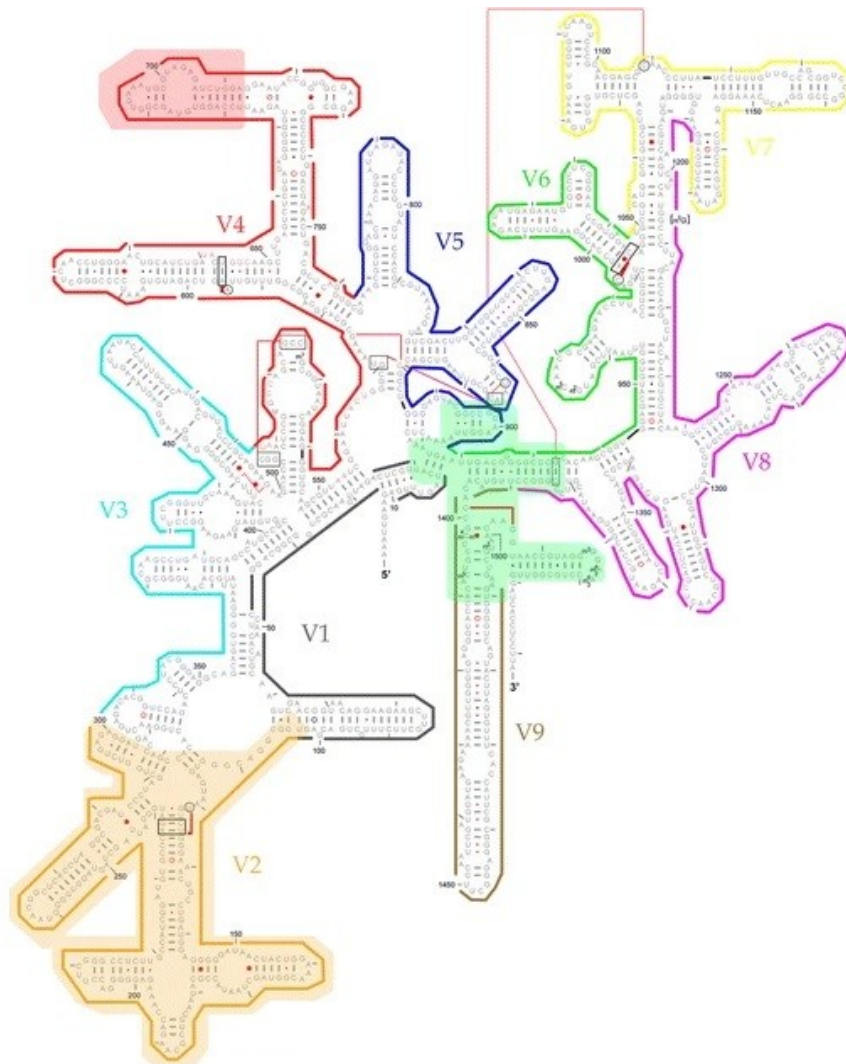
a *Prevotella*. Pokud je porod veden císařským řezem, tak jako první přijde do kontaktu s kožními mikroorganismy, jako např. *Staphylococcus*, nebo *Propionibacterium* [9]. Během tří let života je dětský mikrobiom velmi variabilní a nestálý. K ustálení dochází až po přechodu na pevnou stravu a to má vliv na snížení typických bakterií pro zpracování mléčných oligosacharidů. Přejchod na vyzrálější mikrobiom souvisí i s rychlým vývojem imunitního systému. Rozdíl mezi mateřským mlékem a umělou kojeneckou stravou je hojně studován. Vědci se domnívají, že každý z těchto typů stravování kojence má vliv na vývoj jeho střevního mikrobiomu a později na vliv zdraví či nemoci jedince [8], [10]. Další změna mikrobiomu přichází s nástupem puberty. V této fázi života je rozdíl mezi mikrobiomem adolescenta a dospělého člověka spojen s vývojem a růstem [11]. V dospělosti je mikrobiom poměrně stabilní, ale nemůžeme říci, že je po celou dospělost stejný. Změnu mikrobiomu může ovlivnit např. životní prostředí, nadmořská výška, životní styl, proces stárnutí, složení potravy [12], [13].

1.1.1 Složení střevního mikrobiomu

Převážná většina mikroorganismů v lidském těle žije ve střevech. V tlustém střevě se mikrobiální buněčná hustota odhaduje na 10^{11} buněk/g, pokud to přepočítáme na hmotnost, tak to odpovídá 1-2 kg tělesné hmotnosti [14]. Nejvíce zastoupené jsou rody *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Oproti tomu rody *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* nebo *Verrucomikorie* neřadíme mezi hlavní rody bakterií, které osidlují lidské střevo [15]. Rody *Firmicutes* a *Bacteroidetes* představují až 90 % střevní mikrobioty. Ostatní bakterie jsou spíše v menším zastoupení.

Určování složení střevního mikrobiomu a nalézání nových bakterií je v současné době založeno na sekvenování. Díky tomu, že sekvenování nahradilo kultivace a izolace mikrobů jsou objevovány mikroby, které nelze kultivovat [16]. Sekvenování také postupně nahrazuje denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (DGGE, z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“). Tato metoda byla donedávna hojně využívána pro identifikaci bakterií ve střevním mikrobiomu. V současnosti se pro identifikaci bakterií používá sekvenování nové generace (NGS, z angl. „next-generation sequencing“) [17]. Při sekvenaci nemusí dojít k namnožení celé 16S rRNA (ribosomální RNA), ale sekvenuje se zpravidla pouze část. Důvodem použití jenom části je, že 16S rRNA obsahuje konzervativní a hypervariabilní oblasti. Na konzervativní oblasti lze navrhnout primery. Hypervariabilní oblasti pak slouží k identifikaci fylogenetických charakteristik mikroorganismů. 16S rRNA se skládá z devíti hypervariabilních oblastí

(V1-V9), které jsou od sebe odděleny konzervativními oblastmi (viz. Obrázek 1) [18], [19]. Pro identifikaci bakterií jsou používány hypervariabilní oblasti V3, V4, V6 a V8. Součástí přípravy hypervariabilních oblastí je také polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. „polymerase chain reaction“). Je to jedna z nejpoužívanějších metod pro přípravu vzorků pro identifikaci bakterií pomocí metody DGGE. Pro vyhodnocení sekvenačních dat, která jsou objemná a fragmentovaná, byla vyvinuta bioinformační analýza. Ta umožňuje rozřadit získaná data a identifikovat bakteriální taxony [7].



Obrázek 1: Struktura 16S rRNA, na které jsou vyznačeny hypervariabilní oblasti V1-V9. Převzato a upraveno [17].

1.1.2 Funkce střevního mikrobiomu

Mikroorganismy, které se nacházejí v intestinálním traktu, hrají nezastupitelnou roli v lidském těle [20]. Mají několik základních funkcí. Hlavní funkcí je trávení potravin a získání energie pro svého hostitele. Další funkce střevního mikrobiomu jsou: fermentace nestravitelných částí potravin na vstřebatelné metabolity, syntéza esenciálních vitamínů, ale také regulace a aktivace imunitního systému.

Bylo prokázáno, že střevní mikroorganismy dokážou syntetizovat vitamín K a ve vodě rozpustné vitamíny skupiny B (biotin, kobalamin, nebo foláty). Vitamíny přijímány v potravinách jsou vstřebávány už v tenkém střevě. V tlustém střevě dochází ke vstřebávání vitamínů, které syntetizují mikroorganismy. Syntetizovat vitamíny mohou např. některé druhy bakterií z rodu *Bifidobacterium* [21]. Rozdíl mezi metabolismem probíhajícím v játrech a metabolismem bakteriálním je v tom, že v játrech probíhá většinou metabolismus oxidací a konjugací a vznikají polární metabolity s vysokou molekulovou hmotností. Bakteriální metabolismus v anaerobním prostředí je zaměřen na redukční a hydrolytické reakce, při kterých vznikají nepolární produkty s nízkou molekulovou hmotností [22].

V tlustém střevě jsou tráveny složky potravin, které nebyly v horní části trávicího traktu přeměněny. Fermentačním procesem vznikají ze sacharidů mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, z angl. „short chain fatty acids“). Nejvíce zastoupené SCFAs jsou acetát, propionát či butyrát. Butyrát je využíván jako zdroj energie pro kolonocyty a v tlustém střevě má protirakovinný účinek [23]. Oproti tomu při fermentaci proteinů vznikají toxické sloučeniny, např. aminy. Další sloučeniny, které se dostávají až do tlustého střeva, jsou fytochemikálie, kontaminanty životního prostředí a léky. Tyto látky nazýváme jako xenobiotika. Bylo prokázáno, že mikroorganismy v tlustém střevě dokážou tyto sloučeniny mnohem lépe metabolizovat než mikroorganismy v tenkém střevě. Střevní bakterie mohou přijít do kontaktu s léčivem po perorálním podání látky, pomocí enterohepatální cesty nebo přímou cestou, přes rektální otvor. Rektálním podáním se aplikují především čípky nebo klystýr. Tímto podáním se předpokládá, že dojde ke zvýšení metabolismu prostřednictvím střevních bakterií. Ovšem podání touto formou musí být pečlivě zváženo, protože metabolismus může způsobit, že léčivo je farmakologicky aktivní, neaktivní nebo toxické [22].

1.2 Zánětlivá střevní onemocnění

Zánětlivé střevní onemocnění (IBD, z angl. „inflammatory bowel disease“) je pojem zahrnující skupinu idiopatických střevních zánětů, mezi které patří Crohnova choroba (CD, z angl. „Crohn’s disease“) a ulcerózní kolitida (UC, z angl. „ulcerative colitis“). CD i UC jsou významným chronickým zánětlivým onemocněním dnešní populace, které postihuje celou trávicí soustavu. Tyto choroby jsou spojeny i s ostatními onemocněními. CD je onemocnění, které postihuje tenké a tlusté střevo. Může dojít i k rozšíření do jiné části gastrointestinálního traktu, ale není to tak časté. CD je také spojena s komplikacemi, jako jsou vznik abscesu, píštěle, nebo zúžení střeva. Oproti tomu UC postihuje pouze tlusté střevo a je charakterizována mukózním zánětem [24].

IBD je onemocnění, u kterého se předpokládá, že jej způsobuje nepřiměřená aktivita imunitního systému, který reaguje na mikrobiální flóru nacházející se ve střevech, na vnější prostředí a na genetickou predispozici jedince [24]. Geny, které způsobují vznik IBD jsou z 30% podobné u UC i CD. Analýzy genů ukazují, že nemocní patřící do skupiny IBD mají společnou např. mikrobiální obranu, vrozenou i adaptivní imunitu či metabolické procesy spojené s buněčnou homeostázou [25]. UC i CD je onemocnění, které je děděno, proto je důležité znát rodinnou anamnézu pro případné včasné odhalení onemocnění. Potvrzení vlivu genetické predispozice od rodičů a následná možná náchylnost k získání zánětlivého onemocnění byla potvrzena při studiu genomu u dvojčat [26].

Vznik CD i UC je také podmíněn vnějšími podmínkami, jako je kouření, geografie, nebo hygiena. Z geografického hlediska jsou nejvíce postiženi lidé ze Severní Ameriky a severní Evropy. Naopak v Jižní Americe, jihovýchodní Asii, nebo Austrálii je hlášen malý výskyt tohoto onemocnění. Z toho můžeme usoudit, že rozvojové země jsou méně postiženy. S tím korelují i výsledky epidemiologických studií v Severní Americe a Evropě. Bylo zjištěno, že u lidí žijících ve městě je zvýšený výskyt IBD oproti lidem, kteří žijí na venkově [26]. Dále bylo zjištěno, že u dětí, které byly kojeny je šance pro vznik CD a UC menší než u dětí na umělé stravě. Z toho lze usoudit, že kojení poskytuje ochranu před IBD u dětí [27], [28].

Pokud se podíváme, jak kouření ovlivňuje onemocnění, zjistíme, že kouření chrání pacienta před vznikem UC a zlepšuje průběh onemocnění [26], [29]. Oproti tomu u CD zvyšuje riziko jejího vzniku a v průběhu nemoci zhoršuje průběh, protože

podporuje tvorbu píštělí a zužování střev. Při kouření pacient musí užívat vyšší dávky kortikosteroidů a imunosupresiv. Také zvyšuje potřebu chirurgického zákroku. Pacientům s UC se nedoporučuje přestat s kouřením, pouze se doporučuje kouření omezit z hlediska rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Od pacientů s CD je vyžadováno, aby přestali kouřit, jedná se totiž o hlavní terapeutický cíl, především u mladých žen.

1.2.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba, jak už bylo zmíněno, je chronické zánětlivé onemocnění, které může postihnout celý gastrointestinální trakt [30], [31]. Není vyloučené, že se může objevit v jakékoliv oblasti od úst až po konečník. Častými projevy jsou bolesti břicha, horečka, obstrukce střev, průjem, krvavý průjem, podvýživa, anémie, nebo úbytek hmotnosti.

1.2.1.1 Klasifikace a hodnocení aktivity Crohnovy choroby

V Římě v roce 1991 mezinárodní pracovní skupina prvně klasifikovala IBD. Tato klasifikace vznikla na základě anatomického rozložení, historie a klinického chování onemocnění. V roce 1998 byla nahrazena Vídeňskou klasifikací na Světovém kongresu pro gastroenterologii [32]. Tato klasifikace už zohledňovala věk nástupu onemocnění (A), místo onemocnění (L) a chování nemoci (B). K poslední změně klasifikace došlo v roce 2005 na tzv. Montrealskou klasifikaci, která byla navržena skupinou na Montrealském světovém kongresu o gastroenterologii. Tato klasifikace vychází z Vídeňské, ponechává rozdělení do tří kategorií, ale v každé kategorii došlo k úpravě. Nevýhoda klasifikačního systému je shledávána v nestabilitě rozsahu a chování nemoci v průběhu času. Srovnání obou klasifikací je znázorněno v Tabulce 1, str. 18. Na Obrázku 2, str. 19 je graficky znázorněna Montrealská klasifikace, tzn. kde má pacient v trávicím traktu místo onemocnění (L) a chování nemoci (B). Dále můžeme onemocnění klasifikovat pomocí tzv. Lémannova indexu, který znázorňuje míru poškození trávicího traktu způsobeného CD za určité časové období [33], [34]. Ve studii [33] bylo zjištěno, že střední Lémannův index se zvyšuje s dobou trvání onemocnění. Ostatní indexy pro posuzování závažnosti onemocnění CD jsou založeny na hodnocení klinických a endoskopických dat získaných v konkrétním čase měření.

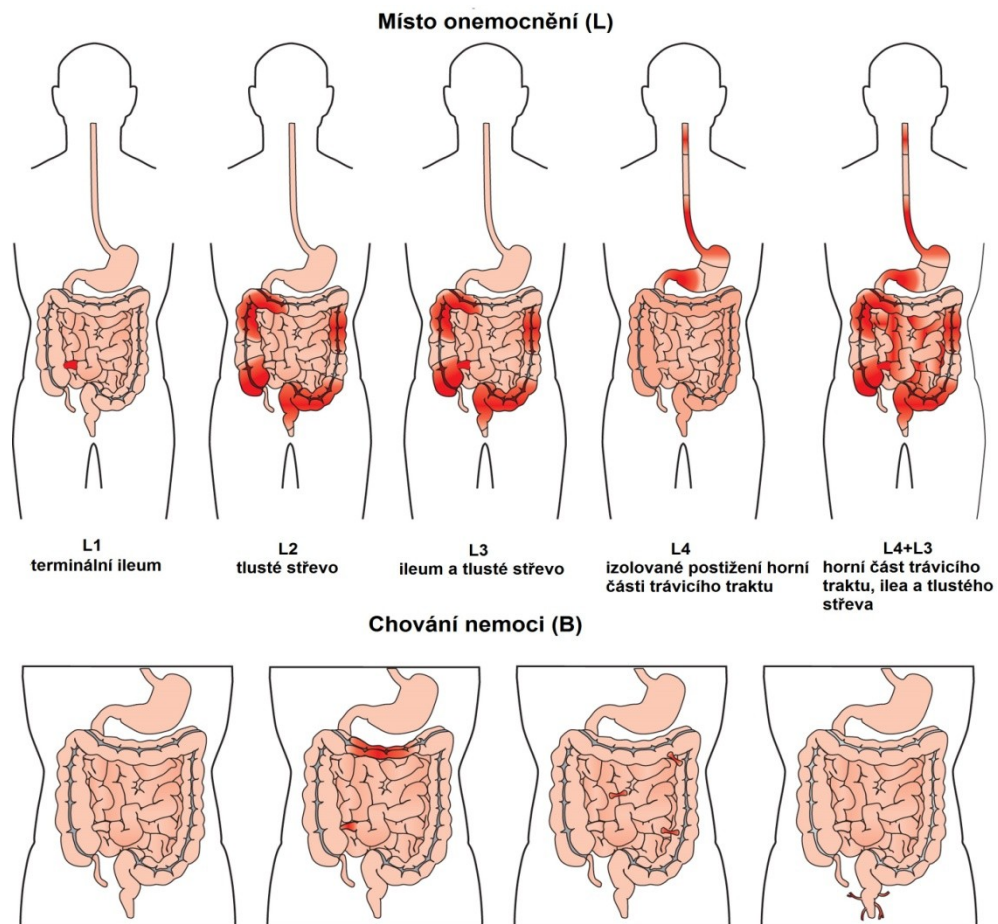
U CD musíme brát zřetel na aktivitu onemocnění nebo případnou remisi. Aktivita CD je charakterizována klinickými známkami projevu, laboratorním, endoskopickým a histologickým vyšetřením. Za standardní nástroj pro měření aktivity

se považuje endoskopické skóre [35]. Endoskopické skóre se převážně používá pro zjištění účinnosti užívaných léků, které ovlivňují střevní sliznici [36]. Pro hodnocení závažnosti symptomů, komplikací a celkového chování střev pacienta s CD byly vyvinuty tyto skórovací systémy – index Crohnovy choroby (CDAI) a Harvey-Bradshawův index (HBI) [37], [38]. Tyto dva indexy se hojně využívají pro hodnocení klinických studií, ale také v klinické praxi, protože umožňují sledování symptomů CD. Hodnocení CDAI má ale i své úskalí v tom, že index zahrnuje subjektivní pocity pacienta, proto mohou být výsledky zkresleny [36], [39].

Tabulka 1 – Rozdíly v klasifikaci CD vzniklé ve Vídni a Montrealu. Převzato a upraveno [40].

	Vídeň	Montreal
Věk při diagnóze (A)	A1 < 40 let	A1 < 16 let
	A2 ≥40 let	A2 mezi 17–40 lety
		A3 > 40 let
Místo onemocnění (L)	L1 terminální ileum	L1 terminální ileum
	L2 tlusté střevo	L2 tlusté střevo
	L3 ileum a tlusté střevo	L3 ileum a tlusté střevo
	L4 horní část trávicího traktu	L4 izolované postižení horní části trávicího traktu*
Chování nemoci (B)	B1 bez omezení, nepronikající	B1 bez omezení, nepronikající
	B2 zúžení	B2 zúžení
	B3 pronikající	B3 pronikající
		p modifikátor perianálního postižení**

Legenda: *L4 – modifikátor, který je přidán k L1–L3, pokud je přítomno postižení horní části trávicího traktu; **p – modifikátor, který je přidán k B1–B3, za přítomnosti perianálního postižení



Obrázek 2: Grafické znázornění Montrealské klasifikace. Převzato a upraveno [31].

1.2.1.2 Diagnostika

Stanovení diagnózy u pacientů s CD je založeno na anamnéze, laboratorních, sérologických, radiologických, endoskopických a histologických vyšetřeních. Samotné stanovení CD může být velmi obtížné, vzhledem k příznakům, které mohou vypovídat i o jiných typech onemocnění [41]. CD nemůžeme stanovit pomocí jedné charakteristické hodnoty, protože tyto hodnoty mohou být zvýšené či snižené i u jiných nemocí. Do anamnézy řadíme symptomy, které jsou přítomné u pacienta, jako například průjem s krví či hlenem, bolest břicha, ztráta váhy, u dětí a dospívajících opožděná puberta, zhoršený růst. Při sérologickém vyšetření se díváme na hodnoty C-reaktivního proteinu, fekálního kalprotektinu a laktoferinu. Při CD dochází ke ztrátě tolerance na mikrobiální osídlení v trávicím traktu a následné produkci protilátek proti mikrobiálnímu osídlení. Nejvíce studované sérologické hodnoty jsou cytoplasmatické perinukleární protilátky proti antigenu (pANCA) a protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) [42], [43]. Dalšími metodami pro určení onemocnění jsou

zobrazovací metody, mezi které patří např. rentgen, kolonoskopie, ultrazvuk, magnetická rezonance, nebo výpočetní tomografie [44], [45]. Histologické vyšetření řadíme mezi spolehlivější metody vyšetření a potvrzení CD. Při histologickém vyšetření jsou pacientovi provedeny biopsie tlustého střeva, rekta a terminálního ilea. Pokud při histologickém vyšetření získáme negativní výsledky, tak to onemocnění CD nevyklučuje a je potřeba provést další vyšetření [46]. Kapslová endoskopie je také jedna z možných zobrazovacích metod, která je používána pro zjištění CD v tenkém střevě. Toto vyšetření se neprovádí často a jeho použití musí být dobře zváženo [47].

1.2.1.3 Léčba

Léčba CD je podřízena aktivitě, místu a chováním onemocnění. Hlavním cílem léčby je vyvolání klinické remise a udržení remise s minimálními nepříznivými účinky [48]. V současné době se používají dvě hlavní strategie léčby, a to tradiční „postupný“ přístup a přístup „shora dolů“. Léčba „postupným“ přístupem začíná kortikosteroidy, nebo mesalazinovými (dříve také jako mesalaminové) produkty. Mesalazinové produkty mají protizánětlivý účinek a jsou obsaženy v lécích, které užívají pacienti s CD. Dalším krokem je nasazení imunomodulátorů, nebo blokátorů tumor nekrotického faktoru (TNF). Nasazení medikamentů záleží na závažnosti onemocnění. Ze začátku pacient užívá méně agresivní léky a postupně přechází k agresivnějším lékům. Druhá strategie léčby přístupem „shora dolů“ začíná u anti-TNF. Při tomto přístupu pacient nejprve začne užívat léky, které jsou silně agresivní a po dosažení remise jsou dávky léčiv snižovány. Některé léky mohou být při remisi onemocnění úplně vysazeny [49], [50].

Další možností léčby CD je použití biologické terapie. Biologická terapie využívá látky přirozené tělu. Tyto látky lze vyrobit i laboratorně. V biologické terapii se využívá monoklonálních protilátek. Protilátky mají schopnost vyvolání imunitní odpovědi a může dojít k indukci apoptózy, produkci protilátek nebo mohou blokovat produkci růstových faktorů pro T-lymfocyty [30]. Tato terapie vyžaduje vysokou specifitu a přesně směřovaný mechanismus účinku, proto se používá pro pacienty, kterým nevyhovuje léčba kortikosteroidy a aminosalicyláty [51], [52].

Pokud selže léčba, např. sníží se účinnost léků, pravidelně dochází ke střevní obstrukci, podvýživě, vzniku píštěle či abscesů, je nutné přistoupit k chirurgickému zákroku. Chirurgickým zákrokem není vždy dosaženo úplného vyléčení CD. Chirurgický zákrok zahrnuje resekci střev, strikturoplastiku nebo drenáž abscesu.

Šetrnější chirurgickou metodou může být laparoskopie, která má oproti běžným chirurgickým metodám určité výhody, jako jsou menší břišní rány, nebo nižší riziko vzniku kýly [53], [54].

Potenciální možností léčby CD je fekální transplantace (FMT, z angl. „faecal microbiota transplantation“). Metoda FMT se v moderní medicíně používá při léčbě infekcí bakterií *Clostridium difficile* [55]. Ve studii [56] bylo prokázáno, že FMT je možnou terapeutickou metodou pro léčbu CD. Pacienti zařazení do této studie byli děti a dospívající do věku 19 let. Studie se zúčastnily celé rodiny. FMT podstoupilo devět pacientů. Dárce fekálního vzorku byla u sedmi pacientů matka a u dvou otec. Výsledky této studie ukazují, že pediatřičtí pacienti léčbu FMT tolerovali a že léčba byla bezpečná. U pacientů došlo ke klinickému zlepšení. Pro rozsáhlou aplikaci léčby pomocí FMT je zapotřebí dalších klinických studií na více pacientech, které by vedly k ověření bezpečnosti a tolerance transplantovaného fekálního vzorku.

1.2.1.4 Mikrobiom pacientů s Crohnovou chorobou

U pacientů s CD je zjištěno, že jejich mikrobiom je pozměněný a mikroorganismy nacházející se v trávicím traktu jsou v dysbióze. Tento stav se vyskytuje jak u pacientů s aktivní CD, tak i u pacientů, kteří mají nemoc v remisi. Některé bakteriální rody (druhy) u pacientů s CD jsou sníženy, jako např. *Clostridiales* (*Faecalibacterium prausnitzii*). Změny v zastoupení byly pozorované u rodu *Bacteroides* a *Firmicutes*, mezi které řadíme *Gammaproteobacteria* a *Enterobacteriales* (*Escherichia coli*) [57], [58]. Ve fekálních vzorcích pacientů s CD byla nalezena adherentně-invazivní *E. coli*, která je spojena s patogenezi CD [59]. Patogeneze je také spojena s anaerobní, grampozitivní bakterií *Ruminococcus gnavus*. Studie ukázaly, že zvýšené zastoupení této bakterie koreluje se zvýšenými příznaky CD [60]. Při zkoumání střevního mikrobiomu dětí s CD, které ještě nepodstoupily léčbu, byl prokázán zvýšený výskyt bakterií *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* a *Fusobacteriaceae* a snížené zastoupení *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* a *Clostridiales*. Tyto výsledky korelují se stavem onemocnění. Také bylo zjištěno, že po zavedení léčby antibiotiky došlo k zesílení dysbiózy, která je spojena s CD [61]. Též bylo vyzpořováno, že množství kvasinek *Candida albicans* bylo zvýšeno, zatímco *Saccharomyces cerevisiae* bylo sníženo [62].

1.2.2 Vzájemný vliv střevního mikrobiomu a cizorodých látek

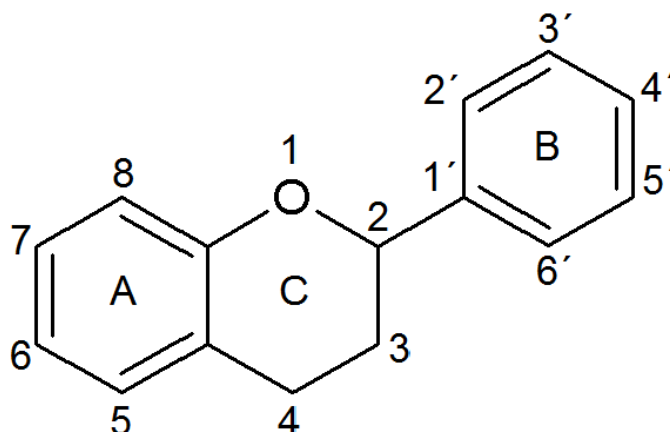
Střevní mikrobiom je velmi komplexní, a proto stále není zcela popsán účinek přijímaných cizorodých látek z potravy na jeho složení. Je třeba uvažovat i opačný vztah, tedy jak střevní mikrobiom metabolizuje přijaté cizorodé látky a jak vzniklé metabolity zpětně mikrobiom ovlivňují. Vliv cizorodých látek na složení a funkci střevního mikrobiomu může být dlouhodobý nebo krátkodobý. Dlouhodobým i krátkodobým vlivem cizorodých látek na střevní mikrobiom může dojít k jeho změně. Přesněji ke změně bakteriálního zastoupení. K této přeměně nejčastěji dochází se změnou stravovacích návyků. Např. příjem potravin s vysokým obsahem tuku nepříznivě snižuje obsah bakterie *Akkermansia muciniphila* a *Lactobacillus* [63]. Nepříznivý účinek na střevní mikrobiom mají i antibiotika. V současnosti jsou antibiotika hojně užívaná, ale i zneužívaná. Právě zneužívání antibiotik vede k vytvoření rezistence bakterií na antibiotika. Proto se některá antibiotika stala neúčinnými. Bylo zjištěno, že hojné užívání antibiotik souvisí nejen se změnou složení střevního mikrobiomu, ale i s rozvojem alergických a autoimunitních chorob [64].

Naopak pozitivně na střevní mikrobiom působí prebiotika, probiotika či kombinace těchto látek [65]. Tyto látky příznivě ovlivňují mikrobiální interakce s imunitním systémem. Prebiotika jsou selektivně fermentované složky potravy, které způsobují specifické změny ve složení mikrobiomu a stimulují činnosti trávicího traktu. Prebiotika se většinou skládají ze 4 až 10 monomerních jednotek hexos. Tyto sloučeniny jsou pro tělo nestravitelné, proto vytvářejí vhodné podmínky pro růst prospěšných bakterií. Na střevní mikrobiom dále působí i probiotikum. Probiotika jsou léčiva, která obsahují živé mikroorganismy, které při podání ve správném množství příznivě ovlivňují střevní mikrobiom. Nejčastěji používané probiotika obsahují bakterie mléčného kvašení, např. bakterie rodu *Bifidobacteria* nebo *Lactobacilli*.

Vliv střevního mikrobiomu na metabolismus cizorodých látek není zdaleka tak prozkoumaný, jako vliv cizorodých látek na složení střevního mikrobiomu. Této problematice se v současnosti věnuje velká pozornost, protože se postupně zjišťuje, že bakterie obsažené v tlustém střevě mohou přeměnit neaktivní formu léčiva na aktivní formu, která je následně pro hostitele toxická [66]. Např. sulfoamid (prontosil) je jednou ze sloučenin, která je biotransformovaná střevními bakteriemi [67].

1.3 Flavonoidní látky

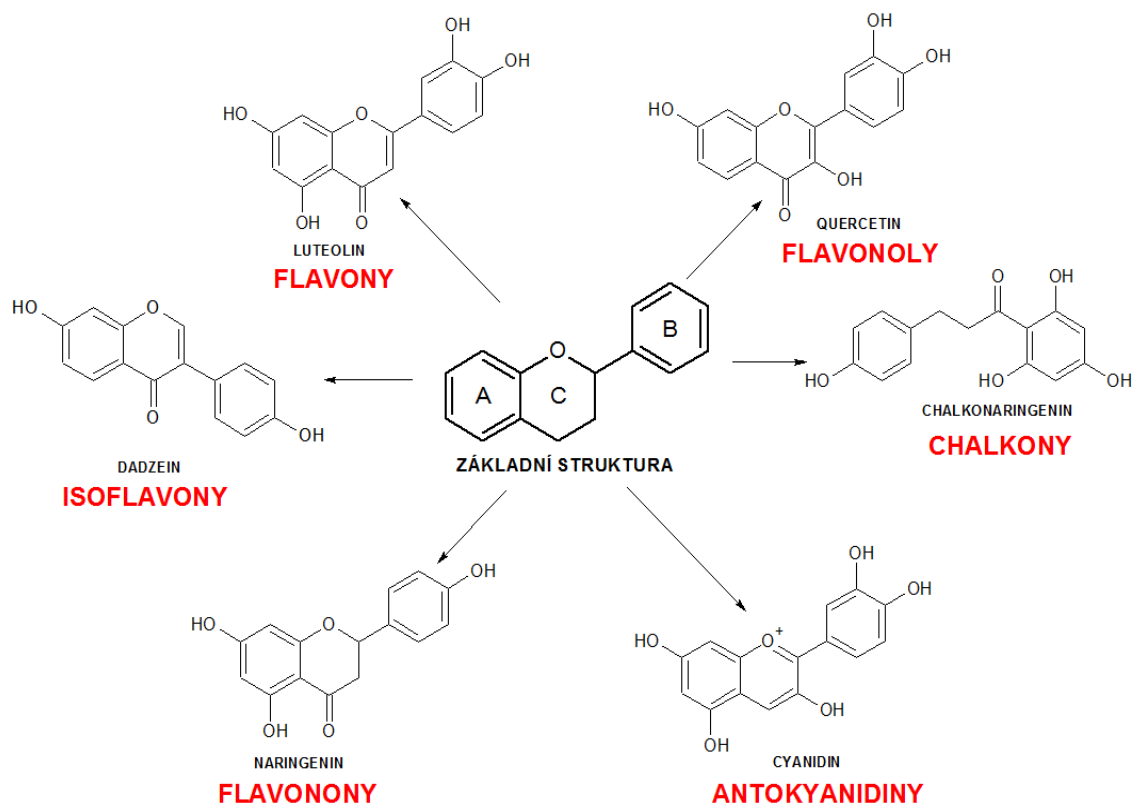
Flavonoidní látky, nebo také flavonoidy jsou přírodní látky s proměnlivou fenolickou strukturou. Ve své struktuře obsahují flavanový skelet, který je znázorněn na Obrázku 3 a jeho systematický název je 2-fenyl-1,4-benzopyron. Z chemického hlediska je pro flavonoidy charakteristická kostra o patnácti uhlících, které jsou uskupeny do dvou benzenových jader (A, B) spojených heterocyklickým pyranovým kruhem (C) [68].



Obrázek 3: Základní struktura flavonoidů. Vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.0.

Flavonoidy jsou velmi rozmanitá skupina látek, která se od sebe liší navázanými substituenty, stupněm oxidace, polohou a druhem připojeného heterocyklického kruhu C. Pokud se B kruh váže na C kruh v poloze 2, lze jej rozdělit do několika podskupin na základě strukturálních vlastností kruhu C. Mezi hlavní třídy patří flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, antokyanidiny, chalkony a isoflavony [69], [70]. Grafické znázornění podskupin je zobrazeno na Obrázku 4, str. 24.

V současné době stoupá zájem výzkumných skupin o flavonoidy, protože jsou považovány za důležitou složku ve farmaceutických, léčivých a kosmetických přípravcích. Zvýšené použití je přisuzované jejich antioxidačním, protizánětlivým, antimutagenním či antikarcinogenním vlastnostem. Výzkumné týmy se zabývají převážně izolací, identifikací, charakterizací, funkcí flavonoidů a především jejich vlivem na zdraví člověka [69]. Doposud je známo okolo 9000 flavonoidních sloučenin [71], které byly nalezeny v rostlinách. Můžeme je označit za jednu z nejpočetnějších skupin přírodních produktů [72].



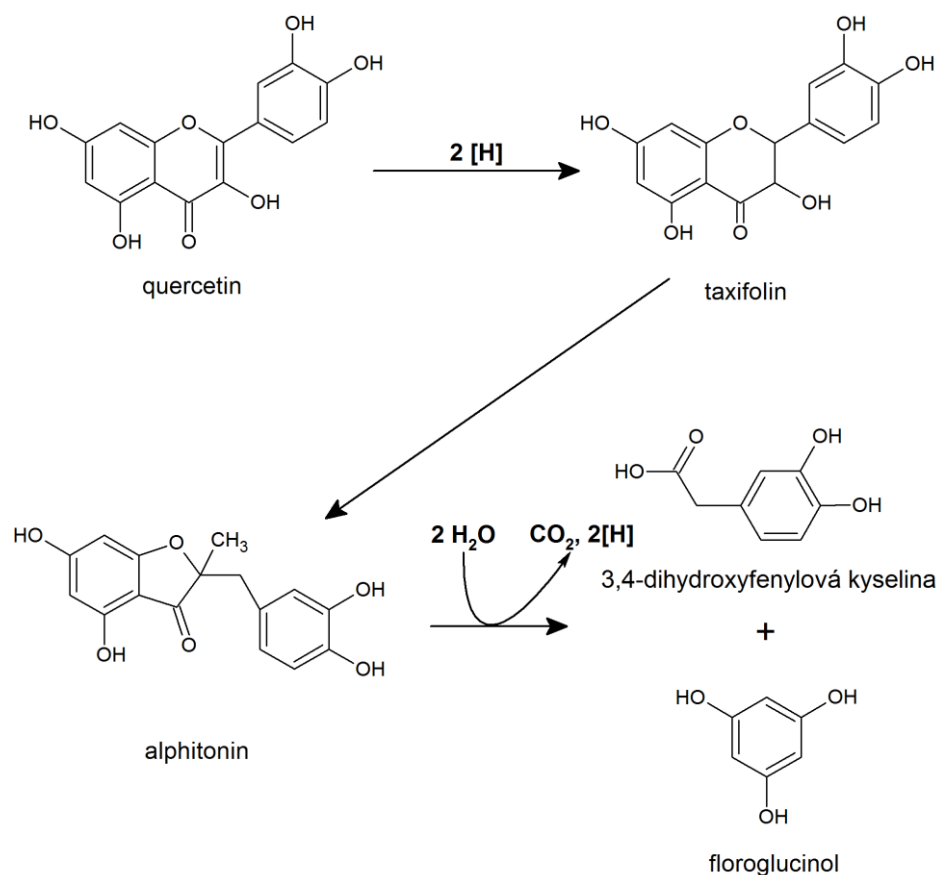
Obrázek 4: Základní struktury flavonoidů. Vytvořeno v programu ChemSketch 12.0.

1.3.1 Výskyt flavonoidů a jejich metabolismus střevním mikrobiomem

Výskyt flavonoidů je rozmanitý. V lidské stravě se nacházejí v ovoci, zelenině, luštěninách, obilí, kořenech, stoncích, květech, víně, nebo bílém či zeleném čaji. Řadíme je mezi hlavní barviva kvetoucích rostlin. Protože flavonoidy patří mezi fytochemikálie, nemohou si je lidé ani zvířata syntetizovat, ale dokážou je metabolizovat [68], [73]. V potravinách jsou zodpovědné za barvu, chuť nebo za ochranu vitamínů a enzymů. Množství přijatých flavonoidů v potravě závisí na její přípravě a zpracování. V závislosti na použitých metodách přípravy stravy se může množství přijatých flavonoidů snížit. Ovšem přesný odhad průměrného denního příjmu v potravě je obtížný, jelikož se jedná o velkou škálu dostupných flavonoidů a také rozdílné spotřeby potravin, které je obsahují [74], [75], [76].

Metabolické dráhy degradace a přeměny, dosud popsanych flavonoidů, nejsou stále přesně definované. Quercetin je flavonoid u kterého je prokázána jeho degradace a přeměna pomocí střevního mikrobiomu. *Eubacterium ramulus* [77], *Clostridium*

orbiscindens [78], *Eubacterium oxidoreducens* [79] nebo *Enterococcus gilvus* se řadí mezi bakterie, které dokážou degradovat a metabolizovat quercetin v lidském gastrointestinálním traktu [80]. Na základě těchto poznatků byly navrženy dvě metabolické dráhy quercetinu. Jedna metabolická dráha byla zkoumána na šesti lidských fekálních vzorcích od dárců v rozmezí věku 20 až 40 let. Druhá byla odhalena na základě izolace bakterií, které byly naneseny na živné půdy s quercetinem a inkubovány za anaerobních podmínek [80], [81]. Ve studii [78] byla pozorována degradace quercetinu za využití bakterie *Clostridium orbiscindens*. Bakterii získali izolací z lidských fekálních vzorků. K izolovaným bakteriím v médiu byl přidán quercetin o koncentraci 0,5 mM. Po 6 hodinách inkubace pozorovali úplnou degradaci. Konečnými produkty metabolismu byla kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a floroglucitol. Metabolická cesta je zobrazena na Obrázku 5. K této metabolické dráze dospěli i ve studii [77], kde byla zkoumána degradace a metabolismus quercetinu pomocí *Eubacterium ramulus*.



Obrázek 5: Návrh metabolické dráhy quercetinu. Převzato a upraveno [77].

Metabolická dráha quercetinu je zkoumána především proto, že se jedná o flavonoid, který se nachází v rostlinách nebo bylinných čajích a má pozitivní účinky na lidské zdraví. Quercetin pozitivně působí na kardiovaskulární systém, proti rakovinným buňkám, má protizánětlivou aktivitu, antihypertenzní, imunomodulační nebo protinfekční účinky [82]. Je považován za jeden z nejrozšířenějších flavonoidů používaných pro léčbu metabolických a zánětlivých poruch. Vyskytuje se v ovoci, především citrusovém, zelené listové zelenině, semenech, brokolici, olivovém oleji, jablkách, červených hroznech, tmavých třešních nebo v zeleném čaji. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny v cibuli, brokolici a v třešních [83].

Mechanismus přeměny a úplné degradace je popsán i u jiných flavonoidních látek, jako například u daidzeinu, genisteinu, rutinu, naringinu nebo myricetinu (MYR). Metabolismus MYR byl zkoumán ve studii [84], kde vědci došli k závěru, že je metabolizován na tři metabolity, které vycházejí z jeho struktury (Obrázek 6, str. 27), protože je tvořen třemi hydroxylovými skupinami, které jsou důležité pro jeho následný metabolismus a pro pozitivní vliv na organismus. Metabolity na které byl MYR metabolisován jsou: kyselina 2-(3,5-dihydroxyfenyl)octová, kyselina fenyloctová a kyselina 3-(3,5-dihydroxyfenyl)propionová. Metabolismus MYR byl oproti jiným flavonoidům použitých ve stejné studii pomalejší a hlavním metabolitem byla zjištěna kyselina fenyloctová, která byla objevena po 48 hodinách inkubace.

1.3.2 Flavonoidy a zánětlivé onemocnění

Metabolismus flavonoidů a absorpce začíná již v tenkém střevě, kde nejsou metabolizovány všechny flavonoidy. Flavonoidy, které nejsou metabolizovány v tenkém střevě, tak přecházejí do tlustého střeva. V tlustém střevě je střevní mikrobiom přeměňuje na fenolické kyseliny [85]. Protizánětlivé vlastnosti flavonoidů jsou spojovány s mechanismem inhibice regulačních enzymů a transkripčních faktorů. Také se řadí mezi silné antioxidanty. Díky této vlastnosti dokážou zachytit volné radikály a snížit jejich tvorbu [86].

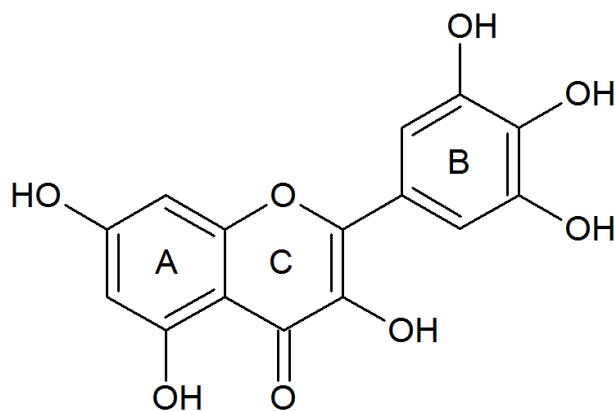
Jak už bylo zmíněno, protizánětlivá aktivita souvisí s inhibicí regulačních enzymů. Mezi enzymy, které jsou ovlivněny flavonoidy, patří cyklooxygenasy (COX) – COX-1 a COX-2, lipoxygenasa nebo některé protein kinasy. Například flavonoly, jako je quercetin nebo MYR, jsou lepšími inhibitory lipoxygenasy než flavony [86], [87]. V současné době ale není zcela jasné, zda příznivé účinky souvisejí s absorbcí

flavonoidů a ovlivněním mechanismů tvorby zánětu, nebo zda flavonoid působí na zanícenou tkáň v tlustém střevě při CD, nebo UC. Je možný i obojí účinek.

Provedené studie s flavonoidy, které byly zaměřeny na protizánětlivý účinek v trávicím traktu, mohou být důvodem použití flavonoidů k potencionální léčbě IBD. V experimentálních modelech byla prokázána jejich účinnost. Mechanismy účinku byly také podobné mechanismům účinku dosud používaných léčiv při terapii IBD [88], [89]. Také byly provedeny studie na pacientech s IBD, kterým byly dávány rostliny obsahující flavonoidy. Při studii zjistili, že přírodní léčba u pacientů s IBD může vyvolat klinickou remisi nebo klinickou odpověď. Závěr z této studie musí být interpretován s opatrností, protože pro spolehlivější výsledky je nutné provést studii u většího počtu pacientů [90].

1.3.3 Myricetin

3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon je systematický název pro myricetin (viz. Obr. 6). MYR je běžně se vyskytující rostlinný flavonoid. Společně s quercetinem, morinem a kaempferolem patří do skupiny flavonolů s podobnou strukturou [91].



Obrázek 6: Strukturální vzorec myricetinu. Vytvořeno v programu ChemSketch 12.0.

MYR je pevná látka žluté barvy. Její fyzikálně-chemické vlastnosti byly popsány teprve nedávno. Ve studii [92] bylo zjištěno, že MYR je těžko rozpustný ve vodě. Z organických rozpouštědel je snadno rozpustný např. v dimethylformamidu. Stabilita MYR je závislá na pH rozpouštědla a na teplotě. Snadno se rozkládá po zvýšení pH a teploty.

MYR je produkován rostlinami z čeledi Vřesnovitých (*Myricaceae*), Ledvinovníkovitých (*Anacardiaceae*), Rdesnovitých (*Polygonaceae*), Borovicovitých

(*Pinaceae*) nebo Prvosenkovitých (*Primulaceae*) [93]. MYR je součástí ovoce (pomeranče, brusinky, borůvky, hroznové víno), zeleniny (špenát, hrách, mrkev, paprika), ale najdeme ho i v rakytníku, chia semínkách, česneku, černém nebo zeleném čaji [91]. Množství MYR v potravinách může být sníženo přípravou potravin, protože jak už bylo zmíněno, MYR je náchylný k degradaci vysokými teplotami.

MYR se řadí mezi látky s antioxidačním, protizánětlivým, protirakovinným a antibakteriálním účinkem. MYR má terapeutický potenciál jako ochrana proti Alzheimerově chorobě. V mozku pacientů se nachází amyloidní beta ($A\beta$) fibrily a neurofibrilární klubka (NFT). Ty jsou složeny z fosforylovaných forem τ -proteinu spojeného s mikrotubuly. Terapeutický potenciál spočívá v tom, že MYR inhibuje tvorbu $A\beta$ fibril a NFT [91]. Protirakovinná aktivita MYR byla potvrzena u rakoviny pankreatu, kde MYR působil jako inhibitor fosfatidylinositol-3-kinasy. Při *in vivo* podání MYR došlo k regresi nádoru a ke snížení metastatického šíření. Dále bylo prokázáno, že MYR je netoxický při pokusech, *in vivo* i *in vitro*, na myších pankreatických buňkách [94]. Také bylo zjištěno, že MYR pozitivně působí proti bakteriím, které mají získanou rezistenci proti antibiotikům. Inhibuje růst multirezistentních *Burkholderia cepacia* a vankomycin rezistentních enterokoků. Také byl baktericidní vůči *B. cepacia* a vykazoval inhibiční aktivitu proti meticilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* [95]. To ukazuje, že flavonoidy obsažené v potravě a potravinových doplňcích mohou ovlivnit složení střevního mikrobiomu.

2 Cíl práce

Cílem práce je studium vlivu potravního flavonoidu myricetinu na bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích pacientů s CD a zjištění zda je tento flavonoid fekálními bakteriemi přeměňován na dihydromyricetin.

Pro splnění cílů práce bylo nutné řešit následující dílčí úkoly:

- sledovat metabolismus MYR při inkubaci s fekálními bakteriemi za anaerobních podmínek metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie
- vyhodnotit vliv MYR na bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích metodou PCR-DGGE
- metodou NGS porovnat bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích, které byly inkubované s přídatkem MYR a bez přídatku MYR

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

APIChem (Čína)	dihydromyricetin
BioConcept (Švýcarsko)	50% TAE pufr
Beckman Coulter (USA)	AMPure XP for PCR Purification
Elisabeth[®] Pharmacon (Velká Británie)	EliZyme HS Robust MIX Red
Kapa Biosystems © Roche (USA)	qPCR Master Mix Primer KAPA Library quantification Kit
Invitrogen (USA)	10% TBE pufr 1M Tris
Lach-Ner (ČR)	ethylacetát 99% kyselina octová methanol
Linde (ČR)	dusík oxid uhličitý vodík
New England BioLabs (USA)	Quick-Load [®] 200bp DNA Ladder OneTaq [®] Quick-Load [®] Master Mix with Standard Buffer Souprava NEBNext [®] Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent [™] Souprava Monarch [®] PCR & DNA Cleanup Kit
OXOID (Anglie)	Brain Heart Infusion (BHI) AnaeroGen [™] 3,5l – sáček pro vytvoření anaerobního prostředí
QIAGEN (Německo)	QIAamp [®] PowerFecal [®] DNA Kit QIAquick [®] PCR purification Kit

Penta s.r.o. (ČR)	ethanol
Serva (Německo)	agarosa močovina peroxodisíran amonný
Sigma-Aldrich (USA)	akrylamid formamid chlorzoxazon SYBER Green dH ₂ O
Thermo Fisher Scientific (USA)	„Barcodey“ dH ₂ O Souprava Ion PGM TM Hi-Q TM View OT2 Kit Souprava Ion PGM TM Hi-Q TM Sequencing Kit
Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd. (Japonsko)	myricetin
Top-Bio (ČR)	PCR Ethidium Bromid
VWR Chemicals (USA)	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin

Experimentální vzorky

Vzorky (A, B, C, D) byly odebrány od jedinců s Crohnovou chorobou. Fekální vzorky byly odebrány do sterilní skleněné uzavíratelné nádoby, která obsahovala sáček AnaeroGenTM 3,5L pro vytvoření dočasného anaerobního prostředí.

Vzorek A – žena, 25 let, dvě děti, kuřák, zatím bez medikace. Vzorek A byl z výzkumu vyloučen, protože dárce v průběhu výzkumu onemocněl a nebylo možné provést celý experiment.

Vzorek B – žena, 44 let, jedno dítě, nekuřák, medikace: Salofalk 500 mg, Prednison 5 mg, Helicid 10 mg

Vzorek C – žena, 52 let, dvě děti, nekuřák, medikace: Salofalk 3000 mg

Vzorek D – žena, 60 let, bezdětná, kuřák, medikace: Salofalk 500 mg, Prednison 10 mg

3.1.2 Použité přístroje

Analytická váha DV215CD	Ohaus (Švýcarsko)
Centrifuga EBA 270	Hettich (Německo)
Centrifuga HERMLE Z 216MK	HERMLE LaborTechnik (Německo)
Centrifuga sekvenačního čipu IonChip™ Minicentrifuga	Thermo Fisher Scientific (USA)
Elektroforetická aparatura DCode™ Universal Mutation Detection System	Bio-Rad (USA)
Homogenizátor FastPrep®-24	M.P. Biomedicals (USA)
HPLC kolona Chromolith RP-18 E	Merck (Německo)
HPLC systém Agilent technologies 1200	
- Automatický dávkovač	
- Čtyřkanálová peristaltická pumpa	Agilent Technologies (USA)
-Vakuový degasser	
-Kolonový termostat	
Injekční stříkačka MICROLITER Syringe 702RN	Hamilton (Švýcarsko)
Inkubátor Biological Thermostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Magnetická míchačka ESP stirrer	VELP Scientifica (Itálie)
NanoDrop™ One ^C	Thermo Fisher Scientific (USA)
PCR cycler Biometra TAdvanced 96 SG	Biometra GmbH (Německo)
qPCR cycler Quant Studio™ 3 Real-Time PCR Instrument	Thermo Fisher Scientific (USA)
Peristaltické čerpadlo a dávkovač PCD 21	Kouřil (ČR)
Předvážka KERN EW 600-2M	Kern & Sohn GmbH (Německo)
Předvážka KERN PLS 1200-3A	Kern & Sohn GmbH (Německo)
Sekvenátor pro přípravu templátu Ion OneTouch™ 2 Systém	Thermo Fisher Scientific (USA)
Sekvenační čip Ion 316™ Chip Kit v2 BC	Thermo Fisher Scientific (USA)
Vakuová pumpa Laboport	KNF Lab (USA)

Vakuové centrifugační odpařovací zařízení CentriVap	Labconco (USA)
Vodní lázeň Julabo TW12	Julabo Labortechnik GmbH (Německo)
Vortex MS2 minishaker	IKA (USA)
Vortex Mixer VX-200	Labnet (USA)
Zdroj elektroforézy PowerPac Basic	Bio-Rad (USA)
Zobrazovací zařízení pro dokumentaci gelů Molecular Imager [®] Gel Doc [™] XR+	Bio-Rad (USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava inkubačních médií

Fekální vzorky byly inkubovány v „chudém“ a „bohatém“ médiu. Za „chudé“ médium označujeme McDougallův pufr (McD., složení: 9,80 g/l NaHCO₃, 4,62 g/l Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0,57 g/l KCl, 0,47 g/l NaCl, 0,12 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 4% CaCl₂), který byl připraven podle návodu [96]. Podle návodu od výrobce OXOID bylo připraveno „bohaté“ BHI médium (složení: 37 g/l Brain Heart Broth). Diluční roztok (složení: 25,6 g/l 100mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 4 g/l NaHCO₃, 0,5 g/l L-Cystein hydrochlorid monohydrát) byl připraven dle návodu [97]. Pufry byly připraveny za anaerobních podmínek. Diluční roztok byl rozdělen do 2 skleněných lahvíček po 35 ml a do 6 skleněných lahvíček po 20 ml. McD. pufr byl rozdělen po 8 ml do 60 zkumavek typu Hungate. BHI médium bylo taktéž rozděleno po 8 ml do 60 zkumavek typu Hungate. Zkumavky typu Hungate budou v textu dále uváděny jako „kultivační zkumavky“.

Příprava fekálních vzorků s McD. pufr a BHI médiem je totožná. Na Obrázku 7, str. 35 je pro upřesnění znázorněna příprava vzorků, která platí pro všechny fekální vzorky (B, C, D) i pro obě média (McD. pufr a BHI médium). Příprava fekálních vzorků pro zjištění degradace MYR je popsána v kapitole 3.2.1.1. V kapitole 3.2.1.2 je popsána příprava vzorků pro zjištění vlivu myricetinu na složení střevního mikrobiomu (biodiverzitu).

Vysvětlivky

 diluční roztok

 roztok s MYR

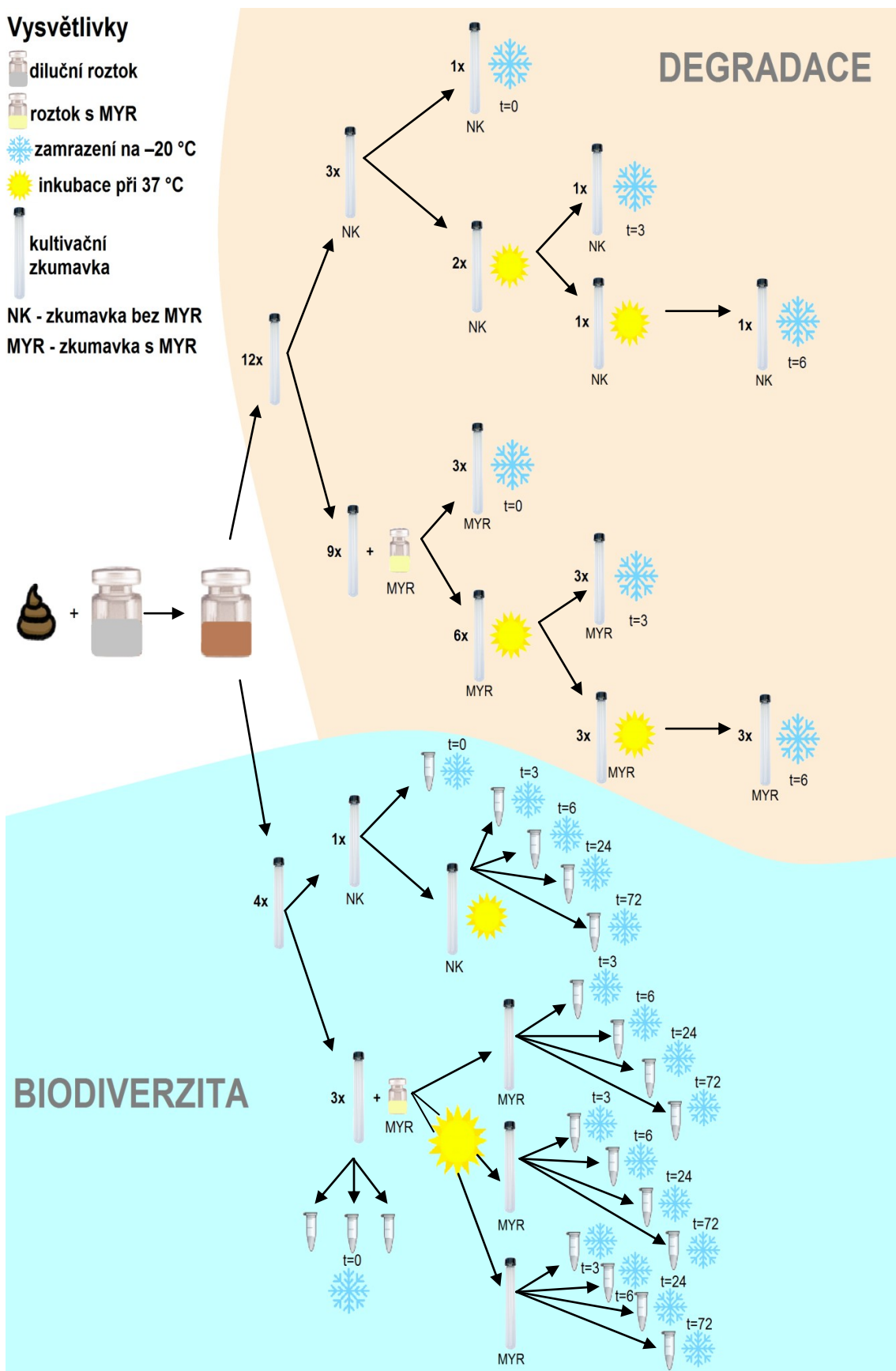
 zamrazení na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

 inkubace při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

 kulturační zkušavka

NK - zkušavka bez MYR

MYR - zkušavka s MYR



Obrázek 7: Schéma přípravy, inkubování a zamrazení vzorků. Postupy příprav jsou popsány v kapitolách 3.2.1.1 a 3.2.1.2.

3.2.1.1 Příprava fekálních vzorků pro zjištění degradace myricetinu

Do 35 ml dilučního roztoku byl připraven MYR o koncentraci 240 nmol/l za současného zavádění plynu (složení plynu: 75 % N₂, 25 % CO₂, 5 % H₂, v textu dále pouze „plyn“) pro vytvoření anaerobního prostředí. Následně byl za současného zavádění plynu navážen 1 g fekálního vzorku do 20 ml dilučního roztoku a vše bylo promícháno na Vortexu. Další příprava kultivačních zkumavek probíhala za anaerobních podmínek. Takto připravená suspenze byla rozdělena injekční stříkačkou po 1 ml do 16 kultivačních zkumavek s McD. pufrům (12 kultivačních zkumavek na sledování degradace a 4 kultivační zkumavky pro zjištění biodiverzity, viz. kapitola 3.2.1.2).

Připravený zásobní roztok MYR byl po 1 ml rozdělen do 9 kultivačních zkumavek s fekálním vzorkem. Zbylé 3 kultivační zkumavky s fekálním vzorkem byly použity jako negativní kontrola (NK). Následně byla 1 kultivační zkumavka NK a 3 kultivační zkumavky zamrazeny a uchovány při -20 °C, čas inkubace t=0. Ostatní kultivační zkumavky (2 kultivační zkumavky NK a 6 kultivačních zkumavek s MYR) byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120). V inkubátoru byla nastavena po celou dobu inkubace teplota 37 °C. Po 3 hodinách inkubace byla odebrána 1 kultivační zkumavka NK a 3 kultivační zkumavky s MYR. Tyto kultivační zkumavky byly zamrazeny a uchovány při -20 °C. Poslední kultivační zkumavky byly po 6 hodinách inkubace odebrány, zamrazeny a uchovány také při -20 °C.

Tento postup přípravy a inkubace je stejný i pro BHI médium a pro všechny fekální vzorky (B, C, D). Postup přípravy fekálních vzorků pro degradaci MYR je znázorněn v horní části na Obr. 7, str. 35.

3.2.1.2 Příprava fekálních vzorků pro zjištění vlivu myricetinu na střevní mikrobiom

V kapitole 3.2.1.1 je popsána příprava 4 kultivačních zkumavek, které jsou využity pro přípravu vzorků pro zjištění vlivu MYR na střevní mikrobiom. 1 kultivační zkumavka s fekálním vzorkem byla použita jako NK, do 3 kultivačních zkumavek s fekálním vzorkem byl přidán 1 ml zásobního roztoku MYR (postup přípravy viz. kapitola 3.2.1.1). Z takto připravených kultivačních zkumavek byl odebrán 1 ml do mikrozkušavky. Tyto mikrozkušavky byly zamrazeny a uchovány při -20 °C v čase inkubace t=0. Všechny 4 kultivační zkumavky byly vloženy do inkubátoru s nastavenou

teplotou 37 °C (Biological Thermostat BT 120). V čase inkubace 3, 6, 24 a 72 hodin byl z každé kultivační zkumavky za současného zavádění plynu odebrán 1 ml do mikrozkušavky. Mikrozkušavky byly následně zamrazeny a uchovány při -20 °C. Názorný postup odebrání vzorků pro zjištění biodiverzity je znázorněn v dolní části Obr. 7, str. 35. Tento postup přípravy fekálních vzorků pro zjištění vlivu MYR na střevní mikrobiom je totožný pro všechny fekální vzorky (B, C, D) i pro BHI médium.

3.2.2 Postup extrakce myricetinu z kultivačních zkumavek

Kultivační zkumavky s fekálními vzorky (B, C, D) inkubované s McD. pufrem a BHI médiem, které byly připraveny pro analýzu obsahu MYR (kap. 3.2.1.1), byly rozmrazeny a protřepány. Z kultivačních zkumavek byly odebrány 2 ml inkubační směsi do vysokých zkumavek. Kultivační zkumavky byly následně zamrazeny. Ke 2 ml inkubační směsi bylo přidáno 10 µl 99% kyseliny octové a následně promícháno na Vortexu. Poté bylo přidáno do každé zkumavky 30 µl 1mM chlorzoxazonu (CHLXZ), který je využit jako vnitřní standard a promícháno pomocí Vortexu. K takto připravené směsi bylo přidáno 6 ml ethylacetátu a 80 s extrahováno pomocí Vortexu. Následně byla extrahovaná směs přenesena do uzavíratelných centrifugačních zkumavek. Ty byly centrifugovány 10 minut při 2254× g na centrifuze EBA 270 s výkyvným rotorem (6 × 15 ml). Separovaná ethylacetátová frakce (5 ml) byla po částech (1 ml) odpařena ve vialkách tvaru „Champage“, přibližně po dobu 150 minut, na vakuovém centrifugačním zahušťovacím zařízení CentriVap (Labconco) při 36 °C. Před aplikací do RP-HPLC byly odparky rozpuštěny v 80 µl methanolu.

3.2.3 Metoda HPLC na reverzní fázi

Pro analýzu degradace MYR byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC, z angl. „reverse phase high-performance liquid chromatography“). Také byl připraven roztok standardu. Standard obsahoval 10mM MYR, 10mM dihydromyricetin (DHM), 1mM CHLXZ a 99% methanol. Takto připravený standard byl přenesen do vialky tvaru „Champage“. Vialky s rozpuštěnými odparky a se standardem byly vloženy do stojanu automatického dávkovače (ALS G1329A), který je součástí přístroje. Připravené vzorky byly analyzovány metodou RP-HPLC s UV-detekcí (HPLC Agilent 1200 series). Analýza probíhala na monolitické koloně Chromolith RP-18 E. Systém HPLC byl složen z čtyřkanálové peristaltické

pumpy, automatického dávkovače, vakuového degasseru (G1322A) a termostatu kolony.

Složení mobilních fází bylo převzato z bakalářské práce [98]. Byly připraveny tři mobilní fáze, kde mobilní fáze A obsahovala 40% methanol a 0,1% trifluoroctovou kyselinu (TFA), mobilní fáze B byla 100% methanol a mobilní fáze C byla ultračistá voda s 0,1% TFA. Mobilní fáze C byla před použitím vakuově přefiltrována (systém Stericup[®]). Mobilní fáze byly odplyněny pomocí ultrazvukové sonikace po dobu 10 minut.

Pro určení množství MYR v extraktech byly použity podmínky a složení gradientu, které jsou uvedeny v Tabulce 2. Analýza probíhala 20 minut při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min. Při analýze byl tlak v koloně přibližně 60 barů. Kolona byla termostatovaná po celou dobu analýzy na 35 °C a detekce byla při vlnových délkách 280 nm a 340 nm. Nástřikový objem na kolonu byl u každého vzorku 20 µl. Po provedené analýze byly vzorky vyhodnoceny pomocí vnitřního standardu.

Tabulka 2 – Složení gradientu a podmínky pro analýzu extraktů pomocí RP-HPLC

t [min]	Mobilní fáze [%]		
	A	B	C
0 – 5,5	40	0	60
6,5 – 15,5	80	0	20
16,0 – 17,5	50	50	0
18,0 – 20,0	40	0	60

3.2.4 Postup izolace bakteriální DNA

Bakteriální DNA byla izolována pomocí soupravy „QIAamp PowerFecal DNA Kit“, výrobce QIAGEN. K izolaci DNA byla v průběhu celé práce použita centrifuga HERMLE Z 216MK a homogenizátor typu FastPrep[®]-24. Zamražené fekální vzorky (B, C, D) v mikrozkušavkách (příprava viz. kapitola 3.2.1.2) byly rozmrazeny a následně centrifugovány 1 minutu při 3384× g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, peleta byla resuspendována v 750 µl „PowerBead Solution“ roztoku a vše bylo přeneseno do zkumavky typu „Dry Bead Tube“. Následně bylo do zkumavek přidáno 60 µl „Solution C1“ a zkumavky byly přeneseny do homogenizátoru a třepány 60 s při max. otáčkách. Vzorky ve zkumavkách byly vloženy na 10 minut do vodní lázně, která byla vyhřátá na

70 °C. Homogenizace a zahřátí bylo provedeno celkem dvakrát. Poté byly zkumavky centrifugovány 1 min. při 12 000× g. Supernatant o objemu 500 µl byl přenesen do mikrozukumavky typu „Collection Tube“. K supernatantu bylo přidáno 250 µl roztoku „Solution C2“ a promícháno na Vortexu. Následně byly zkumavky vloženy na 5 min. do chladicího boxu o teplotě 2 °C. V průběhu inkubace v chladicím boxu docházelo k občasnému míchání obsahu v mikrozukumavkách. Po inkubaci byl celý obsah centrifugován 1 min. při 12 000× g. Po centrifugaci byl přenesen supernatant (600 µl) do nové mikrozukumavky typu „Collection Tube“ a bylo k němu přidáno 200 µl roztoku „Solution C3“, promícháno na Vortexu. Poté byly mikrozukumavky vloženy do chladicího boxu o teplotě 2 °C. Inkubace trvala 5 minut za občasného promíchání obsahu mikrozukumavek. Dalším krokem byla centrifugace 1 min. při 12 000× g. Následně bylo přeneseno 750 µl do nové mikrozukumavky typu „Collection Tube“, přidáno 1200 µl roztoku „Solution C4“ a promícháno 5 s na Vortexu. Vzniklý roztok byl po 650 µl přenášen do kolonky „MB Spin Column“ a centrifugováno 1 min. při 12 000× g. Po filtraci veškerého roztoku bylo do kolonky „MB Spin Column“ přidáno 500 µl roztoku „Solution C5“ a centrifugováno 1 min. při 12 000× g. Filtrát byl odstraněn a kolonka „MB Spin Column“ byla opět centrifugována 2 min. při 12 000× g, to vedlo k odstranění veškerého roztoku „Solution C5“. Poté byla kolona „MB Spin Column“ přenesena do nové mikrozukumavky typu „Collection Tube“ a na matrix v koloně bylo přidáno 60 µl roztoku „Solution C6“. Přidáním roztoku „Solution C6“ a následnou centrifugací 1 min. při 12 000× g došlo k vymytí DNA z kolony. Posledním krokem izolace DNA bylo změření její koncentrace na přístroji NanoDrop One^C. Izolovaná DNA v mikrozukumavkách byla uchována při –20 °C.

3.2.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza a metoda PCR

Izolovaná DNA byla následně analyzována s cílem identifikovat bakteriální zastoupení v jednotlivých vzorcích. Pro analýzu bylo využito metodiky dle Muyzer a kol. [99].

3.2.5.1 Metoda PCR

Pro zjištění zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů je potřeba amplifikovat úsek DNA kódující 16S rRNA. Jak už bylo zmíněno v teoretickém úvodu (viz. kapitola 1.1.1), 16S rRNA se využívá především proto, že obsahuje hypervariabilní úseky, které jsou amplifikovány a používány pro identifikaci bakteriálních druhů.

Mikrozkumavky s izolovanou DNA byly rozmrazeny a podle změřené koncentrace byla izolovaná DNA naředěna PCR H₂O do mikrotitrační destičky. Ředění podle koncentrace bylo buď 2 ×, 3 × nebo 5 ×. Příklad koncentrací a ředění izolované DNA je uveden v Tabulce 3. Vždy bylo do mikrotitrační destičky odměřeno 20 µl DNA a k tomu bylo přidáno 20 µl, 40 µl nebo 80 µl PCR H₂O. Takto připravené vzorky byly promíchány. Následně byla do mikrozkumavky připravena reakční směs pro PCR reakci. Reakční složky jsou uvedeny v Tabulce 4. Do nové mikrotitrační destičky bylo odměřeno 29 µl reakční směsi. Poté byl přidán 1 µl naředěné izolované DNA, aby celkový objem pro PCR reakci byl 30 µl. V Tabulce 4 je ukázka složení reakční směsi pro jeden vzorek DNA. Mikrotitrační destička se vzorky byla uzavřena fólií a vložena do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometra). Reakční podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 5, str. 41.

Tabulka 3 – Příklad koncentrací a ředění izolované DNA

Vzorek	Pufr	c [ng/µl]	Ředění
B0	BHI	21,1	2 ×
B3	BHI	41,4	3 ×
B24	BHI	121,5	5 ×

Legenda: B – fekální vzorek B v čase inkubace 0, 3 a 24 hodin

Tabulka 4 – Složení reakční směsi pro PCR – jeden vzorek

Složky reakční směsi	V [µl]
10 µM primer 338 GC	1
10 µM primer 534 RP	1
PCR mix	15
dH ₂ O	8
DNA templát	1

Legenda: PCR mix (One *Taq*[®] Quick-Load[®] 2X Master Mix with Standard Buffer, BioLabs, New England) – složení: 20mM Tris-HCl, 22mM KCl, 22mM NH₄Cl, 1,8mM MgCl₂, 5% glycerol, 0,06% IGEPAL[®] CA-630, 0,05% Tween 20, 0,2mM dNTPs, barviva, stabilizátory, 25 U/ml One*Taq*[®] DNA polymerasa, pH 8,9 při 25 °C, „Forward“ primer 338 GC (sekvence: 5'-CGCCCGCCGCGCC CCGCGCCCGGCCCGCCGCCGCCGCGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') a „Reverse“ primer 534 RP (sekvence – 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), dH₂O (Sigma-Aldrich).

Tabulka 5 – Reakční podmínky PCR reakce – DGGE

Počet cyklů	Čas	Teplota [°C]
1	5 min.	95,0
32	30 s	95,0
	30 s	52,0
	1 min.	72,0
	5 min.	72,0
1	10 min.	8,0

Kontrola PCR produktů byla provedena pomocí nativní elektroforézy. Pro elektroforézu je nutné připravit 1,5% agarosový gel s 5 μ l ethydium bromidem. Připravená směs byla nalita do misky na gelovou elektroforézu. Po ztuhnutí byly na gel nanášeny PCR produkty o objemu 2 μ l. Vždy do první jamky v gelu byly nanесeny 2 μ l standardu DNA. Celková doba elektroforézy byla 20 minut a probíhala při 110 V. Po elektroforéze bylo v zobrazovacím zařízení (Molecular Imager[®] GelDoc[™] XR+, Bio-Rad) pod UV světlem ověřeno, zda došlo ve všech vzorcích k namnožení úseku DNA, který kóduje 16S rRNA.

3.2.5.2 Metoda DGGE

Metoda DGGE vychází z elektroforetické pohyblivosti části dsDNA v polyakrylamidovém gelu [99]. Elektrické pole působící na amplifikovaný úsek DNA, je důvodem, proč dochází k pohybu DNA v gelu. Rychlost pohybu dsDNA záleží především na její molekulové hmotnosti. Také je rychlost pohybu ovlivněna denaturační silou gelu. Denaturační sílu zajišťují denaturační látky obsažené v polyakrylamidovém gelu, tj. močovina a formamid. Se zvyšující se denaturační silou v gelu dochází k oddělení a denaturaci dsDNA.

Při přípravě gelu musí být dodrženo rozmezí denaturační síly, díky kterému dochází k rozvolnění DNA. Denaturační síla jednoho gelu se pohybuje v rozmezí 35 – 60%. Složky pro přípravu roztoků pro jeden gel jsou uvedeny v Tabulce 6, str. 42.

Tabulka 6 – Chemikálie pro přípravu jednoho denaturačního polyakrylamidového gelu

Reagencie	Denaturační síla	
	35%	60%
40% akrylamid [ml]	5,560	5,560
50% TAE [ml]	0,500	0,500
Formamid [ml]	3,500	6,000
dH ₂ O [ml]	3,675	6,300
Močovina [g]	12,250	9,500

Spojnice v systému spojených nádob byla uzavřena, připravené roztoky byly nality do nádob. Roztok o vyšší denaturační síle byl nalit do nádoby blíž k výpusti. Mezi skla aparatury byla umístěna jehla výpustě. Následně bylo zapnuto míchání a do obou nádob bylo přidáno 20 μ l TEMEDu a 200 μ l 10% peroxidisíranu amonného. Nádoby byly spojeny a bylo zapnuto čerpadlo. Po naplnění DGGE aparatury byl vložen mezi skla „hřeben“ pro aplikaci vzorků. Gel polymeroval přibližně 1 hodinu.

Po přípravě gelu byl připraven tank pro elektroforézu. Do tanku bylo nalito 7 l 1% Tris-acetátového pufru (TAE; složení: 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA). Pufr byl v elektroforetické vaně vyhříván na 60 °C. Gel byl po polymeraci upevněn do DGGE aparatury a celá aparatura byla umístěna do tanku na elektroforézu. Do jamek v gelu byl nejprve aplikován standart a následně byly aplikovány postupně vzorky (30 μ l). Elektroforéza nejprve probíhala 15 minut při 30 V, po ustanovení teploty bylo zvýšeno napětí na 55 V. Doba trvání elektroforézy byla přibližně 18 hodin.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do nádoby s 50 ml 1% TAE pufru a s 5 μ l interkalační barvy SYBER Green. Za stálého míchání byl gel barven 30 minut. Poté byl fotograficky zdokumentován zobrazovacím zařízením „Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+“ (Bio-Rad). Z fotografií byly vybrány významné zóny (podle intenzity zóny, rozdílnosti mezi vzorkem NK nebo vzorkem s MYR). Tyto vybrané zóny byly následně pod UV světlem v tmavé místnosti vyříznuty a přeneseny do mikroskopu. K vyříznutým zónám bylo přidáno 100 μ l dH₂O a 30 s promícháno na Vortexu. Následně byly mikroskopu centrifugovány 10 minut při 9 500 \times g (centrifuga HERMLE Z 216MK). Takto připravené vzorky byly uchovány při – 20 °C.

3.2.5.3 Příprava vzorků pro Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je metoda, kterou lze sekvenovat DNA fragmenty z DGGE gelů. Tuto metodu vyvinul Frederick Sanger v roce 1977. Je založena na náhodném začlenění dideoxynukleotidů do řetězce. Probíhají čtyři paralelní reakce, do kterých vstupuje DNA templát, primer, DNA polymerasa, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs) a jedna skupina modifikovaných dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs). Při této reakci dochází k prodloužení DNA řetězce a k začlenění deoxynukleotidů. Během Sangerovo sekvenování vznikají různě dlouhé fragmenty DNA s dideoxynukleotidy (ddNTPs) na konci [100], [101].

Analýza DNA fragmentů může být uskutečněna pomocí gelové elektroforézy nebo kapilární elektroforézy. Sangerovo sekvenování se skládá ze čtyř reakcí a každá reakce probíhá v samostatné dráze. K zobrazení gelů se využívá UV záření nebo metoda autoradiografie. Konečným výsledkem Sangerova sekvenování je určení nukleotidové sekvence templátu. V současné době se nejvíce využívá fluorescenčně značených dideoxynukleotidů. Při kapilární elektroforéze je použito značení dideoxynukleotidů jinými fluorescenčními barvami, proto připravené vzorky mohou být smíchány a analyzovány společně. Výsledná sekvence je zpravidla odečtena laserovou excitací a tvoří tzv. sekvenogram [101], [102].

Mikrozkumavky s vyříznutými významnými zónami byly rozmrazeny. Následně 30 s promíchány na Vortexu a centrifugovány 10 minut při 9 500× g. To mělo vést k uvolnění malého množství DNA. Poté byla připravena reakční směs pro PCR reakci. Složky reakční směsi pro jeden vzorek jsou uvedeny v Tabulce 7, str. 44.

Připravené vzorky na mikrotitrační destičce byly vloženy do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria) a byl spuštěn program na DGGE. Jednotlivé kroky programu DGGE jsou uvedeny v Tabulce 5, str. 41.

Tabulka 7 – Složky reakční směsi PCR reakce pro jeden vzorek

Složky reakční směsi	V [μl]
dH ₂ O s kouskem ledu	11
10 M primer 341 FP	1
10 M primer 534 RP	1
PCR mix	15
dH ₂ O	2

Legenda: PCR mix (EliZyme HS Robust MIX Red, Elisabeth[®] Pharmacon) – složení: enzym, 2mM dNTPs, 6mM MgCl₂, barvivo, pufr „Forward“ primer 341 FP (sekvence – 5'-CCTACGGGAGGCAG CAG-3'), „Reverse“ primer 534 RP (sekvence – 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), dH₂O (Sigma-Aldrich)

Po dokončení jednotlivých kroků PCR reakce byla provedena kontrola PCR produktů, postup kontroly je popsán v kapitole 3.2.5.1. Po dokončení kontroly byly PCR produkty purifikovány. Purifikace DNA z namnožených vzorků byla provedena pomocí soupravy „QIAquick PCR purification Kit“ (QIAGEN). Připravené vzorky v mikrotitrační destičce o objemu 28 μl byly naředěny 140 μl pufru „Buffer PB“ a promíchány. Následně byl celý objem přenesen do kolony „QIAquick column“ a centrifugována 1 minutu při 17 900× g (centrifuga HERMLE Z 216MK). Po centrifugaci byl filtrát odstraněn a na kolonu bylo aplikováno 750 μl pufru „Buffer PE“, aby došlo k pročištění zachycené DNA na matrix v koloně. Kolona byla centrifugována 1 minutu při 17 900× g (HERMLE Z 216MK). Po centrifugaci byl opět filtrát odstraněn a kolona „QIAquick column“ byla na prázdno centrifugována 1 minutu při 17 900× g. Následně byla kolona přenesena do nové mikrozkuhavky a na matrix v koloně bylo aplikováno 30 μl pufru „Buffer EB“. Následovala centrifugace 1 minutu při 17 900× g pro uvolnění DNA. Posledním krokem purifikace bylo změření koncentrace purifikované DNA na přístroji NanoDrop One^C.

Po purifikaci byly připraveny mikrozkuhavky o objemu 200 μl. Do každé mikrozkuhavky bylo odměřeno 50 ng purifikované DNA. K purifikované DNA bylo přidáno 2,5 μl 10μM primeru 341FP nebo 2,5 μl 10μM 534RP primeru. Poté byly mikrozkuhavky doplněny PCR H₂O do celkového objemu 10 μl. Takto připravené vzorky byly vloženy do obálky a poslány komerční sekvenovací firmě SEQme s.r.o..

3.2.6 Sekvenování nové generace

Vývoj NGS metod otevírá nové možnosti v oblasti sekvenování [103]. S vývojem nových metod je sekvenování levnější, rychlejší a získané výsledky genomů mají přesné informace. Každá používaná metoda má své výhody a nevýhody. Výhodou těchto metod je rychlé statistické zpracování dat. V současnosti existuje celá řada komerčních NGS platform. NGS platformy používají rozdílné sekvenační technologie. Rozdíly v sekvenační technologii jsou patrné především v použitých chemikáliích a detekčních metodách. Nejvíce využívané platformy jsou MinION, Illumina, Ion Torrent a platforma SOLiD. Všechny tyto platformy mají společné následující kroky přípravy, tj. příprava knihovny, namnožení knihovny a sekvenování.

V této práci je k sekvenování využita platforma Ion Torrent (Life Technologies). Tato metoda je založena na iontově polovodičovém sekvenování. Princip detekce bází nespočívá v zobrazení fluorescenčních signálů, ale během prodloužení každého nukleotidu dojde k uvolnění vodíkových iontů [103]. Pro namnožení knihovny využívá platforma Ion Torrent metodu emulzní PCR s použitím kuliček „AmpureBeads“. Při Ion Torrent sekvenování je využíván sekvenační čip. Do jamek sekvenačního čipu jsou následně rozmístěny kuličky „AmpureBeads“ a tím je zajištěno, že v každé jamce sekvenačního čipu je umístěn jiný templát namnožené DNA. Sekvenační čip je složen z několika vrstev. První vrstvou jsou mikrojamky, pod nimi je vrstva citlivá na ionty. Poslední vrstvou čipu je iontový snímač. Princip sekvenačního čipu je založen na detekci protonů vznikajících během sekvenační reakce. Při sekvenační reakci jsou postupně použity roztoky neznačených dNTP, proto musí být sekvenační čip umístěn v průtokové buňce. Sekvenační reakce proběhne pouze za přítomnosti DNA polymerasy. Při začlenění nukleotidu do DNA sekvence dojde k uvolnění vodíkového protonu, který změní pH roztoku. Tato změna je detekována iontovým čínidlem a přenesena do digitální podoby [102], [103].

3.2.6.1 Příprava amplikonů V4-V5 16S rRNA

Prvním krokem NGS je příprava amplikonů V4-V5 16S rRNA. Hlavním cílem namnožení toho úseku je, že se jedná o úsek, který se vyskytuje u všech druhů bakterií. Pro přípravu byly použity primery a amplifikační program podle práce Fliegerové a kol. [104].

Podle koncentrací izolované DNA (viz. kapitola 3.2.4) byly vybrány vzorky, které byly namnoženy a byla u nich provedena sekvenace. Ze 120 vzorků bylo vybráno 60 vzorků pro sekvenaci. Poté byla naředěná DNA rozmrazena a do nové mikrozkuřavky byla připravena směs pro PCR reakci. Složky reakční směsi pro PCR reakci jsou uvedeny v Tabulce 8. Následně byla směs pro PCR reakci rozdělena po 29 μl do mikrotitrační destičky a poté byl k reakční směsi přidán 1 μl naředěné izolované DNA. Mikrotitrační destička byla vložena do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria) a byl spuštěn program NGS V4-V5. Jednotlivé kroky tohoto programu jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 8 – Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA – NGS analýza

Složky reakční směsi	V [μl]
PCR mix	15
„Forward“ primer BactBF	1
„Reverse“ primer BactBR	1
dH ₂ O	12
DNA	1

Legenda: PCR mix (EliZyme HS Robust MIX Red, Elisabeth[®] Pharmacon), složení: enzym, 2mM dNTPs, 6mM MgCl₂, barvivo, puřr „Forward“ primer BactBF (5'-GGATTAGATACCCTGGTAGT-3'), „Reverse“ primer BactBR (5'-CACGACACGAGCTGACG-3'), dH₂O (Sigma-Aldrich)

Tabulka 9 – Reakční podmínky PCR reakce – amplifikace úseku V4-V5 16S rRNA

Poččet cyklů	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas
1	95	5 min.
25	95	30 s
	57	30 s
	72	30 s
	72	5 min.
1	12	∞

Po dokončení PCR reakce byly produkty ověřeny pomocí agarózové elektroforézy. Postup kontroly produktů je uveden v kapitole 3.2.5.1. Při kontrole byly očekávány produkty o délce 300 bp.

Po kontrole byly všechny produkty přečištěny soupravou Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (BioLabs[®] Inc.). V průběhu celého postupu přečištění byla použita centrifuga HERMLE Z 216MK. K 28 μ l namnožené DNA bylo přidáno 140 μ l roztoku „DNA Cleanup Binding Buffer“ a promícháno. Celý objem byl přenesen na kolony umístěné v mikrozkuhavce a centrifugována 1 min. při 16 000 \times g. Po centrifugaci byl filtrát odstraněn a do kolony bylo přidáno 200 μ l roztoku „DNA Wash“ a centrifugováno 1 min. při 16 000 \times g. Po odstranění filtrátu byla kolona na prázdno centrifugována 2 min. při 16 000 \times g. Po centrifugaci byla kolona přenesena do nové mikrozkuhavky. Do středu matrix kolony bylo aplikováno 20 μ l roztoku „DNA Elution Buffer“ a centrifugováno 1 min. při 16 000 \times g. Po přečištění DNA produktů byla změřena koncentrace na přístroji NanoDrop One^C. Naměřená koncentrace se měla pohybovat okolo 20–40 ng/ μ l. Přečištěná DNA byla přenesena do mikrotitrační destičky.

3.2.6.2 Příprava knihovny

Při přípravě knihovny byl dodržován postup NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent od BioLabs Inc. Tento postup je složen z několika na sebe navazujících kroků.

a) Úprava konců templátů – „End repair“

Tento krok slouží k úpravě konců a k vytvoření fragmentů. Vytvořené fragmenty mají tupé zakončení.

Prvním krokem této části přípravy bylo připravení PCR směsi do mikrozkuhavky. Složení reakční PCR směsi, pro jeden vzorek DNA je uvedeno v Tabulce 10, str. 48. Do nové mikrotitrační destičky bylo odměřeno 25 μ l PCR směsi a 5 μ l DNA. Mikrotitrační destička byla vložena do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria) a byl spuštěn program „NGS End repair“. Reakční podmínky tohoto programu jsou uvedeny v Tabulce 11, str. 48.

Tabulka 10 – Složky reakční PCR směsi pro jeden vzorek – krok „End repair“

Složky reakční směsi	V [μl]
„ER buffer“	3
„ER enzym“	1,5
dH ₂ O	20,5
DNA	5

Legenda: „ER buffer“ – End Repair Reaction Buffer (BioLabs Inc., New England), „ER enzym“ – End Repair Enzyme Mix (BioLabs Inc., New England), DNA – amplikony V4-V5 16S rRNA, postup přípravy viz. kapitola 3.2.6.1, dH₂O (Sigma-Aldrich)

Tabulka 11 – Reakční podmínky programu „NGS End repair“

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
1	25	20 min.
1	70	10 min.
1	8	∞

b) Spojení „adaptérů“ a „barcodeů“

V tomto kroku dochází k připojení „adaptérů“ (krátké oligonukleotidy, díky kterým dojde k navázání komplementárních struktur) a jednoho specifického „barcode“ na templát s tupým zakončením, který byl připraven v kroku a) (viz. str. 47). „Barcode“ je krátká a unikátní sekvence, která se připojuje na jednu stranu templátu a slouží ke spojení vzorků do jedné knihovny [105]. Podle těchto „barcodeů“ při závěrečné analýze rozpoznáme o jaký vzorek DNA se jedná.

V tomto kroku byla opět připravena PCR směs. Její složení je uvedeno v Tabulce 12, str. 49. Připravená PCR směs byla přidána po 19 μl do mikrotitrační destičky se vzorky připravenými v kroku a) (viz. str. 47). Posledním krokem bylo přidání 1 μl naředěného barcode (IonExpress, Life Technologies) ze zásobní mikrotitrační destičky. Takto připravené vzorky byly umístěny do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria) a byl spuštěn program NGS „AdaptLig“, jeho reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulce 13, str. 49.

Tabulka 12 – Složky PCR směsi pro jeden vzorek

Složky PCR směsi	V [μl]
„T4 ligase buffer“	5
„P1 adaptor“	0,5
„DNA polymerase“	0,5
„T4 ligase“	3
dH ₂ O	10

Legenda: „T4 ligase buffer“ (BioLabs Inc., New England), P1 adaptor (BioLabs Inc., New England), DNA polymerase (BioLabs Inc., New England), dH₂O (Sigma-Aldrich)

Tabulka 13 – Reakční podmínky programu NGS „AdaptLig“

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
1	25	15 min.
1	65	5 min.
1	8	∞

c) Přečištění DNA s kuličkami „AmpureBeads“

Po napojení „adaptérů“ a „barcodů“ byla DNA ve vzorcích pročištěna pomocí magnetických kuliček „AmpureBeads“. Ke každému vzorku v jamce bylo přidáno 60 μl magnetických kuliček „AmpureBeads“. Obsah jamek byl promíchán pipetou a inkubován 3 minuty. Po inkubaci byla mikrotitrační destička vložena na speciální magnetický stojan. Přibližně po 3 minutách inkubace došlo k fixaci magnetických kuliček s navázanou DNA na stěny jamek. K fixaci dojde vždy na stěnu jamky, kde se stěna jamky dotýká magnetu. Touto fixací vznikl supernatant, který byl odstraněn. Následně bylo přidáno do každé jamky 180 μl 70% ethanolu a inkubováno 1 minutu. Po inkubaci byl ethanol odstraněn. Tento krok byl proveden dvakrát. Pro úplné odstranění ethanolu bylo nutno počkat 3 minuty, aby se přebytečný ethanol odpařil. Poté byla mikrotitrační deska odstraněna z magnetického stojanu a do každé jamky bylo přidáno 50 μl 10mM Tris-HCl, promícháno a inkubováno 3 minuty. To vedlo k uvolnění DNA z povrchu magnetických kuliček. Po inkubaci byla mikrotitrační destička vložena na magnetický stojan a 47 μl supernatantu (obsahoval DNA) bylo přeneseno do nové mikrotitrační destičky.

d) Namnožení knihovny

Namnožení knihovny vede k zesílení výsledného signálu, který získáme ze sekvenátoru při konečné analýze.

Pro namnožení knihovny bylo nutné připravit PCR směs. Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 14. PCR směs byla po 27 μl rozdělena do jamek nové mikrotitrační destičky a bylo k ní přidáno 23 μl purifikované DNA (viz. c), str. 49). Mikrotitrační destička byla vložena do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria) a byl spuštěn program NGS „Amplific“. Reakční podmínky programu jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 14 – Složky PCR směsi pro namnožení knihovny

Složky reakční směsi	V [μl]
Primery	2
PCR mix	25

Legenda: Primery (NEBNext Library Primers for Ion Torrent, BioLabs Inc. New England), PCR mix (NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix, BioLabs Inc., New England)

Tabulka 15 – Reakční podmínky programu NGS „Amplific“

Počet cyklů	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas
1	98,0	30 s
7	98,0	10 s
	58,0	30 s
	72,0	30 s
1	72,0	5 min.

e) Přečištění DNA s kuličkami „AmpureBeads“

Při tomto kroku byl zopakován postup c) Přečištění DNA s kuličkami „AmpureBeads“, str. 49.

f) Ředění knihovny a její kvantifikace

Námi připravenou DNA v předchozím kroku bylo potřeba před přípravou qPCR naředit v poměru 1:20, 1:500 a 1:1000. První ředění bylo 1:20. Do nové mikrotitrační destičky bylo odměřeno 95 μl 10mM Tris-HCl a k tomu bylo přidáno 5 μl přečištěné DNA. Z takto naředěné DNA bylo následně připraveno ředění v poměru 1:500 a 1:1000. Pro

ředění v poměru 1:500 bylo odměřeno do nové mikrotitrační destičky 96 μ l 10mM Tris-HCl a 4 μ l naředěné DNA (1:20). Pro naředění v poměru 1:1000 bylo odměřeno do nové mikrotitrační destičky 98 μ l 10mM Tris-HCl a 2 μ l naředěné DNA (1:20).

Po přípravě ředění knihovny bylo provedeno qPCR podle protokolu KAPA Library Quantification Kit Ion TorrentTM Platforms. Složky reakční směsi qPCR jsou uvedeny v Tabulce 16.

Reakční směs pro qPCR byla připravena pro 69 vzorků:

60 vzorků DNA

6 vzorků standard KAPA

3 vzorky dH₂O

Reakční směs byla odměřena po 6,2 μ l do jamek mikrotitrační destičky a následně k této směsi byly přidány 4 μ l naředěné DNA (1:1000), DNA standardy (STD 1–6) nebo dH₂O. Koncentrace jednotlivých standardů jsou uvedeny v Tabulce 17, str. 52. Mikrotitrační destička byla utěsněna a vložena do qPCR „cycleru“ QuantStudioTM 3 Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific). Nastavené parametry při qPCR reakci jsou uvedeny v Tabulce 18, str. 52.

Tabulka 16 – Složky reakční směsi qPCR pro jeden vzorek naředěné DNA v poměru 1:1000

Složky reakční směsi	V [μ l]
KAPA SYBER FAST qPCR Master Mix (2 \times)	5
Primer Premix (10 \times)	1
ROX High or Low (50 \times)	0,2
DNA	4

Legenda: Všechny složky reakční směsi jsou od výrobce KAPABIOSYSTEMS, Roche.

Tabulka 17 – Koncentrace standardů KAPA použitých při qPCR reakci

	Koncentrace [pM]
STD 1	83
STD 2	8,3
STD 3	0,83
STD 4	0,083
STD 5	0,0083
STD 6	0,00083

Legenda: STD 1 – 6 jsou DNA standardy KAPA od výrobce KAPABIOSYSTEMS, Roche.

Tabulka 18 – Reakční podmínky qPCR reakce

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
1.	1	95 °C	5 min
2.	35	95 °C	30 s
3.		60 °C	45 s
4.	65 – 95 °C		

Legenda: Při 95 °C v kroku 1. dochází k počáteční denaturaci. Následuje 2. krok a to denaturace při 95 °C. V kroku 3. při 60 °C dochází k nasednutí primerů. Krok 2. a 3. se opakují pro amplifikaci DNA. Poslední krok 4. probíhá v rozmezí teplot 65 – 95 °C, v tomto kroku dochází k analýze křivky tání.

Ze získaných koncentrací po ukončení qPCR reakce byl určen poměr ředění pomocí programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft). Do nové mikrotitrační destičky byly vzorky naředěny dle vypočítaných poměrů ředění. Konečná koncentrace naředěných vzorků před NGS sekvenováním byla 40 pM DNA. Z takto připravených vzorků byl odebrán vždy 1 µl a přenesen do nové mikrozkušky. Tímto krokem vznikla konečná knihovna, která byla následně použita pro NGS sekvenování a skladována v lednici. Všechny mikrotitrační destičky s naředěnou DNA byly uchovány při –20 °C.

3.2.6.3 Příprava sekvenačního templátu, sekvenování a analýza dat

Příprava sekvenačního templátu ze vzorků byla provedena za využití komerční sady Ion PGM™ Hi-Q™ View Kit na přístroji Ion OneTouch™ 2 (ThermoFisher Scientific). Při přípravě byl dodržen postup od výrobce sekvenační platformy. Příprava templátu byla zahájena v odpoledních hodinách a probíhala přes noc. Přesný postup je přiložen v Příloze 1.

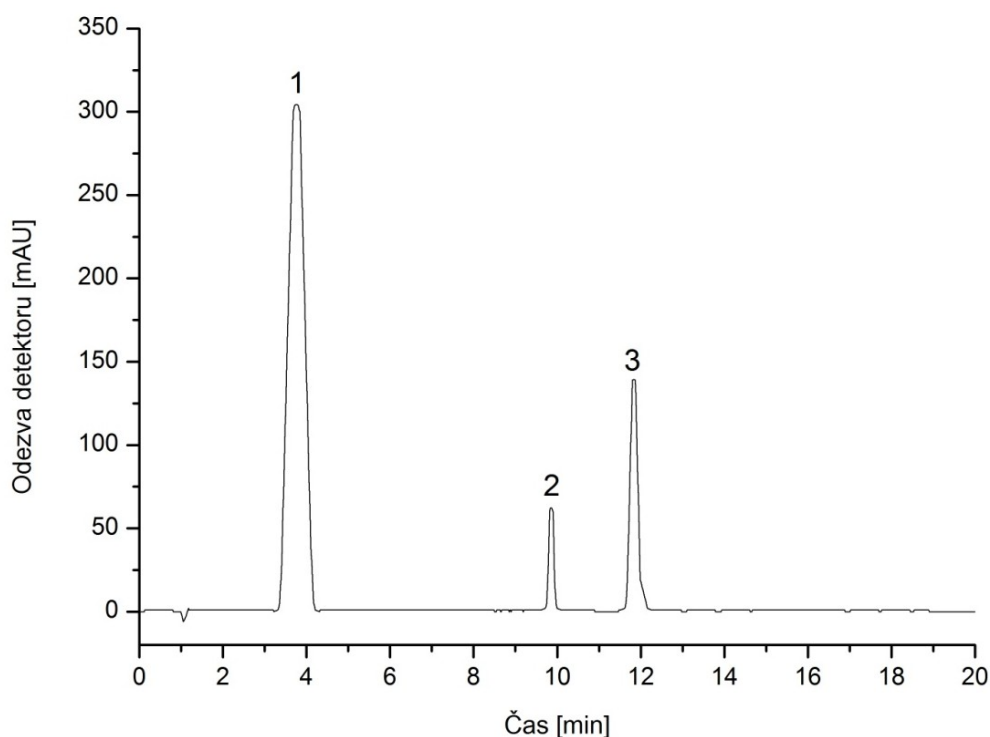
Při sekvenování byla využita sada Ion PGMTM Hi-QTM View Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) a čip Ion 316TM Chip Kit v2 BC (ThermoFisher Scientific). V tomto kroku byl využit templát, který byl připraven v předchozím kroku. Celý postup přípravy je přiložen v Příloze 2.

Získaná data byla analyzována pomocí programu QIIME 2 (z angl. „Quantitative Insights Into Microbial Ecology“). Zpracování dat bylo provedeno ve virtuálním prostředí Linuxu. Byly použity návody, které jsou zveřejněny na webových stránkách www.qiime2.org.

4 Výsledky

4.1 Degradace myricetinu střevním mikrobiomem

Metodou RP-HPLC byla pozorována degradace MYR a případná redukce MYR na DHM ve fekálních vzorcích. Fekální vzorky byly získány od dárců, kteří mají CD. Fekální vzorek A nebyl při těchto pokusech použit. Vzorky B, C, D byly inkubovány v McD. pufru a BHI médiu v přítomnosti MYR v průběhu 0, 3 a 6 hodin za anaerobních podmínek. Na Obrázku 8 je znázorněn typický chromatogram vzorku směsi standardů. Směs standardu obsahovala 10mM DHM, 10mM MYR, 1mM CHLXZ a rozpouštědlo methanol.

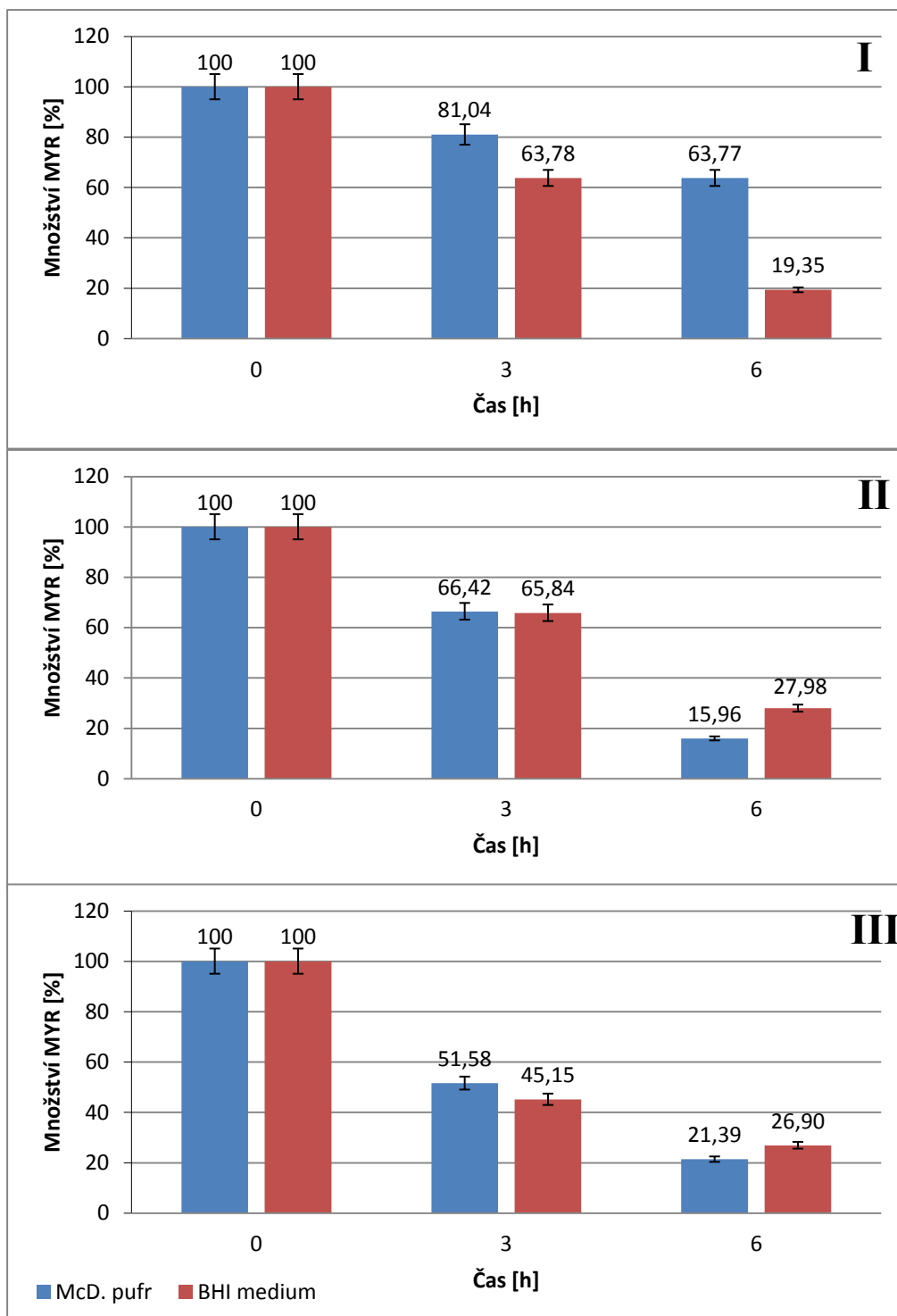


Obrázek 8: Reprezentativní chromatogram vzorku směsi standardů. Vzorek standardu byl připraven z rozpouštědla methanolu, 10mM MYR, 10mM DHM a 1mM CHLXZ. V chromatogramu je vyznačen pík DHM (1), CHLXZ (2) a MYR (3). Analýza vzorku proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E, při nástřikovém objemu 20 μ l, průtoku 1,5 ml/min, tlaku 60 barů. Analýza probíhala 20 minut při 280 nm. Složení mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100% methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA.

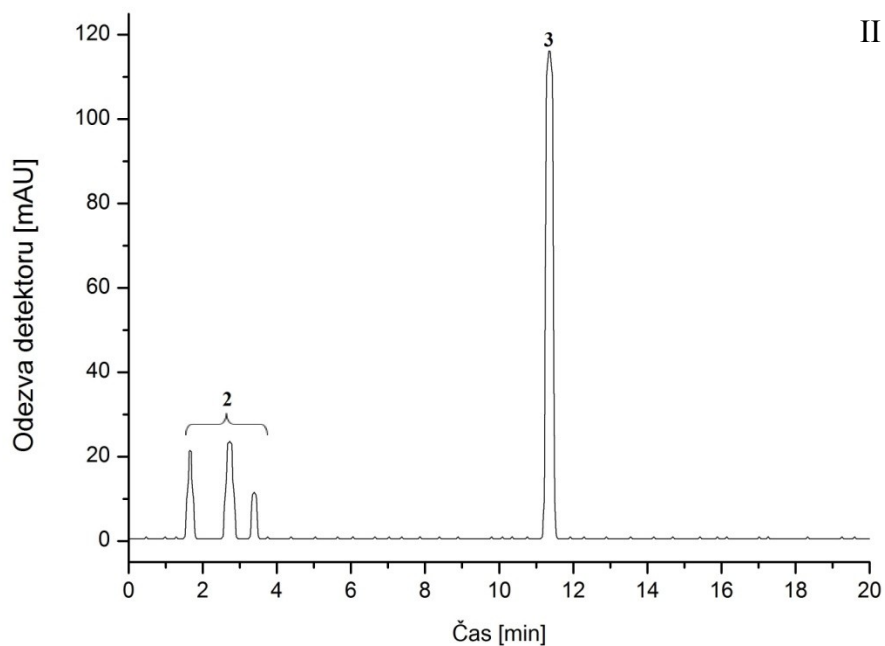
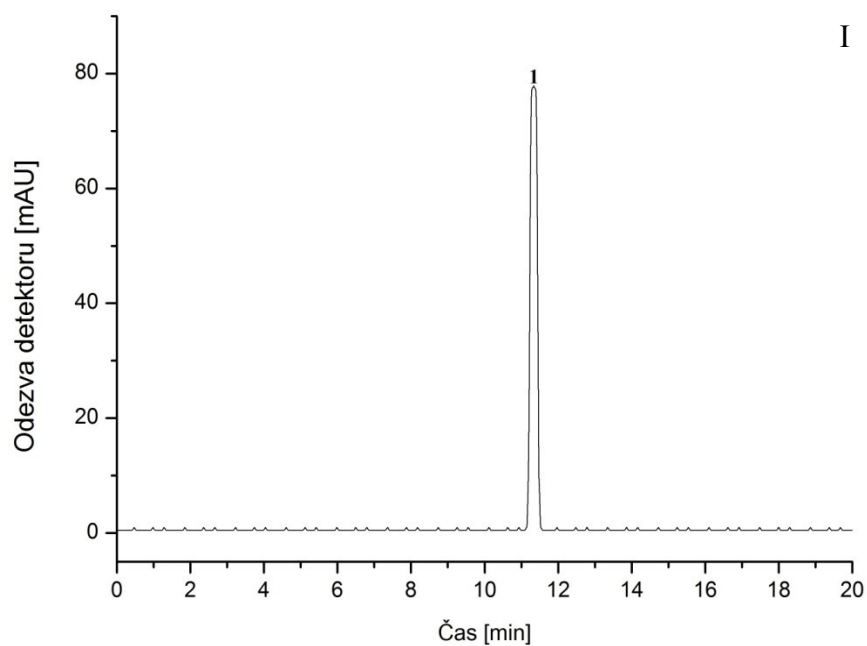
4.1.1 Analýza kultivovaných vzorků s myricetinem

Inkubační směsi lidských fekálních vzorků (B, C, D) s přídavkem MYR byly analyzovány pomocí metody RP-HPLC v McD. pufru a BHI médiu. Každý vzorek inkubační směsi byl analyzován třikrát. Výsledky analýz byly zprůměrovány a byly z nich sestaveny grafy. Každý graf porovnává degradaci MYR ve fekálním vzorku inkubovaném v McD. pufru nebo BHI médiu v průběhu 0, 3 a 6 hodin. Při vyhodnocení se vycházelo z toho, že v čase inkubace 0 hodin fekální vzorek (B, C, D) v McD. pufru a BHI médiu obsahoval 100 % MYR. Množství MYR ve vzorku je vztaženo k vnitřnímu standardu CHLXZ, který byl ke vzorku přidán v průběhu extrakce MYR. Na Obrázku 9, str. 56 je zobrazeno porovnání grafů degradace MYR ve fekálním vzorku B (část obrázku I), fekálním vzorku C (část obrázku II) a fekálním vzorku D (část obrázku III) v McD. pufru a BHI médiu v čase inkubace 0, 3 a 6 hodin.

Při analýze fekálních vzorků metodou RP-HPLC nebyl nalezen v žádném analyzovaném fekálním vzorku metabolit DHM. Na Obrázku 10, str. 57 jsou znázorněny reprezentativní chromatogramy extraktu reakční směsi. Reprezentativní chromatogram I je pro fekální vzorky inkubované v McD. pufru a reprezentativní chromatogram II je pro fekální vzorky inkubované v BHI médiu. Tyto chromatogramy odpovídají všem analyzovaným vzorkům.



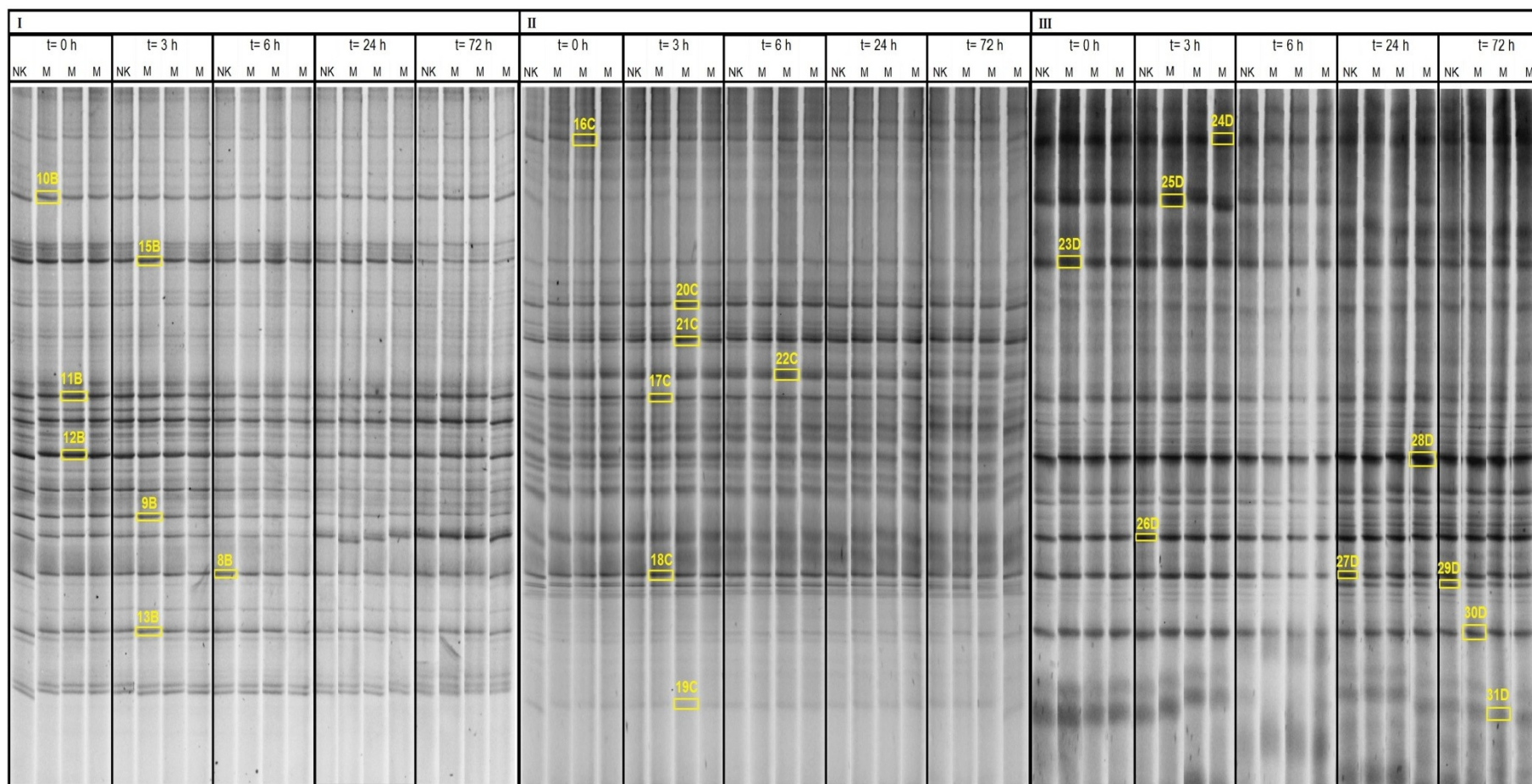
Obrázek 9: Porovnání degradace MYR ve fekálních vzorcích B (I), C (II), D (III) inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu v čase inkubace 0, 3 a 6 hodin. Fekální vzorky byly inkubovány s MYR za anaerobních podmínek. Fekální vzorky byly extrahovány do ethylacetátu a analyzovány metodou RP-HPLC. Množství MYR je vztaheno k množství MYR (100 %) v čase inkubace 0 hodin.



Obrázek 10: Reprezentativní chromatogramy extraktu reakčních směsí. Chromatogram I patří fekálnímu vzorku B inkubovaném v McD. pufru v čase inkubace 0 hodin. Chromatogram II patří fekálnímu vzorku D inkubovaném v BHI médiu v čase inkubace 0 hodin. V chromatogramech je vyznačen pík pro MYR (1, 3). Číslem (2) jsou vyznačené píky pro látky, které pocházejí z BHI média a jsou viditelné při 340 nm. Analýza vzorku proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E, při nástřikovém objemu 20 μ l, průtoku 1,5 ml/min, tlaku 60 barů. Analýza probíhala 20 minut při 340 nm. Složení mobilní fáze A: 40% methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100% methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA.

4.2 Vliv flavonoidů na bakteriální diverzitu zkoumaný metodou DGGE

Pro zjištění mikrobiálního zastoupení ve fekálních vzorcích s přidavkem MYR nebo bez přidavku MYR byla využita metoda DGGE. Fekální vzorky byly inkubovány s MYR/ bez MYR v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Inkubace fekálních vzorků byla provedena v McD. pufru nebo BHI médiu. Metoda DGGE byla použita pro zjištění vlivu přidavku MYR na bakteriální biodiverzitu. Aby inkubované vzorky mohly být použity pro tuto metodu, musela být z inkubovaných vzorků izolovaná DNA, následně byla PCR metodou namnožena DNA kódující 16S rRNA, která je obsažena ve všech bakteriích. Na Obrázku 11, str. 59 jsou fotografie gelů fekálního vzorku B (část I), vzorku C (část II) a vzorku D (část III) inkubované v McD. pufru. Obrázek 12, str. 60 znázorňuje fotografie gelů fekálního vzorku B (část I), vzorku C (část II) a vzorku D (část III) inkubované v BHI médiu.



Obrázek 11: Fotografie DGGE gelů – McD. pufr. Část I je pro fekální vzorek B, část II pro fekální vzorek C a část III pro fekální vzorek D. Fekální bakterie byly inkubovány v McD. pufru v průběhu tří dnů s přidavkem MYR (M) nebo bez přidavku MYR (NK). Na obrázku jsou vyznačeny významné zóny, které byly odeslány na sekvenaci. Výsledky sekvenční analýzy jednotlivých významných zón jsou uvedeny pod totožným označením fragmentů v Tabulce 19, str. 61.

4.3 Bakteriální profil určený metodou DGGE

Metodou DGGE byly vzorky DNA rozděleny a významné zóny byly vyříznuty pod UV zářením. Zóny byly vybírány podle jejich intenzit nebo tloušťky, nebo podle toho jestli se vyskytuje ve vzorku s přidavkem MYR či bez MYR. Celkem bylo vyříznuto 55 významných zón a DNA obsažená ve vyříznutých vzorcích byla namnožena a poslána do sekvenační firmy SEQme s.r.o.. Vyříznuté zóny jsou znázorněny na Obrázku 11 (str. 59) a Obrázku 12 (str. 60).

Ze získaných sekvencí a pomocí programu BLAST byly určeny jednotlivé druhy bakterií, které byly přítomny ve vybraných zónách. V Tabulce 19 jsou uvedeny identifikované bakterie, které byly nalezeny ve fekálních vzorcích (B, C, D) inkubovaných v McD. pufru. Identifikované bakterie fekálních vzorků (B, C, D) inkubovaných v BHI médiu jsou uvedeny v Tabulce 20, str. 62. V tabulkách jsou uvedeny pouze bakteriální druhy, které se podařilo identifikovat.

Tabulka 19 – Přehled identifikovaných bakteriálních druhů zjištěných pomocí programu BLAST ze získaných sekvencí po Sangerově sekvenování.

Číslo vzorku	Identifikace	Shoda [%]	Fekální vzorek	Čas inkubace [h]	MYR/NK
9B	<i>Gemmiger formicilis</i>	96,3	B	0	MYR
11B	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>	95,0	B	0	MYR
12B	<i>Clostridium sardiniense</i>	85,7	B	0	MYR
15B	<i>Prevotella copri</i>	95,4	B	0	MYR
18C	<i>Gemmiger formicilis</i>	91,9	C	3	MYR
19C	<i>Clostridium tepidum</i>	82,1	C	3	MYR
20C	<i>Bacteroides massiliensis</i>	91,0	C	3	MYR
21C	<i>Bacteroides uniformis</i>	94,6	C	3	MYR
22C	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	89,5	C	6	MYR
24D	<i>Prevotella copri</i>	91,4	D	3	MYR
25D	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	80,4	D	3	MYR
27D	<i>Clostridium tepidum</i>	100,0	D	24	NK
28D	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	89,4	D	24	MYR

Číslo vzorku	Identifikace	Shoda [%]	Fekální vzorek	Čas inkubace [h]	MYR/NK
29D	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	86,0	D	72	NK
30D	<i>Dialister succinatiphilus</i>	92,0	D	72	MYR
31D	<i>Clostridium sardiniense</i>	81,8	D	72	MYR

Legenda: V tabulce jsou pouze identifikované bakteriální druhy, které byly zjištěny ve fekálních vzorcích inkubovaných s přidavkem MYR (MYR) nebo bez přidavku MYR (NK) v McD. pufru v čase inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Identifikace bakteriálních druhů byla provedena v programu BLAST.

Tabulka 20 – Přehled identifikovaných bakteriálních druhů zjištěných pomocí programu BLAST ze získaných sekvenací po Sangerově sekvenování.

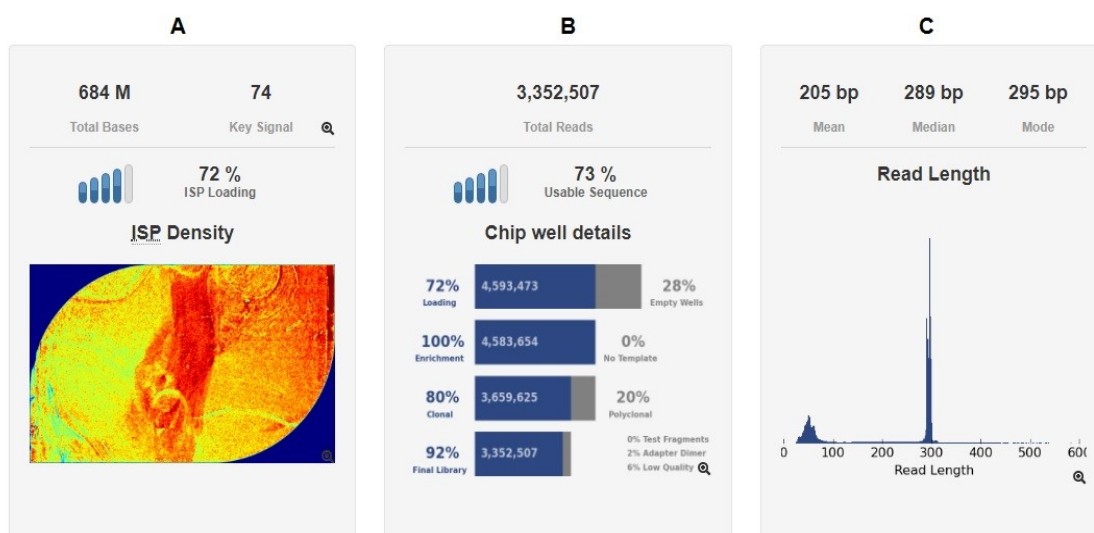
Číslo vzorku	Identifikace	Shoda [%]	Fekální vzorek	Čas inkubace [h]	MYR/NK
1	<i>Prevotella copri</i>	91,4	B	0	MYR
2	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	95,3	B	0	MYR
3	<i>Prevotella veroralis</i>	83,0	B	0	MYR
4 = 6 = 10	<i>Amphibacillus tropicus</i>	80,0	B	-	-
5	<i>Alloprevotella rava</i>	80,0	B	3	MYR
7 = 9	<i>Hydromonas duriensis</i>	81,0	B	72	-
12 = 13	<i>Erysipelothrix larvae</i>	81,0	C	-	NK
16	<i>Kineothrix alysoides</i>	81,0	C	24	NK
18	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	98,5	D	0	MYR
19	<i>Gemmiger formicilis</i>	98,3	D	0	MYR
20 = 32	<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	96,0	D	-	MYR
21	<i>Blautia luti</i>	97,6	D	3	MYR
23	<i>Sutterella massiliensis</i>	91,7	D	6	MYR
25 = 30	<i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i>	90,6	D	-	MYR
26	<i>Lutispora thermophila</i>	91,0	D	24	MYR
27	<i>Lachnobacterium bovis</i>	88,0	D	72	NK
28	<i>Anaerobium acetethylicum</i>	91,9	D	72	NK
29	<i>Kineothrix alysoides</i>	92,8	D	72	MYR

Číslo vzorku	Identifikace	Shoda [%]	Fekální vzorek	Čas inkubace [h]	MYR/NK
31	<i>Enteractinococcus coprophilus</i>	90,0	D	72	MYR

Legenda: V tabulce jsou pouze identifikované bakteriální druhy, které byly zjištěny ve fekálních vzorcích inkubovaných s přidavkem MYR (MYR) nebo bez přidavku MYR (NK) v BHI médiu v čase inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Identifikace bakteriálních druhů byla provedena v programu BLAST.

4.4 Určení vlivu flavonoidů na střevní mikrobiom zkoumaný metodou NGS

NGS metodou bylo zpracováno 60 ze 120 vzorků. Vzorky pro NGS sekvenování byly vybrány podle koncentrace izolované DNA. Vzorky s přidavkem MYR byly odebírány v čase inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin v tripletu. Po izolaci DNA byla změřena její koncentrace. Pro NGS metodu byly vybrány vzorky s nejvyšší koncentrací izolované DNA. Parametry NGS reakcí jsou zobrazeny na Obrázku 13. Při NGS analýze byl sekvenační čip pokryt ze 72 % připravenou knihovnou (Obrázek 13 část A). Z toho je patrné, že sekvenování probíhá správně a knihovna byla v pořádku připravena. Výsledný počet sekvencí byl sekvenován metodou PGM Ion Torrent.



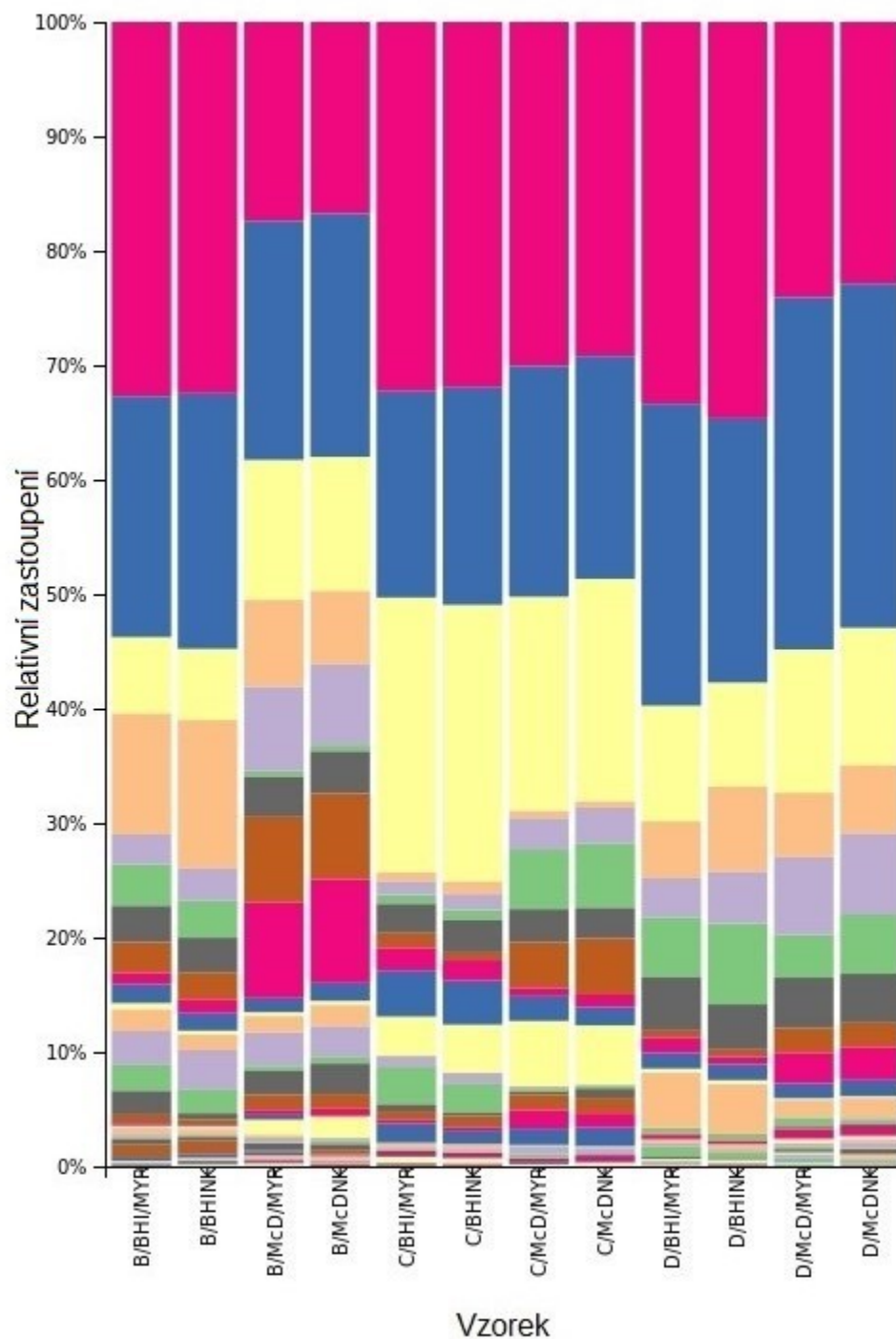
Obrázek 13: Parametry NGS reakce. Parametry pro analyzované fekální vzorky B, C, D inkubované po dobu 72 hodin v McD. pufru a BHI médiu.

Na Obrázku 14, str. 66 jsou zobrazeny sloupcové grafy procentuálního zastoupení, které porovnávají bakteriální zastoupení ve střevním mikrobiomu fekálních vzorků (B, C, D) s přidavkem MYR a bez přidavku MYR inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu. Z grafu je patrné, že nejvíce zastoupenými bakteriemi jsou bakterie z rodu *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* a *Prevotellaceae*. Procentuální zastoupení nejvýznamnějších rodů bakterií ve fekálních vzorcích s přidavkem MYR či bez přidavku MYR je uvedeno v Tabulce 21, str. 65. Procentuální zastoupení všech nalezených bakteriálních rodů ve fekálních vzorcích s přidavkem MYR a bez přidavku MYR jsou uvedeny v Příloze 3.

Porovnání bakteriálního zastoupení podle kritéria typu média (McD. pufr, BHI médium) je zobrazeno na Obrázku 15, str. 68. Na tomto obrázku je porovnání bakteriálního zastoupení mezi McD. pufr a BHI médiem ve fekálních vzorcích B, C, D s přidavkem MYR v průběhu tří dnů. Obrázek 16, str. 69 porovnává bakteriální zastoupení podle kritéria fekální vzorek, tzn. porovnání bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích B, C, D s přidavkem MYR. Rozdílnost bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích (B, C, D) s přidavkem MYR či bez přidavku MYR inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu v čase 0, 3, 6, 24 a 72 hodin je zobrazeno v Příloze 4. Procentuální zastoupení nejvýznamnějších bakteriálních rodů je uvedeno v Příloze 5.


Tabulka 21 - Procentuální zastoupení bakteriálních rodů ve fekálních vzorcích B, C, D inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu s přidavkem MYR (MYR) a bez přidavku MYR (NK).

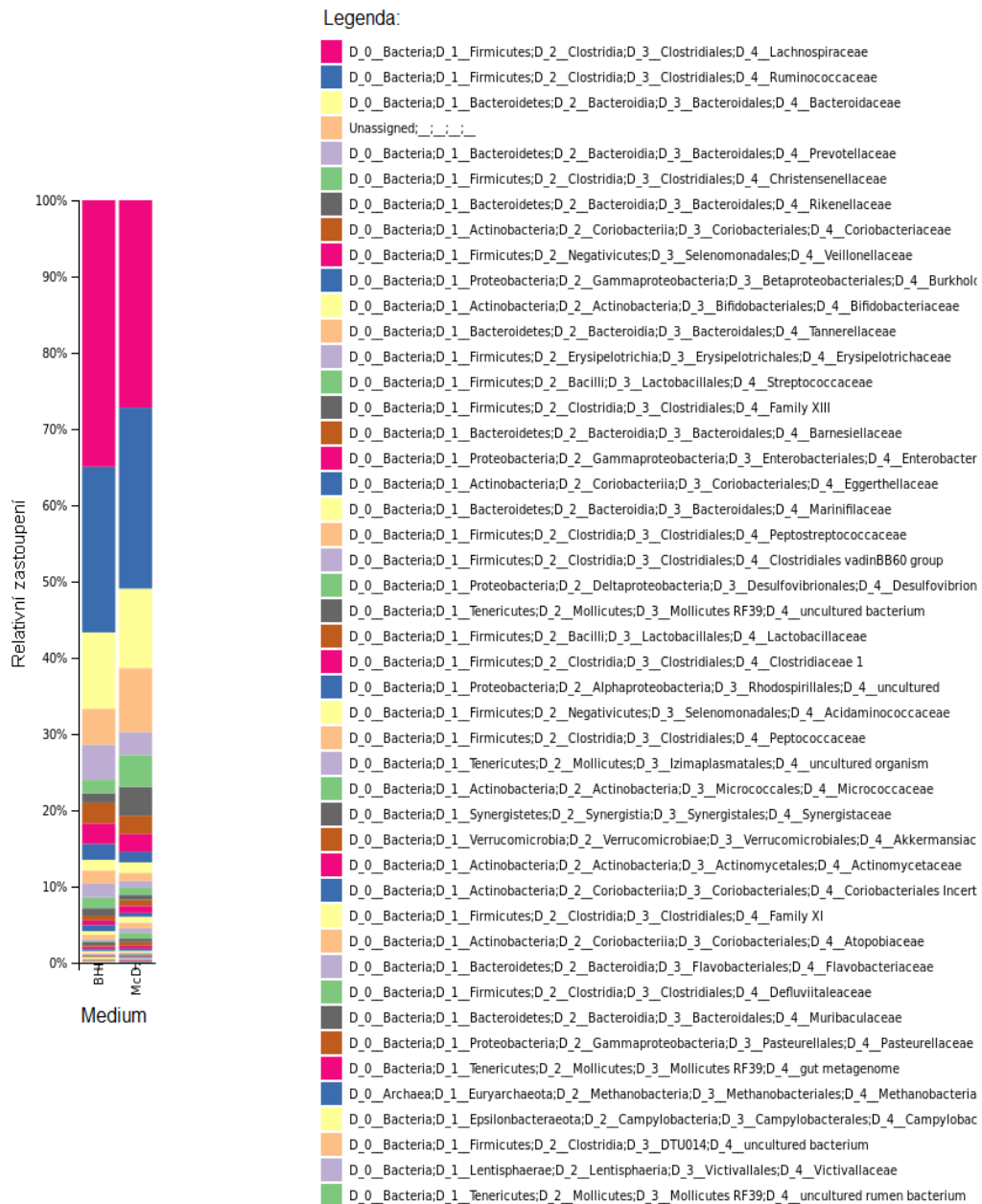
Vzorek	Přídavek	Médium	<i>Lachnospiraceae</i> [%]	<i>Ruminococcaceae</i> [%]	<i>Bacteroidaceae</i> [%]	<i>Prevotellaceae</i> [%]
B	MYR	McD.	17,39	20,87	12,26	7,57
	NK		16,76	21,25	11,72	6,41
	MYR	BHI	32,70	21,05	6,68	10,57
	NK		32,47	22,30	6,24	12,93
C	MYR	McD.	30,08	20,14	18,71	0,63
	NK		29,20	19,46	19,46	0,54
	MYR	BHI	32,28	18,01	24,02	0,79
	NK		31,96	18,98	24,19	1,08
D	MYR	McD.	24,09	30,74	12,52	5,61
	NK		22,87	30,06	12,01	5,96
	MYR	BHI	33,36	26,38	10,11	4,96
	NK		34,65	23,07	9,10	7,44



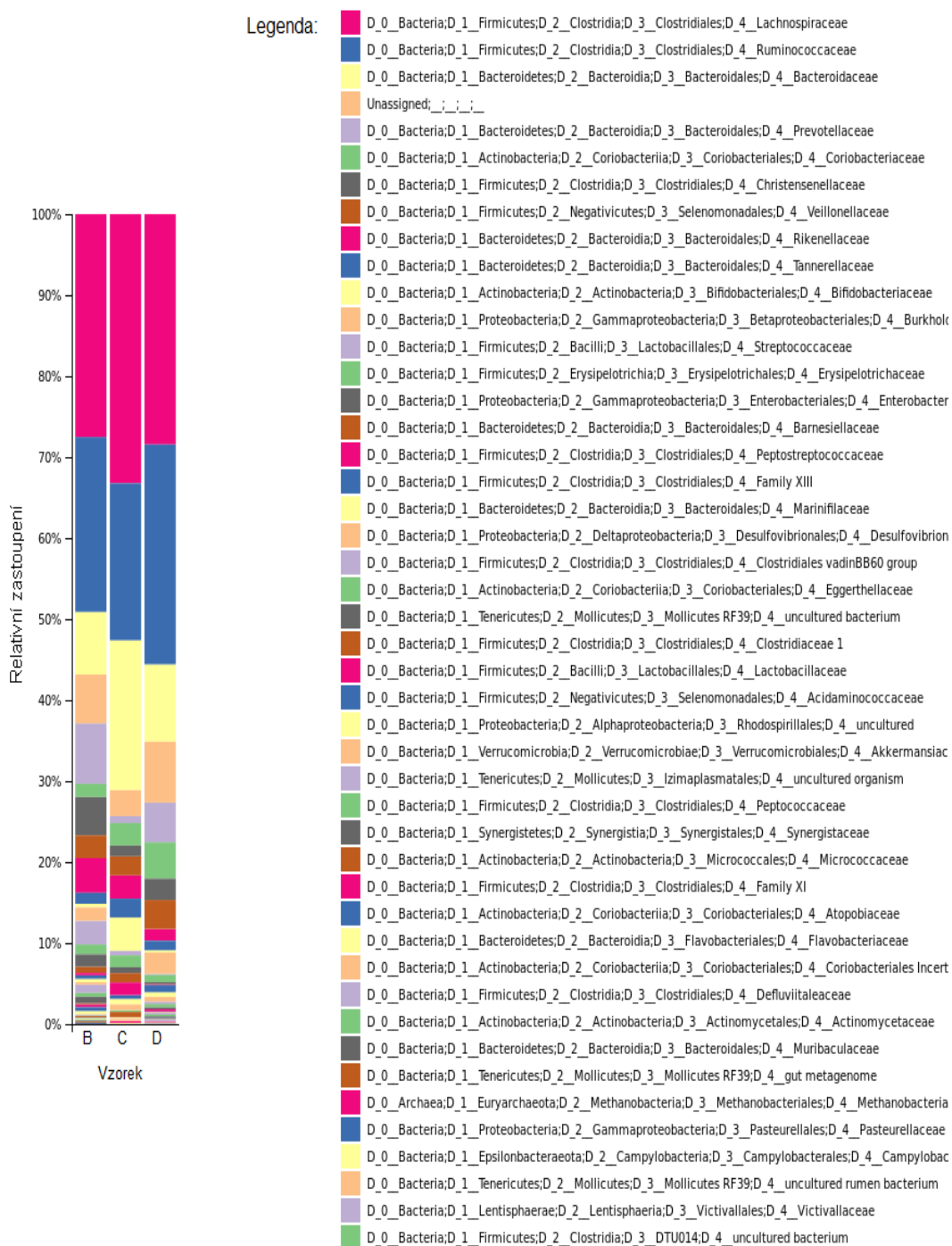
Obrázek 14: Sloupcové grafy – vzorek/médium/přídavek. Grafy znázorňují složení střevního mikrobiomu u fekálních vzorků B, C, D s přídavkem MYR (MYR) a bez přídavku MYR (NK) inkubovaných v McD. pufru (McD.) a BHI médiu (BHI). Legenda ke grafu je na následující straně.

Sloupcové grafy – vzorek/médium/přídavek - LEGENDA

	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae
	Unassigned; ; ; ;
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Negativicutes;D_3_Selenomonadales;D_4_Veillonellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Christensenellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Tannerellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Bifidobacteriales;D_4_Bifidobacteriaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Betaproteobacteriales;D_4_Burkholi
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Enterobacteriales;D_4_Enterobacter
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Barnesiellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Deltaproteobacteria;D_3_Desulfovibrionales;D_4_Desulfovibrion
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptostreptococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Eggerthellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Mariniflaccaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured bacterium
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Negativicutes;D_3_Selenomonadales;D_4_Acidaminococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiaceae 1
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_uncultured
	D_0_Bacteria;D_1_Verrucomicrobia;D_2_Verrucomicrobiae;D_3_Verrucomicrobiales;D_4_Akkermansiac
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Izimaplasmatales;D_4_uncultured organism
	D_0_Bacteria;D_1_Synergistetes;D_2_Synergistia;D_3_Synergistales;D_4_Synergistaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Micrococcales;D_4_Micrococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Atopobiaceae
	D_0_Archaea;D_1_Euryarchaeota;D_2_Methanobacteria;D_3_Methanobacteriales;D_4_Methanobacteria
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriales Incert
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_gut metagenome
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Actinomycetales;D_4_Actinomycetaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XI
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Flavobacteriales;D_4_Flavobacteriaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Epsilonbacteraeota;D_2_Campylobacteria;D_3_Campylobacteriales;D_4_Campylobac
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Defluviitaleaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Pasteurellales;D_4_Pasteurellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_DTU014;D_4_uncultured bacterium
	D_0_Bacteria;D_1_Lentisphaerae;D_2_Lentisphaeria;D_3_Victivallales;D_4_Victivallaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured rumen bacterium

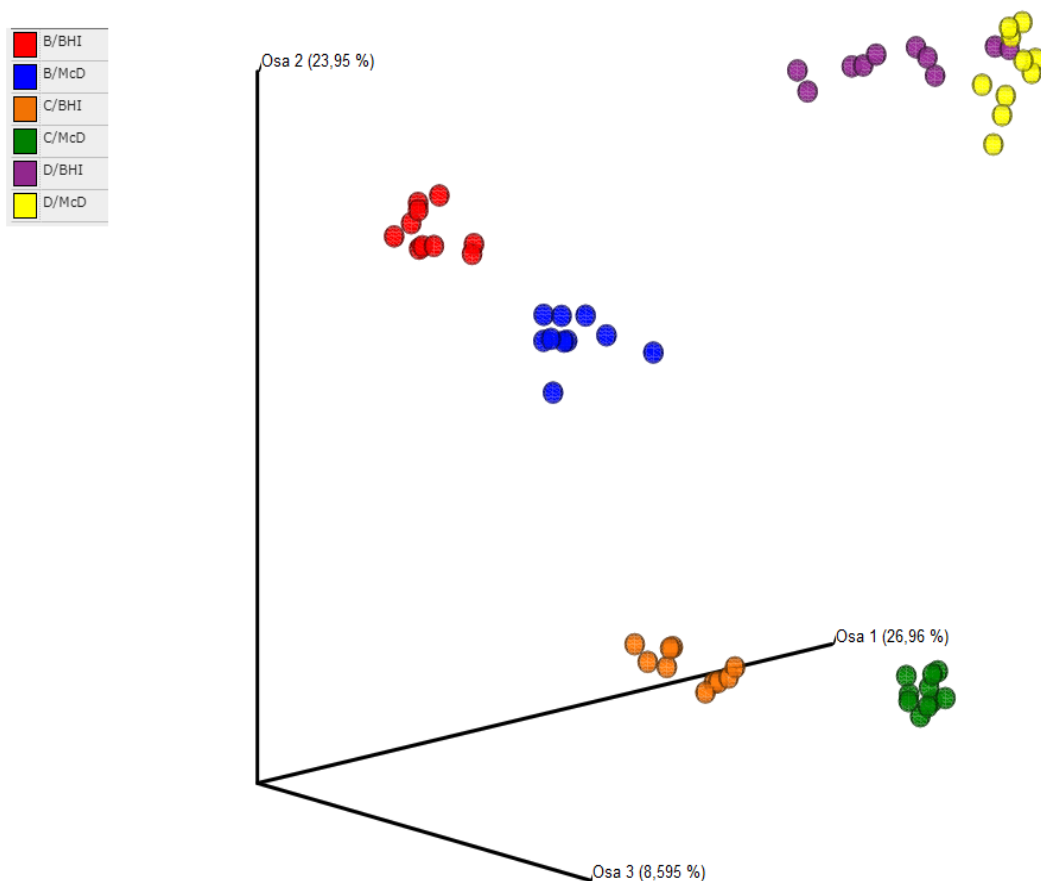


Obrázek 15: Sloupcové grafy – médium. Grafy porovnávající bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích (B, C, D) s přidavkem MYR podle kritéria McD. pufr a BHI médium.

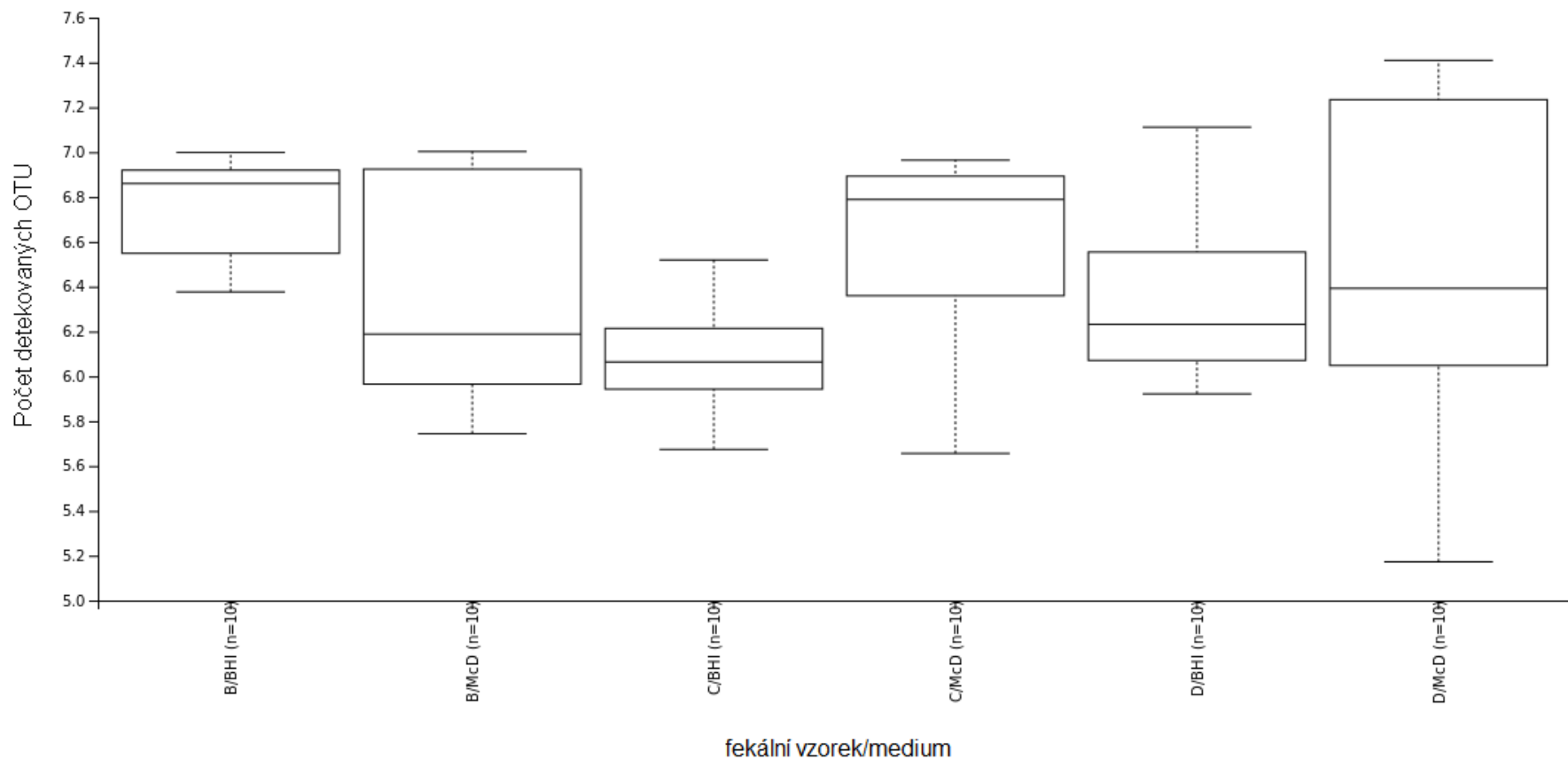


Obrázek 16: Sloupcové grafy – fekální vzorky. Grafy porovnávající bakteriální zastoupení podle kritéria – fekální vzorek B, C, D. Porovnání bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích B, C, D, které byly inkubované s přísadkou MYR.

Fekální vzorky byly následně analyzovány metodu PCoA (analýza hlavních koordinát, z angl. „principal coordinate analysis“). PCoA analýza je využívána ke zkoumání podobnosti vzorků v souboru a k následné vizualizaci. Z PCoA analýzy vznikají diagramy, na kterých jsou zobrazeny všechny analyzované vzorky. Blízko u sebe se nacházejí podobné vzorky, dál od sebe jsou vzorky odlišné. Jednotlivé body jsou analyzované vzorky, ze kterých byla připravena sekvenační knihovna. Na Obrázku 17, str. 71 je diagram, který vystihuje podobnost mezi fekálními vzorky B, C, D inkubované s přídavkem MYR v McD. pufru a BHI médiu. Na obrázku je patrné shlukování jednotlivých fekálních vzorků B, C, D inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu. Na Obrázku 18, str. 72 je znázorněn graf typu „boxplot“, kterým jsou shrnuty výsledky počtu operačních taxonomických jednotek (OTU, z angl. „operational taxonomic unit“) v McD. pufru a BHI médiu. Tyto grafy nám pomáhají porozumět rozmanitosti jednotlivých analyzovaných vzorků. Střední čára v krabicovém grafu je pro střední hodnotu rozmanitosti a je určena mediánem. V Přílohách 6, 8, 10 jsou zobrazeny diagramy PCoA analýzy podle kritérií: médium (McD. pufr/ BHI médium), čas inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin) a fekální vzorek (B, C, D). Bakteriální rozmanitosti podle kritérií: čas inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin), médium (McD. pufr/ BHI médium), přídavek (s MYR/bez MYR) a fekální vzorek (B, C, D) jsou v Přílohách 7, 9, 11 a 12.



Obrázek 17: Diagram PCoA analýzy. Analýza je vytvořena pro jednotlivé fekální vzorky B, C, D inkubované v McD. pufru a BHI médiu. Červená barva jednotlivých bodů patří fekálnímu vzorku B inkubovaného v BHI médiu. Pro fekální vzorek B inkubovaný v McD. pufru náleží barva modrá. Fekální vzorek C je zobrazen oranžovou barvou (pro inkubaci v BHI médiu) a zelenou barvou pro inkubaci McD. pufru. Fialová barva (inkubace v BHI médiu) a žlutá barva (inkubace v McD. pufru) je pro vzorek D.



Obrázek 18: Graf znázorňující bakteriální diverzitu ve fekálních vzorcích B, C, D inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu. Bakteriální rozmanitost ve vzorcích je počítána pomocí operačních taxonomických jednotek (OTU).

5 Diskuze

Pro analýzy byly použity jen tři fekální vzorky B, C, D. Fekální vzorek A byl z analýzy vyřazen, protože dárce v průběhu experimentu onemocněl a nebylo možné provést všechny experimenty. Odebrané fekální vzorky byly inkubované za anaerobních podmínek s přidavkem MYR a bez přidavku MYR. Fekální vzorky byly inkubovány v tzv. „chudém“ a „bohatém“ médiu. Za „chudé“ médium je považován McD. pufr, protože neobsahuje velké množství živin, oproti BHI médiu, které je na živiny bohaté. Metodou RP-HPLC byl zjišťován úbytek MYR a případná přeměna MYR na DHM. Úbytek a případná přeměna byly vyhodnocovány na základě chromatografických analýz. Na Obrázku 9, str. 56 je zobrazen chromatogram pro standardní vzorek, který obsahuje DHM, MYR a CHLXZ. CHLXZ byl přidáván do všech fekálních vzorků a byl použit jako vnitřní standard. Na Obrázku 10, str. 57 jsou reprezentativní chromatogramy pro fekální vzorky inkubované v McD. pufru a BHI médiu.

Degradace MYR ve fekálních vzorcích B, C, D inkubovaných v McD. pufru za anaerobních podmínek byla sledována v průběhu 0, 3 a 6 hodin. Ve všech fekálních vzorcích je pozorována degradace MYR fekálními bakteriemi v průběhu inkubace. Degradace MYR ve fekálním vzorku B probíhala v čase lineárně, ale v ostatních vzorcích lineární průběh neměla. Ve všech fekálních vzorcích byl MYR detekován ještě po 6 hodinách inkubace. Ve fekálním vzorku B po 3 hodinách inkubace byla degradace MYR přibližně 20%. Po 6 hodinách inkubace byla degradace MYR okolo 40 %. Nízká rychlost degradace může naznačovat, že se fekální bakterie ve vzorku nemnožily nebo nevyužívaly MYR. U fekálních vzorků C a D byla degradace MYR rychlejší než u fekálního vzorku B. Ve fekálním vzorku C bylo po 3 hodinách inkubace degradováno okolo 35 % MYR a po 6 hodinách přibližně 85 %. Postupná degradace MYR byla pozorována i u fekálního vzorku D, ve kterém došlo po 3 hodinách inkubace k 50% degradaci MYR. Po 6 hodinách došlo k 80% degradaci MYR. To nasvědčuje tomu, že v tomto fekálním vzorku bakterie využívají jako zdroj energie pro svůj životní cyklus MYR.

Vliv fekálních bakterií na degradaci MYR byl pozorován také u fekálních vzorků B, C a D inkubovaných v BHI médiu za anaerobních podmínek. Fekální vzorky s přidavkem MYR byly inkubované v BHI médiu v čase 0, 3 a 6 hodin. Degradace MYR ve fekálních vzorcích B a D inkubovaných v BHI médiu také neprobíhala v čase

lineárně. Naopak k lineární degradaci došlo ve fekálním vzorku C. Fekální bakterie vzorku C degradovaly po 3 hodinách inkubace přibližně 35 % MYR a po 6 hodinách došlo k 70% degradaci. Ve fekálním vzorku B bylo po 3 hodinách inkubace degradováno 40 % MYR. A po 6 hodinách inkubace dosahovala degradace MYR 80 %. Z toho lze usoudit, že po 3 hodinách inkubace střevní bakterie využily pouze část MYR. Po 6 hodinách inkubace se spotřeba MYR zvýšila, to může být způsobeno zvýšeným počtem fekálních bakterií. Dalším důvodem velkého poklesu množství MYR ve vzorku mezi časem inkubace 3 a 6 hodin může být to, že inkubace fekálních vzorků proběhla v BHI médiu. BHI médium je bohaté na živiny, a to může souviset s mírou a rychlostí degradace MYR ve fekálním vzorku. Ve fekálním vzorku D došlo po 3 hodinách inkubace k 55% degradaci MYR a po 6 hodinách byla degradace přibližně 70 %.

Z těchto výsledků je patrné, že ve fekálním vzorku D docházelo k degradaci MYR jak v McD. pufru tak i v BHI médiu srovnatelně. Z toho lze usoudit, že růst a množení bakterií v tomto fekálním vzorku nezávisí na použitém médiu a fekální bakterie vzorku D využívají pro své namnožení MYR, proto po 3 hodinách inkubace v McD. pufru i BHI médiu bylo ve vzorcích přítomno okolo 50 % MYR. Fekální bakterie vzorku C degradovaly okolo 35 % MYR po 3 hodinách inkubace. Po 6 hodinách inkubace byly už rozdíly v množství degradovaného MYR. Rozdíl mezi McD. pufrům a BHI médiem byl okolo 10 %. To nasvědčuje, že do 3 hodin inkubace se bakterie množily stejnou rychlostí a využívaly proto MYR také stejně. Ale po delší době inkubace v McD. pufru začaly střevní bakterie více využívat MYR. To nejspíš souvisí s tím, že McD. pufr je médium, které není bohaté na živiny. Proto při delší době inkubace potřebují bakterie jiný zdroj energie, kterým je MYR. Ve fekálním vzorku B jsou patrné rozdíly v degradaci MYR mezi McD. pufrům a BHI médiem. Degradace MYR v McD. pufru je oproti BHI médiu velmi pomalá.

Metodou RP-HPLC byly analyzovány vzorky na přítomnost DHM. Přítomnost DHM nebyla v žádném z analyzovaných vzorků potvrzena. Metabolit DHM nebyl nalezen ani v práci [98] a [106]. Z toho lze usoudit, že fekální bakterie za použitých experimentálních podmínek nemohou přeměňovat MYR na DHM. Při porovnání výsledků z bakalářské práce [106], kde byla zkoumána degradace MYR u zdravých jedinců, s výsledky z této práce, je patrné, že vliv onemocnění nehraje zásadní roli v degradaci MYR fekálními bakteriemi a úroveň degradace MYR je velmi podobná. Tato práce byla zaměřena na zkoumání komplexního metabolismu MYR všemi

fekálními bakteriemi obsaženými v trávicím traktu. Další možností jak zjistit zda je možné redukčně metabolizovat MYR, je izolace nejvíce zastoupených fekálních bakterií a následná inkubace těchto bakterií na živné půdě s obsahem MYR. Tímto přístupem byl studován reduktivní metabolismus quercetinu [78], [80],[81].

Flavonoidní látky mají antimikrobiální účinky, např. proti bakterii *Clostridium difficile* [55], proto byly odebrány fekální vzorky od pacientů s CD a byl zkoumán vliv MYR na bakteriální zastoupení pacientů s CD. Je známo, že flavonoly jsou lepšími inhibitory lipoxygenas, než flavony. Mezi flavonoly s těmito účinky patří quercetin nebo námi zkoumaný MYR [86], [87]. Vliv MYR na bakteriální zastoupení byl zkoumán metodou PCR-DGGE. Odebrané fekální vzorky B, C a D byly inkubovány s MYR a bez MYR v McD. pufru i BHI médiu za anaerobních podmínek po dobu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Po inkubaci vzorků byla provedena izolace 16S rRNA a následně její namnožení pomocí metody PCR. Pro zjištění zastoupení a rozdílnosti fekálních bakterií ve vzorku byla použita metoda DGGE.

Fotografie DGGE gelů pro fekální vzorky B, C, D inkubované v McD. pufru jsou na Obrázku 11, str. 59, který znázorňuje rozdílnost bakteriálního zastoupení mezi fekálními vzorky B, C, D, které byly inkubované s přídatkem MYR (M) nebo bez přídatku MYR (NK – negativní kontrola). Ve fekálním vzorku B a C nedošlo v průběhu inkubace k výrazným změnám v bakteriálním zastoupení. Rozdílnost bakteriálního zastoupení není viditelná ani mezi vzorky s přídatkem MYR a bez přídatku MYR. Z toho lze soudit, že přidaný MYR neměl vliv na bakteriální zastoupení a na namnožení bakteriálních druhů ve vzorcích, které byly inkubované v McD. pufru. Ve fekálním vzorku D se objevil po 24 hodinách inkubace nový bakteriální druh. Tento bakteriální druh byl pozorován i v čase inkubace 72 hodin. K jiným významným změnám ve fekálním vzorku D nedošlo. Z fotografie také není patrný rozdíl mezi fekálními vzorky inkubovanými s MYR a bez MYR. Z fekálního vzorku D byla se 100% shodou určena bakterie *Clostridium tepidum* (viz. Tabulka 19, str. 61). Tato bakterie byla nalezena i ve fekálním vzorku C. Ve fekálním vzorku B byla také nalezena bakterie rodu *Clostridium*, ale jednalo se o bakterii *Clostridium sardiniense*. Nejvíce zastoupenými bakteriálními rody ve fekálních vzorcích byly bakterie rodu *Gemmiger*, *Prevotella* a *Bacteroides*.

Fekální vzorky B, C, D byly také inkubovány v BHI médiu za anaerobních podmínek. Inkubace probíhala v čase 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Fotografie DGGE gelů jsou

na Obrázku 12, str. 60. Mezi jednotlivými fekálními vzorky je viditelná rozdílnost v zastoupení významných zón. Ve fekálním vzorku B (Obr. 12, str. 60, část I) jsou sledovány nové zóny po 3 hodinách inkubace a po 72 hodinách inkubace. Ve fekálním vzorku D jsou také pozorovatelné nové zóny mezi časem inkubace 6 a 24 hodin. Ze sekvenačních výsledků bylo zjištěno, že ve fekálním vzorku B se nacházejí bakterie rodu *Prevotella* a bakterie rodu *Faecalibacterium*. Ve fekálním vzorku D byly určeny navíc bakterie rodu *Faecalibacterium*, *Gemmiger*, *Blautia*. Z fekálního vzorku C se podařilo určit jen bakterii *Erysipelothrix larvae* a *Kineothrix alysoides*.

Při porovnání fotografií DGGE gelů pro fekální vzorek B (Obr. 11, str. 59, Obr. 12, str. 60) je patrné, že fekální bakterie byly více stabilní v McD. pufu. Naopak v BHI médiu došlo k nárůstu a vymizení zón. V McD. pufu a BHI médiu nebyl nalezen rozdíl mezi vzorky s přídavkem MYR a bez přídavku MYR. Ve fekálním vzorku B inkubovaném v McD. pufu i v BHI médiu byly nalezeny bakterie rodu *Prevotella*. Srovnáním fotografií gelů pro fekální vzorek C lze zjistit, že v tomto vzorku nedochází k žádným významným změnám. Není zde pozorován žádný nárůst či ztráta zón, rozdílnost není patrná ani mezi vzorky s MYR a bez MYR. Z vyříznutých zón se nepodařilo určit rody bakterií, které by byly společné pro obě inkubační média. Rozdílnost mezi jednotlivými médii je patrná u fotografií gelů fekálního vzorku D. Na fotografiích lze pozorovat, že ve fekálním vzorku inkubovaném v McD. pufu, není tolik významných zón. To může být způsobeno tím, že McD. pufir není bohatý na živiny a dokážou se v něm množit pouze hojně zastoupené bakterie. Oproti tomu BHI médium je bohaté na živiny a proto je v něm možnost množení i málo zastoupených bakteriálních druhů. Sekvenováním významných zón se podařilo určit, že v obou médiích byly přítomny bakterie rodu *Faecalibacterium*.

Tato práce navazovala na poznatky získané v bakalářské práci [106], kde byl pozorován vliv na bakteriální zastoupení za stejných experimentálních podmínek, jaké byly použity v této práci. Autoři zkoumali bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od zdravých dárců. Došli k závěru, že u některých vzorků dochází k nárůstu a zániku zón pouze u vzorků, které byly inkubované s MYR. Také zjistili, že zóny, které se vyskytly ve vzorcích bez přídavku MYR, se u vzorků s přídavkem MYR neobjevují. V této práci byly použity fekální bakterie od dárců s CD. Předpokládalo se, že výsledky budou podobné výsledkům, které byly získané se vzorky od zdravých jedinců. Tedy, že ve fekálních vzorcích od dárců s CD budou též patrné rozdíly mezi bakteriálním

zastoupením ve vzorcích s přídavkem MYR a bez MYR. Také byl očekáván rozdíl mezi jednotlivými inkubačními časy a mezi McD. pufrům a BHI médiem. Tyto předpoklady se nepotvrdily. Naopak bylo zjištěno, že flavonoidní látka MYR nemá vliv na bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárců s CD. Zřejmě MYR není pro přítomné fekální bakterie toxický a nedochází jeho vlivem k zániku fekálních bakterií.

Pro detailnější zjištění celkového bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích B, C, D byla použita metoda NGS. Odebrané fekální vzorky byly inkubované v McD. pufru a BHI médiu v čase inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Metodou NGS bylo zjištěno bakteriální zastoupení v jednotlivých fekálních vzorcích B, C, D. Na Obrázku 14, str. 66 je zobrazeno porovnání bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích B, C, D s přídavkem MYR (MYR) či bez přídavku MYR (NK), které byly inkubované v McD. pufru nebo BHI médiu. Z obrázku je patrné, že mezi vzorky s MYR a bez MYR není viditelný rozdíl v bakteriálním zastoupení. Ve všech vzorcích se nacházejí bakterie rodu *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* (kmen *Bacteroidetes*) a bakterie rodu *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* (kmen *Firmicutes*). Ve fekálním vzorku B a D inkubovaném v McD. pufru bylo nalezeno velké množství neidentifikovaných bakterií bez rozdílu, zda byl fekální vzorek inkubovaný s MYR nebo bez přídavku MYR. V ostatních fekálních vzorcích inkubovaných v McD. pufru i BHI médiu byly také nalezeny neidentifikovatelné bakterie, ale jejich zastoupení ve vzorcích není velké.

Rozmanitost bakteriálního zastoupení ve fekálním vzorku B se mění v závislosti na použitém médiu. Bakterie rodu *Ruminococcaceae* jsou ve vzorcích inkubovaných v McD. pufru a BHI médiu zastoupeny v přibližně stejném množství. Oproti tomu bakterie rodu *Lachnospiraceae* a *Prevotellaceae* jsou více zastoupeny v BHI médiu než v McD. pufru. Opačný trend v zastoupení je pozorovatelný u bakterií rodu *Bacteroidaceae*, které jsou více zastoupeny v McD. pufru než v BHI médiu. Z těchto rozdílů lze usoudit, že bakterie rodu *Lachnospiraceae* a *Prevotellaceae* se mohou lépe množit v médiu, které je bohaté na živiny. Naopak bakterie rodu *Bacteroidaceae* nepotřebují ke svému množení živiny. Ve fekálním vzorku B inkubovaném v McD. pufru byly také ve větším množství nalezeny bakterie rodu *Rikenellaceae*, *Christensenellaceae* nebo bakterie třídy *Gammaproteobacteria*. Také zde byly nalezeny ve větším počtu bakterie, které se neoparilo identifikovat. V BHI médiu bylo nalezeno méně neidentifikovatelných bakterií, ale také méně bakterií rodu *Rikenellaceae* a *Christensenellaceae*. Bakteriální zastoupení ve fekálním vzorku C se také mění

v závislosti na použitém médiu. Ve vzorcích inkubovaných v BHI médiu se nachází více bakterií rodu *Bacteroidaceae* a *Lachnospiraceae* než ve vzorcích inkubovaných v McD. pufru. Bakterie rodu *Ruminococcaceae* mají vyšší zastoupení v McD. pufru, než v BHI médiu. Pouze bakterie rodu *Prevotellaceae* jsou jak v McD. pufru, tak i v BHI médiu zastoupeny v minimálním množství. Fekální vzorek C obsahuje větší množství bakterií rodu *Bifidobacteriaceae* (McD. pufr i BHI médium). Bakterie třídy *Gammaproteobacteria* se v tomto fekálním vzorku nevyskytují nebo jsou přítomné pouze v minimálním množství (rod *Enterobacteriaceae*). Ve fekálním vzorku D bylo více bakterií rodu *Ruminococcaceae* a *Bacteroidaceae* v McD. pufru, než v BHI médiu. Naopak vyšší počet bakterií rodu *Prevotellaceae* a *Lachnospiraceae* byl u vzorků inkubovaných v BHI médiu, než v McD. pufru. V tomto fekálním vzorku byly ve vyšším množství nalezeny také bakterie rodu *Coriobacteriaceae*, *Veillonellaceae* a *Burkholderiaceae*. Bakterie rodu *Burkholderiaceae* (třída *Gammaproteobacteria*) se v tomto fekálním vzorku vyskytuje ve větším množství, ostatní rody se vyskytují minimálně, nebo nebyly nalezeny.

V souladu s literárními údaji byly odebrány fekální vzorky od dospělých dárců s CD. Jelikož v každém z odebraných fekálních vzorků byly nalezeny bakterie rodu *Ruminococcaceae*, které souvisejí s příznaky onemocnění a jsou objevovány u pacientů, kteří trpí CD [60]. Zjištěné bakteriální rody, jako např. *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae* nebo *Pasteurellaceae*, jsou bakterie běžně se vyskytující ve fekálních vzorcích pacientů s CD. Jejich vysoké zastoupení ve fekálních vzorcích je spojeno se závažností onemocnění [107]. Naopak bakterie rodu *Christensenellaceae* patří mezi prospěšné bakterie a vyskytují se u zdravého jedince. Při onemocnění CD dochází k jejich ztrátě [108]. Při analýze NGS byl tento bakteriální rod nalezen ve větším zastoupení u fekálního vzorku B (viz. Obr. 14, str. 66). V ostatních fekálních vzorcích byl bakteriální rod *Christensenellaceae* také nalezen, ale jeho zastoupení je sníženo (procentuální zastoupení viz. Příloha 3). Z těchto výsledků lze předpokládat, že dárci fekálního vzorku B má sníženou aktivitu CD, tzn. že se u něj v době odebrání fekálního vzorku neprojevovaly příznaky typické pro CD (např. bolesti břicha, chronický průjem).

Je známo, že pacienti s CD mají méně bakterií *Clostridiales* (např. *Faecalibacterium prausnitzii*). Námi odebrané a analyzované fekální vzorky obsahují mnoho bakteriálních rodů z *Clostridiales*, ale bakterii *Faecalibacterium prausnitzii* se

metodou NGS nepodařilo najít. Tato bakterie byla nalezena metodou DGGE a následným sekvenováním ve fekálním vzorku B a D. Ve fekálním vzorku C se její přítomnost nepotvrdila. Bakteriální rod, který byl nalezen ve fekálních vzorcích metodou DGGE a metodou NGS jsou bakterie rodu *Prevotellaceae*.

Na Obrázku 17 (str. 71) je analýza metodou PCoA. Metoda PCoA slouží k zobrazení podobných vzorků v souboru dat. Na Obrázku 17 (str. 71) je zobrazeno shlukování podle fekálního vzorku a zároveň podle typu použitého média. Výsledný diagram je rozdělen na tři části podle fekálního vzorku. Z diagramu je patrné, že u fekálního vzorku B a C dochází ke shlukování vzorků podle typu média, ale podobnost mezi těmito médii není patrná. Naopak u fekálního vzorku D dochází k shlukování jednotlivých fekálních vzorků B, C, D podle médií. Je znázorněna podobnost mezi vzorky, které byly inkubované v McD. pufru a BHI médiu. Závěrem je možno shrnout to, že podobnost závisí na fekálním vzorku a na typu média.

Souborné vyhodnocení rozmanitosti bakteriálních druhů je znázorněno na Obrázku 18 (str. 72). Rozmanitost je určena podle počtu OTU. Obrázek 18 (str. 72) znázorňuje bakteriální rozmanitost mezi fekálními vzorky B, C, D, které byly inkubované v McD. pufru a BHI médiu. Fekální vzorek B má vyšší rozpětí bakteriálních druhů v McD. pufru. V BHI médiu je rozpětí bakteriálních druhů nižší. Tento trend je patrný i u ostatních vzorků. Fekální vzorky, které byly inkubované v McD. pufru mají vyšší bakteriální rozmanitost, než vzorky inkubované v BHI médiu. Z těchto výsledků rozmanitosti lze usoudit, že je větší diverzita bakteriálních druhů v médiu, které je chudé na živiny (McD. pufru), než v bohatém médiu (BHI médium).

Výsledky této práce rozšířily poznatky o bakteriálním zastoupení ve fekálních vzorcích od dárců s CD, které byly inkubované za anaerobních podmínek s přídavkem MYR a bez přídavku MYR ve dvou odlišných médiích (McD. pufr a BHI médium) v průběhu 72 hodin. Pro přesné pochopení vlivu použitých experimentálních podmínek na fekální bakterie, které byly obsaženy ve vzorcích od dárců s CD, by bylo vhodné porovnání bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích od zdravých dárců. Také by bylo možné porovnat bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárců s CD, kteří podstupují jiný druh léčby (např. biologická terapie). Z prezentovaných výsledků je zřejmé, že pro zjištění přesné rozdílnosti bakteriálního zastoupení mezi zdravými

jedinci, pacienti s CD a vlivem MYR by bylo vhodné použít kombinaci metod PCR-DGGE a NGS.

6 Souhrn

- S fekálními vzorky od pacientů s CD byla metodou RP-HPLC sledována anaerobní degradace MYR v McD. pufru a BHI médiu. Bez ohledu na zdroj vzorku a inkubační podmínky byl MYR v reakční směsi za 6 hodin inkubace degradován ze 70-85 %.
- Za použitých experimentálních podmínek nebyla detekována reduktivní přeměna MYR na DHM.
- Metodou PCR-DGGE byl zkoumán vliv MYR na fekální bakterie obsažené ve fekálních vzorcích od pacientů s CD. Inkubace fekálních vzorků s MYR nevedla ke změně zastoupení jednotlivých rodů bakterií ve srovnání se vzorky, kde flavonoid nebyl použit.
- Technikou NGS v kombinaci PCR-DGGE se podařilo identifikovat bakterie rodu *Prevotellaceae*, které jsou typické pro mikrobiom pacientů s CD.

Seznam použité literatury

- [1] E. M. M. Quigley, „Gut bacteria in health and disease", *Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 560–569 (2013).
- [2] F. Guarner a J. R. Malagelada, „Gut flora in health and disease", *The Lancet*, **361**, 512–519 (2003).
- [3] F. Karlsson, V. Tremaroli, J. Nielsen a F. Bäckhed, „Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases", *Diabetes*, **62**, 3341–3349 (2013).
- [4] P. J. Kennedy, J. F. Cryan, T. G. Dinan a G. Clarke, „Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder?", *World J. Gastroenterol.*, **20**, 14105–14125 (2014).
- [5] H. Bisgaard, N. Li, K. Bonnelykke, B. L. K. Chawes, T. Skov, G. Paludan-Müller, J. Stokholm, B. Smith a K. A. Krogfelt, „Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age", *J. Allergy Clin. Immunol.*, **128**, 646-652 (2011).
- [6] C. M. Ferreira, A. T. Vieira, M. A. R. Vinolo, F. A. Oliveira, R. Curi a F. dos S. Martins, „The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases", *J. Immunol. Res.*, **2014**, 1–12 (2014).
- [7] S. M. Jandhyala, R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala a D. N. Reddy, „Role of the normal gut microbiota", *World J. Gastroenterol.*, **21**, 8836–8847 (2015).
- [8] P. Kundu, E. Blacher, E. Elinav a S. Pettersson, „Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self", *Cell*, **171**, 1481–1493 (2017).
- [9] M. G. Dominguez-Bello, E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer a R. Knight, „Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 11971–11975 (2010).
- [10] D. A. Sela, J. Chapman, A. Adeuya, J. H. Kim, F. Chen, T. R. Whitedead, D. S. Rokhsar, C. B. Lebrilla, J. B. German, N. P. Price, P. M. Richardson a D. A.

- Mills, „The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 18964–18969 (2008).
- [11] R. Agans, L. Rigsbee, H. Kenche, S. Michail, H. J. Khamis a O. Paliy, „Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **77**, 404–412 (2011).
- [12] L. A. David, C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E. Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton a P. J. Turnbaugh, „Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome", *Nature*, **505**, 559–563 (2014).
- [13] G. A. Cresci a E. Bawden, „Gut microbiome: What we do and don't know", *Nutr. Clin. Pract.*, **30**, 734–746 (2015).
- [14] A. W. Walker, S. H. Duncan, P. Louis a H. J. Flint, „Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota", *Trends Microbiol.*, **22**, 267–274 (2014).
- [15] J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, Ch. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D.R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J.-M. Batto, T. Hansen, D. L. Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, Ch. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, M. Consortium, P. Bork, S. D. Ehrlich a J. Wang, „A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing", *Nature*, **464**, 59–65 (2010).
- [16] V. D'Argenio a F. Salvatore, „The role of the gut microbiome in the healthy adult status", *Clin. Chim. Acta*, **451**, 97–102 (2015).
- [17] B. Yang, Y. Wang a P. Y. Qian, „Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis", *BMC Bioinformatics*, **17**, 135–142 (2016).
- [18] D. J. Lane, B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin a N. R. Pace, „Rapid

- determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6955–6959 (1985).
- [19] Y. Wang a P. Y. Qian, „Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies", *PLoS One*, **4**, 7401–7409 (2009).
- [20] A. Heintz-Buschart a P. Wilmes, „Human Gut Microbiome: Function Matters", *Trends Microbiol.*, **26**, 563–574 (2018).
- [21] J. G. LeBlanc, C. Milani, G. S. de Giori, F. Sesma, D. van Sinderen a M. Ventura, „Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 160–168 (2013).
- [22] T. Sousa, R. Paterson, V. Moore, A. Carlsson, B. Abrahamsson a A. W. Basit, „The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs", *Int. J. Pharm.*, **363**, 1–25 (2008).
- [23] I. Rowland, G. Gibson, A. Heinken, K. Scott, J. Swann, I. Zhiele a K. Tuohy, „Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components", *Eur. J. Nutr.*, **57**, 1–24 (2018).
- [24] Y. Z. Zhang a Y. Y. Li, „Inflammatory bowel disease: Pathogenesis", *World J. Gastroenterol.*, **20**, 91–99 (2014).
- [25] B. Khor, A. Gardet a R. J. Xavier, „Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease", *Nature*, **474**, 307–317 (2011).
- [26] D. C. Baumgart a S. R. Carding, „Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology", *The Lancet*, **369**, 1627–1640 (2007).
- [27] L. Schack-Nielsen a K. F. Michaelsen, „Breast feeding and future health", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **9**, 289–296 (2006).
- [28] E. Klement, R. V. Cohen, J. Boxman, A. Joseph a S. Reif, „Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis.", *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 1342–1352 (2004).
- [29] J. Cosnes, „Tobacco and IBD: Relevance in the understanding of disease

- mechanisms and clinical practice", *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **18**, 481–496 (2004).
- [30] B. R. Ramos de Mattos, M. P. G. Garcia, J. B. Nogueira, L. N. Paiatto, C. G. Albuquerque, C. L. Souza, L. G. R. Fernandes, W. Maria da Silva Cunha Tamashiro a P. U. Simioni, „Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments", *Mediators Inflamm.*, **2015**, 1–11 (2015).
- [31] D. C. Baumgart a W. J. Sandborn, „Crohn’s disease", *The Lancet*, **380**, 1590–1605 (2012).
- [32] C. Gasche, J. Scholmerich, J. Brynskov, G. D’Haens, S. B. Hanauer, E.J. Irvine, D. P. Jewell, D. Rachmilewitz, D. B. Sachar, W. J. Sandborn a L. R. Sutherland, „A Simple Classification of Crohn’s Disease: Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998", *Inflamm. Bowel Dis.*, **6**, 8–15 (2000).
- [33] B. Pariente, J.-Y. Mary, S. anese, Y. Chowers, P. D. Cruz, G. D’Haens, E. V. Loftus Jr, E. Louis, J. Panés, J. Schölmerich, S. Schreiber, M. Vecchi, J. Branche, D. Bruining, G. Fiorino, M. Herzog, M. A. Kamm, A. Klein, M. Lewin, P. Meunier, I. Ordas, U. Strauch, G.-E. Tontini, A.-M. Zagdanski, C. Bonifacio, J. Rimola, M. Nachury, Ch. Leroy, W. Sandborn, J.-F. Colombel a J. Cosnes, „Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn’s disease", *Gastroenterology*, **148**, 52–63 (2015).
- [34] L. M. Spekhorst, M. C. Visschedijk, R. Alberts, E. A. Festen, a E.-J. van der Wouden, G. Dijkstra a R. K. Weersma, „Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases", *World J. Gastroenterol.*, **20**, 15374–15381 (2014).
- [35] A. Bitoun, A. Blanchi, J. F. Contou, J. C. Delchier, C. Florent, J. P. Gendre, E. Rene, D. Rigaud, M. Rousselet, M. Salmeron, C. See, J. C. Soule, J. P. Therond, T. Vallot, J. L. Vienne, J. M. Viteau, M. A. Barboteau, P. Bauret a P. Bonniere, „Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn’s disease: A prospective multicentre study", *Gut*, **30**, 983–989 (1989).

- [36] P. Papay, A. Ignjatovic, K. Karmiris, H. Amarante, P. Milheller, B. Feagan, G. D'Haens, P. Marteau, W. Reinisch, A. Sturm, F. Steinwurz, L. Egan, J. Panés, E. Louis, J.-F. Colombel a R. Panaccione, „Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: A physician's perspective", *J. Crohns Colitis.*, **7**, 653–669 (2013).
- [37] W. R. Best, J. M. Beckett, J. W. Singleton a F. Kern, „Development of a Crohn's Disease Activity Index: National Cooperative Crohn's Disease Study", *Gastroenterology*, **70**, 439–444 (1976).
- [38] R. F. Harvey a J. M. Bradshaw, „A simple index of Crohn's disease activity", *The Lancet*, **315**, 514 (1980).
- [39] H. J. Freeman, „Use of the Crohn's disease activity index in clinical trials of biological agents", *World J. Gastroenterol.*, **14**, 4127–4130 (2008).
- [40] J. Satsangi, M. S. Silverberg, S. Vermeire a J. F. Colombel, „The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications", *Gut*, **55**, 749–753 (2006).
- [41] J. D. Feuerstein a A. S. Cheifetz, „Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management", *Mayo. Clin. Proc.*, **92**, 1088–1103 (2017).
- [42] M. W. Laass, D. Roggenbuck a K. Conrad, „Diagnosis and classification of Crohn's disease", *Autoimmun. Rev.*, **13**, 467–471 (2014).
- [43] X. Bossuyt, „Serologic markers in inflammatory bowel disease", *Clin. Chem.*, **52**, 171–181 (2006).
- [44] C. Schiavone a M. Romano, „Diagnosis and management of Crohn's disease", *J. Ultrasound*, **18**, 1–2 (2015).
- [45] D. J. M. Tolan, R. Greenhalgh, I. A. Zealley, S. Halligan a S. A. Taylor, „MR enterographic manifestations of small bowel crohn disease", *Radiographics*, **30**, 367–384, (2010).
- [46] E. F. Stange, S. P. L. Travis, S. Vermeire, C. Beglinger, L. Kupcinkas, K. Geboes, A. Barakauskiene, V. Villanacci, A.V. Herbay, B. F. Warren, C. Gasche, H. Tilg, S. W. Schreiber, J. Schölmerich a W. Reinisch, „European evidence

- based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis", *Gut*, **55**, 1–15, (2006).
- [47] Z. Fireman, E. Mahajna, E. Broide, M. Shapiro, L. Fich, A. Sternberg, Y. Kopelman a E. Scapa, „Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy", *Gut*, **52**, 390–392 (2003).
- [48] R. K. Cross, K. T. Wilson a D. G. Binion, „Narcotic use in patients with Crohn's disease.", *Am. J. Gastroenterol.*, **100**, 2225–2229 (2005).
- [49] T. Wilkins, K. Jarvis a J. Patel, „Diagnosis and management of Crohn's disease", *Am. Fam. Physician*, **84**, 1365–1375 (2011).
- [50] G. D'Haens, F. Baert, G. van Assche, P. Caenepeel, P. Vergauwe, H. Tuynman, M. De Vos, S. van Deventer, L. Stitt, A. Donner, S. Vermeire, F. J. van De Mierop, J.-Ch. R. Coche, J. van der Woude, T. Ochsenkühn, A. A. van Bodegraven, P. P. van Hoogtegem, G. L Lambrecht, F. Mana, P. Rutgeerts, B. G. Feagan a D. Hommes, „Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial", *The Lancet*, **371**, 660–667 (2008).
- [51] J. Dretzke, R. Edlin, J. Round, M. Connock, C. Hulme, J. Czczot, A. Fry-Smith, C. McCabe a C. Meads, „A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors, adalimumab and infliximab, for crohn's disease", *Health. Technol. Assess.*, **15**, 1–250 (2011).
- [52] P. G. Kotze, V. R. Abou-Rejaile, L. A. Uiema, M. Olandoski, M. C. Sartor, E. F. Miranda, L. M. da Silva Kotze a R. Saad-Hossne, „Adalimumab for maintenance therapy for one year in Crohn's disease: results of a Latin American single-center observational study.", *Arq. Gastroenterol.*, **51**, 39–45 (2014).
- [53] H. J. Duepree, A. J. Senagore, C. P. Delaney, K. M. Brady a V. W. Fazio, „Advantages of laparoscopic resection for ileocecal Crohn's disease", *Dis. Colon Rectum*, **45**, 605–610 (2002).
- [54] B. V. Dasari, D. McKay a K. Gardiner, „Laparoscopic versus Open surgery for small bowel Crohn's disease.", *Cochrane Database Syst. Rev.*, **1**, 1465–1858 (2011).

- [55] C. M. Surawicz, L. J. Brandt, D. G. Binion, A. N. Ananthakrishnan, S. R. Curry, P. H. Giligan, L. V. McFarland, M. Mellow a B. S. Zuckerbraun, „Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of clostridium difficile infections", *Am. J. Gastroenterol.*, **108**, 478–498 (2013).
- [56] D. L. Suskind, M. J. Brittnacher, G. Wahbeh, M. L. Shaffer, H. S. Hayden, X. Qin, N. Singh, Ch. J. Damman, K. R. Hager, H. Nielson a S. I. Miller, „Fecal Microbial Transplant Effect on Clinical Outcomes and Fecal Microbiome in Active Crohn’s Disease", *Inflamm. Bowel Dis.*, **21**, 556–563 (2015).
- [57] A. D. Kostic, R. J. Xavier a D. Gevers, „The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead", *Gastroenterology*, **146**, 1489–1499 (2014).
- [58] J. McIlroy, G. Ianiro, I. Mukhopadhyaya, R. Hansen a G. L. Hold, „Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease-avenues for microbial management", *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **47**, 26–42 (2018).
- [59] W. Y. Mak, A. L. Hart a S. C. Ng, „Crohn’s disease", *Medicine (United Kingdom)*, **47**, 377–387 (2019).
- [60] A. D. O’Brien, J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith a S. B. Formal, „Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea", *Science*, **226**, 694–696 (1984).
- [61] D. Gevers, S. Kugathasan, L. A. Denson, Y. Vázquez-Baeza, W. V. Treuren, B. Ren, E. Schwager, D. Knights, S. J. Song, M. Yassour, Y. C. Morgan, A. D. Kostic, Ch. Luo, A. González, D. McDonald, Y. Haberman, T. Walters, S. Baker, J. Rosh, M. Stephens, M. Heyman, J. Markowitz, R. Baldassano, A. Griffiths, F. Sylvester, D. Mack, S. Kim, W. Crandall, J. Hyams, C. Huttenhower, R. Knight a R. J. Xavier, „The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn’s disease", *Cell Host Microbe*, **15**, 382–392 (2014).
- [62] D. O. Magro, A. Santos, D. Guadagnini, F. M. de Godoy, S. H. M. Silva, W. J. F. Lemos, N. Vitulo, S. Torriani, L. V. Pinheiro, C. A. R. Martinez, M. J. A. Saad a C. S. R. Coy, „Remission in Crohn’s disease is accompanied by alterations in the gut microbiota and mucins production", *Sci. Rep.*, **9**, 1–10 (2019).

- [63] R. K. Singh, H.-W. Chang, D. Yan, K. M. Lee, D. Ucmak, K. Wong, M. Abrouk, B. Farahnik, M. Nakamura, T. H. Zhu, T. Bhutani a W. Liao, „Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health", *J. Transl. Med.*, **15**, 1–17 (2017).
- [64] T. Iizumi, T. Battaglia, V. Ruiz a G. I. Perez Perez, „Gut Microbiome and Antibiotics", *Arch. Med. Res.*, **48**, 727–734 (2017).
- [65] U. Vyas a N. Ranganathan, „Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond", *Gastroenterol. Res. Pract.*, **2012**, 1–16 (2012).
- [66] L. Guthrie a L. Kelly, „Bringing microbiome-drug interaction research into the clinic", *EBioMedicine*, **44**, 708–715 (2019).
- [67] L. Colebrook, G. A. H. Buttle a R. A. Q. O’Meara, „The Mode of Action of p-aminobenzenesulphonamide and prontosil in haemolytic Streptococcal infections", *The Lancet*, **228**, 1323–1326 (1936).
- [68] E. Middleton, „Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function", *Adv. Exp. Med. Biol.*, **439**, 175–182 (1998).
- [69] A. N. Panche, A. D. Diwan a S. R. Chandra, „Flavonoids: an overview.", *J. Nutr. Sci.*, **5**, 1–15 (2016).
- [70] N. C. Cook a S. Samman, „Flavonoids? Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources", *J. Eur. Ceram. Soc.*, **7**, 66–76 (1996).
- [71] J. L. Ferrer, M. B. Austin, C. Stewart a J. P. Noel, „Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids", *Plant Physiol. Biochem.*, **46**, 356–370 (2008).
- [72] Y. Wang, S. Chen a O. Yu, „Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 949–956 (2011).
- [73] S. Kumar, A. K. Pandey, K. P. Lu a J. Sastre, „Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *Sci. World J.*, **2013**, 1–16 (2013).
- [74] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomás-Barberán, N. Datta, R. Singanusong a S. S. Chen, „Flavonoids in food and their health benefits", *Plant Foods Hum.*

- Nutr.*, **59**, 113–122 (2004).
- [75] F. A. Tomás-Barberán a M. N. Clifford, „Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden", *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1073–1080 (2000).
- [76] A. Gil-Izquierdo, M. I. Gil, F. Ferreres a F. A. Tomás-Barberán, „In Vitro Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice", *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1035–1041 (2001).
- [77] A. Braune, M. Gütschow, W. Engst a M. Blaut, „Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5558–5567 (2001).
- [78] L. Schoefer, R. Mohan, A. Schwiertz, A. Braune a M. Blaut, „Anaerobic Degradation of Flavonoids by *Clostridium orbiscindens*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5849–5854 (2003).
- [79] L. R. Krumholz a M. P. Bryant, „*Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin", *Arch. Microbiol.*, **144**, 8–14 (1986).
- [80] Z. Zhang, X. Peng, S. Li, N. Zhang, Y. Wang a H. Wei, „Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes", *PLoS One*, **9**, 1–5 (2014).
- [81] A. R. Rechner, M. A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, S. K. S. Srail, K. P. Moore a C. A. Rice-Evans, „Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products", *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 212–225 (2004).
- [82] P. Lakhnpal, D. Deepak a K. Rai, „Quercetin: A Versatile Flavonoid", *Internet J. Medical Update*, **2**, 22–37 (2007).
- [83] A. V. Anand David, R. Arulmoli a S. Parasuraman, „Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid", *Pharmacogn. Rev.*, **10**, 84–89 (2016).
- [84] A. Serra, A. MacIà, M. P. Romero, J. Reguant, N. Ortega a M. J. Motilva,

- „Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids", *Food Chem.*, **130**, 383–393 (2012).
- [85] S. Thilakarathna a H. Rupasinghe, „Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement", *Nutrients*, **5**, 3367–3387 (2013).
- [86] S. J. Maleki, J. F. Crespo a B. Cabanillas, „Anti-inflammatory effects of flavonoids", *Food Chem.*, **299**, 1–11 (2019).
- [87] M. Serafini, I. Peluso a A. Raguzzini, „Flavonoids as anti-inflammatory agents", *Proc. Nutr. Soc.*, **69**, 273–278 (2010).
- [88] V. Valatas, M. Vakas a G. Kolios, „The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **305**, 763–785 (2013).
- [89] T. Vezza, A. Rodríguez-Nogales, F. Algieri, M. P. Utrilla, M. E. Rodríguez-Cabezas a J. Galvez, „Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review", *Nutrients*, **8**, 1–22 (2016).
- [90] F. Algieri, A. Rodríguez-Nogales, M. E. Rodríguez-Cabezas, S. Risco, M. A. Ocete a J. Galvez, „Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review", *Mediators Inflamm.*, **2015**, 1–14 (2015).
- [91] K. S. Park, Y. Chong a M. K. Kim, „Myricetin: biological activity related to human health", *Appl. Biol. Chem.*, **59**, 259–269 (2016).
- [92] Y. Yao, G. Lin, Y. Xie, P. Ma, G. Li, Q. Meng a T. Wu, „Preformulation studies of myricetin: A natural antioxidant flavonoid", *Pharmazie*, **69**, 19–26 (2014).
- [93] D. K. Semwal, R. B. Semwal, S. Combrinck a A. Viljoen, „Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities", *Nutrients*, **8**, 1–31 (2016).
- [94] P. A. Phillips, V. Sangwan, D. Borja-Cacho, V. Dudeja, S. M. Vickers a A. K. Saluja, „Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway", *Cancer Lett.*, **308**, 181–188 (2011).
- [95] H. Xu a S. F. Lee, „Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant

- bacteria", *Phyther. Res.*, **15**, 39–43 (2001).
- [96] E. I. McDougall, „The composition and output of sheep’s saliva", *Biochem. J.*, **43**, 99–109 (1948).
- [97] M. P. Bryant a L. A. Burkey, „Cultural Methods and Some Characteristics of Some of the More Numerous Groups of Bacteria in the Bovine Rumen", *J. Dairy Sci.*, **36**, 205–217 (1953).
- [98] A. Hušková, „Interakce střevní mikroflóry s myricetinem", Bakalářská práce katedra biochemie PšF UK (2017).
- [99] G. Muyzer, E. C. De Waal a A. G. Uitterlinden, „Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695–700 (1993).
- [100] S. McGinn a I. G. Gut, „DNA sequencing – spanning the generations", *N. Biotechnol.*, **30**, 366–372 (2013).
- [101] J. M. Heather a B. Chain, „The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA", *Genomics*, **107**, 1–8 (2016).
- [102] J. K. Kulski, „Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications". [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-an-overview-of-the-history-tools-and-omic-applications>> [cit. 5. 3. 2020].
- [103] H. P. J. Buermans a J. T. den Dunnen, „Next generation sequencing technology: Advances and applications", *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.*, **1842**, 1932–1941 (2014).
- [104] K. Fliegerova, I. Tapio, A. Bonin, J. Mrazek, M. L. Callegari, P. Bani, A. Bayat, J. Vilkki, J. Kopecny, K. J. Shingfield, F. Boyer, E. Coissac, P. Taberlet a R. J. Wallace, „Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population", *Anaerobe*, **29**, 80–84 (2014).
- [105] Stručný slovník NGS pojmů. *SEQme s. r. o.* [online]. Dostupné z URL:

<<https://www.seqme.eu/cs/magazine/glossary>> [cit. 16. 3. 2020].

- [106] P. Hucková, „Úloha střevní mikroflóry v metabolismu léčiv a karcinogenů“, Bakalářská práce katedra biochemie PřF UK (2018).
- [107] E. K. Wright, M. A. Kamm, S. M. Teo, M. Inouye, J. Wagner a C. D. Kirkwood, „Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn’s disease: A systematic review“, *Inflamm. Bowel Dis.*, **21**, 1219–1228 (2015).
- [108] J. L. Waters a R. E. Ley, „The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health“, *BMC Biology*, **17**, 1–11 (2019).

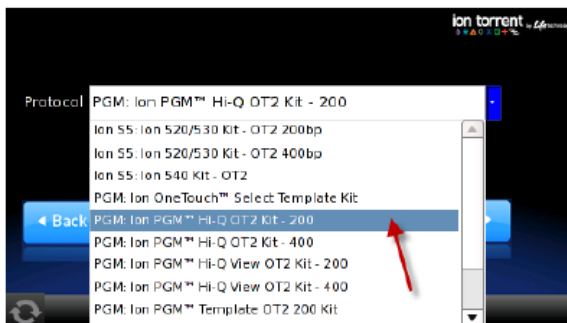
Příloha 1: Zkrácený protokol Ion PGM™ Hi-Q™ View Kit

Run the Ion OneTouch™ 2 Instrument At 4:00 pm

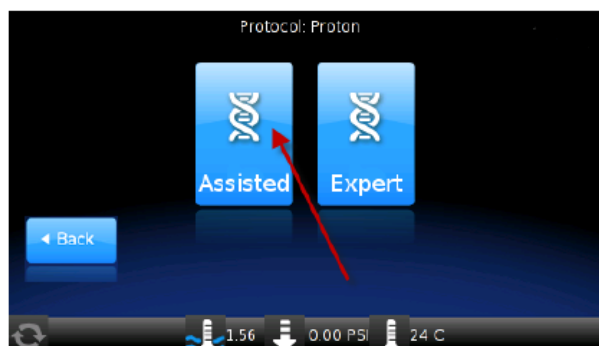
1. Ensure that the centrifuge lid of the Ion OneTouch™ 2 Instrument is closed.
2. On the home screen, touch **Run**:



3. Touch the drop-down menu, then select **PGM: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit-400**



4. Touch **Next**.
5. Touch **Assisted** or **Expert**:

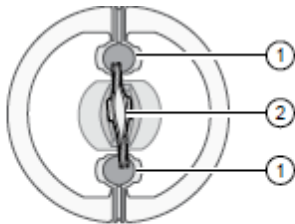


6. **Assisted** mode displays the individual task screens for setting up the run. Select this mode if you are a new user and need step-by-step onscreen guidance. Complete each task, and prepare and install the amplification solution then touch **Next**.

Set up the Ion OneTouch™ 2 Instrument

A) Install the Ion OneTouch™ Recovery Tubes and Ion OneTouch™ Recovery Router

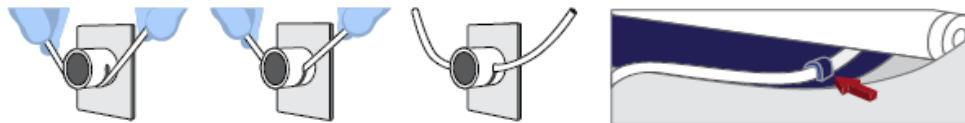
1. Dispense **150 µL Ion OneTouch™ Breaking Solution** into each of two Ion OneTouch™ **Recovery Tubes** and Insert them into the two centrifuge positions.
2. Install the Ion OneTouch™ **Recovery Router** into the center slot of the centrifuge and close the centrifuge lid.



- ① Ion OneTouch™ Recovery Tube
② Ion OneTouch™ Recovery Router

B) Install the Ion OneTouch™ Amplification Plate:

Remove the used Cleaning Adapter, insert the plate, and pull the **handle** to close the heat block. Thread the disposable **tubing** through **the catch** and **pinch valve**.



C) Install the disposable injector (You should hear a click).



D) Install the Reagent Tubes

1. Install the Ion OneTouch™ **Oil**: fill the Reagent Tube **half-full with Oil**.
2. Install the Ion OneTouch™ **Recovery Solution**: fill the Reagent Tube **one quarter-full with Recovery Solution**.

E) Empty the waste container of waste.

F) Prepare the amplification solution

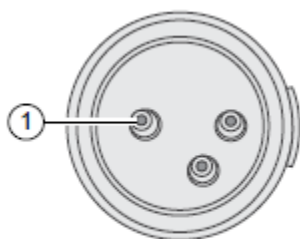
To a 2-mL tube (**violet cap**) containing 800 µL of Ion PGM™ Hi-Q™ **View Reagent Mix**, add the following components in the designated order. Add each component, then pipet the amplification solution up and down to mix:

Order	Reagent	Cap color	volume
1	Nuclease-free Water		25 μ L
2	Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix	Brown	50 μ L
3	Diluted library (40pM)		25 μ L
4	Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs	Black	100 μ L

Prepare the Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs:

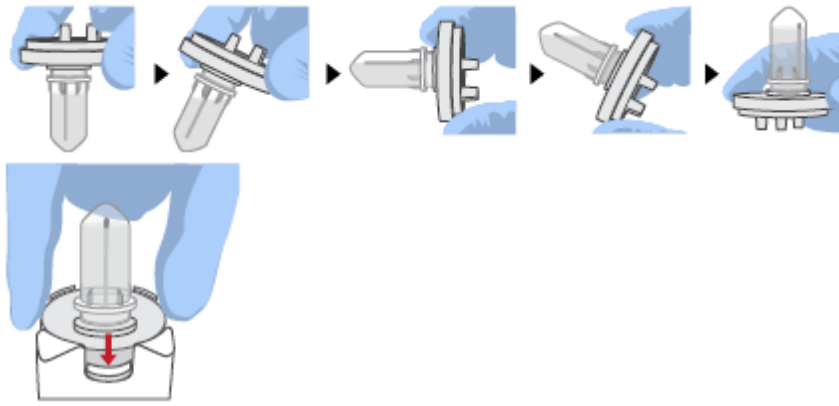
- a. Vortex the ISPs at maximum speed for *1 minute* to resuspend the particles.
- b. Centrifuge the ISPs for 2 seconds.
- c. Pipet the ISPs up and down to mix.**
- d. *Immediately* proceed to the next step.

G) Fill and install the Ion OneTouch™ Reaction Filter



① Sample port

1. Pipet **1000 μ L** of the **amplification solution** through the **sample port** of the Ion OneTouch™ Reaction Filter.
2. Pipet **850 μ L** of Ion OneTouch™ **Reaction Oil** (25-mL size) through the **sample port**.
3. **Change the tip** and pipet an additional 850 μ L of Ion OneTouch™ **Reaction Oil** through the **sample port**.
4. Invert then install the filled Ion OneTouch™ **Reaction Filter** into the three holes on the top stage of the Ion OneTouch™ 2 Instrument



H) Start the run

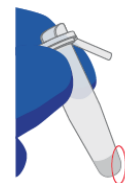
1. After installing the Ion OneTouch™ Reaction Filter, touch **Next** to **start the run**.

Remove the samples <16 hours after starting the **run**.

Day 2 in the morning

A) Recover the template-positive ISPs

1. At the end of the run, follow the screen prompts to centrifuge the sample
2. After the centrifuge has stopped, touch **Open Lid**. Wait until the lid clicks open, **then remove and discard the Recovery Router**.
3. Remove both **Recovery Tubes** from the instrument, then put the two tubes in a tube rack.
4. Remove all but **100 µL** of the Recovery Solution from each Recovery Tube.
5. Process the ISPs:
 - a. Add **500 µL** of **Wash Solution** to each Recovery Tube.
 - b. Pipet **up and down** to disperse the ISPs, then **combine the suspension** from each Recovery Tube **into one** new 1.5-mL **Eppendorf Tube**.
 - c. Centrifuge the ISPs for **2.5 minutes at 15,500 × g**.
 - d. Remove all but **100 µL** of the Wash Solution from the tube. (Withdraw the supernatant from the surface and on the opposite side from the pellet).



B) Enrich the template-positive Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs

B1) Prepare reagents then fill the 8-well strip

I) ISPs

1. Obtain an 8-well strip. Ensure that the square-shaped tab of an 8-well strip is on the left:
2. Pipet the ISPs up and down 10 times to mix, then transfer the suspension into Well 1 of the 8-well strip.

II) Wash and resuspend the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1Beads:

1. Vortex the tube of Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin **C1 Beads** for 30 seconds to resuspend the beads thoroughly
2. pipet the dark pellet of beads up and down until the pellet disperses.
3. Transfer **13 µL** of Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin **C1 Beads** to a new 1.5-mL **Eppendorf Tube**.
4. **Place the tube on a magnet for 2 minutes**, then carefully **remove and discard the supernatant** without disturbing the pellet.
5. Add **130 µL** of My One™ Beads **Wash Solution** to the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads.
6. Remove the tube from the magnet, **vortex** the tube.

III) Prepare Melt-Off Solution

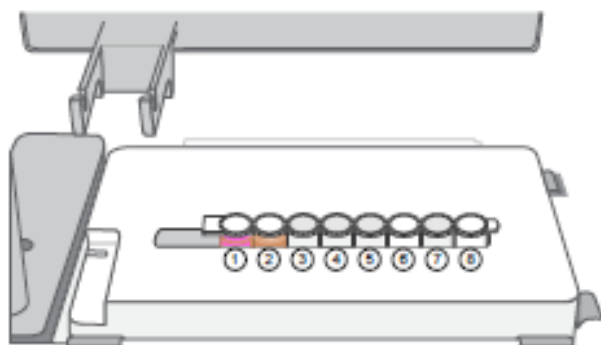
Prepare fresh Melt-Off Solution by combining the components in the following order:

Order	Component	Volume
1	Tween™ Solution	280 µL
2	1M NaOH	40 µL
	Total	320 µL

IV) Fill the remaining wells in the 8-well strip as follows:

Well number	Reagent to dispense in well
Well 1 I) ISPs	100 µL Template positive ISPs
Well 2 II) Wash and resuspend the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin	130 µL Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads+ My One™ Beads Wash Solution

C1Beads	
Well 3	300 μ L of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 4	300 μ L of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 5	300 μ L of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 6	////
Well 7 III) Prepare Melt-Off Solution	300 μ L of freshly-prepared Melt-Off Solution
Well 8	////



Confirm that the **square-shaped tab is on the left, then insert the filled 8-well strip with the 8-well strip pushed all the way to the right end of the slot of the Tray

B2) Prepare the Ion OneTouch™ ES

1. Install a **new PCR collection tube** and a **new pipette tip**.
2. Add **10 μ L of Neutralization Solution** to a new 0.2-mL PCR tube.



B3) Perform the run

1. Press **Start/Stop**. The screen displays "run" during the run. The run takes ~35 minutes.
2. At the end of the run, the instrument displays "End" and beeps. Press the **Start/Stop** button

3. Immediately after the run, securely close, then remove the PCR tube containing the enriched ISPs.
4. Mix the contents of the PCR tube by gently inverting the tube 5 times.
Note: Ensure that the 0.2-mL PCR tube has >200 µL of solution containing the enriched ISPs. After a successful run on the instrument, the sample is in ~230 µL of Melt-Off Solution, Ion OneTouch™ Wash Solution, and Neutralization Solution. If the tube has <<200 µL of solution containing the enriched ISPs, contact Technical Support.
5. Remove then discard the used tip and used 8-well strip.

C) Clean the Ion OneTouch™ 2 Instrument

1. Determine the appropriate reagents to use for maintaining the Ion OneTouch™ 2 Instrument: Already using the **Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit**.
2. Check the level of Ion **OneTouch™ Oil** in the Reagent Tube (must be half-full).
3. Remove and discard the used Ion OneTouch™ Reaction **Filter**.
4. Insert the Cleaning **Adapter** into the three holes on the top stage of the Instrument.
5. Keep the Ion OneTouch™ Amplification Plate in the heat block.
6. The tubing is out of the valve. Remove **the injector** from the Ion OneTouch™ DL Injector Hub and place it into the **waste tube**.
7. On the home screen of the instrument, touch **Clean**.
8. Complete each task that is displayed on the screen, then touch **Next**. After you touch Next on the last task, a progress bar appears, and the cleaning starts.
9. At the end of the cleaning run, the screen displays "**Time Remaining 00:00:00, Cleaning Run Complete**". Press **Next**
10. Remove and discard the used **Amplification Plate, injector, and tubing**. (Leave the heat block open)
11. On the instrument display, touch **Open Lid**, wait until the lid clicks open, then open the centrifuge lid. Wipe the residue from the centrifuge lid with dry Kimwipes™ disposable wipers, then **close the centrifuge lid**.
12. Touch **Next** to return to the home screen on the instrument.

Příloha 2: Zkrácený protokol Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit

A) Clean the Ion PGM™ System

18 MΩ water cleaning

1. Press **Clean**, and select the **18-MΩ water cleaning**. Press **Next**.
2. Secure a **used chip** designated for cleaning **in the chip clamp**.
3. **Keep the sippers** in place at all positions. Press **Next**.
4. **Rinse each bottle** with ~100 mL of 18 MΩ water.
5. **Add 250 mL of 18 MΩ water bottle W1**.
6. **Rinse the sipper tube in the W1 position** with 18 MΩ water.
7. **Attach the 250-mL bottle containing 18 MΩ water to the W1 position**, ensuring that the **W1 cap is screwed on tightly**. Press **Next**.
8. Place **the empty bottles W2 and W3** position. **Do not screw on the caps**.
9. Place **collection trays** below the **reagent sippers in the dNTP** positions. Press **Next** to begin cleaning.
10. When cleaning is complete, **remove the bottles and sippers from the W1, W2 and W3 positions**. **Leave the reagent sippers and collection trays in place**. Press **Next** to return to the main menu and proceed to initialization.

B) Initialize the Ion PGM™ System

Before initialization Check the tank pressure for the nitrogen gas.

Prepare the Wash 2 Bottle

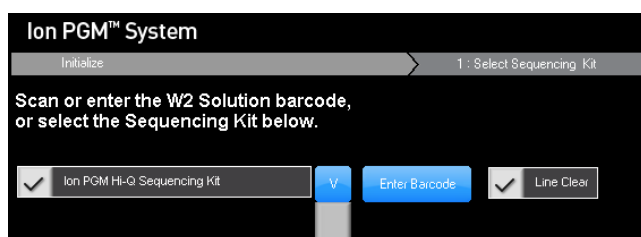
1. Rinse the Wash 2 Bottle (2 L) 3 times with 200 mL of 18 MΩ water.
2. Fill the bottle to the **bold line** with **18 MΩ water**. The volume of water is ~2 liters.
3. Add the **entire bottle of Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W2 Solution** to the **Wash 2 Bottle**.
4. Add **70 μL of 100 mM NaOH** to the **Wash 2 Bottle**.
5. Cap the bottle and **invert 5 times to mix**

Prepare the Wash 1 and Wash 3 Bottles

1. **Rinse** the Wash 1 and Wash 3 Bottles 3 times with 50 mL of 18 MΩ water.
2. **Wash 1 Bottle:** Add **350 μL** of freshly prepared **100 mM NaOH** to the **Wash 1 Bottle**, then cap the bottle.
3. **Wash 3 Bottle:** Add Ion **PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W3 Solution** to the **50-mL** line marked on the **Wash 3 Bottle**, then cap the bottle.

Initialization

1. On the main menu, press **Initialize**.
2. Make the following selections in the next screen, then press **Next**:
 - Alternatively, select the checkbox for the **Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit** from the dropdown list.



After you press **Next**, the system will check the gas pressure.

4. **attach a new, long gray sipper to the cap in the W2 position.**
5. **attach the prepared Wash 2 Bottle** in the W2 position, **then tighten the cap.** Press **Next**.
6. **install new sipper tubes (short gray) in the caps in the W1 and W3 positions.**
7. **attach the prepared Wash 1 and 3 Bottles**, then **tighten the caps.** Press **Next**.
8. the sequencer **begins adjusting the pH of the W2 Solution**, which takes **~30 minutes**. **After 15 minutes, check the instrument touchscreen to confirm that initialization is proceeding normally.**

Prepare the 50 mL Reagent Bottles with dNTPs

1. label four new Reagent Bottles as dGTP, dCTP, dATP, and dTTP.
2. Put **20 μL** of each dNTP stock solution into its respective Reagent Bottle.
3. Cap each Reagent Bottle and store on ice until you are ready to attach it to the instrument. **dNTP stocks back into -20°C for storage.**

Attach the sipper tubes and Reagent Bottles

1. After the wash solutions have initialized, **remove the sipper tubes** and collection trays from the dNTP ports.
2. **insert a new sipper tube (blue) into each dNTP port.**

3. **Attach** each prepared **Reagent Bottle to the correct dNTP port** and **tighten firmly** by hand until snug. Press **Next**.
4. Follow the touchscreen prompts to complete initialization. The instrument will fill each Reagent Bottle with 40 mL of W2 Solution.
5. At the end of initialization, Ion PGM™ System will measure the pH of the reagents:
 - If every reagent is in the target pH range, a green **Passed** screen will be displayed.
6. Press **Next** to finish the initialization process and return to the main menu.

C) Load the chip

Add controls to the enriched, template-positive ISPs

1. **Vortex the Control Ion Sphere™ Particles**, then pulse centrifuge in a picofuge for 2 seconds before taking aliquots.
2. Add **5 µL** of Control ISPs directly to the entire volume of enriched, **template-positive ISPs** in a 0.2-mL PCR tube.

Anneal the Sequencing Primer

1. **Mix** the tube containing **the ISPs** by thoroughly **pipetting up and down**.
2. **Centrifuge for 2 minutes at 15,500 × g**.
3. **Remove the supernatant. Leave ~15 µL** in the tube
4. Vortex the primer for 5 seconds, **Add 12 µL of Sequencing Primer to the ISPs**, then confirm that the total volume is 27 µl
5. Pipet the **mixture up and down** thoroughly **to disrupt the pellet**.
6. Place the tube in the **thermal cycler**, Program a thermal cycler **for 95°C for 2 minutes and then 37°C for 2 minutes**, then run the program.

Perform Chip Check

1. On the main menu of the Ion PGM™ Sequencer touchscreen, press **Run. Remove the waste bottle and completely empty it**. Press **Next**.
2. Use the same **used chip that was used for initialization**. Press **Next** to clean the fluid lines.
3. **Select the instrument** that you used to prepare the template-positive ISPs (**OT2**). Then press **Next**.
4. Use the scanner to scan the **barcode** located on the new chip, or press **Change** to enter the barcode manually.
5. Replace the old chip with the new one. Close the chip clamp, then press **Next**.
6. Press **Chip Check**

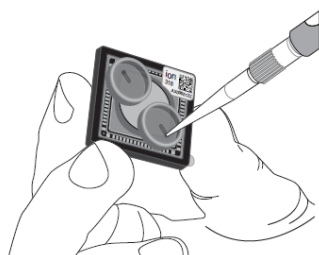
7. Following a successful Chip Check, empty the waste bottle, then select the **Waste bottle is empty** checkbox on the touchscreen. Press **Next**.

Bind the Sequencing Polymerase to the ISPs

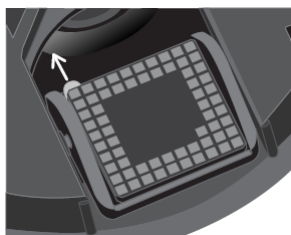
1. After annealing the Sequencing Primer, **add 3 μL of Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerase** to the ISPs, for a **total final volume of 30 μL** .
2. **Pipet the sample up and down to mix**, then incubate at room temperature **for 5 minutes**.

Remove liquid from the chip

1. Following chip calibration, **remove the new chip from the Ion PGM™ Sequencer**. **Insert a used chip in the chip clamp while loading the new chip**.
2. Tilt the new chip at a 45° angle so that the loading port is the lower port.
3. Insert the pipette tip firmly into the loading port, then **remove as much liquid as possible from the loading port**. Discard the liquid.



4. Place the chip **upside-down** in the **minifuge bucket**, then transfer the bucket **with the chip tab pointing in** (toward the center of the minifuge). Balance the bucket with another chip.



5. **Centrifuge for 5 seconds** to empty the chip completely.
6. Remove the chip from the bucket, then **wipe the bucket** with a disposable **wipe to remove any liquid**.

Load the chip

1. Place the chip right side up in the bucket on flat surface. Following polymerase incubation, load the chip with following volume of prepared ISPs

Chip	Volume to load	Recommended pipette ^[1]
Ion 316™ or Ion 318™ Chip	Entire volume (~30 µL)	Rainin™ Pipet-Lite™ LTS L-100XLS, 10–100 µL
Ion 314™ Chip	10 µL	Rainin™ Pipet-Lite™ LTS L-20XLS, 2–20 µL

2. **Insert the tip** firmly into the **loading port of the chip**.

3. With the pipette unlocked, apply gentle pressure between the tip and chip and slowly dial down the pipette (~1 µL per second) to deposit the ISPs. To avoid introducing bubbles into the chip, leave a small amount in the pipette tip (~0.5 µL).



4. Remove, then discard any displaced liquid from the other port of the chip.

5. Transfer the chip in the bucket to the minifuge with the chip tab **pointing in** (toward the center of the minifuge), then **centrifuge for 30 seconds**.



6. Turn the chip so that the chip tab is **pointing out** (away from the center of the minifuge), then **centrifuge for 30 seconds**.



7. Remove the bucket from the minifuge, then place it on a flat surface. Set the volume of the pipettor as follows, depending on your chip type:

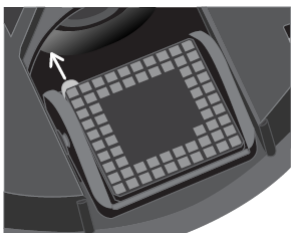
- **Ion 316™ or Ion 318™ Chip:** 25 µL

8. Tilt the chip at a 45° angle so that the loading port is the lower port, then insert the pipette tip into the loading port.

9. Without removing the tip, slowly pipet the sample out and then back into the chip one time. **Pipet slowly to avoid creating bubbles.**

10. Slowly remove as much liquid as possible from the chip by dialing the pipette. Discard the liquid.

11. Turn the chip **upside-down** in the bucket, transfer it back to the minifuge, then centrifuge **for 5 seconds**. Remove and **discard any liquid**.



12. When chip loading is complete, press **Next** on the touchscreen, then proceed immediately to performing the run.

D) Run

Select the Planned Run

1. Press **Browse** next to the **Planned Run** field and select the name of the plan you created, then touch **Next**.
2. Confirm that the settings are correct. If necessary, make any changes using the touchscreen controls.

Perform the run

1. After you enter the Planned Run, press **Next** to verify the experimental setup. Press **OK** to confirm the settings or press **Cancel** to return to the touchscreen to adjust the settings.
2. When prompted by the instrument, load and clamp the chip, then press **Next**.
3. At the beginning of the run, visually inspect the chip in the clamp for leaks before closing the cover. The instrument will flush any loose ISPs from the chip and begin calibrating the chip.
4. When the calibration is complete (~1 minute), the touchscreen will indicate whether calibration was successful.
5. After 60 seconds, the run will automatically begin, or press **Next** to begin the run immediately.
6. When the run is complete, leave the chip in place, then touch **Next** to return to the Main Menu.

Příloha 3: Procentuální zastoupení všech bakteriálních druhů ve fekálních vzorcích s přidavkem myricetinu a bez přidavku myricetinu

Vyhodnocení bakteriálního zastoupení je uvedeno podle kritéria: vzorek/médium/přídavek bez ohledu na čas inkubace. Sloupcové grafy jsou uvedeny na Obrázku 14, str. 66.

Bakteriální zastoupení ve fekálním vzorku B

Fekální vzorek	B			
	McD.		BHI	
	NK	MYR	NK	MYR
Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae	0,00%	0,17%	0,09%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae	0,37%	0,35%	0,36%	0,54%
Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae	0,09%	0,17%	0,09%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Atopobiaceae	0,00%	0,00%	0,09%	0,09%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriaceae	0,55%	0,52%	3,21%	3,61%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriales Incertae Sedis	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Eggerthellaceae	0,09%	0,26%	0,45%	0,63%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae	11,72%	12,26%	6,24%	6,68%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Barnesiellaceae	1,28%	1,30%	0,45%	0,72%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinifilaceae	0,27%	0,43%	0,09%	0,27%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae	0,00%	0,00%	0,18%	0,18%

Fekální vzorek	B				
	Médium	McD.		BHI	
		NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení					
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae	6,41%	7,57%	12,93%	10,57%	
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae	7,51%	7,48%	2,41%	2,71%	
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Tannerellaceae	1,56%	1,22%	1,52%	1,63%	
Bacteroidetes;Bacteroidia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae	0,18%	0,00%	0,00%	0,00%	
Epsilonbacteraeota;Campylobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae	0,37%	0,26%	0,09%	0,09%	
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae	2,75%	2,96%	3,48%	2,98%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Christensenellaceae	9,07%	8,35%	1,16%	0,99%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae 1	0,09%	0,00%	0,09%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiales vadinBB60 group	1,83%	1,30%	0,18%	0,09%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Defluviitaleaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XI	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XIII	0,27%	0,09%	0,18%	0,18%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae	16,76%	17,39%	32,47%	32,70%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptococcaceae	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptostreptococcaceae	0,00%	0,43%	0,09%	0,09%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae	21,25%	20,87%	22,30%	21,05%	
Firmicutes;Clostridia;DTU014;uncultured bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Erysipelotrichia;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae	0,55%	0,43%	2,05%	2,26%	
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Acidaminococcaceae	0,37%	0,17%	1,07%	1,08%	
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Veillonellaceae	3,66%	3,48%	3,03%	3,16%	
Lentisphaerae;Lentisphaeria;Victivallales;Victivallaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	

Fekální vzorek	B			
Médium	McD.		BHI	
Přídavek	NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení				
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;uncultured	0,09%	0,26%	0,36%	0,36%
Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae	0,64%	0,43%	0,09%	0,18%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Betaproteobacteriales;Burkholderiaceae	1,83%	1,39%	1,34%	1,90%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae	2,66%	2,09%	0,54%	2,08%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pasteurellales;Pasteurellaceae	0,00%	0,09%	0,09%	0,00%
Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Synergistaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Izimaplasmatales;uncultured organism	0,09%	0,09%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;gut metagenome	0,18%	0,09%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured bacterium	0,46%	0,61%	0,36%	0,45%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured rumen bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Akkermansiaceae	0,00%	0,00%	0,09%	0,09%
Unassigned	7,05%	7,39%	2,85%	2,62%

Bakteriální zastoupení ve fekálním vzorku C

Fekální vzorek	C			
Médium	McD.		BHI	
Přídavek	NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení				
Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae	5,18%	5,73%	4,23%	3,44%
Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Fekální vzorek	C			
	McD.		BHI	
	NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení				
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Atopobiaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriaceae	5,63%	5,19%	0,88%	0,79%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriales Incertae Sedis	0,09%	0,00%	0,10%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Eggerthellaceae	0,18%	0,18%	0,49%	0,39%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae	19,46%	18,71%	24,19%	24,02%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Barnesiellaceae	1,34%	1,34%	0,98%	0,79%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinifilaceae	0,45%	0,63%	0,20%	0,10%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae	0,54%	0,63%	1,08%	0,79%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae	4,91%	4,03%	0,69%	1,28%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Tannerellaceae	1,61%	2,15%	3,83%	4,04%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Epsilonbacteraeota;Campylobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae	0,00%	0,00%	0,10%	0,10%
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae	0,09%	0,18%	0,98%	0,98%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Christensenellaceae	1,07%	0,72%	1,77%	1,97%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae 1	0,54%	0,36%	0,39%	0,39%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiales vadinBB60 group	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Defluviitaleaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XI	0,00%	0,00%	0,10%	0,20%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XIII	0,18%	0,36%	0,10%	0,20%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae	29,20%	30,08%	31,96%	32,28%

Fekální vzorek	C			
	McD.		BHI	
	NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení				
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptococcaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptostreptococcaceae	1,61%	1,43%	1,18%	1,67%
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae	19,46%	20,14%	18,98%	18,01%
Firmicutes;Clostridia;DTU014;uncultured bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Erysipelotrichia;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae	0,27%	0,27%	2,46%	3,25%
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Acidaminococcaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Veillonellaceae	2,68%	2,86%	2,85%	2,56%
Lentisphaerae;Lentisphaeria;Victivallales;Victivallaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;uncultured	0,18%	0,18%	0,10%	0,20%
Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae	1,25%	1,61%	0,29%	0,30%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Betaproteobacteriales;Burkholderiaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae	0,80%	0,27%	0,29%	0,59%
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pasteurellales;Pasteurellaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Synergistaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Izimaplasmatales;uncultured organism	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;gut metagenome	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured rumen bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Akkermansiaceae	0,18%	0,18%	0,29%	0,49%
Unassigned	3,13%	2,78%	1,38%	1,18%

Bakteriální zastoupení ve fekálním vzorku D

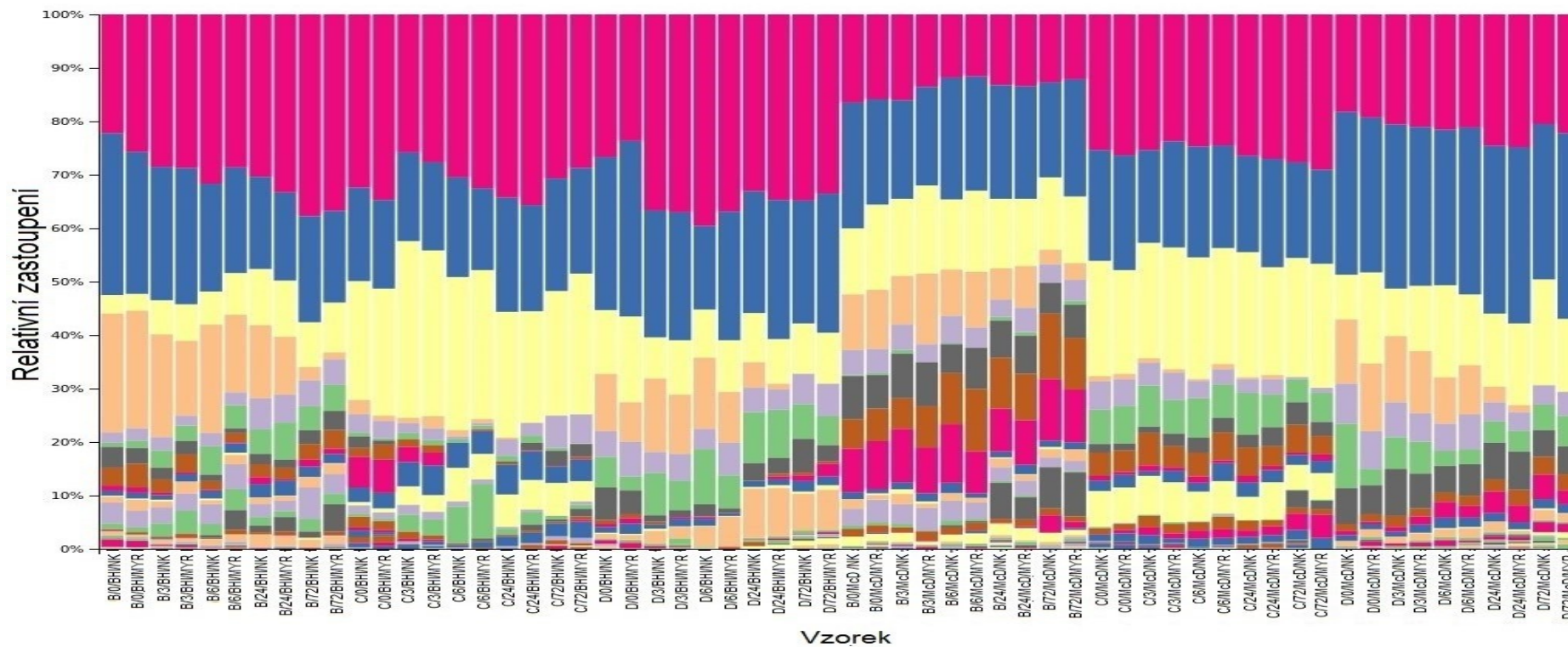
Fekální vzorek	D			
	McD.		BHI	
	NK	MYR	NK	MYR
Médium				
Přídavek				
Bakteriální zastoupení				
Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae	0,18%	0,09%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae	0,18%	0,17%	0,37%	0,37%
Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Atopobiaceae	0,00%	0,09%	0,09%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriaceae	5,17%	3,71%	7,08%	5,24%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriales Incertae Sedis	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%
Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Eggerthellaceae	0,26%	0,09%	0,37%	0,37%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae	12,01%	12,52%	9,10%	10,11%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Barnesiellaceae	0,00%	0,09%	0,00%	0,09%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinifilaceae	0,53%	0,26%	0,18%	0,28%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae	5,96%	5,61%	7,44%	4,96%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae	2,10%	2,16%	0,64%	0,64%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Tannerellaceae	1,40%	1,30%	1,38%	1,38%
Bacteroidetes;Bacteroidia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Epsilonbacteraeota;Campylobacteria;Campylobacteriales;Campylobacteraceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae	0,35%	0,09%	0,00%	0,09%
Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae	0,18%	0,09%	0,00%	0,00%

Fekální vzorek	D				
	Médium	McD.		BHI	
		Přídavek	NK	MYR	NK
	Bakteriální zastoupení				
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Christensenellaceae	2,89%	2,68%	0,64%	1,29%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae 1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiales vadinBB60 group	0,26%	0,35%	0,09%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Defluviitaleaceae	0,09%	0,09%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XI	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XIII	0,09%	0,26%	0,55%	0,92%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae	22,87%	24,09%	34,65%	33,36%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptococcaceae	0,09%	0,00%	0,09%	0,09%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptostreptococcaceae	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae	30,06%	30,74%	23,07%	26,38%	
Firmicutes;Clostridia;DTU014;uncultured bacterium	0,00%	0,00%	0,00%	0,09%	
Firmicutes;Erysipelotrichia;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae	0,44%	0,78%	0,64%	0,55%	
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Acidaminococcaceae	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	
Firmicutes;Negativicutes;Selenomonadales;Veillonellaceae	4,29%	4,40%	3,95%	4,69%	
Lentisphaerae;Lentisphaeria;Victivallales;Victivallaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,09%	
Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;uncultured	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae	0,79%	0,78%	0,28%	0,37%	
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Betaproteobacteriales;Burkholderiaceae	1,67%	1,47%	4,32%	4,78%	
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae	0,18%	0,17%	0,00%	0,00%	
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pasteurellales;Pasteurellaceae	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Synergistaceae	0,18%	0,26%	0,00%	0,00%	

Fekální vzorek	D			
Médium	McD.		BHI	
Přídavek	NK	MYR	NK	MYR
Bakteriální zastoupení				
Tenericutes;Mollicutes;Izimaplasmatales;uncultured organism	0,18%	0,35%	0,18%	0,18%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;gut metagenome	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured bacterium	0,35%	0,26%	0,18%	0,18%
Tenericutes;Mollicutes;Mollicutes RF39;uncultured rumen bacterium	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%
Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Akkermansiaceae	0,00%	0,09%	0,18%	0,09%
Unassigned	7,10%	6,82%	4,50%	3,40%

Příloha 4: Sloupcové grafy bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích

Sloupcové grafy znázorňující porovnání bakteriálního zastoupení ve fekálních vzorcích B, C, D inkubované s přidavkem MYR a bez přidavku MYR v McD. pufru a BHI médiu v průběhu tří dnů.



Legenda ke sloupcovým grafům ze str. 115.

	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Bacteroidaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Prevotellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Negativicutes;D_3_Selenomonadales;D_4_Veillonellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriaceae
	Unassigned;_ ;_ ;_
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Rikenellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Christensenellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Tannerellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Bifidobacteriales;D_4_Bifidobacteriaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Betaproteobacteriales;D_4_Burkholi
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Streptococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Enterobacteriales;D_4_Enterobacter
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Barnesiellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Deltaproteobacteria;D_3_Desulfovibrionales;D_4_Desulfovibrion
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptostreptococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiales vadinBB60 group
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Negativicutes;D_3_Selenomonadales;D_4_Acidaminococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Eggerthellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured bacterium
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Marinifilaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Verrucomicrobia;D_2_Verrucomicrobiae;D_3_Verrucomicrobiales;D_4_Akkermansiac
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_uncultured
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Clostridiaceae 1
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XIII
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Izimaplasmatales;D_4_uncultured organism
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Bacilli;D_3_Lactobacillales;D_4_Lactobacillaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Synergistetes;D_2_Synergistia;D_3_Synergistales;D_4_Synergistaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Micrococcales;D_4_Micrococcaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Family XI
	D_0_Bacteria;D_1_Epsilonbacteraeota;D_2_Campylobacteria;D_3_Campylobacteriales;D_4_Campylobac
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Flavobacteriales;D_4_Flavobacteriaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_gut metagenome
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Muribaculaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Actinobacteria;D_3_Actinomycetales;D_4_Actinomycetaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptococcaceae
	D_0_Archaea;D_1_Euryarchaeota;D_2_Methanobacteria;D_3_Methanobacteriales;D_4_Methanobacteria
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Atopobiaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes;D_2_Mollicutes;D_3_Mollicutes RF39;D_4_uncultured rumen bacterium
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria;D_2_Coriobacteriia;D_3_Coriobacteriales;D_4_Coriobacteriales Incert
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Defluviitaleaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Pasteurellales;D_4_Pasteurellaceae
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_DTU014;D_4_uncultured bacterium
	D_0_Bacteria;D_1_Lentisphaerae;D_2_Lentisphaeria;D_3_Victivallales;D_4_Victivallaceae

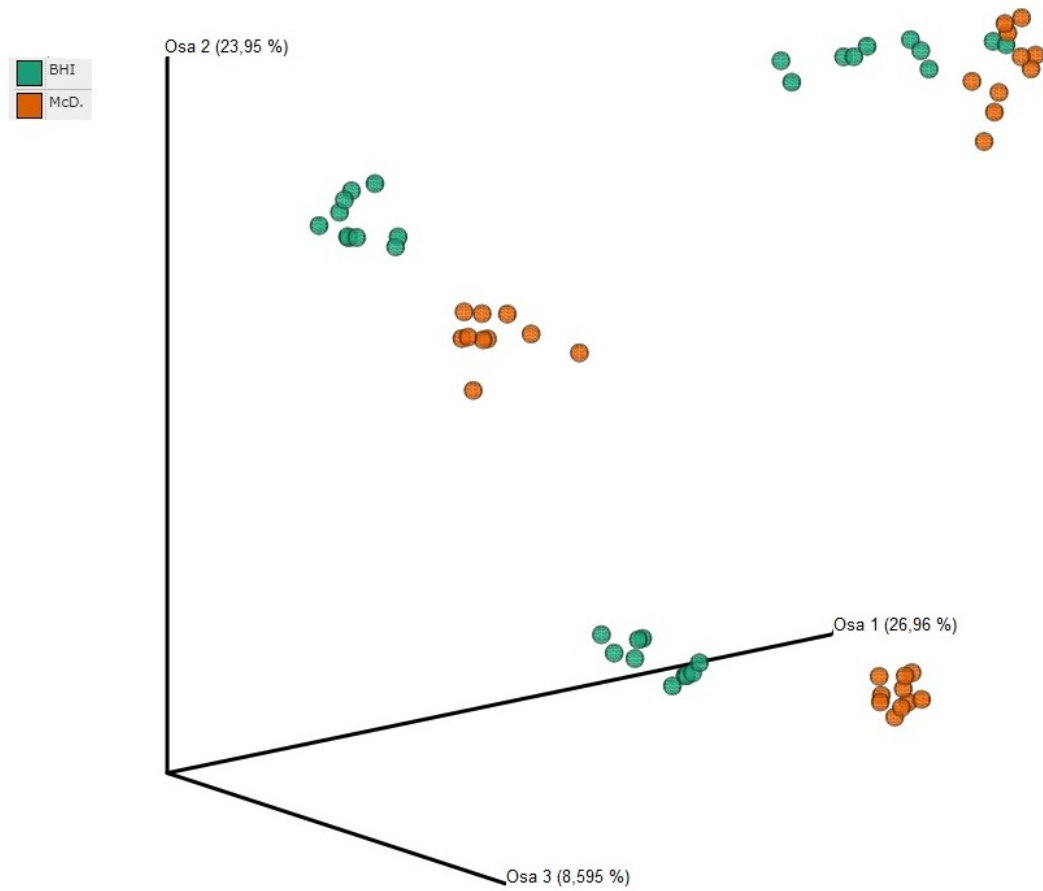
Příloha 5: Tabulka procentuálního zastoupení nejvýznamnějších bakteriálních druhů ve fekálních vzorcích B, C, D

Vzorek	Čas inkubace [h]	Médium	<i>Lachnospiraceae</i> [%]		<i>Ruminococcaceae</i> [%]		<i>Bacteroidaceae</i> [%]		<i>Prevotellaceae</i> [%]	
Přídavek			MYR	NK	MYR	NK	MYR	NK	MYR	NK
B	0	McD.	15,84	16,49	19,74	23,54	15,94	12,36	11,06	10,41
	3		13,56	16,05	18,44	18,44	16,49	14,43	13,23	9,11
	6		11,61	11,82	21,37	22,78	15,18	13,12	10,41	8,68
	24		13,45	13,23	21,04	21,26	12,58	13,02	7,81	5,86
	72		12,15	12,69	21,91	17,79	12,47	13,56	3,15	2,71
	0	BHI	25,7	22,23	26,57	30,26	3,15	3,47	22,02	22,23
	3		28,74	28,52	25,49	24,95	6,83	6,4	13,99	19,2
	6		28,63	31,67	19,74	20,17	7,81	6,18	14,53	20,28
	24		33,3	30,37	16,49	17,25	10,52	10,52	10,85	13,67
	72		36,77	37,74	17,14	19,85	9,33	8,35	1,3	2,49
C	0	McD	26,36	25,38	21,48	20,72	19,41	21,58	0,98	0,98
	3		23,75	25,38	19,85	17,35	22,78	21,58	0,65	0,87
	6		24,51	24,73	19,2	20,73	21,69	22,78	0,98	0,33
	24		27,01	26,46	20,28	18	20,17	23,43	0,76	0,33
	72		20,25	27,66	25,24	17,9	20,39	22,23	14,15	0,11

Vzorek	Čas inkubace [h]	Médium	<i>Lachnospiraceae</i> [%]		<i>Ruminococcaceae</i> [%]		<i>Bacteroidaceae</i> [%]		<i>Prevotellaceae</i> [%]	
Přídavek			MYR	NK	MYR	NK	MYR	NK	MYR	NK
C	0	BHI	34,71	32,43	16,59	17,46	23,75	22,23	0,98	2,71
	3		27,66	25,81	16,49	16,59	31,02	33,08	2,28	0,98
	6		32,54	30,48	15,29	18,66	27,87	28,63	0,76	1,19
	24		35,68	34,27	19,85	21,37	20,82	23,54	0,11	0,33
	72		28,74	30,69	19,74	21,04	26,36	23,32	0	0
D	0	McD.	19,31	25,61	28,96	31,93	17,03	25,79	12,69	17,89
	3		21,04	20,61	29,72	30,69	12,26	8,89	11,61	12,36
	6		21,15	21,58	31,24	29,07	13,23	17,25	9,22	8,68
	24		24,84	24,62	32,97	31,34	15,29	13,67	1,3	2,93
	72		22,23	20,5	34,71	29,07	13,67	19,74	0	0,11
	0	BHI	23,64	26,68	32,86	28,63	16,05	11,93	7,38	10,74
	3		36,98	36,66	23,97	23,75	10,2	7,7	11,06	13,77
	6		36,88	39,59	24,08	15,62	9,65	9	9,54	13,34
	24		34,71	33,08	26,03	22,78	8,35	9,22	1,08	4,77
	72		33,51	34,82	26,03	22,99	9,54	9,44	0	0

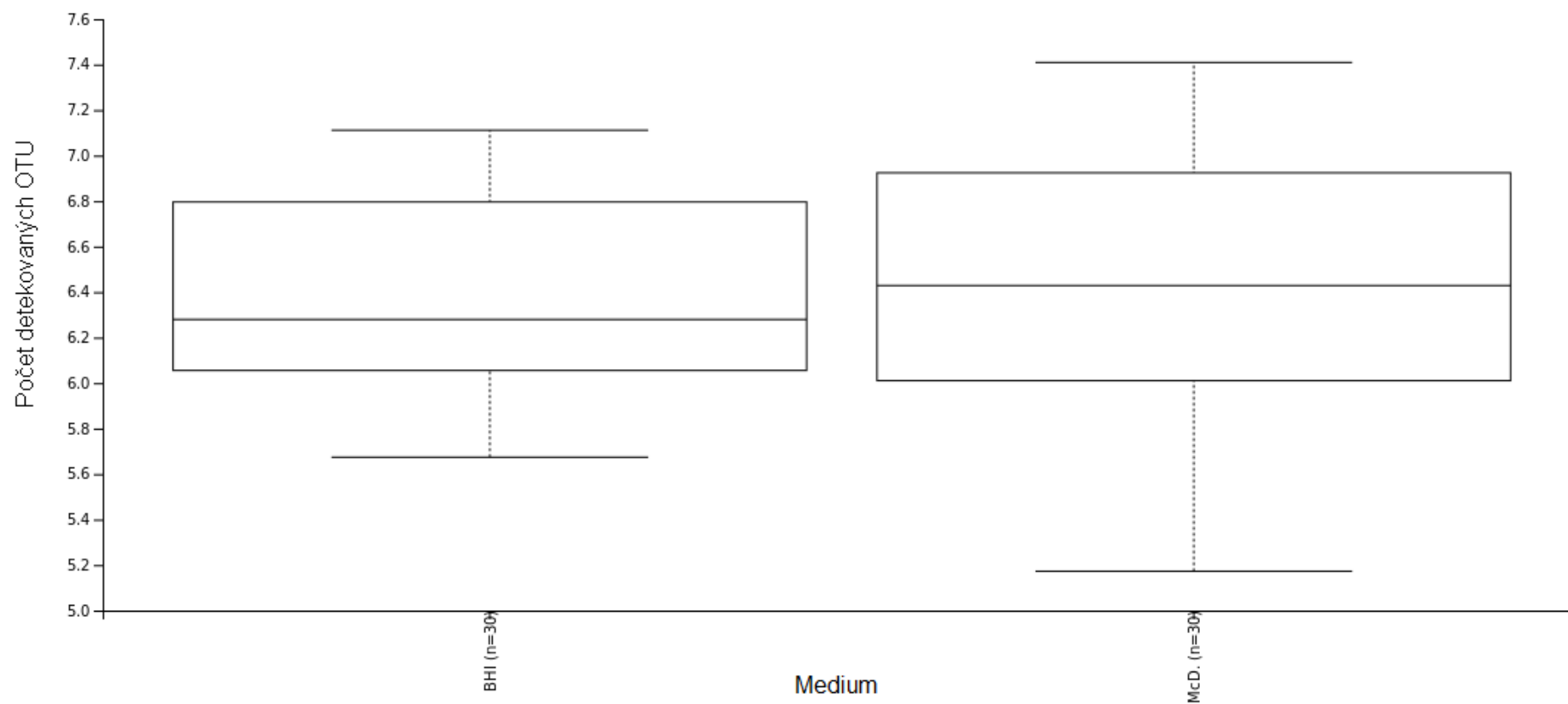
Příloha 6: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: médium

Diagram PCoA analýzy pro porovnání shlukování analyzovaných vzorků podle kritéria: použité médium (McD. pufr a BHI médium).



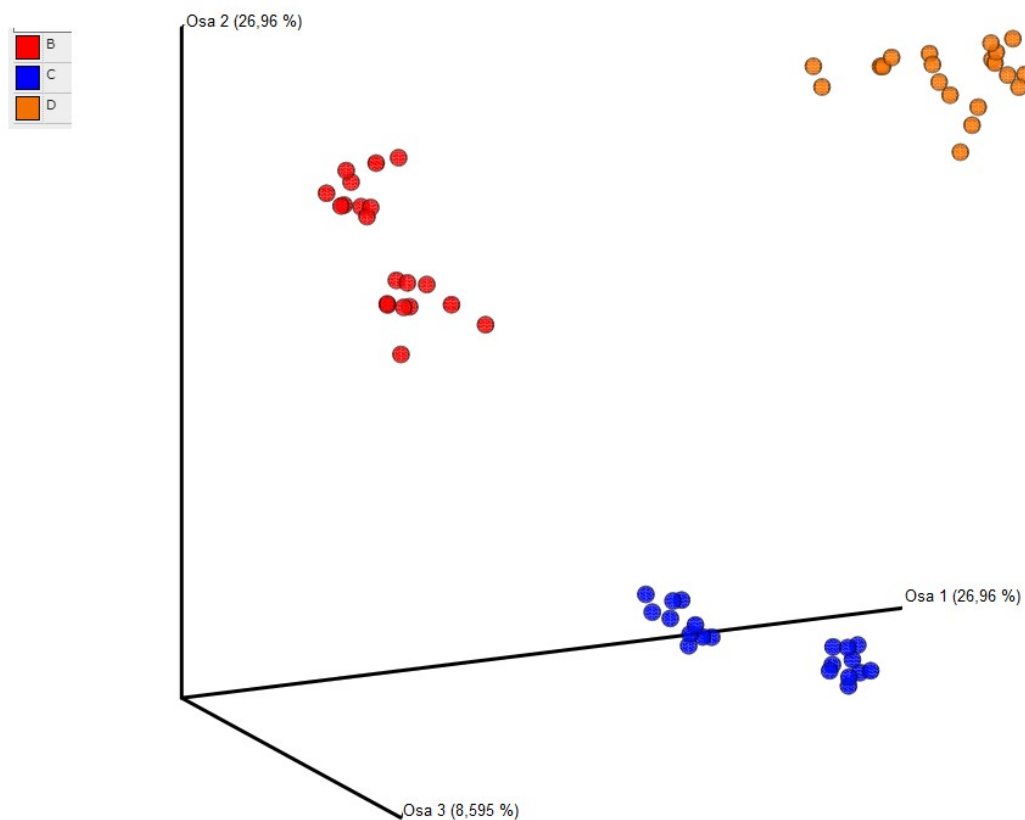
Příloha 7: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: médium

Graf porovnávající bakteriální rozmanitost v analyzovaných vzorcích podle kritéria: médium (McD, pufr a BHI médium). Bakteriální rozmanitost ve vzorcích je počítána pomocí OUT



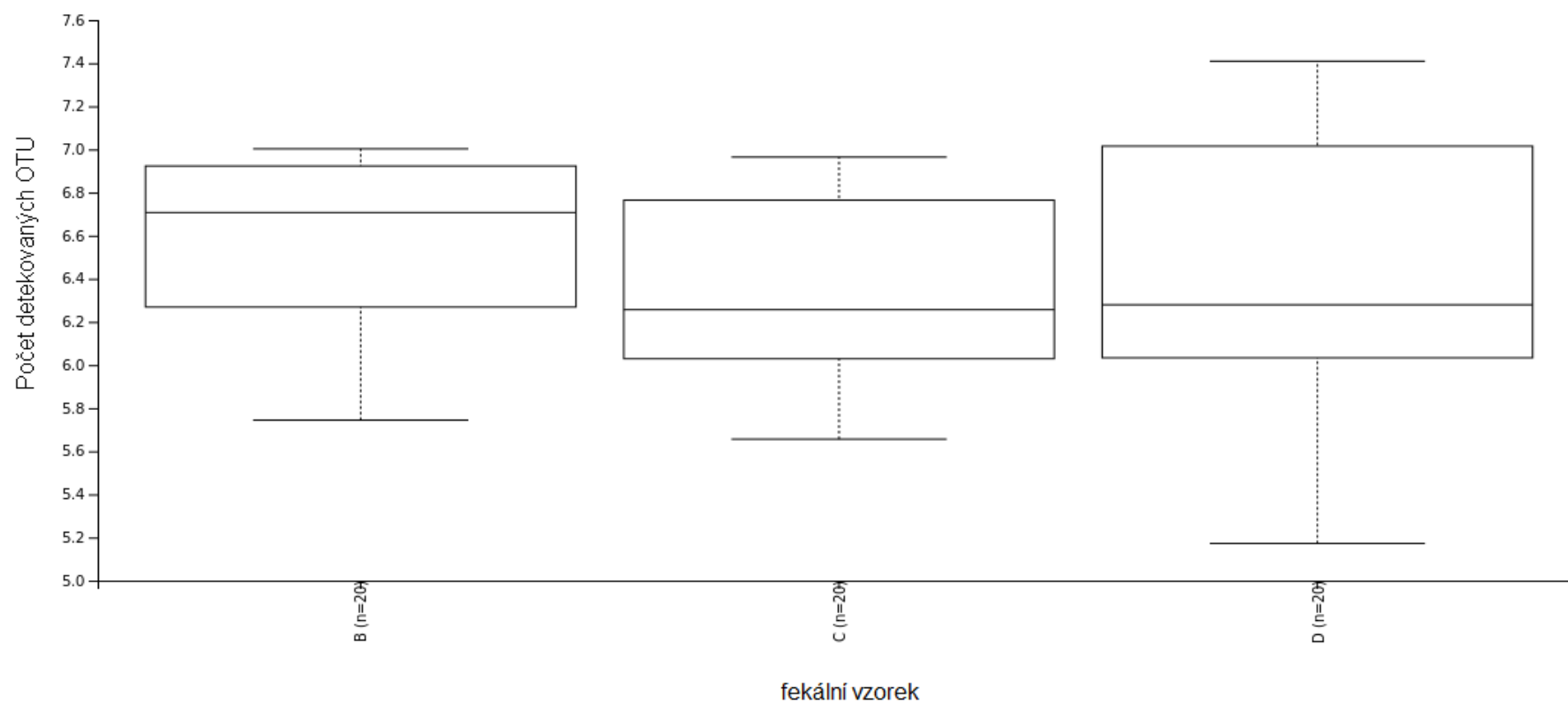
Příloha 8: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: fekální vzorek

Diagram PCoA analýzy pro porovnání shlukování analyzovaných vzorků podle kritéria: fekální vzorek B, C, D.



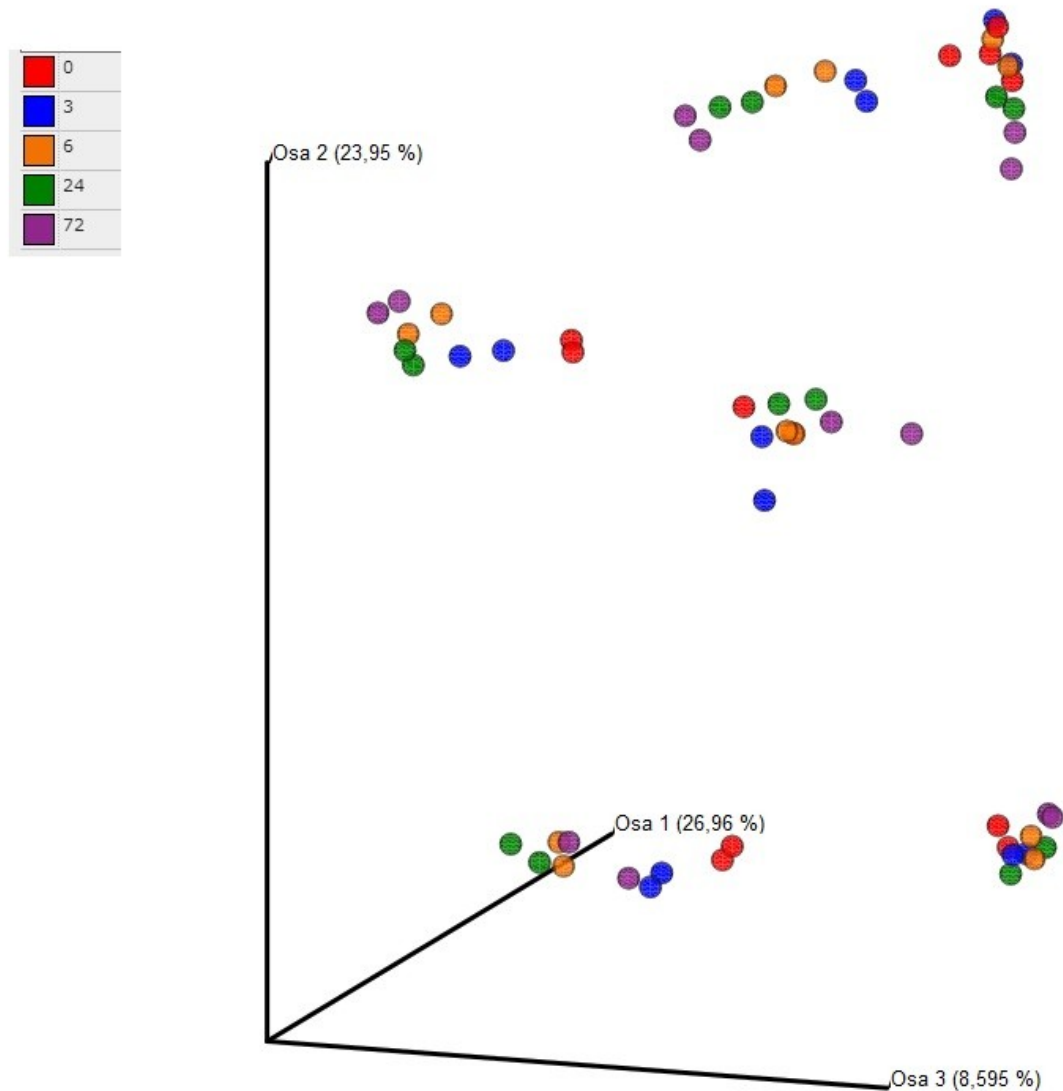
Příloha 9: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: fekální vzorek

Graf porovnávající bakteriální rozmanitost v analyzovaných vzorcích podle kritéria: fekální vzorek (B, C, D). Bakteriální rozmanitost ve vzorcích je počítána pomocí OTU.



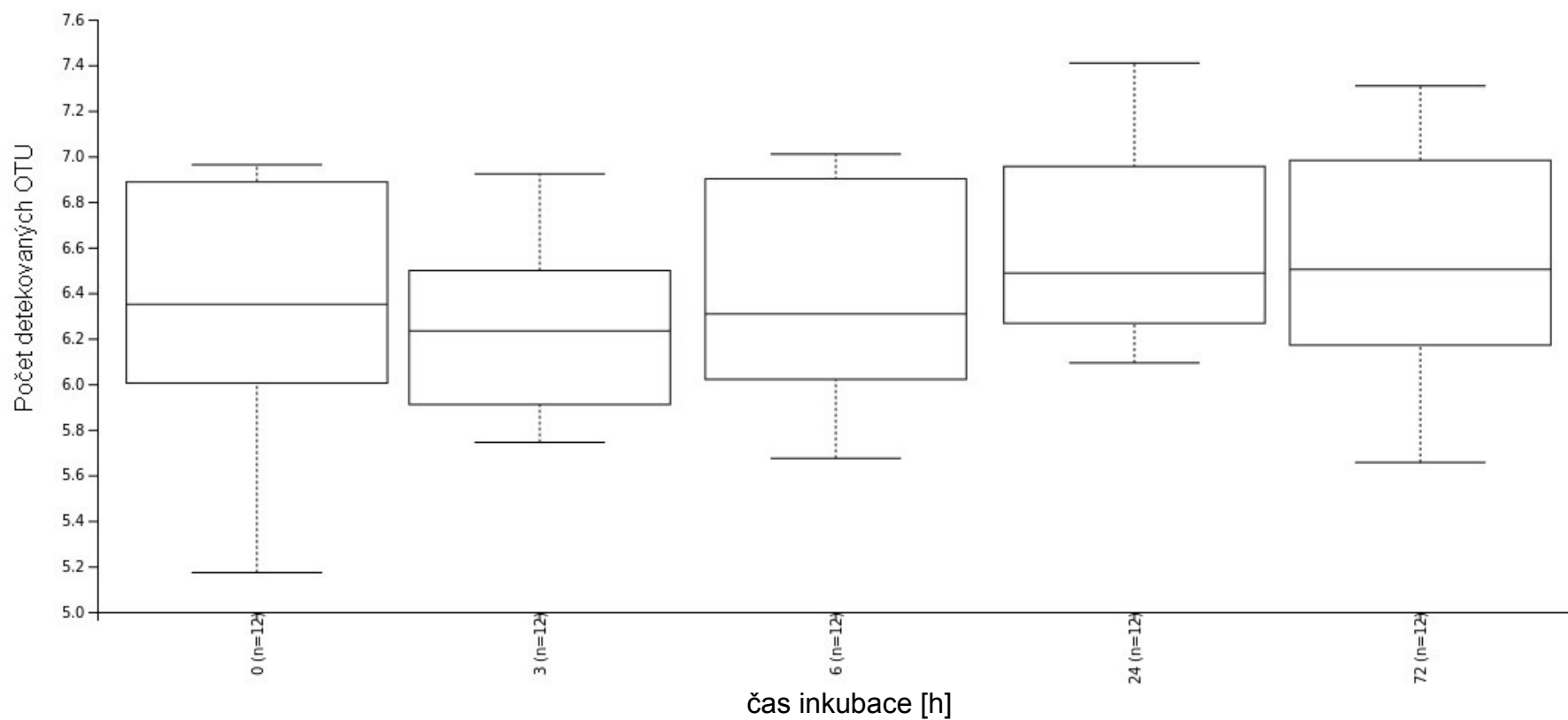
Příloha 10: Diagram PCoA analýzy podle kritéria: čas inkubace

Diagram PCoA analýzy pro porovnání shlukování analyzovaných vzorků podle kritéria: inkubační čas (0, 3, 6, 24 a 72 hodin)



Příloha 11: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: čas inkubace

Graf porovnávající bakteriální rozmanitost v analyzovaných vzorcích podle kritéria: čas inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin). Bakteriální rozmanitost ve vzorcích je počítána pomocí OUT.



Příloha 12: Graf bakteriální rozmanitosti podle kritéria: přídavek

Graf porovnávající bakteriální rozmanitost v analyzovaných vzorcích podle kritéria: přídavek. Bakteriální rozmanitost ve vzorcích je počítána pomocí OUT. Porovnáva rozmanitost ve fekálních vzorcích s přídavkem MYR a bez přídavku MYR.

