

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Anastasiia Nazmutdinova

Metabolomika při studiu mikrobiomu
Metabolomics in the study of microbiome

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Marek Kuzma, Ph.D.

Praha, 2021

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 2021

.....
Bc. Anastasiia Nazmutdinova

Poděkování

Chtěla bych především velice poděkovat za trpělivost všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. Děkuji svému školiteli Ing. Marku Kuzmovi, Ph.D. za důvěru, cenné rady, ochotu sdílet nové informace a věnovaný mně čas. Dále bych poděkovala RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D., a to nejenom za zkušenosti a odborný dohled nad kvalitou práce, ale také za její vstřícnost a neocenitelnou morální podporu.

Děkuji za pomoc se statistickou analýzou a vysvětlení jejích principů RNDr. Blance Šedivé, Ph.D. Ráda bych také poděkovala doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za víru v moje schopnosti a podporu během studia.

Děkuji Ing. Tomáši Hudcovicovi, CSc. a pracovníkům Gnotobiologické laboratoře MBÚ AV ČR za provedení experimentu se zvířaty a zajímavou spolupráci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem kolegům z Laboratoře charakterizace molekulární struktury, a hlavně Jakubu Zápalovi za pomoc v napravování chyb a Mgr. Petře Tomášové a Ing. Thi Tra My Nguyenové za jejich rady.

Zvláště bych poděkovala své rodině a kamarádům za nepřetržitou podporu a pomoc po celou dobu studia.

Abstrakt

Zánětlivé onemocnění střev představuje velmi závažné onemocnění s ne zcela objasněnou etiologií a patogenezí. V této práci bylo na modelu myši se zánětem střev vyvolaným dextransulfátem sodným zkoumáno, nakolik se liší změna metabolismu způsobená rozvojem zánětlivého procesu u bezmikrobních a konvenčně kolonizovaných myši. Pro charakterizaci změn byla využita NMR metabolomika vzorků stolice, moči a séra, kombinovaná s jedno- a vícerozměrnou statistickou analýzou. Bylo prokázáno, že metabolická signatura změn u obou typů myši není stejná. U bezmikrobních myši bylo ve stolici nalezeno významné množství sacharidů, jejichž hladina se snížila v průběhu zánětu, protože docházelo k jejich vylučování močí. Bezmikrobní myši na rozdíl od konvenčních také v průběhu zánětu vylučovaly stolicí velké množství aminokyselin.

Nalezené poruchy metabolismu cukrů a proteinů u bezmikrobních zvířat ukazují na závažnou malnutrici vyvolanou zánětem, přičemž výsledky prokazují, že přítomnost mikrobiomu představuje ochranný mechanismus před zásadním rozvratem v organismu.

Studie stability fekálních extraktů zdravých konvenčně kolonizovaných myši potvrdila, že žádný z identifikovaných a kvantifikovaných metabolitů nevykazoval systematické signifikantní změny ani v průběhu několika po sobě jdoucích odběrů v jednom týdnu, ani v rámci několika vzorků odebraných téže myši v jednom dni. Fekální metabolom kontrolní skupiny tedy lze považovat za dostatečně stabilní a rozdíly detekované v této práci lze přičíst vlivu zánětu a/nebo nepřítomnosti mikrobiomu.

Klíčová slova: DSS indukovaný zánět, metabolomika, mikrobiom, spektroskopie nukleární magnetická rezonance, zánětlivé onemocnění střev

Abstract

Inflammatory bowel disease is a serious condition with an incomplete etiology and pathogenesis. In this thesis, a mouse model of sodium dextran sulfate-induced inflammation was used to study different changes in the metabolism of germ-free and conventionally raised mice due to the development of the inflammatory process. NMR metabolomics of fecal, urine and serum samples, combined with uni- and multivariate statistical analysis, were used to characterize the changes. It was shown that the metabolic signature differs between germ-free and conventional mice. In germ-free mice, significant amounts of carbohydrates were found in feces. Their levels decreased during inflammation as they were excreted in urine. In contrast to conventional mice, germ-free mice also excreted large amounts of amino acids in feces during the developing inflammation.

Disorders of sugar and protein metabolism found in germ-free mice indicate severe malnutrition caused by inflammation. The results show that the presence of a microbiome represents a protective mechanism against significant disruption in the body.

A stability study of fecal extracts of healthy conventionally colonized mice confirmed that none of the identified and quantified metabolites showed significant systemic changes in several consecutively collected samples in one week or several samples collected from the same mouse in one day. Thus, the fecal metabolome of the control group can be considered sufficiently stable and the differences detected in the thesis can be attributed to the influence of inflammation and / or the absence of the microbiome.

Keywords: DSS-induced inflammation, metabolomics, microbiome, nuclear magnetic resonance spectroscopy, inflammatory bowel disease

OBSAH

| | | |
|---------|---|--------|
| 1 | ÚVOD..... | - 8 - |
| 2 | CÍLE PRÁCE | - 9 - |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | - 10 - |
| 3.1 | Mikrobiom..... | - 10 - |
| 3.1.1 | Střevní mikrobiom..... | - 10 - |
| 3.1.2 | Zánětlivé onemocnění střev..... | - 11 - |
| 3.1.3 | Experimentální modely IBD..... | - 13 - |
| 3.2 | Metabolomika – teoretický úvod..... | - 13 - |
| 3.2.1 | Definice a využití metabolomiky | - 14 - |
| 3.2.2 | Základní strategie metabolomiky..... | - 14 - |
| 3.2.3 | Analytické techniky v metabolomice | - 14 - |
| 3.3 | Průběh metabolomické analýzy..... | - 15 - |
| 3.3.1 | Příprava vzorků | - 15 - |
| 3.3.2 | NMR experimenty | - 17 - |
| 3.3.3 | Předúprava NMR dat..... | - 18 - |
| 3.3.4 | Metabolomický fingerprinting | - 19 - |
| 3.3.4.1 | Binování a škálování..... | - 19 - |
| 3.3.4.2 | Vícerozměrná statistická analýza | - 20 - |
| 3.3.5 | Metabolomické profilování..... | - 21 - |
| 3.3.5.1 | Identifikace a kvantifikace metabolitů..... | - 21 - |
| 3.3.5.2 | Jednorozměrná statistická analýza | - 22 - |
| 3.3.6 | Interpretace dat | - 22 - |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | - 23 - |
| 4.1 | Chemikálie..... | - 23 - |
| 4.2 | Přístroje..... | - 23 - |
| 4.3 | Software | - 23 - |
| 4.4 | <i>In vivo</i> experimenty..... | - 24 - |
| 4.4.1 | Stabilita fekálních vzorků | - 24 - |
| 4.4.1.1 | Experimentální zvířata | - 24 - |
| 4.4.1.2 | Odběr a příprava fekálních vzorků | - 24 - |
| 4.4.1.3 | NMR experimenty | - 25 - |
| 4.4.1.4 | Analýza NMR dat..... | - 25 - |
| 4.4.2 | Vliv mikrobioty na průběh akutního zánětu | - 26 - |
| 4.4.2.1 | Experimentální zvířata | - 26 - |
| 4.4.2.2 | Příprava vzorků před NMR analýzou..... | - 27 - |

| | | |
|---------|---|--------|
| 4.4.2.3 | NMR experimenty..... | - 27 - |
| 4.4.2.4 | Analýza NMR dat | - 28 - |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | - 29 - |
| 5.1 | Proměnlivost složení fekálního metabolomu | - 29 - |
| 5.2 | Vliv mikrobiomu na průběh zánětu | - 32 - |
| 5.2.1 | Fekální extrakty..... | - 32 - |
| 5.2.2 | Moč..... | - 39 - |
| 5.2.3 | Sérum..... | - 45 - |
| 6 | ZÁVĚR..... | - 52 - |
| | ZKRATKY..... | - 53 - |
| | REFERENCE | - 55 - |
| | INTERNETOVÉ ZDROJE..... | - 58 - |
| | SEZNAM TABULEK..... | - 59 - |

1 ÚVOD

Symbióza živočichů a mikroorganismů je vzájemně prospěšný vztah, který se vyvinul v průběhu mnoha let evoluce. Rozmanité druhy bakterií, tvořící větší část mikrobioty, produkují prostřednictvím různých metabolických procesů velké množství chemických sloučenin, které ovlivňují organismus hostitele a působí tak i na jeho zdraví.

Zánětlivé onemocnění střev (IBD) je stav charakterizovaný chronickým zánětlivým procesem v gastrointestinálním traktu. Přesná etiologie IBD stále není zcela objasněna, což komplikuje jeho prevenci i léčbu. Současná studia ovšem předpokládají, že centrální roli v rozvoji tohoto onemocnění hrají patologické změny ve složení střevního mikrobiomu neboli „dysbióza“. Pochopení mechanismu působení bakteriálních metabolitů na organismus hostitele by mohlo významně pomoci při odhalení patofyziologie vývoje IBD a v důsledku tak zlepšit kvalitu života pacientů.

Metabolomika je relativně mladý vědní obor, zabývající se komplexním studiem metabolomu, tj. všech metabolitů přítomných v daný okamžik ve studovaném organismu. Metabolom je dynamicky se měnící systém, který je ovlivňován mnoha faktory, jako např. okolní prostředí, výživa nebo aktuálně probíhající vnitřní procesy. V biomedicínské oblasti tak metabolomika umožňuje sledovat nejen vývoj onemocnění, ale i účinnost jejich terapie. Výzkum metabolických procesů na molekulární úrovni se také zaměřuje na identifikaci charakteristických biomarkerů studovaného stavu a tím na jeho účinnou diagnostiku.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jednou ze základních analytických metod používaných v metabolomice. Její kvantitativnost, robustnost a vysoká reprodukovatelnost se výborně uplatní při analýze komplexních biologických matic. Získaná spektrální data, vyhodnocená vhodnými statistickými metodami, poskytují informace o signifikantně změněných metabolitech, které charakterizují studovaný proces.

Předložená diplomová práce se zabývá studiem vlivu mikrobiomu na průběh zánětlivého procesu v gastrointestinálním traktu u experimentálního modelu, využívajícího bezmikrobní myši. Součástí práce je také vyhodnocení některých faktorů při odběru a zpracování fekálních vzorků, které by mohly ovlivnit kvalitu jejich NMR metabolomické analýzy.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je použití NMR metabolomiky pro studium metabolických změn u bezmikrobních a konvenčních myší se zánětem střev, vyvolaným podáním dextransulfátu sodného. Data, získaná NMR analýzou vzorků stolice, séra a moči, budou zpracována jednorozměrnými i vícerozměrnými metodami statistické analýzy. Na základě těchto výsledků budou vyhodnoceny odlišnosti v metabolismu bezmikrobních a konvenčních myší se zánětem střev, a tak získány informace o efektu přítomnosti mikrobiomu na průběh onemocnění.

Součástí práce bude i krátká studie stability metabolického složení fekálních vzorků zdravých konvenčních myší.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Mikrobiom

3.1.1 Střevní mikrobiom

Mikrobiota je komunita mikroorganismů osídlujících organismus hostitele. Tuto komunitu, která kromě bakterií (nejpočetnější skupina) zahrnuje i houby, prvoky a viry, lze detekovat v ústní dutině, na kůži, v dýchacích cestách, urogenitálním a trávicím traktu.

Koncentrace bakteriální biomasy v gastrointestinálním traktu (GIT) klesá od 10^{8-9} buněk/ml efluentu z ústní dutiny až po 10^{2-3} buněk/ml žaludeční šťávy, což se vysvětluje extrémně kyselým prostředím žaludku. V tlustém střevě, díky jeho neutrálnímu či slabě zásaditému pH, většímu objemu a dlouhé retenci potravin, dosahuje mikrobiota koncentrace až 10^{11} buněk/ml střevního obsahu ¹.

Mikrobiom, neboli společný genom mikrobioty, obsahuje stokrát více genů než genom hostitelského lidského organismu ². Není divu, že tak velký počet různorodých mikroorganismů má nesmírně významný vliv na fungování celého hostitelského organismu, včetně trávení, imunity a individuálního vývoje. Díky této symbióze získávají savci schopnost štěpit některé složky potravy (hlavně komplexní rostlinné polysacharidy), které jinak rozkládat neumí, a získávat z nich potřebné látky a energii. Bakterie dále přispívají k hostitelské biotransformaci substrátů detoxifikací dusíkatých sloučenin, a to jejich přeměnou na amoniak a mikrobiální proteiny. Důležitou roli hrají v syntéze vitaminů skupiny B a K či při absorpci vody a sodíku ³.

Symbióza člověka a mikroorganismů je rovnováhou, která předpokládá přítomnost určitých druhů bakterií ve vhodném zastoupení. Na druhé straně dysbióza je všeobecně definovaná jako kompoziční a funkční změna v mikrobioty, způsobená souborem faktorů souvisejících s prostředím a hostitelem. Dysbióza má obvykle jednu nebo více z následujících charakteristik: převaha patobiontů, deficit komensálních bakterií a ztráta rozmanitosti bakteriálních druhů ⁴. Narušení rovnováhy mezi hostitelem a jeho mikrobiomem vede k poruše homeostázy v organismu a vývoji celé řady onemocnění, jako je chronický zánět zažívacího traktu, obezita a diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, nádory zažívacího traktu, atd.

Mechanismus komunikace mezi mikrobiomem a hostitelem není doposud přesně znám. Existuje však celá řada důkazů, že je zprostředkován mikrobiálními metabolity, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids, SCFA), deriváty indolu, fenoly a podobně.

Nejvíce prozkoumanou skupinou mikrobiálních metabolitů jsou SCFA, zahrnující acetát,

propionát a butyrát. Hlavní cestou jejich syntézy je bakteriální fermentace složitých polysacharidů a některých proteinů. SCFA mají důležitou úlohu v mnoha fyziologických procesech a podle různých studií má jejich produkce pozitivní vliv na lidské zdraví^{5,6}. SCFA, zejména butyrát, zajišťují většinu energetické potřeby kolonocytů⁷.

Díky své schopnosti aktivovat intestinální glukoneogenezi butyrát má příznivé účinky na glukózovou a energetickou homeostázu. Studie také uvádí, že butyrát podporuje β -oxidaci mastných kyselin v střevních epitelálních buňkách, což pomáhá udržovat kyslíkovou rovnováhu ve střevě a zabraňuje dysbióze střevní mikrobioty⁸. Propionát má vliv na regulaci glukoneogeneze v játrech a na regulaci pocitu sytosti. Bylo prokázáno, že kyselina propionová má antilipogenní a cholesterol-snižující účinky. Existují důkazy, že propionát má stejně jako butyrát antiproliferativní účinek na nádorové buňky tlustého střeva⁹. Acetát – nejvíce produkovaná SCFA a základní metabolit pro růst dalších bakterií - se dostává do periferních tkání, kde se účastní metabolismu cholesterolu, a může hrát roli v centrální regulaci chuti k jídlu. Randomizované kontrolované studie ukázaly, že vyšší produkce SCFA koreluje s nižší obezitou a se sníženou inzulínovou rezistencí⁸.

Vliv na zdraví byl studován i u dalších metabolitů, hojně produkovaných bakteriami, jako je např. trimethylamin a indoxylsulfát. Studie prokázaly významné rozdíly mezi koncentracemi bakteriálních metabolitů tryptofanu a indolu v séru normálních a bezmikrobních myší. Mezi další specifické produkty střevní mikrobioty, které se přímo podílejí na stavu lidského zdraví, patří trimethylamin a kyselina 3-indolpropionová. Produkce trimethylaminu z potravinového fosfatidylcholinu a karnitinu (z masa a mléčných výrobků) závisí na střevní mikrobiotě, a proto se jeho množství v krvi u různých lidí liší. Trimethylamin je oxidován v játrech na trimethylamin N-oxid, který je spojen se zvýšeným rizikem aterosklerózy a dalších nežádoucích kardiovaskulárních poruch. Kyselina 3-indolpropionová, jejíž koncentrace přímo koreluje s příjmem vlákniny, prokazuje *in vitro* aktivitu v odstraňování volných radikálů, což snižuje riziko výskytu diabetu mellitu 2. typu⁸.

3.1.2 Zánětlivé onemocnění střev

Významnou skupinou chorob spojených s dysbiózou je zánětlivé onemocnění střev (Inflammatory Bowel Disease – IBD), které zahrnuje Crohnovu nemoc a ulcerózní kolitidu.

Zánětlivé onemocnění střev (IBD) je chronickým stavem, charakterizovaným zánětlivými procesy v různých částech gastrointestinálního traktu¹⁰. Podle dat z roku 2017 trpí IBD přes 6,8 milionů lidí¹¹, přičemž nejvíce jsou postiženi obyvatelé nejrozvinutějších zemí Evropy a

Severní Ameriky.

IBD má komplexní etiologii, zahrnující interakci genetické predispozice, mikrobiomu a environmentálních faktorů. Genetické a environmentální vlivy byly mnohokrát popsány v literatuře^{12,13}. V případě vlivu mikrobioty existuje řada hypotéz, které se zatím nepodařilo propojit. Bylo prokázáno, že dysbióza je jedním z nejčastějších symptomů IBD, ovšem dosud není zjištěno, zda je příčinou nebo až důsledkem nemoci¹⁴.

Podle lokalizace zánětu se IBD dělí na dva hlavní druhy: Crohnovu chorobu (Crohn's disease, CD) a ulcerózní kolitidu (ulcerative colitis, UC). K symptomům těchto nemocí patří trvalé průjmy, abdominální bolesti, krvácení z rektu, pokles váhy a chuti k jídlu a únava. Případné komplikace IBD jsou poměrně závažné [online¹]. Projevy onemocnění, jeho dlouhodobá terapie a případné operace významně komplikují sociální a ekonomické fungování pacientů a mají velký dopad na celkovou kvalitu jejich života.

Crohnova choroba může zasáhnout jakoukoli část GIT, od ústní dutiny až po konečník, nejčastěji ovšem postihuje konec tenkého střeva (ileum)¹⁵. CD se může projevit pouze v některých oblastech GIT, zatímco ostatní části zůstávají zcela nedotčenými, přičemž zánět prochází celou tloušťkou střevní stěny [online¹¹].

Na rozdíl od Crohnovy choroby je ulcerózní kolitida omezena pouze na tlusté střevo a konečník, přičemž zánět se vyskytuje pouze ve vnitřní vrstvě střeva¹⁶. U některých jedinců je obtížné určit, zda mají Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu; v těchto vzácných případech je potom diagnostikována nedeterminovaná kolitida (indeterminate colitis, IC)¹⁷.

Joossens et al.¹⁸ uvádí, že disproporce některých druhů bakterií může být příčinou nedostatku butyrátu a degradace střevního hlenu u pacientů s IBD. Zheng & Wen ve své studii uvádí, že *Bacteroides* mohou metabolizovat tryptofan na serotonin, který vazbou na různé serotoninové receptory může kromě jiného i regulovat střevní zánět. Metabolismus tryptofanu střevními bakteriemi však u pacientů s IBD klesá, což vede k narušení střevního mikroprostředí a rozvoji enteritidy¹⁹.

Metabolomika je jedním z významných nástrojů v hledání molekulárních základů IBD, a také postupů pro její diferenciální diagnostiku. Byla publikována celá řada metabolomických studií využívajících hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance, jejichž výsledky jsou přehledně zpracovány v práci autorů Bauset et al.²⁰.

3.1.3 Experimentální modely IBD

Ačkoliv neexistuje zvířecí model, který by lidské IBD dokázal plně napodobit, pro účely studia této nemoci se často používají myšičí modely, které IBD napodobují alespoň v určitých rysech. Vzhledem k multifaktorovosti etiologie IBD existuje několik způsobů vyvolání zánětlivé reakce u myší. Různé zdroje uvádí genetické modifikace pomocí inserce/delece příslušných genů, přenos T-buněk asociovaných s IBD a další metody spontánního vývoje, které jsou přehledně popsány v publikaci Cominelli et al. ²¹, přičemž každá z nich má svoje výhody i nevýhody. Nejčastěji používanými experimentální modely IBD jsou modely chemicky indukované. Jsou to metody relativně levné a jednoduché v provedení i kontrole, ovšem uvádí se, že jejich hlavním minusem je poměrně nízká reprodukovatelnost výsledků. V práci Wirtz et al. jsou porovnány některé z chemických myšičích modelů vyvolání střevního zánětu podobného kolitidě ²². Mezi používané chemické látky tak např. patří oxazolón a kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová (TNBS).

Dextranulfát sodný (DSS) je další z látek často používaných pro indukci střevního zánětu. Dle doby trvání experimentu a koncentrace DSS je možno tuto metodu optimalizovat pro vyvolání akutní, recidivující i chronické formy nemoci. DSS se podává perorálně rozpuštěním v pitné vodě v koncentracích 3-10 %. Vyvolává průjem, krvácení do stolice, pokles váhy, zkrácení tlustého střeva, ulcerace střevní sliznice a infiltrace neutrofilů ²³, což odpovídá projevům UC. Dle závažnosti symptomů se posuzuje celková závažnost navozeného zánětu. Tento model se často používá pro sledování vlivu střevního mikrobiomu, dietárních faktorů a také pro monitoring terapií IBD ²².

Do současné doby bylo publikováno několik prací, které aplikovaly metabolomiku pro sledování metabolických změn na myšičích modelech s DSS indukovaným zánětem u konvenčních myší ²⁴⁻²⁶, ale prozatím nebyl popsán tento vliv u bezmikrobních myší.

3.2 Metabolomika – teoretický úvod

Při zkoumání role mikrobiomu ve fyziologii organismů a patofyziologii rozvoje nemocí se významně uplatňuje metabolomika, neboť dovoluje sledovat produkci mikrobiálních metabolitů, jejich přestup do organismu a následně identifikovat změny, které způsobují v metabolismu hostitele.

3.2.1 Definice a využití metabolomiky

Metabolomika je relativně mladý obor systémové biologie, který v roce 2002 poprvé definoval Oliver Fiehn jako komplexní analýzu metabolomu, tj. veškerých metabolitů přítomných v určitém fyziologickém nebo vývojovém stadiu ve studovaném organismu (tkáni, buňce)²⁷. Na rozdíl od proteomu či genomu, které pracují s poměrně stálými systémy, je složení metabolomu velmi dynamické a odráží aktuální stav organismu včetně veškerých na něj působících externích vlivů. Toto může být s výhodou použito právě pro porozumění odpovědi organismu na vyvinutou patologii nebo provedený zákrok. Kromě biomedicíny^{28,29}, může být metabolomika využita např. v potravinářství³⁰, mikrobiologii³¹, botanice³² a farmaceutickém průmyslu³³.

3.2.2 Základní strategie metabolomiky

Metabolomika při studiu využívá dva základní přístupy: necílený (tzv. „metabolic fingerprinting“) a cílený (tzv. „metabolic profiling“).

Metabolický fingerprinting je založen na analýze kompletních spekter, aniž by v nich byly předem identifikovány či kvantifikovány jednotlivé metabolity. Na spektrum zkoumaného vzorku se nahlíží jako na otisk jasně definovaného stavu studované entity. Vyhodnocením spekter metodami vícerozměrné statistické analýzy lze zjistit, nakolik se od sebe liší skupiny zkoumané v rámci daného modelu, a stanovit, které oblasti spektra k těmto rozdílům nejvíce přispívají. Necíleným přístupem tedy lze zachytit i změny nepředpokládané a dosud neznámé. Výsledkem tohoto postupu je statistický model, který jednotlivé skupiny dostatečně charakterizuje, a u nových vzorků může předpovědět jejich příslušnost k dané skupině.

Cílená analýza se naopak zaměřuje na studium skupiny (či několika málo) předem vybraných metabolitů, které jsou nejprve identifikovány (většinou srovnání s databázemi) a poté kvantifikovány. Statistická signifikance rozdílů jejich koncentrací mezi jednotlivými skupinami je pak vyhodnocována vhodnými metodami jednorozměrné statistiky.

V řadě metabolomických studií jsou oba přístupy s výhodou kombinovány.

3.2.3 Analytické techniky v metabolomice

Metabolom zahrnuje stovky až tisíce různorodých sloučenin, které se výrazně liší jak fyzikálně-chemickými vlastnostmi, tak svým koncentračním zastoupením. Analýza takto komplexních směsí klade velké nároky na použité analytické platformy. V současnosti je

nejvíce využívanou metodou spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) a minoritně také infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanova spektrometrie.

MS se obvykle používá ve spojení se separací pomocí chromatografie, a to kapalinové chromatografie (vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC nebo ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie – UPLC) nebo plynové chromatografie (GC). Separační krok zmenšuje komplexitu vzorku, proto se MS metabolomika uplatňuje často při metabolomickém profilování. V porovnání s NMR má MS výrazně větší citlivost, ale pro kvantifikaci metabolitů vyžaduje složitější kalibraci s použitím standardů.

NMR je nedestruktivní technika s vysokou reprodukovatelností měření a poměrně nenáročnou přípravou vzorků, která nevyžaduje chemickou derivatizaci ani kalibraci pomocí řady standardů. Tyto výhody se uplatňují zejména při metabolomickém fingerprintingu, neboť NMR spektrum je schopno v jediném experimentu detekovat signály protonů všech látek ve vzorku obsažených. Důležitou předností NMR spektroskopie je její kvantitativnost, zatímco velkou nevýhodou je poměrně nízká citlivost. Pokroky v použití magnetů s vyšší intenzitou magnetického pole, zavedení kryosond a vylepšených pulzních sekvencí však nadále posouvají hranice kvantifikace metabolitů pod tradiční mikromolární koncentrace ³⁴.

3.3 Průběh metabolomické analýzy

NMR metabolomickou analýzu je možné rozdělit do několika kroků: odběr a příprava vzorků, měření NMR spekter a jejich zpracování, statistická analýza dat, identifikace metabolitů, a nakonec interpretace získaných výsledků. Protože výsledky metabolomických studií se zakládají na statistickém vyhodnocení velkého objemu dat, je velmi důležité v každém kroku analýzy co nejvíce snížit jejich variabilitu tak, aby se rozdíl mezi vzorky pokud možno zakládal pouze na studovaném jevu. Tento požadavek lze naplnit důsledným dodržováním předem domluveného experimentálního protokolu.

3.3.1 Příprava vzorků

Jako vzorky pro NMR metabolomiku slouží nejčastěji biologické tekutiny (především moč, sérum či plazma) a tkáňové nebo fekální extrakty. Již při plánování samotného biologického experimentu je třeba určit vhodné časové intervaly a způsob odběru vzorků, a to i s ohledem na následnou metabolomickou analýzu. Je třeba i volit vhodný okamžik a způsob odběru, tj. např.

odběr nalačno či po jídle, v případě moči pak např. akutní odběr nebo dlouhodobý sběr (12 nebo 24 hodin).

Okamžitě po odběru je nutné zajistit, aby nedocházelo k degradaci vzorků. Obvykle se tak děje jejich okamžitým zamražením a následným skladováním při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, která zaručuje u většiny metabolitů jejich jen minimální degradaci. Velkou výhodou vysoké reprodukovatelnosti NMR experimentů je fakt, že vzorky není nezbytně nutné analyzovat v jediné sérii měření (jako např. u MS), ale v případě potřeby lze postupovat i po menších skupinách.

Při vývoji metod pro metabolomickou analýzu se obvykle volí co nejjednodušší postupy, zaručující co největší reprodukovatelnost. Z hlediska metodického se výrazně liší vzorky kapalné a pevné.

Vzorky moči v experimentálních (myších či potkaních) modelech jsou odebírány buď jednorázově, nebo ideálně v metabolických klíčcích po dobu 12-24 hodin. Před vlastním měřením je vzorek odstředěn při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pro odstranění nerozpustných zbytků) a následně smíchan s pufrům, který obsahuje interní standard a deuterovanou vodu. Pufr se používá pro dosažení konstantního pH (obvykle 7.4) v celé sadě vzorků, což snižuje drobné odchylky chemických posunů signálů mezi vzorky. Úprava pH také zjednodušuje identifikaci metabolitů při porovnání jejich chemických posunů s databázemi.

Krevní sérum nebo plazma obsahují velké množství proteinů, které komplikují NMR analýzu. Tyto látky v NMR spektrech rezonují jako široké signály, zkreslují tvar základní linie spektra a překrývají signály některých metabolitů. Jejich vliv je možné eliminovat buď experimentálně použitím vhodné pulzní sekvence (Carr-Purcell-Meiboom-Gill – CPMG, viz pododíl 3.3.2), nebo je možné je vysrážet pomocí precipitačního činidla ³⁵, nejčastěji methanolu, a následně odstranit centrifugací. I když je potlačení proteinů pouhou CPMG sekvencí výhodné pro experimentální nenáročnost, v posledních letech je preferováno jejich odstranění ze vzorku. Důvodem je nescifická vazba mezi nízkomolekulárními metabolity a proteiny ³⁶, která snižuje frakci volných metabolitů, což může vést k jejich nepřesné kvantifikaci.

Pevné vzorky (stolice, tkáň apod.) vyžadují náročnější přípravu, neboť je třeba je extrahovat. Vzniklé extrakty se následně rekonstituují do vhodného pufru, případně rozpouštědla, které obsahuje interní standard. Nejčastěji používanou metodou v NMR studiích stolice je extrakce pomocí fosfátového pufru, který umožňuje extrahovat většinu metabolitů rozpustných ve vodě ³⁷. Vzhledem k vysoké těkavosti některých látek přítomných ve stolici

(např. SCFA) se doporučuje využívat extrakci do rozpouštědla vhodného pro NMR analýzu bez lyofilizačního mezikroku.

Pro zlepšení reprodukovatelnosti v přípravě velkých sad vzorků lze použít automatické robotické systémy, které umí manipulovat i s malými objemy vzorků.

3.3.2 NMR experimenty

Pro dosažení co nejnižšího detekčního limitu a vysokého rozlišení jsou pro NMR metabolomiku využívány různé varianty jednorozměrných ^1H NMR spekter. Tento typ měření je rychlý, kvantitativní a poskytuje dostatečné rozlišení.

Zásadním problémem všech NMR metabolomických měření je přítomnost silného signálu vody, resp. HDO signálu v případě, že je měření prováděno v deuterovaném rozpouštědle. Tento signál svou intenzitou mnohonásobně převyšuje intenzitu signálů jednotlivých metabolitů. Proto všechny pulsní sekvence pro NMR metabolomiku obsahují nějakou metodu pro potlačení tohoto signálu. Existuje celá řada metod potlačení vody, a to např. experiment WATERGATE (WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation) používaný v NMR studiích proteinů³⁸, technika CHESS (chemical shift selective) vhodná pro *in vivo* analýzy³⁹, pulsní sekvence WET (water suppression enhanced through T_1 effects)⁴⁰, atd. V NMR metabolomice je nejčastěji používanou metodou potlačení vody presaturace, a to především díky jednoduchosti jejího provedení^{41,42}. Presaturace může být integrována do zvoleného NMR experimentu. Její podstatou je ozáření signálu vody dlouhým pulzem o nízkém výkonu během relaxační prodlevy. K nevýhodám této metody patří určité potlačení dalších signálů nacházejících se blízko signálu vody.

Nejčastěji používanou pulsní sekvencí je 1D-nuclear Overhauser effect spectroscopy (1D-NOESY) s presaturací, která je velmi robustní a poskytuje efektivní potlačení signálu vody, což dává ve výsledku lepší základní linii spekter a možnost odečíst signály metabolitů nacházející se v oblasti spektra blízké k vodě⁴³.

Pulsní sekvence spin-echo Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) s presaturací je dalším experimentem používaným v metabolomice. CPMG využívá rozdílů v relaxačních časech nízko- a vysokomolekulárních látek a její výhodou je tak filtrace signálů makromolekul, např. proteinů obsažených v séru. Významným problémem je, že jakýkoliv signál nízkomolekulárního metabolitu vázaného na protein nebo jinou makromolekulu bude touto pulsní sekvencí úplně nebo částečně eliminován, což bude mít za následek ztrátu signálu nebo

nepřesnou kvantifikaci. Metabolity, jako je tyrosin, histidin, fenylalanin a tryptofan, které se vážou na protein, vykazují významné rozšíření píku v důsledku T_2 relaxace³⁴.

Jediný z dvourozměrných experimentů, který našel uplatnění v rutinních NMR metabolomických měřeních, je *J*-rozlišený (*J*-resolved) experiment s presaturací. Jeho podstatou je refokusování multiplicity signálů do nepřímé dimenze se zachováním jejich chemického posunu, což pomáhá rozlišit signály jednotlivých metabolitů v případech, kdy se tyto signály překrývají. Tento experiment usnadňuje identifikaci metabolitů a v určité míře dovoluje i jejich relativní kvantifikaci.

K doplnění informací potřebných ke spolehlivé identifikaci metabolitů se využívají i další 2D experimenty, především COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) a HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy). Protože jsou ovšem mnohem časově náročnější než klasické 1D experimenty, používají se prakticky pouze pro vybrané reprezentativní vzorky s cílem ověřit identifikaci metabolitů.

3.3.3 Předúprava NMR dat

Před vlastní statistickou analýzou je potřeba naměřená spektra zpracovat. Nejprve je provedena Fourierova transformace, která převede signály z časové domény do frekvenční. Následujícím krokem je korekce základní linie spektra.

Dalším důležitým krokem před statistickým zpracováním je referencování všech spekter na jeden společný signál. Obvykle se spektra referencují na přidaný interní standard. V metabolomice se nejčastěji používají částečně deuterované sloučeniny, jako je kyselina 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionová (TSP- d_4) a sodná sůl kyseliny 1,1,2,2,3,3-hexadeuterio-3-(trimethylsilyl)-1-propansulfonové³⁴. V případě séra je prokázáno, že zbytkové proteiny mohou nespecificky vázat silylové standardy, což mění intenzitu a polohu jejich signálu. Taková spektra se referencují na jiný vhodný signál, např. α -anomerního protonu glukózy.

Uvedené operace (fázování, korekce baseline a kalibrace chemického posunu) jsou standardní součástí software pro ovládání NMR spektrometru. Před dalším zpracováním jsou pak ze spekter vyloučeny úseky, obsahující reziduální signál vody, zbytkových rozpuštědel, antikoagulantů (EDTA), signál močoviny v moči, apod.

Normalizace je nezbytným krokem v procesování spekter, který vylučuje rozdíly ve spektrech nezpůsobené sledovaným dějem a dovoluje přímé srovnání spekter mezi sebou.

Nejčastějším nežádoucím rozdílem je různé zředění vzorků, obvyklé v případě moči. Metody normalizace lze všeobecně rozdělit na fyziologické a numerické. Fyziologické metody zahrnují například normalizaci moči na kreatinin ⁴⁴. Mezi numerické metody patří normalizace na celkovou plochu spektra (total area). Tato hojně využívaná metoda ale není účinná v případě, kdy se v některých spektrech vyskytnou navíc jednotlivé signály s velkou intenzitou ⁴⁵. V takových případech je vhodná pravděpodobnostní podílová normalizace („probabilistic quotient normalization“, PQN). Normalizačním faktorem je v této metodě medián podílů jednotlivých binů vzorku testovaného a vzorku referenčního (eventuálně průměrného spektra referenční skupiny) ^{46,47}. Základní výhodou PQN je skutečnost, že extrémní hodnoty nemají na medián tak velký vliv jako na průměrnou hodnotu, a tak ani ojedinělé intenzivní signály ve spektru nezkreslí hodnotu normalizačního faktoru.

3.3.4 Metabolomický fingerprinting

3.3.4.1 Binování a škálování

Při metabolickém fingerprintingu, který pracuje s celými spektry, je nutné poněkud snížit jejich komplexitu. Děje se tak pomocí tzv. binování, kdy jsou spektra rozdělena na malé úseky, jejichž plochy jsou integrovány a tyto hodnoty pak slouží jako nové proměnné, nesoucí informaci o intenzitě signálů (nebo ploše pod křivkou – „area under curve“, AUC) v této oblasti. Moderní programy nabízejí několik variant binování spekter. Nejčastěji používanými jsou uniformní a tzv. „inteligentní“ binování ⁴⁸. Uniformní binování rozděluje spektra na jednotlivé ekvidistantní úseky, obvykle s šířkou 0,001 až 0,04 ppm. Na rozdíl od uniformního binování, kdy může dojít k rozdělení jednoho signálu do více binů nebo k situaci, kdy jeden bin obsahuje více než jeden signál, „inteligentní“ binování pomocí různých algoritmů rozděluje spektra tak, aby se v jednom binu nacházel pouze jeden signál. Velice užitečným programem je pro tento účel online software NMRProcFlow[©] (Bordeaux Metabolomics Facility, France).

Výsledkem binování je matice dat, kde jednotlivé řádky odpovídají změřeným vzorkům a sloupce reprezentují intenzitu signálu v jednotlivých částech spektra.

Škálování je operace, která dovoluje mezi sebou porovnávat změny intenzit jednotlivých metabolitů (či binů), jejichž koncentrace ve vzorku se přirozeně velice liší ⁴⁹. Je zjevné, že stejné množství přidané látky se na koncentraci hojně zastoupeného metabolitu projeví jen minimálně, zatímco koncentraci minoritního metabolitu může znásobit. První změna přitom nemusí být nijak fyziologicky podstatná, kdežto druhá může nést důležité informace. Bez škálování by se větší signály více prosazovaly v multivariační statistické analýze, což by vedlo

k podcenění vlivu signálů méně intenzivních.

Nejvíce používanými škálovacími metodami v NMR metabolomice jsou centrování na medián nebo průměr binu, autoškálování (vydělení směrodatnou odchylkou) a Pareto škálování (vydělení rozptylem) ⁴⁷. Poslední varianta se používá v metabolomice často, neboť nově získaná data jsou podobná originálním a vliv šumu zůstává výrazně menší než vliv signálů.

3.3.4.2 Vícerozměrná statistická analýza

Pro vyhodnocení vzájemných vztahů mezi více proměnnými je nezbytné použít některý z postupů vícerozměrné (multivariační) statistické analýzy. V současné době se nabízí desítky metod pro vyhodnocení metabolomických dat, těmi nejužívanějšími zůstávají analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) a diskriminační analýza částečných nejmenších čtvců (Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA), které byly také použity v experimentální části diplomové práce.

PCA patří do kategorie tzv. „unsupervised“ statistických metod, ve kterých se mezi jednotlivými vzorky hledají rozdíly bez ohledu na jejich zařazení do experimentálních skupin. Cílem PCA je vytvořit projekci původních vícerozměrných dat stovek binů do nového prostoru hlavních komponent s menším počtem dimenzí, a přitom zachytit co nejvíce rozdílů mezi daty ⁵⁰. Výsledky analýzy se znázorňují formou grafu komponentních skóre („score plot“), ve kterém vzdálenost jednotlivých spekter ukazuje na podobnost mezi vzorky. Takto lze zjistit tendence v seskupení vzorků a detekovat vzorky odlehlé. Určitým problémem všech „unsupervised“ metod je to, že za jistý podíl rozdělení může být odpovědná variabilita v datech, která přímo nesouvisí se studovaným jevem.

Proto bývá v dalším kroku použita jiná – „supervised“ – metoda, diskriminační analýza částečných nejmenších čtvců (Partial Least-Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). Je to metoda klasifikační, což znamená, že do výpočtového algoritmu předem vnášíme informaci o tom, jak jsou vzorky rozděleny do skupin. Úkolem algoritmu je pak najít, které proměnné nejvíce přispívají k takto nabídnutému rozdělení. Problémem metabolomických studií je ovšem velká převaha počtu binů (proměnných) nad počtem vzorků, což může vést k přeurčení („overfittingu“) modelu. Algoritmus vždy najde řešení soustavy několika lineárních rovnic o řádově větším počtu proměnných, neboli vždy najde souvislost mezi vzorky a skupinami, aniž by reálně existovaly ⁵¹.

Z tohoto důvodu je nezbytnou součástí PLS-DA analýzy validace modelu. Pro studie

s malým počtem vzorku je výhodná tzv. „leave-one-out cross-validation“ (LOOCV). Ze sady vzorků se vynechává jeden a na zbylých se testuje prediktivní schopnost modelu. Pak se test opakuje pro každý vzorek⁵². Výsledkem jsou hodnoty přesnosti, podílu predikovaného rozptylu („fraction of predicted variation“) Q^2 a podílu vysvětleného rozptylu („fraction of explained variation“) R^2 . Další validační metodou je permutační test, kdy se vzorky opakovaně (1000-2000x) náhodně rozdělí do skupin. Následně se původní model porovnává s každým z náhodných a dle získané p -hodnoty se posuzuje, zda reálný model poskytuje lepší rozdělení vzorků⁵³.

Výsledky PLS-DA modelu se také prezentují pomocí grafu komponentních skóre. Důležité informace poskytuje Variable Importance in Projection (VIP) skóre, které znázorňuje biny nejvíce přispívající k rozdělení skupin.

Ideální výstup z vícerozměrné analýzy tak přináší model, jenž dostatečně charakterizuje studované skupiny, označuje kombinaci metabolitů, které k tomuto modelu nejvíce přispívají, a tak poskytuje informace o vztahu mezi metabolickým složením vzorku a studovaným procesem (zdravotní stav či terapie).

3.3.5 Metabolomické profilování

3.3.5.1 Identifikace a kvantifikace metabolitů

Identifikace metabolitů se většinou provádí ručně na základě jednorozměrných protonových NMR spekter. Často používanou pomůckou je komerční software Chenomx, který umožňuje přiřazení jednotlivých signálů příslušným metabolitům. Pro přiřazení signálů je k dispozici také celá řada databází, např. Human Metabolome DataBase (HMDB), Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a PubChem. Tyto databáze jsou volně přístupné a lze v nich najít informace o stovkách milionů sloučenin. Dalšími často používanými zdroji jsou Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) a National Center for Biotechnology Information (NCBI). Některé z nich nabízejí nejenom klasická 1D spektra, ale také 2D-HSQC a 2D-TOCSY spektra s podrobnými informacemi pro porovnání.

Identifikace metabolitů jen na základě srovnání ^1H NMR spekter s daty dostupnými v databázích nemusí být jednoznačná, a proto se pro ověření používají i 2D spektra, zejména J -resolved, COSY, TOCSY a HSQC, poskytující informaci o multiplicitě signálů, spinových systémech a chemických posunech uhlíků. Další variantou identifikace je přidavek standardu čisté látky ke vzorku.

Ke kvantifikaci jednotlivých metabolitů lze kromě manuální či (polo)automatické integrace protonových signálů v předem stanovených hranicích použít program ChenomX (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada), který umožňuje kvantifikaci přeložením spekter metabolitů z databáze přes spektra vzorku.

3.3.5.2 Jednorozměrná statistická analýza

Jednorozměrná analýza na rozdíl od multivariační posuzuje signifikanci změn jednotlivých metabolitů bez vazby na ostatní. Lze tak zachytit i signifikantní změny metabolitů, které se do výsledného multivariačního modelu nepromítly. Tento přístup je také snazší z hlediska biologické interpretace, neboť popisuje změny pro každý metabolit zvlášť, a nikoliv jako jejich kombinaci. Vhodný test se volí podle normality dat (parametrický či neparametrický) a počtu studovaných skupin. Na dvě skupiny se většinou aplikuje parametrický t-test nebo neparametrický Wilcoxon-Mann-Witney test, pro více než dvě skupiny se používá parametrická nebo neparametrická ANOVA. Jako signifikantní se obvykle považuje změna s p-hodnotou $\leq 0,05$.

Výstupem jednorozměrné statistické analýzy jsou rozdíly v hladinách jednotlivých metabolitů mezi experimentálními skupinami, obsahující informaci o statistické významnosti těchto změn. Výsledky bývají znázorňované často formou sloupcových či krabicových grafů.

3.3.6 Interpretace dat

Výsledky vícerozměrné a jednorozměrné statistické analýzy shrnují informace o vzájemných vztazích jednotlivých metabolitů a změnách jejich koncentrací, vyvolaných studovaným jevem. Pro další vyhodnocení těchto údajů je důležité znát i výsledky jiných experimentálních parametrů (biometrických, biochemických, hormonálních), s jejichž hodnotami je vhodné metabolická data korelovat. Konečným výstupem studie pak může být komplexní charakterizace metabolických změn v organismu, interpretovaná v biologickém kontextu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

- *Fosfátové pufrý*
 - Hydroxid draselný (VWR, Leuven, Belgium)
 - Dihydrogenfosforečnan draselný (VWR, Leuven, Belgium)
 - Sodná sůl kyseliny 3-(trimethylsilyl)propionové-d₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - Deuterovaná voda (99,90 % D, VWR, Leuven, Belgium)
 - PBS tablety (VWR Ohio, USA)
 - Kyselina chlorovodíková (37% (w/w) vodný roztok, Honeywell Chemicals, Morris Plains, NJ, USA)
- *Roztok vnitřního standardu*
 - Sodná sůl kyseliny 3-(trimethylsilyl)propionové-d₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - Deuterovaná voda (99,90 % D, VWR, Leuven, Belgium)
- *Metanol (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic)*

4.2 Přístroje

Po odběru byly vzorky zmrazeny a uloženy při -80 °C ve vertikálním mrazáku HERAFreeze HFU B Series ULT (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro odstředění vzorků byla použita centrifuga Hermle Z326 K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany). Supernatanty z vysráženého séra byly lyofilizovány na přístroji Speedvac Savant SPD121P (Thermo Fisher Scientific, USA).

Veškeré NMR experimenty byly naměřeny na NMR spektrometru Bruker Avance III 600 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) vybaveném 5 mm TCI kryosondou a autosamplerem SampleJet.

4.3 Software

Transformace, fázování a referencování naměřených spekter byly provedeny pomocí standardního software TopSpin 3.5 od výrobce spektrometru (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Binování a následující statistická analýza byla provedena pomocí programu

MATLAB R2021 (The MathWorks Inc., Natick, USA) a také softwaru MetaboAnalyst 3.0 a 4.0 (Xia Lab, Montreal, Canada). Metabolity byly identifikovány v programu ChenomX NMR Suite 7.51 a 8.51 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada), srovnáním s databázemi HMDB [online^{III}], BMRB [online^{IV}] a s daty v publikacích, uvedených v seznamu použité literatury.

4.4 *In vivo* experimenty

4.4.1 Stabilita fekálních vzorků

4.4.1.1 Experimentální zvířata

Studie byla prováděna na myších kmene BALB/c. Se zvířaty se zacházelo podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 359/2012 Sb.). Myši byly chovány v akreditovaném zvěřinci MBÚ AV ČR, v.v.i., Praha v areálu ústavů Akademie věd v Krči při teplotě 22 ± 2 °C a rytmu světlo/tma 12/12 hodin (začátek světla 6.00) s volným přístupem k pitné vodě.

4.4.1.2 Odběr a příprava fekálních vzorků

Studie byla provedena na myších ve věku 1,5 měsíce. Od každé myši (počet myší $n = 8$) byla sbírána čerstvá stolice v rozmezí 1 týdne v intervalech „Pondělí – Středa – Pátek – Pondělí“ – celkem 54 vzorků ve 4 odběrech (u některých myší více vzorků za jeden odběr) (viz Tab. 4.1).

Tabulka 4.1 Počet odebraných vzorků od myší pro jednotlivé odběry.

| Číslo odběru | Číslo myši | | | | | | | |
|--------------|------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 |
| O1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| O2 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 |
| O3 | 1 | 3 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| O4 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |

Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním PBS tablet v deuterované vodě a pomocí kyseliny chlorovodíkové byla hodnota pH upravena na 7,2. Dále byl pufr filtrován přes 0,2 μm polypropylenový filtr (WhatmanTM). Odebrané vzorky stolice byly s použitím vortexu zhomogenizovány ve fosfátovém pufru v poměru 500 μl pufru na 25 mg vzorku. Větší částice byly rozpuštěny za použití ultrazvukové sonikace. Takto upravené vzorky byly centrifugovány

při 14 000 rpm a 4 °C po dobu 10 minut, supernatanty byly přeneseny do nových zkumavek a uchovány v mrazáku při -80 °C až do NMR analýzy.

4.4.1.3 NMR experimenty

Před vlastní NMR analýzou byly fekální extrakty ponechány volně rozmraznout při pokojové teplotě a poté byly odstředěny při 14 000 rpm po dobu 30 minut. Supernatanty (450 µl) byly smíchány s 58µM roztokem TSP v deuterované vodě (50 µl) a přeneseny do 5mm NMR kyvet. Všechny NMR experimenty byly naměřeny při teplotě 300 K. Pro každý vzorek bylo provedeno automatické naladění rezonančního obvodu a homogenity magnetického pole a nakalibrována délka 90° pulzu. CPMG spektra s presaturací (standardní pulzní sekvence firmy Bruker *cpmgpr1d*) byla snímána s následujícími parametry: počet skenů NS = 256, počet datových bodů TD = 64k, šířka spektra SW = 20 ppm, relaxační prodleva D₁ = 4 s s presaturací signálu vody, echo 0,3 ms, smyčka pro T2 filtr 126. Krátký 2D *J*-rozlišený experiment s presaturací (pulzní sekvence *jresgpprqf*, NS = 4, SW = 16 ppm, TD = 16k, počet inkrementů NI = 40, SW v nepřímé dimenzi 78.125 Hz, relaxační prodleva s presaturací 2 s) sloužil pro lepší identifikaci metabolitů a také jako dodatečný zdroj dat pro vícerozměrnou statistickou analýzu. Signály volně doznívající indukce (FIDy) byly zváženy pomocí umělého rozšíření čáry (line broadening 0,3 Hz). Spektrům byla automaticky upravena fáze a základní linie a byla referencována na signál TSP (0,00 ppm).

4.4.1.4 Analýza NMR dat

Metabolity byly identifikovány porovnáním CPMG spekter s databázemi Chenomx NMR Suite 7.51 a 8.51 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada), HMDB [online^{III}], BMRB [online^{IV}] a s dříve publikovanými spektrálními daty. Před vlastní multivariační statistickou analýzou byla spektra v rozsahu -1,00 – 10,00 ppm rozdělena na pravidelné biny se šířkou 0,04 ppm. Pro kvantifikaci v univariační analýze byly ručně vypsány hranice signálů odpovídajících jednotlivým metabolitům. Ze spekter byly vyloučeny oblasti se signály vody (5,17 – 4,62 ppm) a TSP (-0,12 – 0,12 ppm).

4.4.2 Vliv mikrobioty na průběh akutního zánětu

4.4.2.1 Experimentální zvířata

V pokusech byly využity samice inbredního myšního kmene BALB/c. Myši pocházely z chovu Laboratoře gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku v Orlických horách. Myši byly chovány v plastových izolátorech typu Trexler v bezmikrobních nebo gnotobiologických podmínkách a byly krmeny sterilními peletami a autoklávovanou vodou *ad libitum* ⁵⁴. Konvenční myši pocházely z chovu Laboratoře gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku a byly chovány v podmínkách srovnatelných s podmínkami bezmikrobních myší. Se zvířaty se zacházelo podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 359/2012 Sb.). Pro vyvolání akutního zánětu byl použit 2,5% roztok dextransulfátu sodného v pitné vodě podávaný po dobu 1 týden myším ve věku 2 měsíců. Kromě myší s chemicky indukovaným zánětem byly za stejných experimentálních podmínek chovány kontrolní bezmikrobní a konvenční myši. Pro sledování zánětu byly zkoumány skupiny myší uvedené v Tab. 4.2.

Tabulka 4.2 Rozdělení myší do experimentálních skupin pro sledování změn vyvolaných zánětem.

| Skupina | GF-ctrl | GF-DSS | CV-ctrl | CV-DSS |
|--------------|---------|--------|---|--------|
| Počet vzorků | 8 | 9 | 8 (fekální extrakty a moč), 7 (sérum) | 8 |

GF - bezmikrobní myši, CV - konvenčně kolonizované myši, DSS - myši se zánětem, ctrl - kontroly bez zánětu.

Veškeré odběry vzorků pro metabolickou analýzu byly provedeny v Laboratoři gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku. Fekální vzorky byly připraveny postupem uvedeným v odstavci 4.4.1.2. Přímý odběr ranní moči byl proveden v 08.00 ráno jemným tlakem na břicho. Vzorky byly uchovávány při -80 °C až do vlastní NMR analýzy. Z plné krve bylo centrifugací připraveno sérum a uchovávalo při -80 °C až do NMR analýzy.

4.4.2.2 Příprava vzorků před NMR analýzou

Vzorky fekálních extraktů byly připraveny dle protokolu popsaného v pododdílu 4.4.1.3.

Vzorky moči byly ponechány volně rozmraznout při pokojové teplotě a poté byly odstředěny při 14 000 rpm po dobu 10 minut. Odebrané supernatanty (70 μ l) byly smíchány přímo ve zkumavce s destilovanou vodou (340 μ l) a byl k nim přidán fosfátový pufr o pH 7,2 (60 μ l) připravený v deuterované vodě. Výsledný poměr destilované vody k deuterované vodě v připravených vzorcích byl 9:1. Následně byly vzorky přeneseny do 3 mm NMR kyvet. Vzorky s objemem supernatantu menším než 70 μ l byly zředěny destilovanou vodou na požadovaný objem a připraveny stejným postupem.

Pro vysrážení proteinů byl ke vzorkům sér (145 μ l) přidán v poměru 1:2 methanol (290 μ l). Po homogenizaci (30 s) byly vzorky odstředěny při 14 000 rpm po dobu 30 minut. Odebrané supernatanty (350 μ l) byly vysušeny v lyofilizátoru a rozpuštěny v deuterované vodě (180 μ l) s přídatkem fosfátového pufru o pH 7,4 obsahujícím 58 μ M roztok TSP (20 μ l). Vzorky byly přeneseny do 3 mm NMR kyvet. Vzorky původně obsahující méně než 145 μ l byly připraveny s použitím chemikálií v odpovídajících poměrech.

4.4.2.3 NMR experimenty

Všechny NMR experimenty byly naměřeny při teplotě 300 K. Pro každý vzorek bylo provedeno automatické naladění rezonančního obvodu a homogenity magnetického pole a nakalibrována délka 90° pulzu.

CPMG experiment s presaturací (standardní pulzní sekvence firmy Bruker *cpmgpr1d*) byla snímána s následujícími parametry: NS = 256 pro fekální extrakty a moč a 512 pro sérum, TD = 64k datových bodů, SW = 20 ppm, D_1 = 4 s, s presaturačním pulzem centrováním na vodní signál, echo 0,3 μ s, smyčka pro T2 filtr 126.

Krátké *J*-rozlišené experimenty s presaturací (standardní pulzní sekvence firmy Bruker *jresgpprqf*) byly naměřeny pro všechny vzorky s následujícími parametry: NS = 8 pro vzorky moči a séra a NS = 4 pro vzorky stolice, SW = 16 ppm, TD = 8k, počet inkrementů NI = 40, SW v nepřímé dimenzi 78.125 Hz, relaxační prodleva s presaturací 4 s.

Signály volně doznívající indukce (FIDy) byly zváženy pomocí umělého rozšíření čáry (line broadening 0,3 Hz). Spektrům byla automaticky upravena fáze a základní linie. Všechna spektra fekálních extraktů a moči byla referencována na signál TSP (0,00 ppm). Spektra séra byla referencována na signál α -anomerního protonu glukózy (5,245 ppm).

4.4.2.4 Analýza NMR dat

Metabolity byly identifikovány porovnáním CPMG spekter s databázemi Chenomx NMR Suite 7.51 a 8.51 (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada), HMDB, BMRB a s dříve publikovanými spektrálními daty. Před vlastní multivariační statistickou analýzou byla spektra v rozsahu -1,00 – 10,00 ppm rozdělena na pravidelné biny se šířkou 0,04 ppm. Pro kvantifikaci v univariační analýze byly ručně vypsány hranice binů odpovídající signálům jednotlivých metabolitů. Ze všech spekter byly vyloučeny oblasti se signály TSP a vody. Ze spekter vzorků moči byl navíc vyloučen signál močoviny a ze spekter sér byl vyloučen signál methanolu.

Pro normalizaci vzorků byla zvolena metoda pravděpodobnostní podílové normalizace (PQN). Protože spektra z fekálních extraktů vykazovala nejen výrazné kvantitativní a kvalitativní rozdíly mezi konvenčními a bezmikrobními myšmi, jejich společná normalizace by mohla zkreslit výsledky (nebyl zdaleka splněn předpoklad stejné plochy spekter). Z tohoto důvodu byly CV a GF skupiny normalizovány zvlášť, každá na průměrné spektrum odpovídající kontrolní skupiny bez zánětu. Spektra vzorků moči a séra byla pro zachování stejného metodologického postupu normalizována stejným způsobem.

PCA a PLS-DA multivariační analýzy byly provedeny v online software MetaboAnalyst 3.0 a 4.0 (Xia Lab, Montreal, Canada)^{55,56}. Data byla předem centrována odečtením průměru a Pareto škálována. Kvalita jednotlivých modelů a volba správného počtu hlavních komponent byla posouzena LOO křížovou validací; testované modely byly hodnoceny pomocí podílu vysvětleného rozptylu („fraction of explained variation“) R^2 a podílu predikovaného rozptylu („fraction of predicted variation“) Q^2 .

Všechna data měla normální rozdělení, proto pro vyhodnocení signifikantních rozdílů v metabolitech byl zvolen Studentův t-test.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Proměnlivost složení fekálního metabolomu

Pokud je odběr stolice u myši prováděn paralelně s odběrem moči v metabolických klecích, je situace poměrně jednoduchá: konstrukce klece zajišťuje oddělené jímání moči a stolice tak, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci. Stáří pelet stolice zároveň odpovídá době odběru moči, tj. většinou 12 nebo 24 hodin.

Situace se mění v případě, kdy jsou jednotlivé pelety odebírány přímo z chovné klece; uspořádání experimentu ne vždy umožní aktuální odběr čerstvých vzorků.

Účelem této studie bylo ověřit, jestli ve skupině zdravých myši bez jakéhokoliv terapeutického zásahu dochází v průběhu 8 dnů u některých metabolitů k signifikantním změnám v koncentraci. Dalším cílem bylo zjistit, nakolik jsou variabilní hladiny metabolitů u pelet odebraných téže myši v průběhu jednoho dne.

Ve spektrech fekálních extraktů vzorků, odebraných podle schématu v Tab. 4.1, bylo identifikováno a kvantifikováno 49 metabolitů.

Nejprve byla vyhodnocena relativní koncentrace signálů metabolitů, které byly porovnány pomocí parametrického testu ANOVA a vypočteny hodnoty statistické významnosti, přičemž hranice významnosti byla stanovena jako $p < 0,05$, resp. $p < 0,1$ (Tab. 5.1).

Tabulka 5.1 Signifikantně změněné metabolity – mezi jednotlivými odběry a souhrnně.

| Metabolit | Porovnání odběrů | | | | | | Souhrnná p -hodnota |
|----------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
| | O1-O2 | O1-O3 | O1-O4 | O2-O3 | O2-O4 | O3-O4 | |
| Nicotinát | 0,277 | 0,071 | 0,994 | 0,789 | 0,347 | 0,087 | 0,034 |
| 3-Hydroxyfenylacetát | 0,632 | 0,214 | 0,898 | 0,762 | 0,167 | 0,031 | 0,031 |
| Threonin | 0,062 | 0,481 | 0,970 | 0,679 | 0,119 | 0,711 | 0,046 |
| Lactát | 0,979 | 0,438 | 0,067 | 0,555 | 0,073 | 0,696 | 0,040 |
| Taurin | 0,999 | 0,059 | 0,989 | 0,015 | 0,995 | 0,016 | 0,008 |
| Glutamát | 0,224 | 0,803 | 0,936 | 0,715 | 0,037 | 0,389 | 0,043 |
| Thymin | 0,108 | 0,436 | 0,975 | 0,872 | 0,021 | 0,175 | 0,016 |
| Oxokyselina č.2 | 0,015 | 0,017 | 0,034 | 0,998 | 0,999 | 0,992 | 0,010 |
| Cholát | 1,000 | 0,030 | 1,000 | 0,010 | 1,000 | 0,021 | 0,006 |

O1-O4 – odběry. Modře jsou zvýrazněny p -hodnoty $p < 0,1$, červeně $p < 0,05$.

Z celkového souboru bylo identifikováno 9 signifikantně se měnících metabolitů. Porovnání krajních odběrů O1 a O4, vzniklých s 8-denním odstupem, však ukazuje na signifikantní změnu pouze dvou metabolitů, laktát a oxokyselina, které měly hodnotu $p < 0,1$, resp. $p < 0,05$. Z výsledků je vidět (Tab. 5.1), že žádný z metabolitů nevykazuje systematicky signifikantní změny u všech či většiny odběrů. Na základě těchto výsledků se domníváme, že se jedná o nahodilé změny, které se vyskytují v biologických vzorcích. Tento problém je možné eliminovat dostatečným počtem vzorků ve studii a také velmi pečlivým statistickým zpracováním a eliminací odlehlých dat.

Posoudit variabilitu vzorků odebraných od stejného zvířete ve stejný den bylo možné jen u velmi omezeného počtu myši a jen u některých odběrů. Navíc počet vzorků od stejné myši byl maximálně 4 pelety/den, a proto vyhodnocení má poněkud omezenou výpovědní hodnotu. Pro posouzení variability byl využit variační koeficient vypočítaný ze vztahu (5.1):

$$v = s/\bar{x} \quad (5.1)$$

kde v je variační koeficient, s je směrodatná odchylka, \bar{x} je průměr.

Hranice variačního koeficientu byla stanovena na 0,5, což odpovídá obvyklé vyšší variabilitě u biologických vzorků. Takto bylo v celém souboru identifikováno 12 metabolitů s vyšším variačním koeficientem (Tab. 5.2). I zde je však zjevné, že u žádného z nich se nejednalo o systematický jev pozorovaný u většího počtu odběrů. Jedná se tedy také pravděpodobně o nahodilé změny, které je možné eliminovat vhodným nastavením biologického experimentu a jeho pečlivým statistickým vyhodnocením.

Tabulka 5.2 Metabolity s variačním koeficientem vyšším než 0,5 u vícenásobného odběru.

| Metabolit | Odběr | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|
| | M1-O1 | M1-O2 | M2-O2 | M2-O3 | M2-O4 | M3-O2 | M5-O2 | M5-O3 | M6-O2 | M8-O4 |
| Thymidin | 0,054 | 0,392 | 0,148 | 0,186 | 0,134 | 0,504 | 0,072 | 0,120 | 0,052 | 0,106 |
| Uracil | 0,146 | 0,153 | 0,151 | 0,102 | 0,522 | 0,174 | 0,180 | 0,402 | 0,100 | 0,360 |
| Galactóza | 0,276 | 0,234 | 0,083 | 0,096 | 0,605 | 0,094 | 0,051 | 0,129 | 0,079 | 0,166 |
| Ribóza | 0,409 | 0,178 | 0,089 | 0,040 | 0,700 | 0,128 | 0,011 | 0,136 | 0,181 | 0,278 |
| Glucóza | 0,621 | 0,329 | 0,100 | 0,135 | 0,494 | 0,115 | 0,151 | 0,094 | 0,284 | 0,158 |
| Xylóza | 0,535 | 0,169 | 0,179 | 0,193 | 0,142 | 0,079 | 0,056 | 0,068 | 0,503 | 0,231 |
| Asparagin | 0,256 | 0,154 | 0,538 | 0,079 | 0,222 | 0,713 | 0,570 | 0,316 | 0,155 | 0,328 |
| Aspartát | 0,279 | 0,388 | 0,346 | 0,220 | 0,322 | 0,312 | 0,506 | 0,174 | 0,481 | 0,602 |
| Succinát | 0,777 | 0,010 | 0,356 | 0,358 | 0,417 | 0,070 | 0,492 | 0,083 | 0,611 | 0,198 |
| Ethanol | 0,152 | 0,120 | 0,653 | 0,092 | 0,359 | 0,215 | 0,459 | 0,145 | 0,317 | 0,318 |
| Oxokyselina č.2 | 0,230 | 0,222 | 0,545 | 0,419 | 0,727 | 0,143 | 0,323 | 0,225 | 0,750 | 0,478 |
| Propionát | 0,060 | 0,684 | 0,196 | 0,040 | 0,438 | 0,167 | 0,288 | 0,232 | 0,139 | 0,387 |

M1-M8 – myši, O1-O4 – odběry.

Lze shrnout, že skupina metabolitů, které vykazovaly signifikantní změnu během jednoho týdne odběru vzorků nebo vysokou variabilitu při vícenásobném odběru, byla ve srovnání s celkovým počtem kvantifikovaných metabolitů nevýznamná. Žádný z těchto výsledků navíc neukazuje na určitou systematickou změnu.

Výsledky prokázaly, že metabolický profil fekálních extraktů zdravých myši je v průběhu jednoho týdne poměrně stabilní, stejně tak nebyly pozorovány významné rozdíly v metabolickém složení vzorků odebraných téže myši během jednoho dne. Variabilita žádného z identifikovaných a kvantifikovaných metabolitů nebyla natolik vysoká, aby znemožnila jeho validní analýzu.

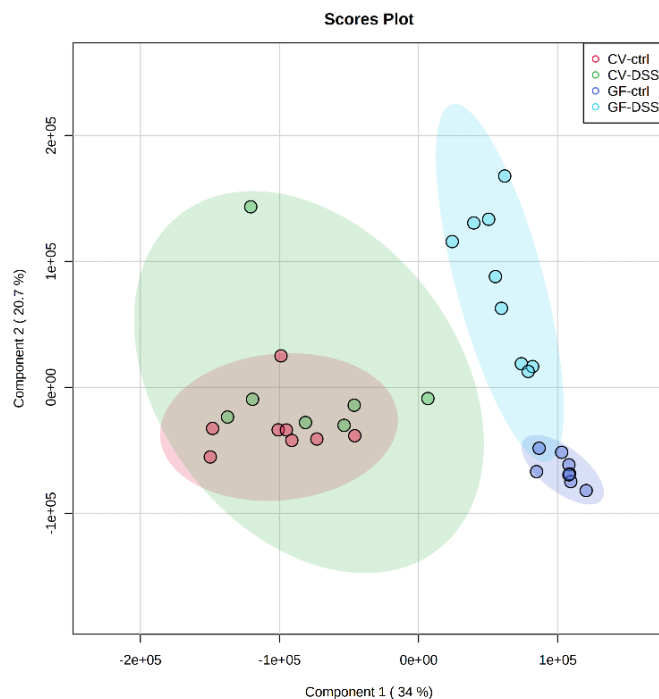
5.2 Vliv mikrobiomu na průběh zánětu

V rámci této práce byly na myším modelu IBD sledovány metabolické změny způsobené zánětlivým procesem ve střevě. Pro tuto práci byl zánět u bezmikrobních (GF) a konvenčních (CV) myší vyvolán podáním roztoku DSS. Na vzorcích fekálních extraktů, moči a séra byl prostřednictvím změn ve složení biologických vzorků sledován rozdílný průběh zánětu u GF a CV myši z pohledu metabolomiky.

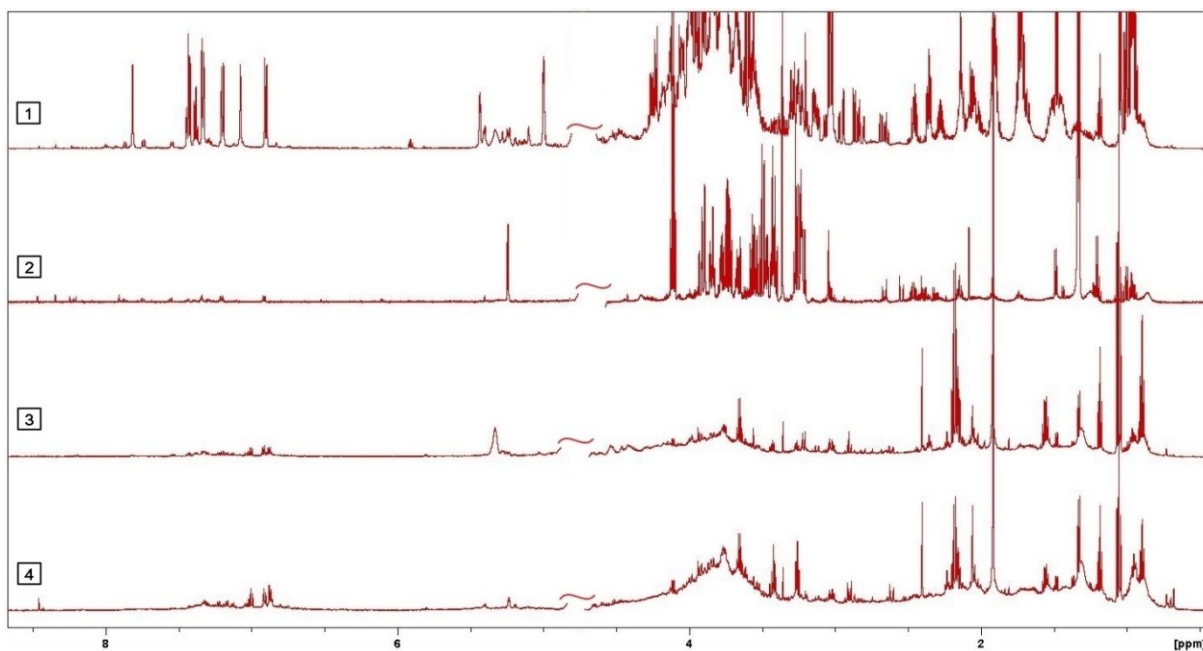
5.2.1 Fekální extrakty

Pro posouzení vlivu vývoje zánětu na trávení a fyziologickou funkci střeva byla analyzována stolice ve formě vodných extraktů. Vizuální srovnání spekter GF a CV myši ukázalo významné kvalitativní rozdíly, což zásadně komplikovalo vyhodnocení dat. Ve spektrech bezmikrobních myši byly nalezeny signály celé řady aminokyselin, které ovšem u konvenčních myši byly přítomny v koncentracích pod mezí stanovitelnosti. Navíc bezmikrobní myši vylučovaly ve stolici více sacharidů než myši konvenčně kolonizované (Obr. 5.2), proto byly plochy spekter u GF myši mnohem větší než u CV myši. Ovlivnilo to především volbu normalizační metody (viz pododдіl 4.4.2.6). Protože spektra GF a CV myši jsou normalizovaná na jinou plochu, není možné ve spektrech fekálních extraktů přímo porovnávat hodnoty koncentrací mezi GF a CV myšmi, lze pouze kvalitativně ohodnotit přítomnost či nepřítomnost daných metabolitů ve vzorku.

Nejprve bylo provedeno srovnání pomocí vícerozměrné analýzy PLS-DA (Obr. 5.1). Ta sice ukázala významné rozdíly mezi CV a GF myšmi, což je možné očekávat, ale rozdíl způsobený DSS u jednotlivých druhů myši již nebyl tak výrazně demonstrován.



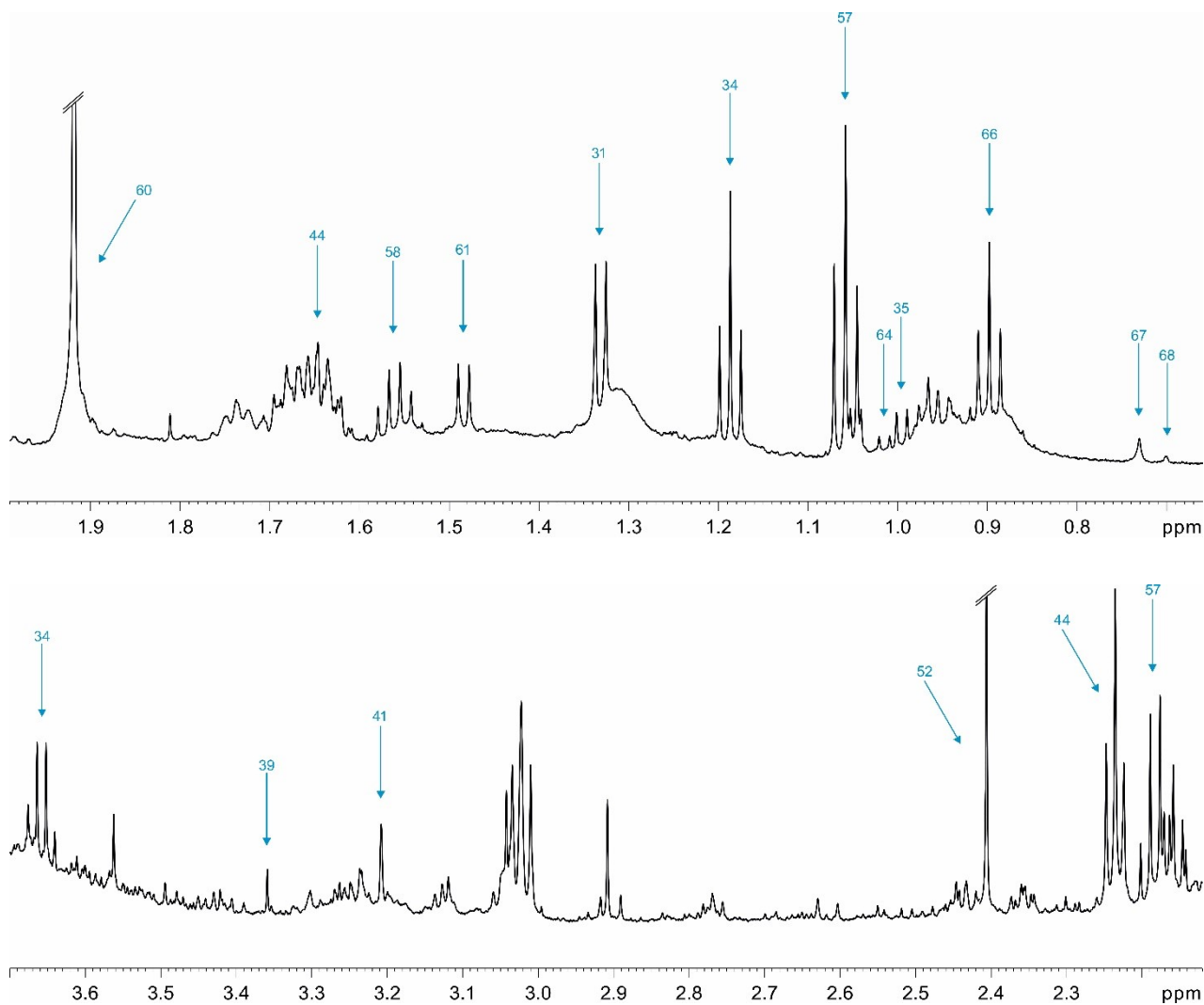
Obrázek 5.1 PLS-DA model fekálních extraktů vzorků CV a GF myši na DSS a kontrol. Validace modelu: počet komponent: 3, přesnost: 0,781, $R^2 = 0,743$, $Q^2 = 0,384$, p -hodnota permutačního testu (2000 opakování) $< 0,0005$, CV se zánětem – zelená, GF se zánětem – světlemodrá, CV kontrola – červená, GF kontrola – modrá.



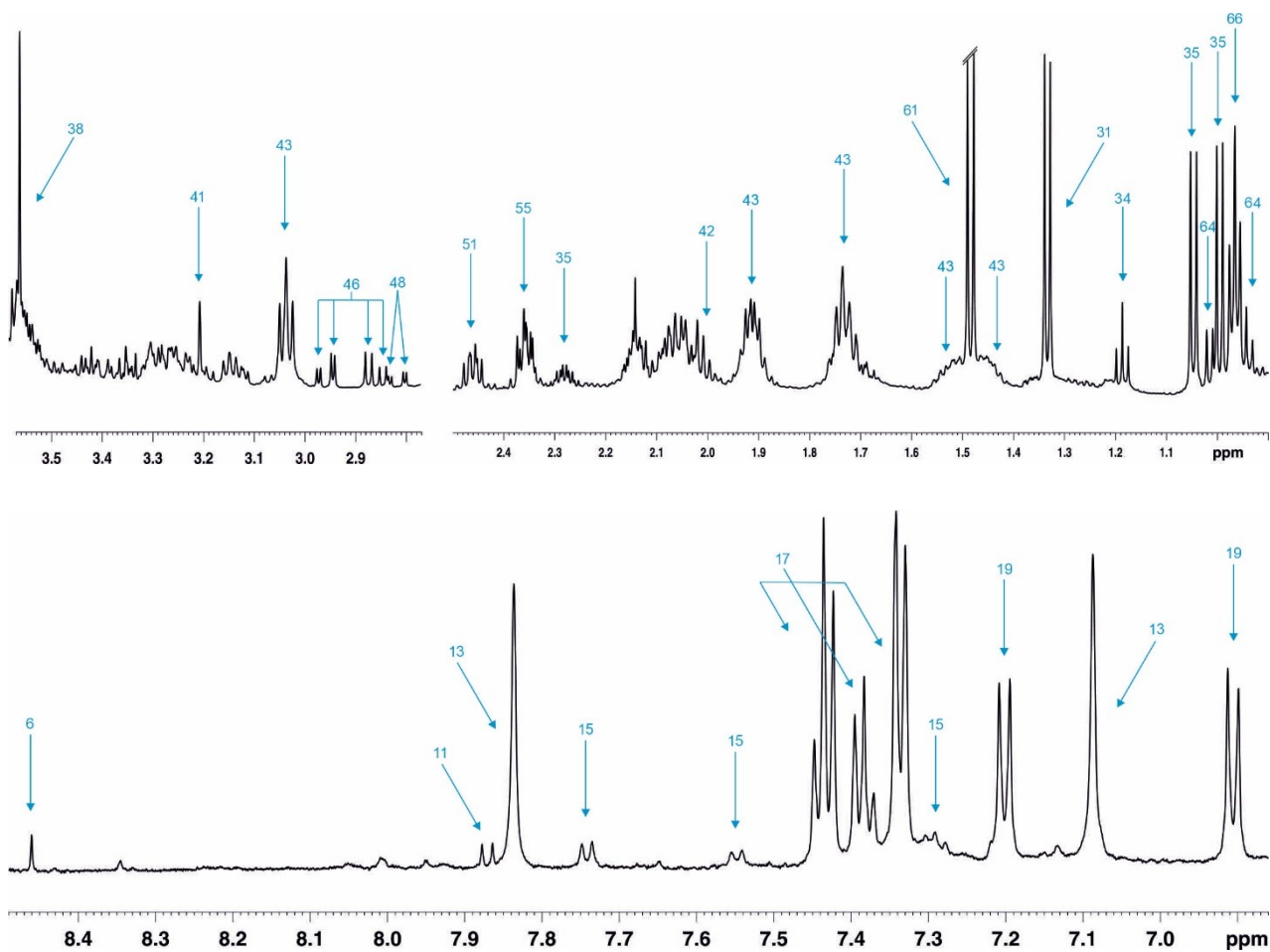
Obrázek 5.2 Reprezentativní spektra fekálních extraktů. 1) GF myši se zánětem, 2) GF kontrolní myši, 3) CV myši se zánětem, 4) CV kontrolní myši. Oblast intenzivního signálu vody je vyřznuta.

Vzhledem k tomu, že vícerozměrná analýza neposkytla takovou kombinaci metabolitů, která by byla rozdělila vzorky s ohledem na efekt podání DSS, byla pro jeho vyhodnocení použita jednorozměrná analýza. Pro tento účel bylo ve spektru identifikováno 32 metabolitů, a to nikotinát, formiát, uridin, histidin, tryptofan, fenylalanin, tyrosin, maltóza+sacharóza, sacharidy, cholin, asparagin, aspartát, glutamin, sukcinát, glutamát, 5-aminopentanoát, prolin, acetát, lysin, alanin, laktát, ethanol, glycin, methanol, propionát, isoleucin, valin, leucin, butyrát, cholát a glykocholát. Typická spektra a přiřazení jednotlivých signálů ve spektrech jsou uvedeny na Obr. 5.3 a Obr. 5.4.

Pomocí jednorozměrné analýzy byly vyhodnoceny změny v relativních koncentracích identifikovaných metabolitů a jejich statistická významnost pomocí Studentova t-testu. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.3.



Obrázek 5.3 Repräsentativní spektrum fekálních extraktů s přiřazenými metabolity u konvenčních myší. Přiřazení metabolitů k číslům je dáno v Tab. 5.6.



Obrázek 5.4 Reprezentativní spektrum fekálních extraktů s přiřazenými metabolity u bezmikrobních myší. Přiřazení metabolitů k číslům je dáno v Tab. 5.6.

Tabulka 5.3 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů ve fekálních extraktech.

| Metabolit | Metabolická dráha | CV-DSS x CV-ctrl [%] | GF-DSS x GF-ctrl [%] |
|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Maltóza + sacharóza | Glykolýza a glukoneogeneze | n.d. | -52*** |
| Sacharidy 1 | | n.d. | -46*** |
| Sacharidy 2 | | n.d. | -49*** |
| Acetát | | -23 | n.d. |
| Propionát | SCFA | 2 | n.d. |
| Butyrát | | -2 | n.d. |
| Valin | | n.k. | (550***) |
| Leucin | BCAA | n.k. | (511***) |
| Isoleucin | | n.d. | (424***) |
| Asparagin | | n.d. | (917***) |
| Aspartát | | n.k. | (189***) |
| Glutamin | Recyklace dusíku | n.d. | (121***) |
| Glutamát | | 93* | (172***) |
| Prolin | | n.d. | 59** |
| Tryptofan | | n.d. | (138***) |
| Fenylalanin | Aromatické aminokyseliny | 52 | (767***) |
| Tyrosin | | 75 | (1274***) |
| Histidin | | n.k. | (1661***) |
| Lysin | Jiné aminokyseliny | n.k. | (272***) |
| Alanin | | 227 | (1050***) |
| Cholát | Metabolismus žlučových kyselin | -58 | n.d. |
| Glykocholát | | -79** | n.d. |
| Uridin | Metabolismus purinů a pyrimidinů | n.d. | 48 |
| Nikotinát | Metabolismus nikotinamidu | 6 | n.d. |
| Sukcinát | Krebsův cyklus | -17 | n.d. |
| Cholin | | 198 | 89*** |
| Laktát | | 39 | 169*** |
| Ethanol | | 2 | -11* |
| 5-Aminopentanoát | | -46 | n.d. |

Hodnoty v tabulce vyjadřují procentuální změnu koncentrace metabolitů myši se zánětem vůči kontrolám. Signifikance je vyjádřena *p*-hodnotou ze Studentova t-testu (* *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001). Hodnoty uvedené v závorkách označují metabolity, jejichž koncentrace u kontrolní skupiny byly blízké limitu detekce (případně byl metabolit detekován pouze u některých vzorků ve skupině). GF - bezmikrobní myši, CV - konvenčně kolonizované myši, DSS - myši se zánětem, ctrl - kontroly bez zánětu, n.d. - metabolit nebyl detekován, n.k. - metabolit nebyl kvantifikován (překryv signálů). SCFA - short-chain fatty acid, BCAA – branched-chain amino acid.

Absence bakteriální mikroflóry vedla ve stolici k vyšší hladině různých jednoduchých cukrů, jejichž hladiny u CV myši byly na úrovni šumu, což souhlasí s výsledky Swann et al. ⁵⁷. Vzhledem k tomu, že střevní mikroflóra je zodpovědná za trávení sacharidů, a jejich trávení je u GF myši porušeno, jsou nestrávené sacharidy u těchto myši vylučovány ve stolici. S vývojem zánětu ovšem hladina cukrů klesala. Vzhledem k tomu, že během zánětu dochází k poškozování střevní stěny, je možné úbytek cukrů ve stolici u GF myši v průběhu zánětu vysvětlit jejich přechodem přes porušenou střevní stěnu. V séru GF-DSS myši v porovnání s GF kontrolní skupinou byl zjištěn nesignifikantní nárůst sacharidů, ale v moči byl obsah sacharidů výrazně zvýšen, což ukazuje na to, že jsou cukry velmi rychle eliminovány močí.

SCFA představuje skupinu látek, které jsou mikrobiálním produktem transformace vlákniny, a hrají významnou roli jako např. zdroj energie pro kolonocyty, substrát pro syntézu cholesterolu a mastných kyselin v játrech ⁹, v regulaci pocitu sytosti ⁸ a regulaci T_{reg} buněk ⁵⁸, atd. Hudcovic et al. prokázali, že podávání butyrát produkujícího *Clostridium tyrobutyricum* brání u myši akutní kolitidě vyvolané DSS ⁵⁹. Proto není překvapující, že žádná skupina GF myši neměla ve stolici přítomné SCFA. V průběhu zánětu u CV myši nebyl zjištěn signifikantní pokles SCFA ⁵⁷, což ukazuje na skutečnost, že přítomnost zánětu pravděpodobně nevedla k významnému narušení činnosti mikrobiomu, který tak může uplatňovat svoji protektivní funkci.

Laktát je metabolit, který je produkován a spotřebováván celou řadou střevních mikroorganismů. Za fyziologických podmínek nedochází k jeho akumulaci ve střevě, ale jeho koncentrace narůstá při vývoji střevního zánětu ⁶⁰. Naše data ukazují významně nižší koncentraci laktátu ve stolici u GF kontrolních myši, ale u myši s DSS-indukovaným zánětem byla hladina výrazně vyšší, přičemž tento nárůst byl výraznější u GF než u CV myši. V případě CV myši souvisí zvýšená koncentrace laktátu se snížením jeho utilizace určitými druhy bakterií v důsledku dysbiózy, jak uvádí Belenguer et al. ⁶⁰. V případě GF myši je zdroj laktátu odlišný. U GF myši pochází laktát z endogenního metabolismu zvířete, jak bylo prokázáno Gillis et al. ⁶¹. V průběhu rozvoje zánětu pak dochází v důsledku porušení střevní stěny k jeho vyššímu uvolnění do stolice.

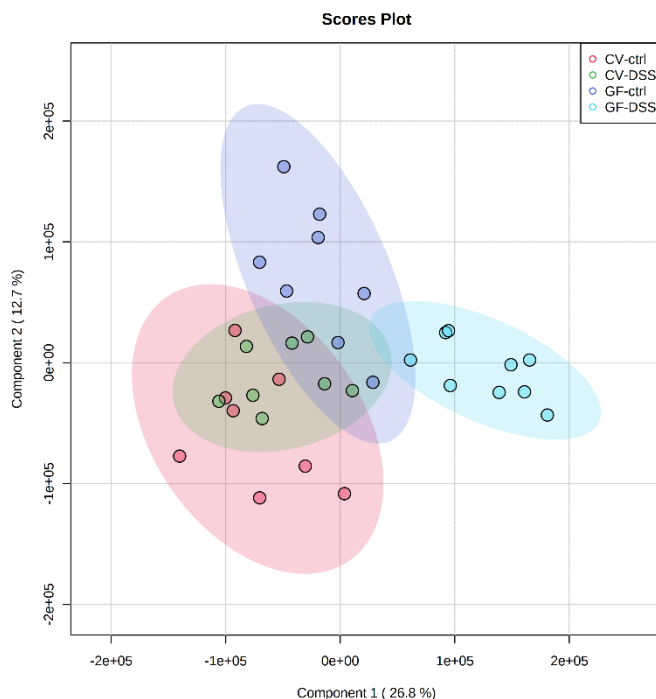
Další skupinou metabolitů, která byla ovlivněna přítomností zánětu, jsou aminokyseliny. Studie prokázaly, že některé aminokyseliny nejsou absorbovány sliznicí tlustého střeva, ale jsou místo toho intenzivně metabolizovány střevní mikroflórou ⁶². U skupiny CV myši nebyly, ani po podání DSS zjištěny jejich významné hladiny. Pokud byly detekovány, tak jejich hladiny byly pod mezí kvantifikace. Jiná situace byla u GF myši, které v kontrolní skupině vykazovaly

hladiny aminokyselin na úrovni meze detekce, ale po podání DSS došlo k jejich výraznému nárůstu. Jednalo se zejména o rozvětvené aminokyseliny (branched-chain amino acids, BCAA), aminokyseliny spojené s recyklací dusíku, ale také o aromatické aminokyseliny, což je v souladu s některými dříve publikovanými články^{10,63}. Pro trávení proteinů jsou využívány enzymy pepsin, trypsin, chymotrypsin a elastáza, které se vylučují v žaludku a tenkém střevě⁶⁴. Proto se domníváme, že u CV myši není v důsledku podání DSS porušena funkce horních částí zažívacího traktu a/nebo funkce mikrobiomu není zásadně narušena. Souhlasí to s hypotézou Neis et al.⁶² o zvýšení biologické dostupnosti aminokyselin pro hostitele vlivem mikroflóry. V případě GF myši po podání DSS je ale pravděpodobně trávení bílkovin porušené a vyžaduje poměrně delší dobu, a proto se aminokyseliny hromadí ve stolici. Další důvodem může být skutečnost, že je v důsledku vývoje zánětu porušena funkce střeva, která vede k horší resorpci aminokyselin.

Cholin je důležitým donorem methylové skupiny a hraje tak velmi významnou roli v celé řadě fyziologických procesů a je klíčový pro zdraví organismu. Je buď získáván z potravy, nebo může být produkován *de-novo* biosyntézou v organismu⁶⁵. U GF kontrolních myši byla zjištěna nižší hladina cholinu než u CV kontrolních myši, ale po podání DSS došlo k výraznému nárůstu množství cholinu ve stolici, i když tento nárůst byl statisticky významný jen u GF myši. To ukazuje na významnou depleci cholinu z organismu, která je zapříčiněná vývojem zánětlivého onemocnění, což může významně ovlivnit celou řadu fyziologických procesů v organismu, neboť se jedná o esenciální složku potravy⁶⁵.

5.2.2 Moč

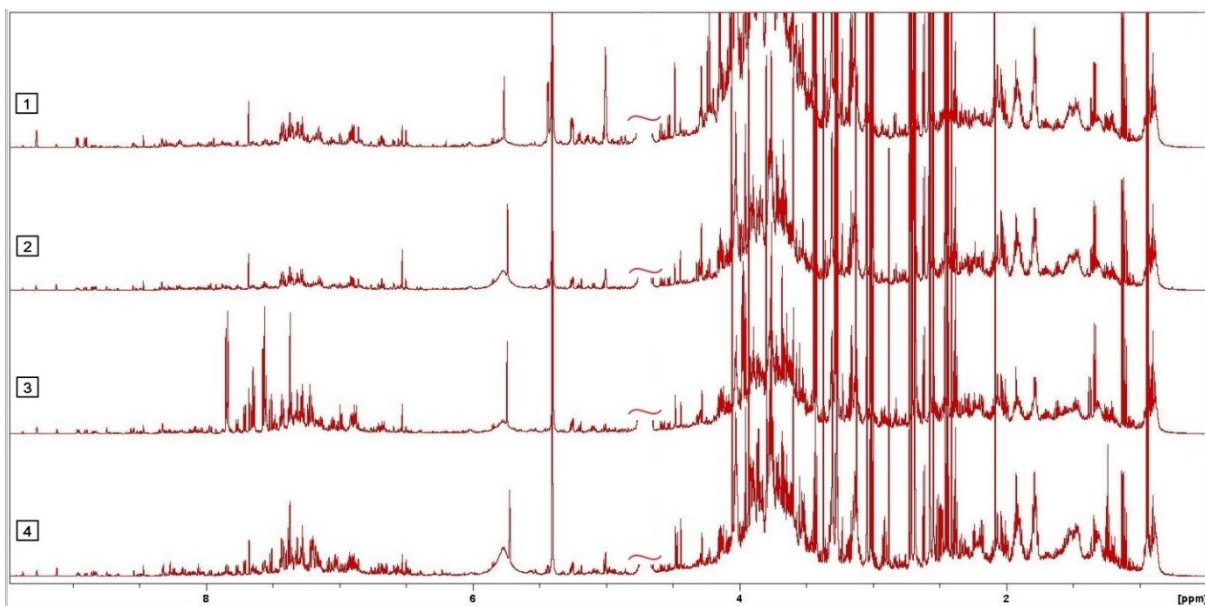
Pro zjištění změn v exkreci metabolitů bylo studováno také složení moči a změny způsobené vývojem zánětu. Porovnání dat s využitím vícerozměrné analýzy PLS-DA (Obr. 5.5) prokázalo rozdíly mezi CV a GF myšmi, ale vliv DSS již nebyl tak výrazně demonstrován.



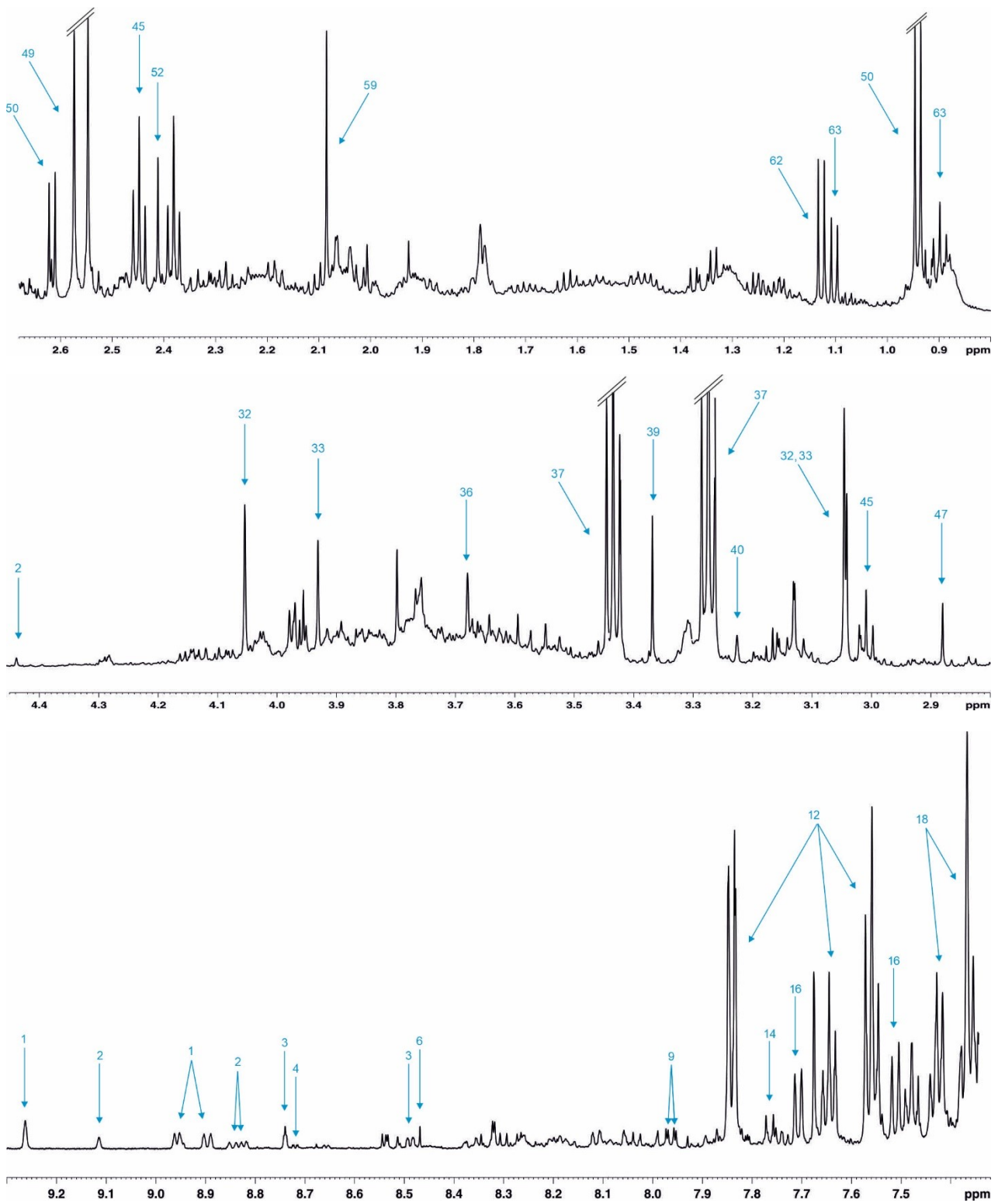
Obrázek 5.5 PLS-DA model vzorků moči CV a GF myši na DSS a kontrol. Validace modelu: počet komponent: 3, přesnost: 0,788, $R^2 = 0,678$, $Q^2 = 0,453$, p -hodnota permutačního testu (2000 opakování) $< 0,0005$, CV se zánětem – zelená, GF se zánětem – světlemodrá, CV kontrola – červená, GF kontrola – modrá.

Vzhledem k tomu, že efekt podání DSS nebylo možné plně vyhodnotit pomocí vícerozměrné analýzy, byla použita jednorozměrná analýza. V ^1H NMR spektrech bylo identifikováno 31 metabolitů, a to 1-methylnikotinamid, trigonelin, nikotinamid N-oxid, nikotinamid, formiát, N-methyl-4-pyridon-3-karboxamid (4-PY), hippurát, 4-hydroxybenzoát, 3-indoxylsulfát, fenylacetylglycin (PAG), fumarát, kyselina orotová, maltóza, sacharidy, xylóza, arabinóza, sacharóza, kreatinin, kreatin, sarkosin, taurin, methanol, karnitin, 2-oxoglutarát, trimethylamin, 2-oxoisokaproát, citrát, sukcinát, N-acetyl, neidentifikovaná oxokyselina a 3-methyl-2-oxovalerát. Typická spektra a přiřazení jednotlivých signálů ve spektrech je uvedeno na Obr. 5.6 a Obr. 5.7.

Pomocí jednorozměrné analýzy byly vyhodnoceny změny v relativních koncentracích identifikovaných metabolitů a následně byla vypočtena jejich statistická významnost. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.4.



Obrázek 5.6 Reprezentativní spektra moči. 1) GF myši se zánětem, 2) GF kontrolní myši, 3) CV myši se zánětem, 4) CV kontrolní myši. Oblast intenzivního signálu vody je vyřiznuta.



Obrázek 5.7 Reprezentativní spektrum moči s přiřazenými metabolity. Přiřazení metabolitů k číslům je dáno v Tab. 5.6.

Tabulka 5.4 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů v moči.

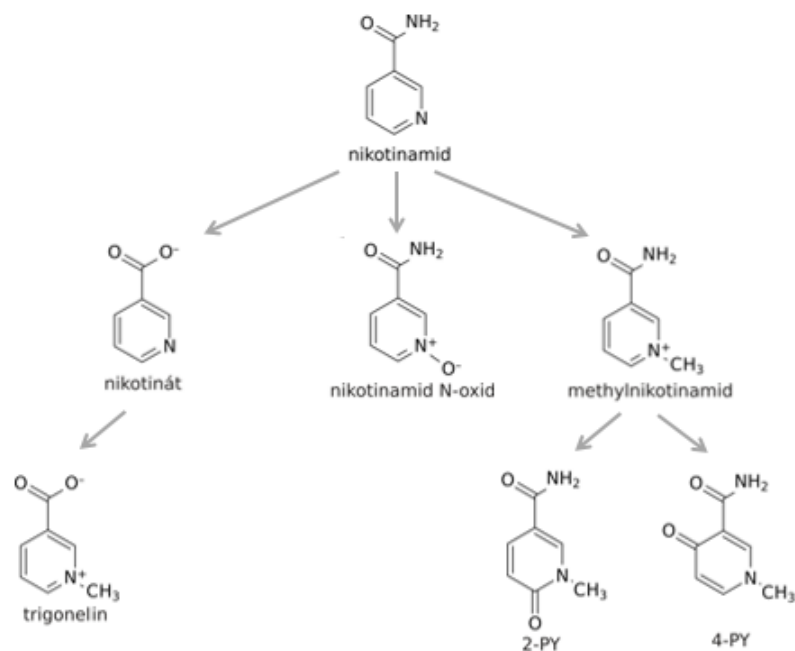
| Metabolit | Metabolická dráha | GF-ctrl x CV-ctrl [%] | GF-DSS x CV-DSS [%] | CV-DSS x CV-ctrl [%] | GF-DSS x GF-ctrl [%] |
|-----------------------|--|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Hippurát | Mikrobiální metabolismus | n.d. | n.d. | -26 | n.d. |
| 3-Indoxylsulfát | | n.d. | n.d. | -37 | n.d. |
| Trimethylamin | | n.d. | n.d. | -38* | n.d. |
| Sacharidy | Glykolýza a glukoneogeneze | 49*** | 60*** | 52** | 64*** |
| Sacharóza | | 66*** | (706***) | -23* | 274*** |
| Maltóza | | 108** | (885***) | - | 424*** |
| Arabinóza | | 101** | -18 | 289 | 59*** |
| Nikotinamid | Metabolismus nikotinamidu | -30*** | 32* | -53*** | -12 |
| 1-Methylnikotinamid | | 64* | 17 | 128** | 62** |
| Nikotinamid N-oxid | | 62** | -78** | 60 | -78*** |
| Trigonelin | | -58*** | -42*** | -54*** | -36 |
| 4-PY | Krebsův cyklus | 60** | -55** | 122** | -37** |
| Citrát | | 61* | 137*** | -34 | -3 |
| Fumarát | | 23 | 54* | -32** | -15 |
| 2-Oxoglutarát | | 132* | 56** | 10 | -26 |
| Kreatin | Metabolismus kreatinu | -18 | 31 | 48 | 136** |
| Kreatinin | | 83** | 66*** | 107** | 87*** |
| Sarcosin | | 44** | 160*** | -6 | 71*** |
| Taurin | Metabolismus žlučových kyselin a taurinu | 35 | -47 | 552** | 158*** |
| Formiát | Metabolismus folátu | 0 | 15 | -28* | -18 |
| Karnitin | | 38** | 38* | 50** | 50* |
| Kyselina orotová | | -5 | 108* | -5 | 108* |
| N-karbamoyl-β-alanin | | -21 | -54** | 50* | -13 |
| 2-Oxoisokaproát | | 25 | -6 | 25* | -5 |
| 3-Methyl-2-oxovalerát | | 52* | -27* | 70*** | -18 |
| 4-Hydroxybenzoát | | -16* | -60*** | 30* | -38*** |
| PAG | | -43*** | -34** | -8 | 7 |
| Oxokyselina | | 69* | -29* | 95*** | -18 |

Hodnoty v tabulce vyjadřují procentuální změnu koncentrace metabolitů GF a CV myši a myši se zánětem vůči kontrolám. Signifikance je vyjádřena *p*-hodnotou ze Studentova *t*-testu (* *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001). Hodnoty uvedené v závorkách označují metabolity, jejichž koncentrace u kontrolní skupiny byly blízké limitu detekce (případně byl metabolit detekován pouze u některých vzorků ve skupině). GF - bezmikrobní myši, CV - konvenčně kolonizované myši, DSS - myši se zánětem, ctrl - kontroly bez zánětu, n.d. - metabolit nebyl detekován. 4-PY - N-methyl-4-pyridon-3-karboxamid, PAG - fenylacetylglucin.

Jak již bylo zmíněno v pododdílu 5.2.1, byly v moči GF myši se zánětem vyvolaným DSS signifikantně zvýšené hladiny sacharidů. Sacharidy, které se přes porušenou střevní stěnu pravděpodobně dostaly ze stolice do krevního oběhu, jsou rychle eliminovány močí.

Významnými metabolity mikrobiálního původu, které bylo možné detekovat v moči, jsou hippurát, 3-indoxylsulfát a trimethylamin. Hippurát je produktem mikrobiálního metabolismu a také jaterní a ledvinové detoxikace některých potravinových polyfenolů a je obvykle vylučován s močí⁶⁶. Bakteriální enzymy tryptofanazy přispívají k produkci indolu z tryptofanu, který poté prochází biotransformací v játrech hostitele a je ve výsledku metabolizován na 3-indoxylsulfát. Tyto látky byly detekovány pouze v moči konvenčních myši (Tab. 5.4), a v důsledku podávání DSS byly jejich hladiny u CV sníženy, i když k signifikantnímu poklesu došlo jen v případě trimethylaminu.

Nikotinamid, který je formou vitamínu B3, a je prekurzorem nikotinamidadeninukleotidu (NAD), který hraje klíčovou roli v mnoha metabolických cestách⁶⁷. Produkty metabolismu nikotinamidu jsou nikotinamid N-oxid, methylnikotinamid, trigonelin, N-methyl-2-pyridon-5-karboxamid (2-PY) a N-methyl-4-pyridon-3-karboxamid (4-PY) (Obr. 5.8)⁶⁸.



Obrázek 5.8 Metabolismus nikotinamidu

Výsledky prokazují významné ovlivnění metabolismus nikotinamidu u GF kontrolních myší v porovnání s CV kontrolami. Podání DSS vedlo u CV myší k signifikatnímu snížení nikotinamidu a trigonelinu a výraznému zvýšení 1-methylnikotinamidu a 4-PY, zatímco u GF myší byl signifikantně snížen nikotinamid N-oxid a 4-PY. To velmi dobře odpovídá nižší hladině nikotinamidu, který Schicho et al. pozorovali u konvenčních myší po podání DSS ²⁴.

V moči byly detekovány změny v hladinách citrátu, fumarátu a 2-oxoglutarátu, které jsou součástí Krebsova cyklu. Podání DSS se projevilo u CV myší signifikantním poklesem pouze u fumarátu.

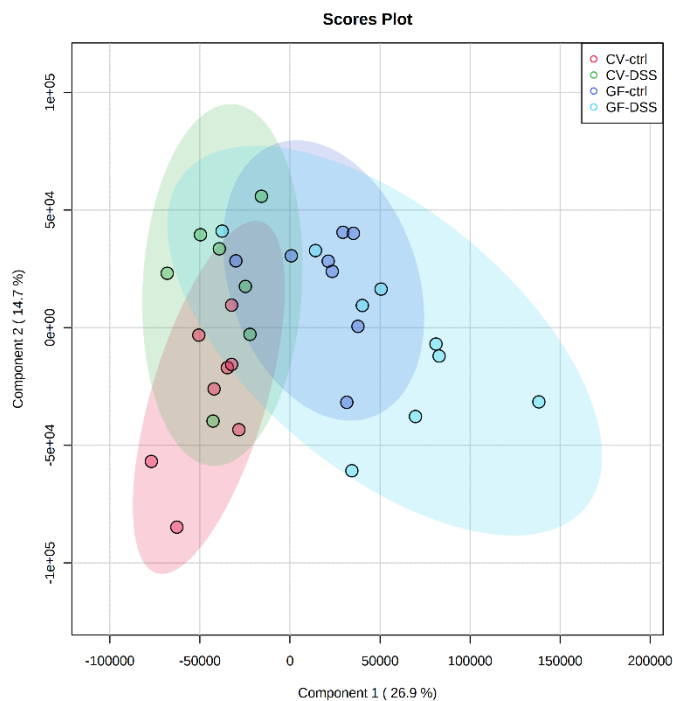
Významně zvýšená hladina byla pozorována u kreatininu u GF kontrolních myší v porovnání s CV myšmi, přičemž v důsledku podání DSS došlo ke zvýšení i hladiny kreatinu u GF myší. To by mohlo poukazovat na poškození funkce ledvin u GF myší, resp. na důsledek podání DSS.

V moči CV myší po podání DSS byly zjištěny zvýšené hladiny oxokyselin, a to konkrétně 2-oxoisokapronové a 3-metyl-2-oxovalerové, které jsou produkty oxidační deaminace leucinu a isoleucinu. To ukazuje na zvýšený metabolismus BCAA, což souhlasí s výsledky Martin et al., kteří prokázali zvýšenou hladinu těchto metabolitů u dětí s IBD ⁶⁹.

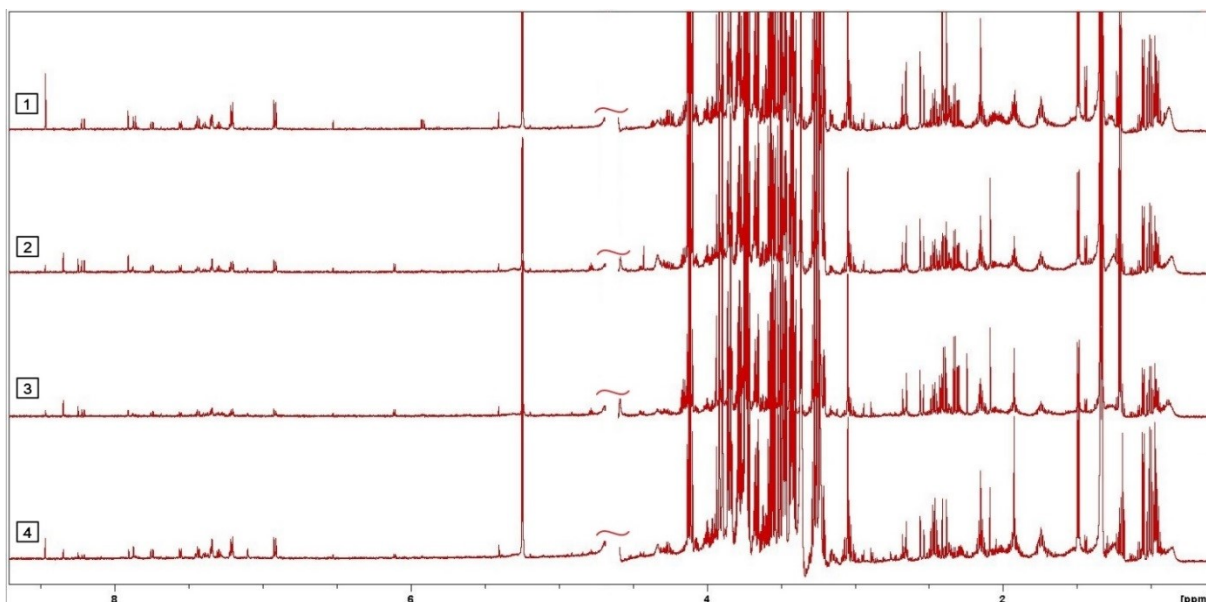
5.2.3 Sérum

Pro sledování stavu organismu bylo také využito sérum. Spektra byla nejprve porovnána pomocí vícerozměrné analýzy PLS-DA (Obr. 5.9), která ukázala jen minimální rozdíly mezi bezmikrobními a konvenčními myšmi. Vliv podávání DSS se na základě této analýzy jevil jako minimální.

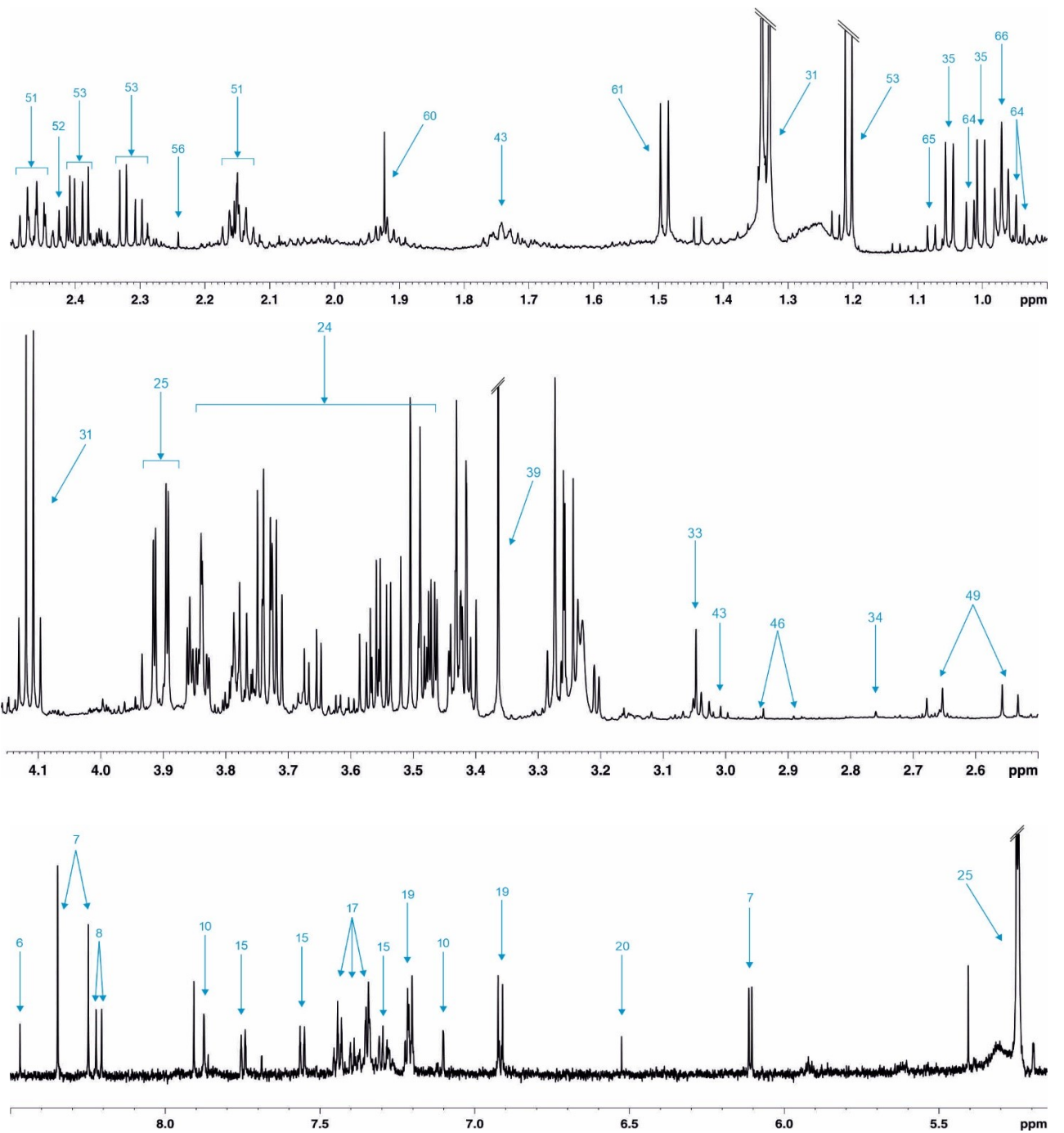
Pro detekci signifikantních změn mezi skupinami byla v dalším kroku provedena jednorozměrná analýza. V ¹H NMR spektrech bylo identifikováno 32 metabolitů, a to formiát, inosin, hypoxanthin, histamin, tryptofan, fenylyalanin, tyrosin, fumarát, uridin, glukóza, mannóza, threonin, laktát, kreatin, sacharidy, lysin, asparagin, sarkosin, citrát, glutamin, sukcinát, 3-hydroxybutyrát, pyruvát, valin, aceton, N-acetyl, acetát, alanin, ethanol, 2-methylglutarát / isobutyrylát, isoleucin, leucin. Typická spektra a přiřazení jednotlivých signálů ve spektrech jsou uvedeny na Obr. 5.10 a Obr. 5.11.



Obrázek 5.9 PLS-DA model vzorků séra CV a GF myši na DSS a kontrol. Validace modelu: počet komponent: 5, přesnost: 0,688, $R^2 = 0,548$, $Q^2 = 0,162$, p -hodnota permutačního testu (2000 opakování) $< 0,0005$, CV se zánětem – zelená, GF se zánětem – světlemodrá, CV kontrola – červená, GF kontrola – modrá.



Obrázek 5.10 Reprezentativní spektra séra. 1) GF myši se zánětem, 2) GF kontrolní myši, 3) CV myši se zánětem, 4) CV kontrolní myši. Oblast intenzivního signálu vody je vyříznuta.



Obrázek 5.11 Repräsentativní spektrum séra s přiřazenými metabolity. Přiřazení metabolitů k číslům je dáno v Tab. 5.6.

Změny v relativních koncentracích identifikovaných metabolitů a jejich statistická významnost vyhodnocená jednorozměrnou analýzou jsou shrnuty v Tab. 5.5.

Tabulka 5.5 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů v séru.

| Metabolit | Metabolická dráha | GF-ctrl x CV-ctrl [%] | GF-DSS x CV-DSS [%] | CV-DSS x CV-ctrl [%] | GF-DSS x GF-ctrl [%] |
|---|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Trimethylamin | Mikrobiální metabolismus | -62* | -13 | -34 | 50** |
| Glukóza | Glykolýza a | -40*** | -23 | -11 | 13 |
| Sacharidy | glukoneogeneze | -37** | -12 | -16 | 18 |
| Acetát | SCFA | -65*** | -56** | -32* | -14 |
| Valin | | -20 | 19 | -33* | -1 |
| Leucin | BCAA | -32* | 5 | -31* | 6 |
| Isoleucin | | -8 | 56** | -25 | 27 |
| Tryptofan | | 1 | -4 | -12 | -16** |
| Fenylalanin | Aromatické aminokyseliny | -21* | 37* | -17* | 44* |
| Tyrosin | | -20 | 81*** | -31* | 56** |
| Inosin | | 19 | -79** | 96* | -65* |
| Uridin | Metabolismus purinů a pyrimidinů | 14* | 53 | 27* | 71* |
| Hypoxanthin | | 109* | -23 | 88** | -31 |
| Glutamin | Recyklace dusíku | -22* | -31** | -5 | -16 |
| Citrát | | 16 | 20 | 23* | 28* |
| Sukcinát | Krebsův cyklus | 30 | 136* | 15 | 109* |
| Pyruvát | | -16 | 63* | 2 | 98** |
| Aceton | Syntéza a degradace ketosloučenin | -67 | -90 | 80 | -48 |
| 3-Hydroxybutyrát | | 22 | -41 | 156* | 25 |
| Alanin | Cahillův cyklus | -26* | 43* | -33* | 31 |
| Laktát | Coriho cyklus | 61*** | 94*** | -1 | 20 |
| Formiát | Metabolismus folátu | 1 | 183*** | -7 | 161*** |
| Threonin | | -18* | 46** | -18* | 46** |
| Ethanol | | -7 | -81 | -2 | -79* |
| Histamin | | -36** | -70*** | -26* | -66*** |
| Neidentifikovaný singlet 4.42 - 4.43 ppm | | 147* | -61** | 44 | -77** |
| Neidentifikovaný dublet 1.22 - 1.24 ppm | | 35** | -12 | 20 | -22** |

Hodnoty v tabulce vyjadřují procentuální změnu koncentrace metabolitů GF a CV myši a myši se zánětem vůči kontrolám. Signifikance je vyjádřena *p*-hodnotou ze Studentova *t*-testu (* *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001). GF-bezmikrobní myši, CV-konvenčně kolonizované myši, DSS-myši se zánětem, ctrl-kontroly bez zánětu. SCFA - short-chain fatty acid, BCAA – branched-chain amino acid.

Signifikantně změněných metabolitů u GF kontrolních myší v porovnání s CV kontrolními myšmi bylo jen několik. Významný rozdíl byl v hladině glukózy a dalších sacharidů, což odpovídá výsledkům publikovaným Velagapudi et al. ⁷⁰. Rovněž byla snížena hladina acetátu a vzrostla hladina laktátu. Všechny tyto změny ukazují, že nepřítomnost střevní mikroflóry ovlivňuje i úroveň energetického metabolismu, jak uvádí Velagapudi et al. ⁷⁰.

Z metabolitů, které přímo souvisí s metabolickou aktivitou mikrobiomu, byla změněna hladina trimethylaminu, která byla nižší u GF myší než u CV myší.

Zánět u CV myší byl charakterizován poklesem celé řady aminokyselin, konkrétně BCAA (signifikantně v případě valinu a leucinu; isoleucin byl na hranici signifikance (p -hodnota = 0,068)) a některých dalších aminokyselin, jako je fenylalanin, tyrosin, alanin a threonin. Obdobný trend nebyl zaznamenán u GF myší, u nichž došlo k poklesu jen u tryptofanu, ale ostatní aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin naopak signifikantně vzrostly. Vzhledem k tomu, že ve stolici bezmikrobních myší se zánětem docházelo k akumulaci aminokyselin ve stolici, domníváme se, že malabsorbce aminokyselin ze střeva nebyla pro všechny aminokyseliny stejná, a proto byly hladiny některých aminokyselin v séru zvýšeny.

Na podání DSS reagovaly konvenční myši zvýšenou hladinou inosinu, hypoxanthinu a uridinu, které jsou významnými intermediáty v metabolismu purinů a pyrimidinů a jejich hladina v séru poskytuje informaci o energetickém stavu organismu a hospodaření s adenosintrifosfátem (ATP) ⁷¹. Jejich vzestup u CV myší se zánětem ukazuje na depleci ATP ²⁴ a tedy na celkovou malnutrici. To také dobře odpovídá nárůstu 3-hydroxybutyrátu, který se řadí mezi ketolátky a jehož hladina stoupá např. v době hladovění ⁷². V případě GF myší došlo sice k nárůstu uridinu, ale inosin naopak poklesl a zvýšení 3-hydroxybutyrátu nebylo signifikantní. To ukazuje na odlišný průběh zánětu, což je i v souladu s tím, že u GF myší v důsledku zánětu došlo k výraznému zvýšení metabolitů citrátového cyklu citrátu a sukcinátu, a také zvýšení hladiny pyruvátu, což by mohlo ukazovat na aktivaci aerobní glykolýzy.

Podání DSS také vyvolalo pokles hladiny histaminu jak u CV, tak u GF, přičemž GF myši vykazovaly nižší hladinu histaminu než CV myší. Histamin je důležitý biogenní amin, který není jen mediátorem alergické reakce, ale působí jako neurotransmitter v mozku ⁷³. Signifikantně nižší hladina u GF myší potvrzuje, že část histaminu je bakteriálního původu. Jeho snížení v důsledku podávání DSS a to jak u CV, tak u GF myší asi souvisí nejen se snížením jeho bakteriální produkce, ale také zhoršením jeho transportu.

Tabulka 5.6 Seznam identifikovaných metabolitů (s příslušnými chemickými posuny ¹H).

| Kód | Metabolit | Chemický posun [ppm] | Biologická tekutina |
|-----|---------------------|--|---------------------|
| 1 | 1-Methylnikotinamid | 9,27 (s) , 8,96 (d), 8,90 (d), 4,48 (s) | M |
| 2 | Trigonelin | 9,12 (s) , 8,83 (m), 4,44 (s) | M |
| 3 | Nikotinamid N-oxid | 8,74 (t) , 8,49 (m) | M |
| 4 | Nikotinamid | 8,95 (dd), 8,72 (dd) | M |
| 5 | Nikotinát | 8,94 (s) , 8,61 (d), 8,26 (d) | F |
| 6 | Formiát | 8,47 (s) | S, M, F |
| 7 | Inosin | 8,35 (s), 8,25 (s), 6,10 (d) | S |
| 8 | Hypoxanthin | 8,22 (s), 8,20 (s) | S |
| 9 | 4-PY | 7,96 (dd) | M |
| 10 | Histamin | 7,87 (d), 7,10 (d) | S |
| 11 | Uridin | 7,87 (d)^F , 5,91 (m)^S | S, F |
| 12 | Hippurát | 7,84 (dd) , 7,64 (m), 7,56 (m), 3,97 (d) | M |
| 13 | Histidin | 7,81 (d), 7,08 (d) | F |
| 14 | 4-Hydroxybenzoát | 7,77 (m) , 6,99 (m) | M |
| 15 | Tryptofan | 7,75 (d) , 7,55 (d), 7,28 (m) | S, F |
| 16 | 3-Indoxylsulfát | 7,71 (d) , 7,51 (d), 7,37 (s), 7,28 (dd), 7,21 (dd) | M |
| 17 | Fenylalanin | 7,44 (m) , 7,38 (m), 7,34 (d) | S, F |
| 18 | PAG | 7,43 (m) , 7,37 (m) | M |
| 19 | Tyrosin | 7,20 (d)^F , 6,91 (d)^S | S, F |
| 20 | Fumarát | 6,51 (s) | S, M |
| 21 | Kyselina orotová | 6,20 (s) | M |
| 22 | Maltóza + sacharóza | 5,44 (m) | F |
| 23 | Maltóza | 5,43 (m) , 5,26 (m), 4,66 (m) | M |
| 24 | Sacharidy | 5,25 (m)^M , 5,17 (m)^F , 5,00 (m)^F , 3,45-3,90 (m)^S | S, M, F |
| 25 | Glukóza | 5,25 (d) , 4,66 (d), 3,91 (dd), 3,83 (m), 3,78(m), 3,73 (m), 3,55 (dd), 3,55 (dd), 3,47 (dd), 3,42 (m), 3,26 (dd) | S |
| 26 | Mannóza | 5,19 (d) | S |
| 27 | Arabinóza | 5,25 (d), 4,53 (d) | M |
| 28 | Xylóza | 4,59 (d) , 5,20 (d) | M |
| 29 | Threonin | 4,26 (m) , 3,60 (d) | S |
| 30 | Sacharóza | 4,23 (d) | M |
| 31 | Laktát | 4,11 (q), 1,33 (d) | S, F |
| 32 | Kreatinin | 4,06 (s) , 3,05 (s) | M |
| 33 | Kreatin | 3,93 (s) , 3,04 (s) | S, M |
| 34 | Ethanol | 3,66 (q), 1,19 (t) | S, F |
| 35 | Valin | 3,62 (d), 2,27 (m), 1,05 (d)^S , 0,99 (d)^F | S, F |
| 36 | Sarkosin | 3,60 (s)^M , 2,73 (s)^S | S, M |
| 37 | Taurin | 3,43 (t) , 3,27 (t) | M |
| 38 | Glycine | 3,6 (s) | F |
| 39 | Methanol | 3,37 (s) | M, F |

| | | | |
|----|--------------------------------|--|---------|
| 40 | Karnitin | 3,23 (s) | M |
| 41 | Cholin | 3,21 (s) | F |
| 42 | Prolin | 3,30 (m), 2,35 (m), 2,00 (m) | F |
| 43 | Lysin | 3,03 (t) ^S , 1,90 (m) ^F , 1,74 (m), 1,51 (m), 1,44 (m) | S, F |
| 44 | 5-Aminopentanoát | 3,02 (t), 2,24 (t) , 1,63 (m) | F |
| 45 | 2-Oxoglutarát | 3,01 (t), 2,45 (t) | M |
| 46 | Asparagin | 2,96 (dd) ^F , 2,86 (dd) ^S | S, F |
| 47 | Trimethylamin | 2,88 (s) | M |
| 48 | Aspartát | 2,81 (dd) , 2,67 (dd) | F |
| 49 | Citrát | 2,67 (d), 2,55 (d) | S, M |
| 50 | 2-Oxoisokaproát | 2,61 (d) , 0,94 (d) | M |
| 51 | Glutamin | 2,46 (m) , 2,14 (m) | S, F |
| 52 | Sukcinát | 2,41 (s) | S, M, F |
| 53 | 3-Hydroxybutyrát | 2,40 (dd), 2,33 (dd), 1,21 (d) | S |
| 54 | Pyruvát | 2,38 (s) | S |
| 55 | Glutamát | 2,36 (m) , 2,14 (m), 2,07 (m) | F |
| 56 | Aceton | 2,24 (s) | S |
| 57 | Propionát | 2,19 (q), 1,07 (t) | F |
| 58 | Butyrát | 2,16 (t), 1,57 (m) , 0,90 (t) | F |
| 59 | N-acetyl | 2,09 (s) | S, M |
| 60 | Acetát | 1,92 (s) | S, F |
| 61 | Alanin | 1,49 (d) | S, F |
| 62 | Oxokyselina | 1,13 (d) | M |
| 63 | 3-Methyl-2-oxoalerát | 1,1 (d) , 0,90 (t) | M |
| 64 | Isoleucin | 1,02 (d) , 0,94 (t) | S, F |
| 65 | 2-Methylglutarát / Isobutyrate | 1,08 (d) | S |
| 66 | Leucin | 0,97 (d,d) | S, F |
| 67 | Cholát | 0,73 (s) | F |
| 68 | Glycocholát | 0,70 (s) | F |
| 69 | Neidentifikovaný metabolit č.1 | 4,42 (s) | S |
| 70 | Neidentifikovaný metabolit č.2 | 1,23 (d) | S |

Tučně jsou zvýrazněny signály použité ke kvantifikaci. S – sérum, M – moč, F – fekální extrakty, s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet, dd - dublet dubletu, 4-PY - N-methyl-4-pyridon-3-karboxamid, PAG - fenylacetyl glycin.

6 ZÁVĚR

V první části práce byla studována variabilita metabolitů přítomných ve fekálních extraktech, a to jak v průběhu několika odběrů během jednoho týdne, tak mezi vzorky odebranými témuž zvířeti během jednoho dne. V ani v jednom případě data neprokázala příliš významnou a systematickou variabilitu. Změny hladin metabolitů jak v průběhu času, tak v rámci jednoho odběru jsou nahodilé a neukazují, že by některý konkrétní metabolit vykazoval významnější variabilitu. Výsledky pozorování usnadňují experimentální provedení odběru i následnou interpretaci naměřených koncentračních změn. Na druhou stranu je ovšem zřejmá nutnost velmi obezřelého statistického zpracování dat s případným vyloučením odlehlých hodnot.

V další části práce byl pomocí NMR metabolomiky fekálních extraktů, séra i moči sledován vliv přítomnosti mikrobiomu na průběh zánětu vyvolaného pomocí dextransulfátu sodného u konvenčně kolonizovaných a bezmikrobních myší. Data ukazují, že přítomnost mikrobiomu, i když ovlivněného vývojem zánětu, hraje významnou roli. Zejména výsledky analýzy fekálních extraktů ukazují, že průběh zánětu z hlediska metabolomického se v případě přítomnosti a nepřítomnosti střevní mikrobioty významně liší. Je evidentní, že došlo k signifikantnímu ovlivnění trávení sacharidů a proteinů, což ukazuje na vážnou malnutrici u bezmikrobních zvířat. Vylučování cukrů močí u bezmikrobních myší se zánětem také ještě více přispívá k podvýživě zvířat a celkovému rozvratu organismu.

Je zřejmé, že z metabolického hlediska hraje mikrobiom v průběhu střevního zánětu velmi pozitivní roli a je schopen do jisté míry jeho negativní vliv na výživu organismu eliminovat. Získaná data budou dále korelována s analýzou střevní mikrobioty a její změny během zánětlivého procesu. Práce tak nejen prokázala význam NMR metabolomiky pro poskytnutí celkového obrazu o stavu organismu, ale také přispěla k rozšíření znalostí o zásadním významu mikrobiomu pro průběh onemocnění.

ZKRATKY

| | |
|---------|--|
| 1D | jednorozměrný |
| 2D | dvourozměrný |
| 2-PY | N1-methyl-2-pyridon-5-karboxamid |
| 4-PY | N1-methyl-4-pyridon-3-karboxamid |
| ANOVA | analýza rozptylu (analysis of variance) |
| ATP | adenosintrifosfát |
| AUC | plocha pod křivkou (area under curve) |
| BCAA | větvená aminokyselina (branched-chain amino acid) |
| BMRB | Biological Magnetic Resonance Data Bank |
| CD | Kronová choroba (Crohn's disease) |
| ChEBI | Chemical Entities of Biological Interest |
| CHESS | chemical shift selective |
| COSY | correlation spectroscopy |
| CPMG | Carr-Purcell-Meiboom-Gill |
| CV | konvenčně chované myši (conventionally raised mice) |
| CV-ctrl | konvenční kontrolní skupina (conventional control group) |
| DSS | dextranulfát sodný |
| EDTA | kyselina ethyldiamintetraoctová |
| FID | pokles volné indukce (free induction decay) |
| FTIR | infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací |
| GC | plynová chromatografie |
| GF | bezmikrobní myši |
| GF-ctrl | bezmikrobní kontrolní skupina (germ-free control group) |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HMDB | human metabolome database |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HSQC | heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy |
| IBD | zánětlivé onemocnění střev (inflammatory bowel disease) |
| IC | nedeterminovaná kolitida (indeterminate colitis) |
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |

| | |
|-----------|---|
| LOOCV | leave-one-out cross-validation |
| MS | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry) |
| MUP | hlavní močový protein (major urinary protein) |
| NAD | nikotinamidadenindinukleotid |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NI | počet inkrementů (number of increments) |
| NK | natural killer |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| NOESY | nuclear Overhauser effect spectroscopy |
| NS | počet scanů |
| PAG | fenylacetylglycin |
| PCA | analýza hlavních komponent (principle component analysis) |
| PLS-DA | diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (partial least-squares discriminant analysis) |
| PQN | pravděpodobnostní podílovátová normalizace (probabilistic quotient normalization) |
| SCFA | mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids) |
| SW | šířka spektra |
| TD | počet datových bodů |
| TNBS | kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová |
| TOCSY | total correlation spectroscopy |
| TSP-d4 | kyselina 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionová |
| UC | ulcerózní kolitida (ulcerative colitis) |
| UPLC | ultra účinná kapalinová chromatografie |
| VIP | variable importance in projection |
| WATERGATE | WATER suppression by GrAdient-Tailored Excitation |
| WET | water suppression enhanced through T ₁ effects |

REFERENCE

1. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, 1–14 (2016).
2. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
3. Stevens, C. E. & Hume, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* **78**, 393–427 (1998).
4. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 219–232 (2017).
5. Lu, D., Huang, Y., Kong, Y., Tao, T. & Zhu, X. Gut microecology: Why our microbes could be key to our health. *Biomed. Pharmacother.* **131**, 110784 (2020).
6. Postler, T. S. & Ghosh, S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab.* **26**, 110–130 (2017).
7. Walter, J. & Ley, R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu. Rev.* 411–429 (2011) doi:10.1146/annurev-micro-090110-102830.
8. Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E. & Spector, T. D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* **361**, 36–44 (2018).
9. Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr. Rev.* **69**, 245–258 (2011).
10. Marchesi, J. R. *et al.* Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J. Proteome Res.* **6**, 546–551 (2007).
11. Alatab, S. *et al.* The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 17–30 (2020).
12. Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 205–217 (2015).
13. Van Der Sloot, K. W. J., Amini, M., Peters, V., Dijkstra, G. & Alizadeh, B. Z. Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflamm. Bowel Dis.* **23**, 1499–1509 (2017).
14. Nagao-Kitamoto, H. *et al.* Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cmgh* **2**, 468–481 (2016).
15. Ha, F. & Khalil, H. Crohn’s disease: a clinical update. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **8**, 352–359 (2015).
16. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. & Colombel, J.-F. Ulcerative colitis. *Lancet* **389**, 1756–1770 (2017).
17. Geboes, K. & De Hertogh, G. Indeterminate Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **9**, 324–331 (2003).
18. Joossens, M. *et al.* Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn’s disease and their unaffected relatives. *Gut* **60**, 631–637 (2011).
19. Zheng, L. & Wen, X.-L. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: The current status and perspectives. *World J. Clin. Cases* **9**, 321–333 (2021).
20. Bauset, C., Gisbert-Ferrándiz, L. & Cosín-Roger, J. Metabolomics as a Promising Resource Identifying Potential Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Med.* **10**, 622 (2021).

21. Cominelli, F., Arseneau, K. O., Rodriguez-Palacios, A. & Pizarro, T. T. Uncovering Pathogenic Mechanisms of Inflammatory Bowel Disease Using Mouse Models of Crohn's Disease–Like Ileitis: What is the Right Model? *Cmgh* **4**, 19–32 (2017).
22. Wirtz, S. *et al.* Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* **12**, 1295–1309 (2017).
23. Oh, S. Y., Cho, K. A., Kang, J. L., Kim, K. H. & Woo, S. Y. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 333–340 (2014).
24. Schicho, R. *et al.* Quantitative metabolomic profiling of serum and urine in DSS-induced ulcerative colitis of mice by 1H NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* **9**, 6265–6273 (2010).
25. Xin, Z. *et al.* Metabolic profiling of liver in C57BL/6 mice with DSS-induced inflammatory bowel disease by untargeted metabolomics analysis. 1–26 (2019) doi:10.21203/rs.2.16664/v1.
26. Kim, S. H. *et al.* Metabolomic Analysis of the Liver of a Dextran Sodium Sulfate-Induced Acute Colitis Mouse Model: Implications of the Gut-Liver Connection. *Cells* **9**, (2020).
27. Fiehn, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **48**, 155–171 (2002).
28. Pelantová, H. *et al.* Urinary metabolomic profiling in mice with diet-induced obesity and type 2 diabetes mellitus after treatment with metformin, vildagliptin and their combination. *Mol. Cell. Endocrinol.* **431**, 88–100 (2016).
29. Ren, S. *et al.* Mechanism of rutaecarpine on ethanol-induced acute gastric ulcer using integrated metabolomics and network pharmacology. *Biomed. Pharmacother.* **138**, 111490 (2021).
30. Rocchetti, G. & O'Callaghan, T. F. Application of metabolomics to assess milk quality and traceability. *Curr. Opin. Food Sci.* **40**, 168–178 (2021).
31. Whon, T. W., Shin, N. R., Kim, J. Y. & Roh, S. W. Omics in gut microbiome analysis. *J. Microbiol.* **59**, 292–297 (2021).
32. Vo, K. T. X. *et al.* Proteomics and Metabolomics Studies on the Biotic Stress Responses of Rice: an Update. *Rice* **14**, (2021).
33. Meng, Z. *et al.* Effects of exposure to prothioconazole and its metabolite prothioconazole-desthio on oxidative stress and metabolic profiles of liver and kidney tissues in male mice. *Environ. Pollut.* **269**, 116215 (2021).
34. Crook, A. A. & Powers, R. Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. *Molecules* **25**, (2020).
35. Nagana Gowda, G. A. & Raftery, D. Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* **86**, 5433–5440 (2014).
36. Nagana Gowda, G. A., Gowda, Y. N. & Raftery, D. Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* **87**, 706–715 (2015).
37. Hauser, A. *et al.* Efficient extraction from mice feces for NMR metabolomics measurements with special emphasis on SCFAs. *Metabolites* **9**, (2019).
38. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenář, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665 (1992).
39. Haase, A., Frahm, J., Hanicke, W. & Matthaei, D. 1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Phys. Med. Biol.* **30**, 341–344 (1985).
40. Ogg, R. J., Kingsley, P. B. & Taylor, J. S. WET, a T1- and B1-Insensitive Water-Suppression Method for in Vivo Localized 1H NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*

- vol. 104 1–10 (1994).
41. Hoult, D. I. Solvent peak saturation with single phase and quadrature fourier transformation. *J. Magn. Reson.* **21**, 337–347 (1976).
 42. Giraudeau, P., Silvestre, V. & Akoka, S. Optimizing water suppression for quantitative NMR-based metabolomics: a tutorial review. *Metabolomics* **11**, 1041–1055 (2015).
 43. McKay, R. T. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabolomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.* **38 A**, 197–220 (2011).
 44. Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J. K. & Lindon, J. C. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets. *Anal. Chem.* **78**, 2262–2267 (2006).
 45. Nagana Gowda, G. A. & Raftery, D. *NMR-Based Metabolomics. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1280 (2021).
 46. Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G. & Senn, H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in 1 H NMR Metabolomics. *Anal. Chem.* **78**, 4281–4290 (2006).
 47. Hochrein, J. *et al.* Data Normalization of 1H NMR Metabolite Fingerprinting Data Sets in the Presence of Unbalanced Metabolite Regulation. *J. Proteome Res.* **14**, 3217–3228 (2015).
 48. Boughton, B. A. & Hamilton, B. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 965 (Springer International Publishing, 2017).
 49. Heude, C., Jay, N., Carrigan, J. B. & Ludwig, C. *Nuclear Magnetic Resonance Strategies for Metabolic Analysis.* vol. 965 (Springer International Publishing, 2017).
 50. Forshed, J., Idborg, H. & Jacobsson, S. P. Evaluation of different techniques for data fusion of LC/MS and 1H-NMR. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **85**, 102–109 (2007).
 51. Holmes, E. *et al.* Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Analytical Biochemistry* vol. 220 284–296 (1994).
 52. Čermáková, M. M. & Hrabal, R. Metabolomics studied by NMR spectroscopy. (2019).
 53. Percival, B., Gibson, M., Leenders, J., Wilson, P. B. & Grootveld, M. *Chapter 1: Univariate and Multivariate Statistical Approaches to the Analysis and Interpretation of NMR-based Metabolomics Datasets of Increasing Complexity. RSC Theoretical and Computational Chemistry Series* vols 2021-Janua (2021).
 54. Hudcovic, T., Štěpánková, R., Kozáková, H., Hrnčíř, T. & Tlaskalová-Hogenová, H. Effects of monocolonization with Escherichia coli strains O6K13 and Nissle 1917 on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol. (Praha).* **52**, 618–626 (2007).
 55. Xia, J., Psychogios, N., Young, N. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 652–660 (2009).
 56. Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* **43**, W251–W257 (2015).
 57. Swann, J. R. *et al.* Variation in antibiotic-induced microbial recolonization impacts on the host metabolic phenotypes of rats. *J. Proteome Res.* **10**, 3590–3603 (2011).
 58. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–450 (2013).

59. Hudcovic, T. *et al.* Protective effect of *Clostridium tyrobutyricum* in acute dextran sodium sulphate-induced colitis: Differential regulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-18 in BALB/c and severe combined immunodeficiency mice. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 356–365 (2012).
60. Belenguer, A. *et al.* Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6526–6533 (2007).
61. Gillis, C. C. *et al.* Dysbiosis-Associated Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support *Salmonella* Growth. *Cell Host Microbe* **23**, 54–64.e6 (2018).
62. Neis, E. P. J. G., Dejong, C. H. C. & Rensen, S. S. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* **7**, 2930–2946 (2015).
63. Mishima, E. *et al.* Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.* **92**, 634–645 (2017).
64. Freeman, H. J., Kim, Y. S. & Slesinger, M. H. Protein digestion and absorption in man. *Am. J. Med.* **67**, 1030–1036 (1979).
65. Zeisel, S. H. & Da Costa, K. A. Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr. Rev.* **67**, 615–623 (2009).
66. Lees, H. J., Swann, J. R., Wilson, I. D., Nicholson, J. K. & Holmes, E. Hippurate: The natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J. Proteome Res.* **12**, 1527–1546 (2013).
67. Okabe, K., Yaku, K., Tobe, K. & Nakagawa, T. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J. Biomed. Sci.* **26**, 1–13 (2019).
68. HOLMAN, W. I. M. & DE LANGE, D. J. Metabolism of Nicotinic Acid and Related Compounds by Humans. *Nature* **165**, 604–605 (1950).
69. Martin, F. P. *et al.* Urinary metabolic phenotyping reveals differences in the metabolic status of healthy and inflammatory bowel disease (IBD) children in relation to growth and disease activity. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–15 (2016).
70. Velagapudi, V. R. *et al.* The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J. Lipid Res.* **51**, 1101–1112 (2010).
71. Harkness, R. HYPOXANTHINE , XANTHINE AND URIDINE IN BODY FLUIDS , INDICATORS OF ATP DEPLETION HPRT hyp MS urd xan Adenosine 5 ' -diphosphate Adenine phosphoribosyl-transferase Adenosine 5 ' 4riphosphate Cerebrospinal fluid Ethylenediaminetetraacetic acid High-p. *J. Chromatogr.* **429**, 255–278 (1988).
72. Møller, N. Ketone Body, 3-Hydroxybutyrate: Minor Metabolite - Major Medical Manifestations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, 2884–2892 (2020).
73. Sudo, N. Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–7 (2019).

INTERNETOVÉ ZDROJE

- I. Centers for Disease Control and Prevention [Dostupné z URL: <<https://www.cdc.gov/ibd/what-is-ibd.htm>> [cit. 22.04.2021]].
- II. Ranasinghe IR, Hsu R. Crohn Disease, Treasure Island (FL): StatPearls, Jan, 2021. [Dostupné z URL: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436021/>> [cit. 17.05.2021]].
- III. Human Metabolome Database – HMDB [Dostupné z URL: <<https://hmdb.ca/>> [cit. 17.05.2021]].
- IV. Biological Magnetic Resonance Data Bank – BMRB [Dostupné z URL: <<https://bmr.io/>> [cit. 17.05.2021]].

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|--------|
| Tabulka 4.1 Počet odebraných vzorků od myši pro jednotlivé odběry..... | - 24 - |
| Tabulka 4.2 Rozdělení myši do experimentálních skupin pro sledování změn vyvolaných zánětem. | - 26 - |
| Tabulka 5.1 Signifikantně změněné metabolity – mezi jednotlivými odběry a souhrnně. | - 29 - |
| Tabulka 5.2 Metabolity s variačním koeficientem vyšším než 0,5 u vícenásobného odběru. | - 30 - |
| Tabulka 5.3 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů ve fekálních extraktech. | - 37 - |
| Tabulka 5.4 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů v moči. | - 43 - |
| Tabulka 5.5 Rozdíly v relativních koncentracích metabolitů v séru. | - 48 - |
| Tabulka 5.6 Seznam identifikovaných metabolitů (s příslušnými chemickými posuny ¹ H). | - 50 - |