

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Bc. Irena Bušková

Možnosti využití veganské střevní mikrobioty jako prevence nebo podpůrné terapie
metabolických poruch spojených s obezitou

Possibilities of using vegan gut microbiota as a prevention or a supportive therapy for
metabolic disorders associated with obesity

Diplomová práce

Vedoucí práce / Školitelka:
doc. RNDr. Monika Cahová, Ph.D.

Odborný konzultant:
MUDr. David Funda PhD.

Praha, 2024

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, 8.8.2024

Bc. Irena Bušková

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat své školitelce doc. Monice Cahové, PhD. za její odborné vedení, vstřícný přístup a trpělivost během psaní diplomové práce.

Velký dík patří rovněž kolegům z laboratoře IKEM za podporu a příjemné pracovní prostředí. Děkuji také všem členům Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za vytvoření přátelského pracovního prostředí a zejména MUDr. Davidu Fundovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc s experimentální prací. Děkuji také kolegům z Gnotobiologické laboratoře v Novém Hrádku, kteří provedli speciální odchov a přípravu humanizovaných myší.

Děkuji také mým blízkým za morální podporu během studia.

Abstrakt

Transplantace střevní mikrobioty (fecal microbiota transfer, FMT) je metoda používaná k obnově narušené střevní mikrobioty. Zatím je schválena pouze pro léčbu rekurentní clostridiové infekce, ale na úrovni experimentálních studií se testuje její další využití, včetně léčby metabolických onemocnění. Tato diplomová práce zkoumá možnosti využití střevní mikrobioty od veganských dárců jako podpůrné terapie metabolických onemocnění spojených s obezitou, s využitím modelu humanizovaných myší. Hlavním cílem bylo zjistit, zda transplantace veganské mikrobioty a suplementace prebiotickou vlákninou inulinem mohou ovlivnit metabolické a imunologické parametry, jako je inzulinová rezistence, steatóza jater a změny v imunitních subpopulacích. V rámci studie byly germ-free (GF) myši inokulovány mikrobiotou od veganských dárců a následně vystaveny vlivu standardní nebo western-type diety (WD) samotné nebo suplementované rostlinnou vlákninou inulinem. Všechny pokusy jsme paralelně prováděli na myších stejného kmene z konvenčního chovu. Sledovali jsme vliv diet a suplementace inulinem na metabolické a imunologické parametry spojené s obezitou, konkrétně hmotnost, parametry glukózového metabolismu, frekvence subpopulací T lymfocytů a složení střevní mikrobioty.

Naše výsledky ukázaly, že samotný přenos mikrobioty od veganských dárců nechránil experimentální zvířata před negativními metabolickými dopady obezigení WD. Suplementace inulinem u humanizovaných myší však vedla k úpravě některých metabolických parametrů, konkrétně zlepšení glukózové homeostázy a normalizaci obsahu triglyceridů v játrech. Žádná z intervencí nevedla k významným změnám v subpopulacích T lymfocytů v lymfatických uzlinách, v Peyerových plátech, ani ve slezině. Hlavním zjištěním studie byla výrazná změna složení střevní mikrobioty v závislosti na dietě a suplementaci vlákninou, přičemž tyto změny korelovaly s projevy pozorovanými na fenotypové úrovni.

Výsledky této studie poukazují na interakci mezi dietou a střevní mikrobiotou. Prokázali jsme, že kombinace přenosu mikrobioty od veganských dárců a úpravy diety může být efektivní prevencí některých metabolických poruch spojených s obezitou. Otázka, zda by tato strategie byla účinná i v léčbě již rozvinutého metabolického onemocnění, vyžaduje další zkoumání.

Klíčová slova: střevní mikrobiota, GALT, diabetes 2. typu, humanizované myši, prebiotika

Abstract

Fecal Microbiota Transplantation (FMT) is a method used to restore disrupted gut microbiota. Currently, it is approved only for the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection, but its potential applications are being explored in experimental studies, including the treatment of metabolic diseases. This thesis investigates the potential use of gut microbiota from vegan donors as a supportive therapy for metabolic diseases associated with obesity, using a humanized mouse model. The main objective was to determine whether the transplantation of vegan microbiota and supplementation with the prebiotic fiber inulin could influence metabolic and immunological parameters, such as insulin resistance, liver steatosis, and changes in immune subpopulations. In this study, germ-free (GF) mice were inoculated with microbiota from vegan donors and subsequently exposed to the effects of either a standard or a Western-type diet (WD), with or without supplementation with plant-derived inulin fiber. All experiments were conducted in parallel on conventionally raised mice of the same strain. We evaluated the effects of diets and inulin supplementation on obesity-related metabolic and immunological parameters, specifically body weight, glucose metabolism, frequencies of T lymphocyte subpopulations, and gut microbiota composition.

Our results showed that the mere transplantation of microbiota from vegan donors did not protect experimental animals from the negative metabolic effects of the obesogenic WD. However, inulin supplementation in humanized mice led to improvements in some metabolic parameters, notably glucose homeostasis and normalization of liver triglyceride content. None of the interventions resulted in significant changes in T lymphocyte subpopulations in lymph nodes, Peyer's patches, or the spleen. A major finding of the study was the significant alteration in gut microbiota composition depending on diet and fiber supplementation, with these changes correlating with phenotypic outcomes observed at the physiological level.

The results of this study highlight the interaction between diet and gut microbiota. We demonstrated that the combination of microbiota transplantation from vegan donors and dietary modification could effectively prevent certain obesity-associated metabolic disorders. However, whether this strategy would also be effective in treating established metabolic diseases requires further investigation.

Keywords: gut microbiota, GALT, type 2 diabetes, humanized mice model, prebiotics

Seznam zkratek

| | | |
|-------|---|---|
| BCAA | Branched chain amino-acids | Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem |
| CDI | <i>Clostridioides difficile</i> infection | Infekce <i>Clostridioides difficile</i> |
| CV | Conventional microbiota | Konvenční mikrobiota |
| EAE | Experimental autoimmune encephalomyelitis | Experimentální autoimunitní encefalomyelitida |
| FMT | Fecal microbiota transfer | Transplantace fekální mikrobioty |
| GF | Germ-free | Bezmikrobní |
| GLUT4 | Glucose transporter type 4 | Glukózový transportér typu 4 |
| GPR | G protein-coupled receptor | Receptor spřažený s G proteinem |
| HDAC | Histone deacetylase | Histon-deacetyláza |
| HFD | High-fat diet | Dieta bohatá na tuk |
| IBD | Inflammatory bowel syndrome | Idiopatický střevní zánět |
| ILN | Iliac lymph node | Lymfatické uzliny třísel |
| IR | Insulin resistance | Inzulínová rezistence |
| MLN | Mesenteric lymph nodes | Mezenterické lymfatické uzliny |
| NAFLD | Non-alcoholic fatty liver disease | Nealkoholové postižení jater |
| NASH | Non-alcoholic steatohepatitis | Nealkoholická steatohepatitida |
| PLN | Pancreatic lymph node | Pankreatická lymfatická uzlina |
| PP | Peyer's patches | Peyerovy pláty |
| PSA | Polysaccharide A | Polysacharid A |
| SCFA | Short-chain fatty acids | Mastné kyseliny s krátkým řetězcem |
| SD | Standard diet | Standardní dieta |
| SPL | Spleen | Slezina |
| TAG | Triacylglycerides | Triacylglyceridy |
| T2D | Type 2 diabetes | Cukrovka 2. typu |
| TMA | Trimethylamine | Trimethylamin |
| VG | Vegan microbiota | Mikrobiota od veganských dárců |
| WD | Western diet | Dieta západního typu |

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 6 |
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Přehled literatury | 10 |
| 2.1. Mikrobiota a dysbióza | 10 |
| 2.2. Transplantace mikrobiomu a léčebné indikace | 11 |
| 2.3. Mikrobiota a imunita | 13 |
| 2.3.1. Vliv mikrobioty na regulační T lymfocyty | 13 |
| 2.4. Imunologické faktory v patogenezi inzulinové rezistence, cukrovky 2. typu a steatózy jater | 15 |
| 2.5. Veganská strava a mikrobiota | 18 |
| 2.5.1. FMT mikrobioty od veganských dárců a vliv suplementace | 18 |
| 3. Cíle diplomové práce | 20 |
| 4. Metody a materiál | 21 |
| 4.1. Zpracování mikrobioty od veganských dárců | 21 |
| 4.1.1. Výběr dárců a odběr vzorků | 21 |
| 4.1.2. Homogenizace vzorků | 21 |
| 4.1.3. Určení celkového počtu bakterií a pooling inokulátu | 22 |
| 4.2. Experimentální zvířata a podávané diety | 22 |
| 4.2.1. Příprava pokusné skupiny myší – transplantace VG mikrobioty | 23 |
| 4.2.2. Experimentální diety | 23 |
| 4.2.3. <i>In vivo</i> testy | 24 |
| 4.2.4. Odběr vzorků | 24 |
| 4.3. Měření obsahu triglyceridů v játrech | 24 |
| 4.4. Izolace DNA a příprava knihovny | 25 |
| 4.4.1. Příprava DNA | 25 |
| 4.4.2. První kolo PCR pro 16S rRNA | 25 |
| 4.4.3. Přečištění a ředění produktů | 25 |
| 4.4.4. Druhé kolo PCR (připojení indexů) | 26 |
| 4.4.5. Pooling vzorků | 26 |
| 4.5. Sekvenování nové generace | 26 |
| 4.6. Bioinformatická analýza mikrobiomu | 27 |
| 4.7. Izolace lymfocytů a cytometrická analýza | 27 |
| 4.7.1. Použité materiály a protilátky | 27 |
| 4.7.2. Postup | 28 |
| 4.8. Statistické zpracování výsledků | 28 |
| 4.8.1. Analýza fyziologických parametrů | 28 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.8.2. | Analýza cytometrických dat..... | 28 |
| 4.8.3. | Určení alfa diverzity | 29 |
| 4.8.4. | Určení beta diverzity..... | 29 |
| 4.8.5. | Univariační analýza mikrobioty..... | 29 |
| 4.8.6. | Klasifikační modely | 29 |
| 4.8.7. | Korelační sítě..... | 29 |
| 5. | Výsledky | 30 |
| 5.1. | Cytometrická analýza | 30 |
| 5.1.1. | Gating strategie CD3+ CD4+ lymfocytů | 30 |
| 5.1.2. | Gating strategie subpopulace FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ | 31 |
| 5.1.3. | Gating strategie subpopulace CD3+ CD4+ IFN- γ +..... | 32 |
| 5.1.4. | Gating strategie subpopulace CD3+ CD4+ IL-10+ | 33 |
| 5.1.5. | Vliv diet na zastoupení subpopulací lymfocytů v lymfatických uzlinách a slezině | 34 |
| 5.2. | Analýza složení střevní mikrobioty | 44 |
| 5.2.1. | Složení střevní mikrobioty před dietní intervencí..... | 44 |
| 5.2.2. | Vliv dietní intervence na složení mikrobioty ve slepém střevě | 46 |
| 5.2.3. | Složení mikrobioty jako prediktor příslušnosti ke skupině | 48 |
| 5.2.4. | Analýza diskriminačních taxonů mezi dietními skupinami | 49 |
| 5.2.5. | Integrativní analýza..... | 52 |
| 6. | Diskuse | 53 |
| 7. | Závěr | 57 |
| 8. | Přílohy | 58 |
| 8.1. | Přílohy k metodám | 58 |
| 8.2. | Přílohy k výsledkům | 62 |
| 9. | Seznam zdrojů..... | 76 |

1. Úvod

Výzkum střevní mikrobioty se v posledních letech stal významnou oblastí zájmu napříč mnoha vědními obory. Mikrobiota má zásadní vliv na různé fyziologické procesy a hraje klíčovou roli ve zdraví a onemocnění. Rozvoj technologií sekvenování DNA umožnil hlubší porozumění složení a funkcí mikrobioty, což otevřelo nové možnosti pro léčbu různých onemocnění prostřednictvím ovlivnění složení mikrobioty, včetně fekální transplantace mikrobioty (FMT).

FMT je terapeutická metoda, která obnovuje narušenou střevní mikrobiotu pomocí přenosu stolice od zdravého dárce na pacienta. Tato metoda se ukázala jako účinná při léčbě recidivující infekce *Clostridioides difficile*, a současný výzkum naznačuje její potenciál při léčbě dalších onemocnění, jako je obezita, metabolický syndrom a inzulinová rezistence. Inzulinová rezistence, stav charakterizovaný sníženou schopností těla odpovídat na inzulin, je klíčovým faktorem v patogenezi diabetu 2. typu a často je doprovázena hromaděním tuku v játrech (steatózou jater), které může vést k nealkoholové steatohepatitidě (NASH).

Veganská strava, charakterizovaná vysokým obsahem vlákniny a absencí živočišných produktů, byla spojena s pozitivními účinky na zdraví střevní mikrobioty a metabolické zdraví. Dosud však není objasněno, zda příznivý efekt veganské diety na metabolické zdraví je důsledkem výlučně jejího složení, nebo zda se na něm podílí i střevní mikrobiota. Formulovali jsme hypotézu, že přenos mikrobioty od veganského dárce může mít protektivní účinky vzhledem k obezitě, inzulinové rezistenci a dalším metabolickým poruchám indukovaným western-type dietou. Dále jsme se rozhodli ověřit, zda je možné efekt dárcovské mikrobioty na příjemce zvýšit suplementací inulinem, tj. prebiotickou vlákninou, a zda může dále podporovat růst prospěšných bakterií ve střevě a zvýšit produkci protizánětlivých mikrobiálních metabolitů.

Tato diplomová práce zkoumá vliv FMT střevní mikrobioty od veganského dárce a prebiotika inulinu v pro-diabetogenním a obezitogenním prostředí na modelu humanizovaných myší. Zaměřuje se na inzulinovou rezistenci a steatózu jater vyvolaných obezitou jako na „autozánětlivá“ onemocnění, která lze zvrátit stimulací regulujících imunologických faktorů, zejména T regulačních lymfocytů. Cílem je zjistit, zda mikrobiota od veganského dárce a suplementace inulinem působí protektivně na metabolické a imunologické projevy spojené s diabetem 2. typu a steatózou jater. Výsledky této studie by mohly přinést nové poznatky o interakci mezi dietou, střevní mikrobiotou a imunitním systémem a naznačit nové možnosti pro terapeutické intervence při metabolických onemocněních.

2. Přehled literatury

2.1. Mikrobiota a dysbióza

Mikrobiota je v posledních letech často skloňovaný pojem napříč mnoha vědními obory. Zasahuje nejen do mikrobiologie, gastroenterologie a nutričních věd, ale i do imunologie, neurologie a dalších oborů medicíny. Přestože pojmy mikrobiota a mikrobiom představují rozdílné fenomény, v literatuře bývají často zaměňované. Mikrobiota je definována jako soubor mikroorganismů v konkrétním prostředí (střevo, ústní dutina, pochva), zatímco mikrobiomem se rozumí soubor genomů ze všech mikroorganismů v daném prostředí, který zahrnuje nejen společenství mikroorganismů (mikrobiotu), ale také mikrobiální struktury a metabolity (Berg et al., 2020). Dá se tedy říct, že mikrobiom je širší pojem zahrnující také definici mikrobioty. Tato práce se zabývá zejména střevní mikrobiotou.

Lidský střevní mikrobiom se stal na začátku 21. století populárním předmětem výzkumu. Obzvláště velký díl na této přízni nese spuštění „Human Microbiome Project“ v roce 2007, který měl za cíl charakterizovat mikrobiální společenství různých prostředí lidského těla a analyzovat jejich roli ve zdraví a onemocněních (Turnbaugh et al., 2007). Od té doby vzniklo na toto téma velké množství publikací, odkazujících na kauzální roli mikrobiomu ve zdraví a různých typech onemocnění (Hernández-Ceballos et al., 2021; Sommer and Bäckhed, 2013; Tan et al., 2022; Yoo et al., 2020), avšak přesto je mikrobiom stále relativně málo probádán. Částečně proto, že v tuto chvíli neexistuje univerzální druhová definice zdravého mikrobiomu, což je dáno několika faktory. Jedním z klíčových důvodů je enormní variabilita mikrobiomu mezi jednotlivci, která je ovlivněna genetikou, stravou, životním stylem, environmentálními a dalšími, zatím neidentifikovanými, faktory (Joos et al., 2024). Každý člověk má tedy unikátní mikrobiální složení a z nich vyplývající metabolity a také unikátní komplexitu interakcí mezi mikrobiálními druhy navzájem nebo s hostitelem. Mikrobiom je vysoce dynamický a mění se nejen v průběhu života jedince, ale i v reakci na krátkodobé změny, jako změna stravy (dodržování diet), fyzická námaha, nebo užívání antibiotik a jiných léků (Hasan and Yang, 2019). Navíc stále existuje mnoho aspektů interakce mikrobiom-hostitel, které nejsou dostatečně prozkoumány, včetně role virů, hub a archeí, a to jak těch známých, tak i ještě neidentifikovaných druhů (Joos et al., 2024).

Se současnými poznatky za „zdravou mikrobiotu“ považujeme takovou, která splňuje určitá obecná kritéria: má vysokou diverzitu mikrobiálních druhů a vysoké zastoupení komenzálních druhů, je stabilní a chrání své hostitele před invazí patogenních mikroorganismů. Mimo jiné moduluje imunitní systém hostitelů a tím dále přispívá k prevenci různých onemocnění a produkuje metabolity (například SCFA), které jsou prospěšné pro symbionta-hostitele (Joos et al., 2024; Marietta et al., 2020).

V mikrobiomovém výzkumu se často naráží na pojem „rovnováha“ mezi druhy. Tato rovnováha znamená, že žádný mikrobiální druh nepřevládá nad ostatními do takové míry, která by negativně ovlivňovala zdraví hostitele. Je nutno zdůraznit, že patogenní a oportunně patogenní mikroorganismy mohou být ve střevě přítomny neustále, avšak převaha a kompetice komenzálních a symbiotických mikroorganismů ve „zdravé mikrobiotě“ jim nedovoluje množení do takových počtů, které by byly pro zdraví hostitele nepříznivé (Chow and Mazmanian, 2010; Coyte and Rakoff-Nahoum, 2019). Pokud dojde k narušení této rovnováhy, může dojít ke stavu známému jako dysbióza.

Dysbióza je těžko definovatelná podobně jako zdravá mikrobiota, a to ze stejných důvodů. Pro dysbiotickou mikrobiotu je charakteristické přemnožení patobiontů, ztráta komenzálů a ztráta diverzity. Patobionti se typicky vyskytují v nízkých počtech, ale při přemnožení dokážou vyvolat střevní infekci a zánět. Dysbióza střevní mikrobioty narušuje integritu střevní bariéry, což umožňuje vstup

mikrobiálních molekul mezi narušenými spoji epitelu do lamina propria. Tento proces stimuluje imunitní buňky ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α , IFN- γ a IL-17, což vede k lokálním i systémovým zánětlivým reakcím a přispívá k rozvoji chronických zánětlivých onemocnění, jako je například idiopatický zánět střev či nealkoholová steatohepatitida (Zhao et al., 2023). Dysbióza vzniká z mnoha známých i zatím neznámých příčin, například antibiotická léčba či jiné léky, dlouhodobý stres, nevyvážený jídelníček, nedostatečná hygiena či infekce. Jedná se tedy o stav, kdy mikrobiota vykazuje nerovnováhu mezi druhy nebo vytváří prostředí nepříznivé pro soužití mikroorganismů a imunitního systému hostitele (Levy et al., 2017; Marietta et al., 2020). Pro jednoduchost se dá dysbióza definovat negací, tedy když není splněno jedno z kritérií pro zdravou mikrobiotu.

Dysbióza může být přechodná, zcela asymptomatická, nebo také velmi stabilní a tím dlouhodobě, až chronicky, ovlivňovat zdraví jedince. Spojuje se s celou řadou onemocnění, jako jsou poruchy trávení, syndrom dráždivého tračníku, idiopatické záněty střev, metabolický syndrom nebo kolorektální karcinom, a může přispívat ke zvýšené propustnosti střevní bariéry, což zvyšuje riziko infekcí a imunitních dysfunkcí (Metwaly et al., 2022). Tato vazba mezi dysbiózou a imunitním systémem se odráží také v mikrobiotě pacientů s autoimunitními onemocněními, jako jsou diabetes 1. typu, celiakie, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida nebo Sjögrenův syndrom. U osob s těmito onemocněními je popisováno odlišné složení mikrobiomu než u osob, které těmito chorobami netrpí a jsou považovány za zdravé kontroly (Marietta et al., 2020).

Kvůli tomu, že dysbiózu zatím nelze přesně charakterizovat, jsou výzkumy mikrobiomu postavené na korelaci abnormální přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních druhů a konkrétního onemocnění. Určit, co je abnormální, obvykle vyžaduje kontrolní mikrobiotu, kterou považujeme za „zdravou“. Obvyklá kontrola u myši je takzvaná „specific pathogen free“ (SPF) mikrobiota, která je extrémně proměnlivá, což může způsobovat problémy v reproducibilitě pokusů. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny pozitivně definované pokusné mikrobioty, které mohou v budoucím výzkumu pomoci tento efekt eliminovat (Darnaud et al., 2021).

Je však důležité uvést, že zánětlivé onemocnění může být jak důsledkem dysbiózy, tak i její příčinou, proto může být obtížné určit, zda byla příčina onemocnění v dysbióze samotné, zda naopak byl zánět spouštěčem změny v dysbiotickou mikrobiotu, nebo zda se jedná o pouhou korelaci bez přímé souvislosti (Arthur et al., 2012; Kehrmann et al., 2019; Levy et al., 2017). Dysbiózu proto nelze vnímat jako primární příčinu onemocnění, nýbrž pouze jako součást multifaktoriálního mechanismu.

2.2. Transplantace mikrobiomu a léčebné indikace

FMT neboli fecal microbiome transplantation (česky „transplantace fekální mikrobioty“), je terapeutická metoda založená na infuzi dárcovského vzorku stolice do gastrointestinálního traktu příjemce. Cílem této metody je obnovit narušenou mikrobiální diverzitu pacienta neboli dysbiózu.

Experimentální počátky FMT ve formě tak, jak ji známe dnes, sahají až do padesátých let minulého století, kdy se s její pomocí dařilo léčit pseudomembranózní kolitidu ještě před tím, než byla známa její příčina (Eiseman et al., 1958). Dnes se již metoda rutinně využívá pro terapii recidivující a rezistentní infekce *Clostridioides difficile* (CDI), typického dysbiotického stavu, a to s vysokou úspěšností kolem 90% (Baunwall et al., 2021; Kelly et al., 2021; Roshan et al., 2020). CDI způsobuje již zmíněnou pseudomembranózní kolitidu, což je životu nebezpečné onemocnění tlustého střeva doprovázené silnými průjmy a silnou bolestí. Za hlavní rizikový faktor vzniku CDI je považováno užívání některých antibiotik (například aminopeniciliny a fluorochinolony) (Rafey et al., 2023). Konvenční léčba dalšími antibiotiky (Metronidazol a Vankomycin) (Shen and Surawicz, 2008) může vést ke zhoršení situace tím, že dodatečně narušuje již tak antibiotiky oslabený střevní mikrobiom a umožňuje snadnou kolonizaci

rezistentním kmenům *C. difficile*. Taková rezistentní infekce se již velmi těžko léčí dalšími antibiotiky a obnovení komplexního střevního mikrobiomu pomocí FMT je téměř jedinou terapeutickou možností.

Kromě toho jsou rezistentní kmeny *C. difficile* potenciálním zdrojem nemocniční nákazy i pro ostatní pacienty (Roshan et al., 2020), a proto má prevence jejího vzniku vysokou prioritu v zájmu veřejného zdraví. Právě FMT se proto jeví jako vítaná změna paradigmatu v léčbě CDI. Nabízí možnost nejen účinně bojovat proti rezistenci, ale také obnovit střevní mikrobiom a jeho přirozenou odolnost vůči patogenům díky jevu zvanému kolonizační rezistence (Caballero-Flores et al., 2023; Khan et al., 2021). Kolonizační rezistence je vlastnost mikrobiálního společenství, která napomáhá k jeho stabilitě a udržení rovnováhy mezi druhy. Mezi mechanismy, které se na udržení stabilního stavu podílejí, patří kompetice o zdroje živin a prostor, produkce antimikrobiálních látek, které inhibují růst konkurenčních mikroorganismů, stimulace imunitních reakcí hostitele proti patogenním mikroorganismům, nebo jiné modulační prostředky tak, aby bylo méně příznivé pro invazivní patogeny, například regulace pH (Khan et al., 2021).

Vzhledem k tomu, že se již dlouhodobě nalézají spojitosti s dysbiózou nejen u obezity a metabolického syndromu, ale dokonce i u autoimunitních a neurologických onemocnění (Jiang et al., 2015; Marietta et al., 2020), se těší FMT velkému zájmu ve výzkumu nových terapeutických metod. Současný rozvoj metod a pokroky v pochopení složení a funkce střevní mikrobioty vedly k rozšíření potenciálních aplikací FMT daleko za rámec jejího původního použití.

Obzvláště obezita a metabolický syndrom přitahují značnou pozornost vzhledem k jejich naléhavě rostoucí globální prevalenci. V nedávném pokusu bylo zjištěno, že transplantace fekální mikrobioty FMT vedla u db/db myši k výraznému zlepšení inzulinové senzitivity. FMT výrazně snížila hladiny glukózy nalačno a také zlepšila toleranci glukózy, což bylo hodnoceno pomocí OGTT testu. Studie navíc uvádí významný pokles indexu HOMA-IR, který indikuje snížení inzulinové rezistence. Studie rovněž poukazuje na imunologické změny, jako je zvýšení exprese IL-10 a snížení exprese TNF- α v tkáni tenkého střeva po podání FMT, což ukazuje na snížení zánětlivé reakce ve střevní sliznici. Tento protektivní efekt byl pozorován v kontextu, kdy byly myši před podáním FMT ošetřeny antibiotiky, což pomohlo eliminovat jejich původní střevní mikrobiotu a umožnilo kolonizaci transplantované mikrobioty (Chen et al., 2023).

V další studii lidští pacienti s obezitou podstoupili terapii kombinující metformin a FMT s mikrobiotou od štíhlých dárců bez předchozího podávání antibiotik, tato skupina byla srovnána s kontrolní skupinou pacientů s obezitou užívající pouze metformin. Ve srovnání s kontrolní skupinou FMT terapie u příjemců vedla k signifikantnímu zlepšení inzulinové senzitivity a snížení BMI, avšak vliv na BMI byl klinicky málo významný (Wu et al., 2022).

V předchozích studiích lze pozorovat, že zatím není jasně určeno, zda by mělo být součástí FMT terapie předchozí podávání antibiotik a jedná se o často diskutovanou otázku. Předpokládá se, že původní mikrobiota hostitele by měla být vůči dárcovské mikrobiotě rezistentní, a tedy podávání antibiotik se jeví na první pohled jako logický krok pro snížení tohoto efektu a tím zlepšení šancí pro přijetí větší části dárcovské mikrobioty. Pokusy zkoumající tento efekt poukazují na „dysbiózu vyvolanou antibiotiky“ jako na pozitivní faktor pro lepší přijetí dárcovské mikrobioty (Podlesny et al., 2022; Smith et al., 2022). Existuje však i důkaz vyjadřující opačný názor, že podávání antibiotik před FMT naopak snižuje šance na přijetí transplantované mikrobioty (Singh et al., 2022). „Kolonizační rezistence“ mikrobioty příjemce FMT tedy není zatím dokonale pochopena a otázka používání antibiotik a jiných procedur pro přípravu na FMT zatím není zodpovězena.

Výzkum posledních let přináší přesvědčivé důkazy, že střevní mikrobiota hraje významnou roli v patogenezi metabolických poruch a související imunitní odpovědi. FMT by tedy mohla představovat způsob, jak složení střevního mikrobiomu manipulovat, avšak v tuto chvíli nemáme dost informací k tomu, abychom tento nástroj mohli dostatečně personalizovaně a cíleně využívat.

2.3. Mikrobiota a imunita

Rozpoznání úlohy střevní mikrobioty jako klíčového hráče ve zdraví a nemoci hostitele vedlo k rozsáhlému zkoumání interakcí mezi dietou, mikrobiotou a imunitním systémem. Tento vztah je zprostředkován mnoha různými mechanismy, které ještě nejsou zcela odkryté. Na lokální úrovni ve střevech mikrobiota podporuje vývoj a udržení rovnováhy střevního imunitního systému mezi ochranou proti patogenům a tolerancí vůči symbiontům. Taktéž na systémové úrovni se objevují důkazy o protizánětlivých účincích některých střevních metabolitů (Muske and Knoop, 2023).

Zatím byly odhaleny dvě možné cesty, jakými střevní mikrobiota moduluje imunitní systém. Tou první je aktivace PRR (pattern recognition receptors), jako například Toll-like receptorů nebo protilátek. Mezi látkami aktivující PRR stojí za zmínku například PSA (Polysacharid A), které aktivují TLR2. Za druhou identifikovanou cestu je považována produkce SCFA (Short-chained fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem), které stimulují specifické SCFA receptory. SCFA se v práci věnují zejména, neboť jsou významným produktem fermentace inulinu (viz dále v kapitole 2.5.1.) (Marietta et al., 2020; Xie et al., 2024).

Řada střevních bakterií, např. *Bacteroides fragilis*, *Prevotella sp.* (kmen Bacteroidota) nebo *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis*, *Anaerostipes butyraticus* (kmen Bacillota) fermentuje složité sacharidy a produkuje SCFA (Glick-Bauer and Yeh, 2014; Rangan and Mondino, 2022; Rios-Covian et al., 2017). Jedná se o mastné kyseliny s méně než šesti uhlíkovými atomy, například acetát, propionát a butyrát. Primárně slouží jako zdroj energie pro kolonocyty, ale také snadno difundují přes střevní epitel a procházejí do periferní krve a jater, čímž mohou působit na systémové úrovni (Muske and Knoop, 2023; Rangan and Mondino, 2022).

SCFA, obzvláště butyrát, přímo inhibují činnost histon deacetyláz (HDAC), čímž ovlivňují acylaci histonů a následně genovou expresi, diferenciaci, proliferaci nebo apoptózu hematopoetických buněk. Konkrétně bylo zjištěno, že snižují aktivaci NFκB a sekreci TNF-α, a to u lidských PBMCs, které byly stimulovány LPS *in vitro* (Usami et al., 2008). TNF-α zvyšuje permeabilitu střev a indukuje apoptózu infikovaných buněk střevního epitelu, čímž zvyšuje prozánětlivou odpověď v *lamina propria*. Jeho systémově zvýšená produkce je typická pro zánětlivá onemocnění střev, například Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu (Pagnini and Cominelli, 2021; Ślebioda and Kmiec, 2014).

2.3.1. Vliv mikrobioty na regulační T lymfocyty

Mikrobiom má zásadní roli ve vývoji T regulačních buněk, které jsou důležité pro udržení imunitní homeostázy a prevenci autoimunitních onemocnění a nepřiměřeného zánětu. Za fyziologických podmínek je v *lamina propria* přítomno mnoho efektorových lymfocytů Th1 a Th17 fenotypu, které udržují pohotovost v takzvaném fyziologickém zánětu. Přítomné efektorové CD4+ T buňky produkují mimo jiné IFN-γ a frekvence těchto lymfocytů odráží, zda a jak velká zánětlivá reakce na daném místě probíhá. Prozánětlivý potenciál těchto buněk regulují T regulační buňky (Treg) produkující IL-10 (Ivanov et al., 2022; Yoo et al., 2020).

Mezenterické lymfatické uzliny, Peyerovy pláty a *lamina propria* jsou místem vzniku velké subpopulace indukovaných T regulačních buněk díky vystavování antigenům pocházejícím ze střevních mikroorganismů a potravy (Yoo et al., 2020). Zároveň jsou místní lymfocyty vystavovány SCFA, které podporují diferenciaci konvenčních CD4+ T lymfocytů na Treg a jejich následnou proliferaci tím, že

podporují expresi FoxP3 a IL10 (Furusawa et al., 2013; Hu et al., 2022). Analýza obsahu Peyeroých plátů může poskytnout pohled na bezprostřední a lokální reakci lymfocytů na mikrobiotu a její metabolity *in situ*. Mezenterické uzliny centralizují imunitní odpověď celého střevního traktu a dochází zde k další diferenciaci ovlivněnou mikrobiálními produkty migrujícími z *lamina propria*. Poskytují tak další vhled do střevní imunitní odpovědi lymfocytů na mikrobiom (Wiechers et al., 2021).

V důsledku podávání vlákniny a samotného butyrátu bylo pozorováno zvýšení exprese FoxP3 a L-10 a zlepšení symptomů například u myšního modelu střevní kolitidy, ve srovnání s myšmi, kterým nebyla podávána vláknina ani butyrát (Furusawa et al., 2013). Podobně působilo podávání dietního doplňku bohatého na rezistentní škroby (který zvýšil produkci butyrátu) pacientům s cukrovkou 1. typu. Oproti pacientům bez dietní intervence u nich byla v periferní krvi zaznamenána expanze FoxP3+ lymfocytů, zvýšená exprese IL-10 a snížená hladina IFN- γ , IL-6 a TNF- α (Bell et al., 2022).

SCFA působí jako ligandy receptorů spřažených s G-proteiny (například propionát aktivuje GPR43 a GPR41) a jejich aktivace je spojována s expanzí T regulačních buněk ve střevech (Ang and Ding, 2016; Furusawa et al., 2013). Kromě toho bylo zjištěno, že SCFA, které difundovaly do krevního oběhu, podporují hematopoézu dendritických buněk se sníženou schopností aktivovat Th2 efektorové lymfocyty (snížená exprese MHCII a CD40), v důsledku čehož bylo pozorováno zmírnění alergických a astmatických reakcí v plicích (Trompette et al., 2014). V neposlední řadě byl nalezen také inhibiční vliv SCFA na IFN- γ signalizaci a proliferaci Th1 lymfocytů, což bylo pozorováno v mezenterických uzlinách krys (Cavaglieri et al., 2003) a u myšního modelu experimentální autoimunitní uveitidy (Nakamura et al., 2017). Díky těmto a mnoha podobným zjištěním se SCFA považují za faktor, který vede k výraznému zmírnění zánětlivých onemocnění na lokální i systémové úrovni. V rámci výzkumu mikrobiálních metabolitů a T2D byly identifikovány podobné léčebné účinky a jsou v ně vkládány naděje pro potenciální terapii různých onemocnění včetně cukrovky 2. typu (Bastos and Rangel, 2022; Rangan and Mondino, 2022), avšak zatím neexistují pokusy, které by testovaly jejich vliv na FoxP3 a IFN- γ lymfocyty u modelu T2D.

SCFA se vážou na receptor GPR43 T lymfocytů, čímž indukují fosforylaci jeho podjednotky $G\alpha_q$, a aktivují kaskádu PLC. Další downstream aktivace pravděpodobně vedou k inhibici HDAC6 a HDAC9. Podrobný molekulární mechanismus spojující aktivaci GPR43 a inhibici HDAC zatím není popsán, je však známo, že inhibice HDAC je na GPR43 přímo závislá, což vyplývá z pokusu na *Ffar2*^{-/-} myších neexprimujících GPR43, kde inhibice HDAC6 a HDAC9 byla závislá na přítomnosti tohoto receptoru (Smith et al., 2013). Inhibice HDAC6 způsobuje, že se zvyšuje acetylace histonů H3 v regionu v nekódující sekvenci FoxP3, což umožňuje zesílenou expresi transkripčního faktoru FoxP3 (Furusawa et al., 2013). Tento mechanismus vede k *de novo* diferenciaci CD4+ T lymfocytů na regulační fenotyp CD4+ FoxP3+ IL-10+ ve střevní *lamina propria* a také expanzi Helios+ Treg lymfocytů, které jsou původem z thymu, tzv. tTreg lymfocyty (Cosovanu and Neumann, 2020; Smith et al., 2013).

FoxP3 je známým transkripčním faktorem exprese IL-10, avšak nejedná se o jediný stimulační faktor. Subpopulace intestinálních Th1 a B regulačních lymfocytů rovněž zvýší produkci IL-10 po vystavení SCFA, a to pravděpodobně díky zvýšení aktivace mTOR komplexu (Luu and Visekruna, 2019; Park et al., 2015; Sun et al., 2018). IL-10 je nezbytný pro udržení mutualistické homeostázy mezi mikrobiotou a imunitním systémem a v jeho nepřítomnosti dochází k přílišné aktivaci slizniční Th17 ve střevní *lamina propria* (Li et al., 2015; Wilke et al., 2011).

Stimulace Treg nebo efektorových buněk neprobíhá pouze na lokální úrovni střev, ale jejich neobvykle zvýšenou frekvenci v důsledku stimulace SCFA lze pozorovat na periférii v lymfatických uzlinách a/nebo systémově (Muske and Knoop, 2023; Ney et al., 2023; Tang and Li, 2021). Vyšší frekvenci Treg

v důsledku vlivu bakteriálních metabolitů lze nalézt například ve slezině a cervikálních lymfatických uzlinách (Bhaskaran et al., 2018; Du et al., 2022).

Některé komensální bakterie, zejména *Bacteroides fragilis*, produkují polysacharid A (PSA), který je rozeznáván TLR2 přímo na T lymfocytech a dendritických buňkách v *lamina propria*. Rozeznání PSA přímo podporuje expresi IL-10 v T lymfocytech a také podporuje dendritické buňky v produkci IL-10 a TGF- β , což dále podporuje diferenciaci Treg (Round et al., 2011).

Jsou tedy důvody k předpokladům, že FMT může vést ke změně zastoupení Treg lymfocytů díky změně produkovaných metabolitů mikrobiotou, což může v důsledku příznivě ovlivnit zdraví v případech autoimunitních či zánětlivých onemocnění.

2.4. Imunologické faktory v patogenezi inzulinové rezistence, cukrovky 2. typu a steatózy jater

Inzulinová rezistence je definována jako poškození absorpce glukózy zprostředkované inzulinem ve tkáních, buňky tedy nedokážou dostatečně využít glukózu z krve a glykemie činností inzulinu neklesá. Tento proces může být zpočátku kompenzován zvýšenou produkcí inzulinu pankreatem, ale pokud se inzulinová rezistence neléčí a zhoršuje se, pankreas již není schopen produkovat dostatek inzulinu na udržení normálních hladin glukózy. Tento stav nakonec vede k rozvoji T2D, který lze vnímat jako „extrémní stav na spektru inzulinové rezistence“ (Ruze et al., 2023). U některých pacientů s obezitou s inzulinovou rezistencí se diabetes nevyvíjí díky dostatečné kompenzaci pankreatických buněk (Donath and Shoelson, 2011).

Patofyziologie tohoto onemocnění vede k postupnému vyčerpání beta buněk slinivky, které inzulin produkují (Wysham and Shubrook, 2020). Výsledkem je chronická hyperglykemie, která může vést k typickým komplikacím, včetně kardiovaskulárních onemocnění, nefropatie, retinopatie a neuropatie. V posledních letech jeho prevalence prudce roste a čím dál více se vyskytuje i u dětí (Pappachan et al., 2024). Tento růst je paralelní s rostoucím výskytem obezity a „západním stylem života“, se kterými je tento typ cukrovky nejčastěji spojován (Kopp, 2019). Komplexní etiologie T2D je příliš obsáhlé téma, než abych se ho pokusila zahrnout v této diplomové práci, proto se budu pohybovat zejména v kontextu obezity, imunologie a mikrobiomu.

Nevhodná strava, která je asociována s vysokým výskytem obezity a cukrovky, je typická nedostatečným příjmem vlákniny, celozrnných obilovin, ovoce, ořechů a semen, a naopak nepřiměřeným příjmem sladkých nápojů, rafinovaného cukru, rafinovaných obilovin, zpracovaného masa a zvýšeným příjmem kalorií obecně (O’Hearn et al., 2023). Tento jídelníček se v literatuře často označuje jako „western diet“, neboli západní dieta. Western diet je rizikovým faktorem rozvoje obezity, inzulinové rezistence a zánětlivého onemocnění jater (Rakhra et al., 2020; Yang et al., 2023). Podávání western diety myším navozuje poruchy glukózového metabolismu v řádu týdnů (Demaria et al., 2023; Schierwagen et al., 2015). Poslední dobou se začínají odkrývat nové mechanismy jejího negativního působení na organismus, a to prostřednictvím remodelace mikrobioty (Yang et al., 2023). Western diet proto v této studii slouží jako pro-diabetogenní faktor vyvolávající změnu mikrobioty a obezitu vedoucí k narušené glukózové homeostáze a steatóze jater.

Vlivem buněčného stresu a z něj vyplývajícího chronického zánětu v pankreatu beta buňky postupně ztrácejí schopnost produkovat dostatek inzulinu pro udržení normální glykemie. Mezi faktory vyvolávající buněčný stres a apoptózu beta buněk patří stres endoplazmatického retikula, usazeniny amyloidů, ektopické tukové usazeniny, lipotoxicita a glukotoxicita (Donath and Shoelson, 2011). Obzvláště vysoké hladiny glukózy a mastných kyselin způsobují nadměrnou aktivaci TNFR-5, který

aktivuje prozánětlivé dráhy NF κ B a STAT-1 a signální dráhu apoptózy přes aktivaci kaspáz (Bagnati et al., 2016). Všechny tyto faktory jsou spojovány s obezitou a následným zánětem nebo jsou jejich následkem.

V cukrovce hrají velkou roli buňky přirozené imunity, avšak nesporná je i role adaptivní imunity. Experimentálně bylo pozorováno zlepšení symptomů cukrovky u dietně indukovaných modelů T2D po depleci B i T buněk (Tsai et al., 2015; Winer et al., 2012). Zánětlivá reakce provázející T2D má v určitých aspektech až autoimunitní charakteristiky, například přítomnost autoprotilátek proti proteinům beta buněk pankreatu (GADA, ICA, IA-2A, ZnT8A) a autoreaktivních lymfocytů. Takové případy jsou poměrně vzácné, ale poukazují na fluiditu etiologie T2D (de Candia et al., 2019). Tato zjištění ukazují, že cukrovka 2. typu má prvky „autozánětlivého“ onemocnění, ve kterém kauzální roli zastávají mimo jiné i lymfocyty (Donath and Shoelson, 2011).

U pacientů s T2D je pozorován zvýšený výskyt IFN- γ exprimujících buněk, který je obzvláště pozorován v tukové tkáni. Je také spojován s narušenou glukózovou homeostázou a pozitivně koreluje s BMI (Jagannathan-Bogdan et al., 2011; Kintscher et al., 2008; Winer et al., 2009). Ukazuje se, že IFN- γ zeslabuje inzulinovou signalizaci v lidských adipocytech tím, že snižuje expresi inzulinového receptoru, signální molekuly IRS-1 i glukózového transportéru GLUT4 (McGillicuddy et al., 2009). A naopak, IFN- γ deficientní myši vykazují zlepšení inzulinové sensitivity ve srovnání s kontrolními skupinami bez deficitu, a to jak v pokusu s vysokotučnou dietou (Rocha et al., 2008), tak v pokusu se standardní myší dietou (Wong et al., 2011). Ačkoliv u předchozích pokusů byl kladen důraz na IFN- γ lymfocyty v tukové tkáni, existují důkazy, že u myši s obezitou lze zvýšení IFN- γ + buněk pozorovat mimo jiné v mezenterických lymfatických uzlinách (Du et al., 2016).

Bylo také zjištěno, že IFN- γ snižuje počet inzulinových receptorů ve svalech, což opět přispívá k dalšímu rozvoji inzulinové rezistence (Šestan et al., 2018; Wali et al., 2014). IFN- γ také podporuje M1 prozánětlivou polarizaci makrofágů, které následně produkují IL1, IL6 a TNF- α (Wali et al., 2014; Xia et al., 2017).

U pacientů s T2D byla pozorována snížená frekvence periferních FoxP3+ buněk a snížený obsah IL-10 v séru ve srovnání se zdravými kontrolami (Jagannathan-Bogdan et al., 2011; Qiao et al., 2016; Yuan et al., 2018). Výrazně snížená hladina IL-10 byla také nalezena u pacientů s obezitou a metabolickým ve srovnání s jedinci s normální vahou (Yuan et al., 2018). V jedné ze studií byly snížené frekvence FoxP3 u myši s obezitou dokonce progresivně závislé na BMI (Winer et al., 2009). U studií s lidskými pacienty byly snížené hladiny IL-10 spojeny se zvýšeným výskytem inzulinové rezistence a metabolického syndromu (McLaughlin et al., 2014; van Exel et al., 2002). Aktivní Treg produkující IL-10 mohou zlepšovat metabolické parametry tím, že podporují lepší fungování inzulinových receptorů a signalizačních drah. IL-10 přispívá k lepší inzulinové signalizaci a tím snižuje riziko vzniku T2D (Hong et al., 2009).

Dosud není zcela jasné, zda se podobné změny u T2D vyskytují přímo v pankreatu. Studie, která zkoumala obsah imunitních buněk v pankreatických ostrůvcích lidí s diabetem 2. typu a ukázala zvýšený počet CD68+ makrofágů ve vzorcích histologických řezů a také zvýšení počtu Th1 a Th17 buněk a snížení počtu Treg v periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami. Vzhledem k tomu, že podmínky T2D lokálně v pankreatu mohou ovlivnit nejen makrofágy, ale i jiné typy leukocytů včetně lymfocytů, jsou nezbytné další studie k úplné charakterizaci složení imunitních buněk v ostrůvcích a k určení jejich potenciálního vlivu na zánět uvnitř Langerhansových ostrůvků u T2D (Butcher et al., 2020). V této diplomové práci se zaměřím mimo jiné na analýzu lymfocytů z pankreatické uzliny, která reprezentuje populaci lymfocytů na lokální úrovni pankreatu.

Předpokládá se, že snížení Treg lymfocytů vlivem obezity zabraňuje dostatečnému potlačování efektorových Th1 a Th17 lymfocytů na fyziologickou úroveň a tyto nekontrolované lymfocyty svou prozánětlivou cytokinovou činností navozují zhoršení již probíhající inzulinové rezistence (Xia et al., 2017). Naopak, fyziologická činnost Treg buněk a jejich produkce IL-10 působí protektivně proti inzulinové rezistenci a způsobuje polarizaci makrofágů na protizánětlivý fenotyp M2. Jeden experiment zaměřený na zvýšení frekvence Treg lymfocytů u myši s obezitou prokázal normalizaci inzulinové rezistence po imunoterapii zvyšující IL-10, a to i v dlouhodobém měřítku při pokračující obezitogenní dietě (Winer et al., 2009).

Vzhledem k těmto důkazům se zdá, že stravou a obezitou indukovaná T2D může být ovlivněna chronickou prozánětlivou tendencí přítomných subpopulací lymfocytů. Zda je však přítomnost těchto subpopulací následkem anebo příčinou inzulinové rezistence a zda s aktivací těchto subpopulací má něco společného mikrobiota, není příliš zkoumané téma a současné poznatky jsou nedostatečné a obecné.

U jedinců s obezitou byla pozorována vyšší permeability střeva, díky které se do krevního oběhu a lymfatických uzlin dostávají vyšší koncentrace bakteriálních antigenů, PAMP a LPS. Tento stav se dává do souvislosti s odlišným složením střevní mikrobioty jedinců s normální vahou a obezitou (Cani et al., 2012; Ďásková et al., 2023). V lymfatických uzlinách dochází k setkávání antigenů s naivními T lymfocyty, které jsou aktivovány a následně migrují do oběhu a tkání, kde se účastní buněčných i humorálních imunitních reakcí. Aktivované leukocyty, včetně lymfocytů, produkují cytokiny, které přispívají k již zmíněné inzulinové rezistenci ve svalech a ostatních cílových tkáních inzulinu (Pinheiro-Machado et al., 2020).

Lymfatická drenáž ze střevního traktu, která prochází mezenterickými uzlinami, vstupuje do portálního oběhu a dostává se do jater. Játra tak mohou být sekundárně ovlivněna jak metabolity ze střev, tak i lymfocyty migrujícími z mezenterických uzlin, což podporují některé studie a odborné články (Anand and Mande, 2022; Su et al., 2019). Poslední výzkumy také naznačují silné propojení T2D s rozvojem nealkoholového jaterního postižení (NAFLD) ve stádiu steatohepatitidy (NASH) (Xiong and Li, 2023).

Většina pacientů s NAFLD/NASH je asymptomatická, onemocnění jsou často diagnostikována náhodně na základě zobrazovacích metod (např. ultrazvuku), které ukazují na tukové usazeniny v játrech, nebo na základě zvýšených hladin jaterních enzymů v krvi. NASH doprovází chronický zánětlivý stav jater, kdy se do jater infiltrují neutrofilové a M1 makrofágy; dochází k sekreci TNF, IL-1 β , a IL-6 (Song et al., 2023). Za hlavní příčiny NAFLD a NASH se považuje obezita a T2D, a kromě úpravy jídelníčku se zatím nenabízí mnoho terapeutických postupů.

Diabetes 2. typu a NAFLD jsou spojeny s abnormalitami metabolismu lipidů. Inzulinová rezistence u T2D zhoršuje schopnost inzulinu inhibovat lipolýzu v tukové tkáni, což vede k uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) do cirkulace. Játra využívají tyto mastné kyseliny k syntéze triacylglycerolů, které se hromadí v hepatocytech a přispívají k rozvoji steatózy. Zhoršená funkce jater a jejich schopnost regulovat metabolismus glukózy a lipidů dále přispívá ke zvýšení inzulinové rezistence, čímž se zhoršuje klinický průběh T2D (Silbernagl et al., 2016).

Výzkum v této oblasti dále ukazuje, že při NASH dochází v játrech k expanzi efektorových CD4+ lymfocytů a snížení populace Treg lymfocytů, avšak jejich role v patogenezi je zatím nejasná. (Dywicki et al., 2021; Zhou et al., 2022). Existují tedy důkazy propojující dysbiózu, imunitní systém a patogenezi NASH. Výzkum v této oblasti zatím nenese jasné závěry, jakou přesně roli v ní hrají lymfocyty, avšak je vysoce pravděpodobné, že jejich zvýšená přítomnost indikuje patologickou reakci v játrech (Su et al., 2019). NASH je tedy častým doprovodným symptomem inzulinové rezistence indukované obezitou.

2.5. Veganská strava a mikrobiota

V posledních desetiletích zaznamenal zájem o veganskou stravu značný nárůst, což přineslo nové otázky ohledně jejího vlivu na zdraví člověka a mimo jiné i na střevní mikrobiotu. Veganská strava je charakterizována vyloučením všech živočišných produktů, jejich náhradou rostlinnými alternativami a z toho vyplývajícím větším zastoupením dietní vlákniny. U veganské diety (VD) je dlouhodobě pozorováno snížené riziko obezity, cukrovky 2. typu, hypertenze a NAFLD (Chen et al., 2018; Lv et al., 2023; Selinger et al., 2023). Obezita a vysoký krevní tlak jsou důležité rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, které jsou dle statistik nejčastější příčinou smrti v Evropě (*Causes of Death Statistics*). Tyto nálezy inspirují výzkumy veganské stravy a mikrobioty asociované s tímto typem stravování. Uvažuje se o potenciálním využití k FMT terapii zmíněných onemocnění, avšak důkazy o prospěšnosti samotné FMT stolice od veganského dárce jsou zatím málo prozkoumané (Smits et al., 2018; Stols-Gonçalves et al., 2023; Witjes et al., 2020).

Důležitá část pozitivních účinků mikrobioty asociované s veganskou dietou se přisuzuje absenci živočišných látek v dietě a s tím související změně ve skladbě produktů bakteriální fermentace ve střevě. Mikrobiota lidí s omnivorním jídelníčkem, zahrnujícím živočišnou stravu, produkuje významně větší množství TMA, než u vegetariánů a veganů. TMA je mikrobiální produkt metabolismu L-kartnitinu, který má mimo jiné významné aterosklerotické účinky (Koeth et al., 2013). Veganská strava je také typická pro svůj vysoký obsah vlákniny, jejíž metabolity, zejména SCFA, jsou dlouhodobě spojovány se sníženým rizikem kardiovaskulárních onemocnění, obezity a diabetu (Glick-Bauer and Yeh, 2014; López-Almela et al., 2021).

Je nutné podotknout, že veganská strava není jen jedna a existuje více možností, jak ji dodržovat. Kvůli pokrokům v potravinářské technologii může současná VD obsahovat řadu potenciálně diabetogenních či jinak nezdravých potravin, které mohou snížit její prospěšné účinky. Za „zdravou“ a „přínosnou“ se považuje tzv. *whole-food plant-based* dieta, která je založená na vybraných čerstvých potravinách v co možno nejméně průmyslově zpracovaném stavu (Gallagher et al., 2022). Rozdíl mezi „zdravou“ a „nezdravou“ veganskou stravou se vskutku ukazuje jako zásadní. Podle jedné metaanalýzy zdravá plant-based dieta snižuje riziko cukrovky 2. typu o 19 %, zatímco nezdravá varianta tohoto jídelníčku může toto riziko dokonce o 10 % zvýšit (Nikparast et al., 2024). Proto za jediný faktor přínosných účinků VD nelze považovat pouhou absenci živočišných makronutrientů.

2.5.1. FMT mikrobioty od veganských dárců a vliv suplementace

Oproti omnivorní mikrobiotě štíhlých zdravých dárců, které se běžně používají v FMT studiích, přináší ta od veganských dárců navíc několik potenciálních výhod. Jisté výzkumy ukazují, že mikrobiota veganů má zvláště významnou abundanci anti-obezitogenních druhů bakterií, například *Blautia wexlerae* (Stols-Gonçalves et al., 2023), významně menší abundanci některých bakteriálních genů zprostředkovávajících rezistenci k antibiotikům (Losasso et al., 2018), a výrazně menší počet patobiontů, zejména čeledi *Enterobacteriaceae* (Glick-Bauer and Yeh, 2014). Důraz se také klade na střevní metabolom, který je s činností mikrobioty úzce spjatý, konkrétně se s ní spojuje zvýšená produkce SCFA a snížená produkce potenciálně nepříznivých molekul BCAA, kyseliny lithocholové a p-kresolu (Prochazkova et al., 2022).

Výše uvedená zjištění naznačují, že mikrobiota od veganského dárce by mohla být přínosná k předcházení a léčbě cukrovky a zánětlivého onemocnění jater, proto transfer mikrobioty veganů nabízí možnost, jak její benefiční účinky přenést na pacienty. Prozatímní výsledky experimentů testujících tuto hypotézu na lidských pacientech nejsou početné. Jedna malá studie s 21 účastníky zaměřující se na FMT mikrobioty od veganského dárce v kontextu zánětlivého onemocnění jater ukazuje jisté pozitivní efekty v zánětlivých markerech steatohepatitidy i v histologii jater, a potvrzuje

trend změny mikrobioty v příjemcích, která však byla na hranici statistické významnosti (Stols-Gonçalves et al., 2023). Další studie využívající FMT od veganských dárců v léčbě NAFLD pacientů uvádí zlepšení „nekroinflamačního skóre“, avšak nenalezla signifikantní zlepšení histologie jater, ani úroveň steatózy (Witjes et al., 2020). Výsledky dosavadních studií jsou zatím rozporuplné, což zanechává prostor k dalšímu výzkumu (Smits et al., 2018; Stols-Gonçalves et al., 2023).

Možný důvod neuspokojivých výsledků se nabízí ve skutečnosti, že donorská mikrobiota od veganského dárce rozdílná od původní mikrobioty příjemce, není udržována stejným stravováním, které dodržoval dárce, tedy změna bakteriálního složení po FMT a její potenciální účinky nejsou dost výrazné a dlouhodobě stabilní. Obecná doporučení nejen pro pacienty po FMT zákroku zahrnují dodržování zdravého jídelníčku, se zvláštním důrazem na dostatečný příjem vlákniny. Pacientům se však často nedaří toto doporučení dlouhodobě dodržovat (Clancy et al., 2021). Proto nejen pro příjemce FMT, ale i pacienty usilující o zlepšení svého zdravotního stavu jen dodržováním vhodného jídelníčku, se někdy doporučují doplňky stravy obsahující vlákninu (inulin, pektin) (Clancy et al., 2021; Zhu et al., 2023). V kontextu FMT mikrobiotou od veganského dárce se tedy logicky nabízí východisko, že suplementace vlákninou by mohla zvýšit produkci potenciálně příznivých SCFA, a tím i specificky zesílit efekt FMT jako terapeutické metody a stabilizovat její účinky (Hanssen and Nieuwdorp, 2021). Efekt vlákniny v kombinaci s FMT byl zkoumán a přinášel pozitivní výsledky na inzulínovou rezistenci a obsah cholesterolu v séru (Hanssen and Nieuwdorp, 2021; Mocanu et al., 2021), avšak žádná studie zatím nekombinovala vlákninu s mikrobiotou veganů, která by mohla potenciálně přinášet větší benefity než mikrobiota zdravých omnivorů.

Jedním z lehce dostupných zdrojů vlákniny, spojovaným s významným nárůstem produkce SCFA je inulin (Song et al., 2020; van der Beek et al., 2018). Je také široce studovaný jako prebiotikum, je spojován s předcházením a léčbou NAFLD (Kei et al., 2024) a zlepšením inzulínové rezistence (Rao et al., 2019; van der Beek et al., 2018). Z hlediska imunologie byl inulin přímo asociován se snížením některých zánětlivých markerů (TNF- α , NF κ B) v plazmě a střevní sliznici (Guo et al., 2018), zvýšenou indukci FoxP3 buněk a sekrecí IL-10 v periferní krvi (Amarante et al., 2018) a zmírněním zánětu pankreatu a dalších projevů cukrovky prvního typu díky zvýšení migrace Treg do pankreatu (Guimarães et al., 2024). Účinky inulinu by se daly znásobit tím, že mikrobiota od dárce bude obsahovat zvýšený podíl bakterií, které jsou na trávení inulinu přizpůsobené (jedná se o rody *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Roseburia* a další) (Riva et al., 2023), a právě tuto vlastnost nabízí mikrobiota veganů (Sidhu et al., 2023). Kombinace FMT mikrobioty od veganských dárců a suplementace inulinu se tak jeví jako optimalizovaná terapeutická metoda již zmíněných onemocnění.

3. Cíle diplomové práce

Předložená práce je součástí většího projektu, který se zabýval studiem vlivu mikrobioty od veganských dárců, a to samotné nebo v kombinaci s prebiotikem inulin, na vybrané metabolické parametry u dietně indukované obezity. V této práci navíc uvádím výsledky nepublikované části experimentu, která se zabývala studiem aktivace imunitních buněk. Jako model jsme využili ex-GF myši kolonizované směsnou mikrobiotou od lidských veganských dárců. Ke srovnání jsme použili konvenční myši stejného kmene.

Dílčí cíle:

1. Analyzovat vliv mikrobioty od veganských dárců a inulinu na tělesnou stavbu a parametry glukózového a lipidového metabolismu u sledovaných modelů.
2. Analyzovat vliv mikrobioty od veganských dárců a inulinu na složení střevní mikrobioty.
3. Analyzovat vliv mikrobioty od veganských dárců a inulinu na vybrané imunologické parametry.
4. Identifikovat možné souvislosti mezi konkrétním složením mikrobioty, metabolickým stavem hostitele a imunologickými parametry.

Fyziologickou část studie zpracovaly kolegyně Mgr. Marie Heczková a Ing. Miriam Brátová. Jejich závěry uvádím ve stručné formě, protože jsou nezbytné pro pochopení kontextu experimentu. Statistické zpracování bylo provedeno ve spolupráci se specialisty IKEM Nikolou Ďáskovou, Ph.D. a Ing. Istvánem Módosem, kteří poskytli specializované skripty pro analýzu dat a prováděli korekturu analýzy pro publikaci. Výsledky projektu byly publikovány v časopise *Nutrients* (Daskova et al., 2023).

4. Metody a materiál

4.1. Zpracování mikrobioty od veganských dárců

4.1.1. Výběr dárců a odběr vzorků

Vzorky stolice k přenosu na GF zvířata byla získána od čtyř dárců – veganů, kteří souhlasili s využitím jejich mikrobioty k pokusům na zvířatech. Dárci splňovali následující kritéria:

- dodržovali veganskou dietu nejméně 3 roky
- měli normální BMI
- nebyli léčeni antibiotiky alespoň 3 měsíce před odběrem
- netrpěli žádným metabolickým onemocněním ani chronickým onemocněním zažívacího traktu
- neužívali dlouhodobě žádná léčiva s výjimkou hormonální antikoncepce
- nebyla mezi nimi těhotná žena
- konzumovali alkohol nanejvýš příležitostně
- splňovali klinické normy hladin HDL, LDL a celkového cholesterolu a obsahu triacylglycerolů v séru

Před účastí byla těmto dárcům odebrána krev pro klinické určení hladin HDL, LDL a celkového cholesterolu a obsahu triacylglycerolů v séru. Odběr a klinické měření byl prováděn v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Tyto hladiny byly u všech dárců vyhodnoceny jako normální (Daskova et al., 2023).

Stolice byla odebrána dárcem a ihned zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v domácích podmínkách. Následně byla ve zmraženém stavu převezena do laboratoře, kde byla uchovávána v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zpracována do 7 dní po odběru.

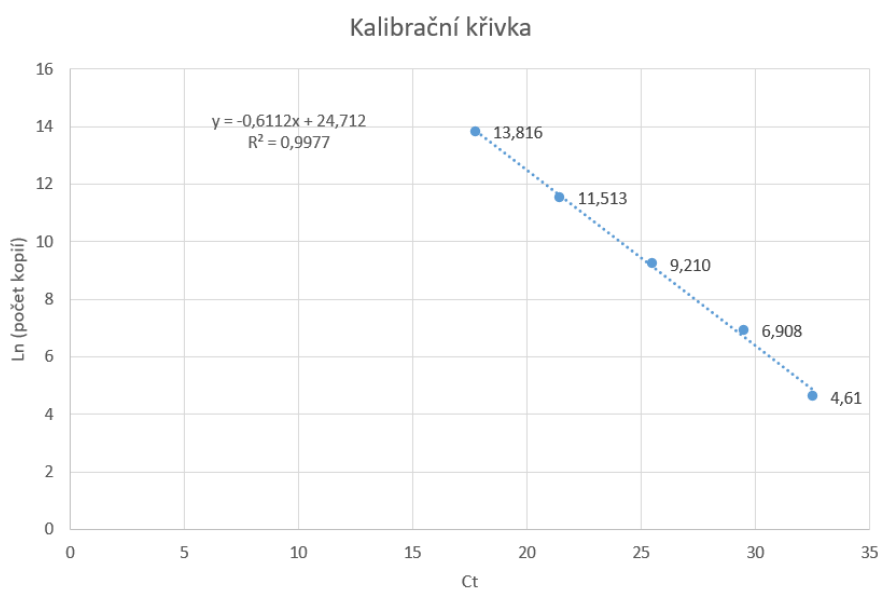
4.1.2. Homogenizace vzorků

Protokol zpracování vzorků pro transplantaci byl částečně převzat (Hamilton et al., 2012). Napřed byl připraven „freezing buffer“ smícháním PBS a glycerinu v poměru 1:1 a přidáním 4% DMSO, pufr byl skladován ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení bylo přibližně 50 g stolice zředěno fyziologickým roztokem na 250 ml a homogenizováno ve sterilním mixéru v prostředí s plynným dusíkem. Směs byla přefiltrována přes sérii nerezových sít s 2mm, 1mm, 0,5mm a 0,12mm otvory (WS Tyler, USA). Filtrát byl rozdělen do 50ml zkumavek a centrifugován (6000 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl odlit a sediment resuspendován ve freezing bufferu v objemovém poměru 1:1.

Z homogenátů byly odebrány 1ml vzorky pro určení počtu bakterií. Homogenát byl mezitím zamražen v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.3. Určení celkového počtu bakterií a pooling inokulátu

Homogenizované vzorky (1 ml) byly odebrány pro určení počtu bakterií pro správné ředění a kvantifikaci počtu bakterií v budoucím inokulátu. Celková DNA byla izolována za použití sady QIAmp PowerFecal DNA Kit (Qiagen) a izolát byl poté amplifikován na kvantitativním real-time PCR LightCycler 480 Instrument (Roche, USA) s pan-bakteriálními primery (Forward: ACACTGACGACATGGTTCTACAGAGTT–GATCNTGGCTCAG, Reverse: TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGTNTTANGCGGCKGCTG). Standardní křivka pro výpočet celkového počtu kopií byla vytvořena ze série ředění známého množství 16S rRNA genu (viz Obrázek 4-1). Počet kopií 16S genů v bakteriálních genomech není vždy stejný, což komplikuje výpočet CFU na základě měření počtu kopií 16S genů. Pro odhad CFU jsme využili postupu publikovaného v Větrovský & Baldrian (Větrovský and Baldrian, 2013), tj. odhadu průměrného počtu kopií 16S genu na bakteriální buňku (4,2). Homogenizované vzorky byly zředěny fyziologickým roztokem na přibližně stejnou koncentraci $3,9 \times 10^6$ CFU/ μ L a následně stejným dílem smíchány do poolu. Ke směsi bylo přidáno 10 % média Buffered glycerol saline (Thermo Fisher Scientific, USA), inokulát byl rozdělen do alikvotních vzorků a skladován v -80 °C do transplantace.



Obrázek 4-1: Kalibrační křivka a rovnice lineární regrese pro výpočet počtu kopií 16S RNA ve vzorcích homogenátu mikrobioty.

4.2. Experimentální zvířata a podávané diety

K pokusům byly využity GF a konvenční myši kmene C57Bl6/J. Tyto myši pocházely z chovu gnotobiologické laboratoře MBU Nový Hrádek. Konvenční myši byly chovány v SPF zvěřinci MBU. GF a ex-GF zvířata byla chována ve sterilních izolátorech při konstantním světelném režimu (12 hodin tmy:12 hodin světla) za standardních teplotních podmínek. Axenicita GF myší byla hodnocena každé dva týdny potvrzením negativní aerobní a anaerobní kultivace bakterií, plísní a kvasinek ve vzorcích myší stolice a stěrů. K odchovu pokusných ex-GF myší byly použity GF samice a k následnému pokusu byli použiti již výhradně samci. K odchovu a před experimentem bylo podáváno krmivo Altromin 1414 (Altromin, Německo). Krmivo bylo před každým podáním sterilizováno ionizačním zářením a zvířata měla volný přístup ke sterilní pitné vodě. Zvířata byla odchovávána postupně a byla usmrcována přibližně ve stejném věku s odchylkou několika dní. Experimenty probíhaly v souladu s předpisy etické komise a se zákonem ČNR č. 246/1992 Sb. pro ochranu zvířat proti týraní.

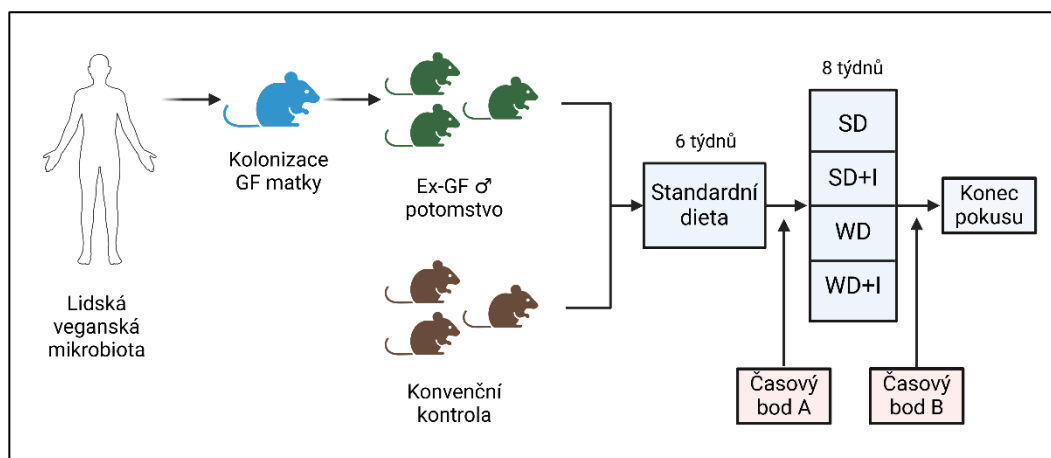
4.2.1. Příprava pokusné skupiny myší – transplantace VG mikrobioty

Připravený inokulát byl pomalu rozmražen v ledové lázni a následně zředěn fyziologickým roztokem na 150 ml. GF samice byly inokulovány s využitím orální gaváže a klistýru. Tyto samice byly připuštěny GF samci a jejich samčí potomstvo bylo odstaveno po 4 týdnech jako pokusné myši skupiny VG. Podařilo se odchovat celkem 32 VG myší.

4.2.2. Experimentální diety

VG myši byly společně s kontrolní CV skupinou myší po odstavení krmeny sterilní chovnou krmnou směsí Altromin 1414 (podrobné složení viz v příloze Obrázek 8-1) po dobu tří týdnů *ad libitum*. Po třech týdnech chovné diety byla myším podávána další 3 týdny standardní dieta (SD) (dieta Control to western, viz níže). Po uplynutí doby podávání standardní diety byla z izolátorů odebrána stolice pro izolaci DNA (časový bod A, viz Obrázek 4-2). Poté byly obě myší skupiny náhodně rozděleny do čtyř dietních skupin, kterým bylo po dobu osmi týdnů podáváno experimentální krmivo:

- Skupina SD (standard diet) pokračovala v dietě Control to western (Ssniff, Německo): Podrobné složení viz v příloze Obrázek 8-2.
- Skupině SD+I (standard diet + čekankový inulin) byla podávána dieta Control to western + 10% (w/w) Inulin (Ssniff, Německo)
- Skupině WD (western diet) byla podávána dieta Western diet + 0,21% cholesterol (Ssniff, Německo): Podrobné složení viz v příloze Obrázek 8-3.
- Skupině WD+I (western diet + čekankový inulin) byla podávána dieta Western diet + 0,21% cholesterol + 10% (w/w) inulin (Ssniff, Německo)



Obrázek 4-2: Schéma pokusu. Obrázek byl vytvořen v aplikaci BioRender.com

Myši tak byly rozděleny do celkem osmi skupin. Počet myší v každé skupině uvádí Tabulka 4-1.

Tabulka 4-1: Počty myší v pokusných skupinách.

| | SD | SD+I | WD | WD+I |
|----|----|------|----|------|
| CV | 10 | 10 | 10 | 10 |
| VG | 8 | 8 | 9 | 7 |

4.2.3. *In vivo* testy

Po osmi týdnech podávání experimentální diety (časový bod B, viz Obrázek 4-2) byly myši podrobeny testu orální glukózové tolerance (OGTT) a odběru krve pro určení koncentrace C-peptidu v séru. Myším byla odebrána potrava na 8 hodin před zahájením testu. Poté, v čase T_0 byl intragastrickou sondou podán glukózový roztok (1 mg glukózy/g.těl.hm.). V časech T_0 , T_{30} , T_{60} a T_{120} minut po podání glukózy byla změřena glykemie v kapce krve z ocasní žíly pomocí glukometru Accu-check (Roche, Švýcarsko). V časech T_0 a T_{30} byly odebrány vzorky krve z ocasní žíly na stanovení koncentrace C-peptidu v séru. Koncentrace C-peptidu byla stanovena s využitím kitu C-peptide ELISA (Merkodia, Švédsko) na čtečce mikrotitračních destiček Synergy Mx (BioTek, USA) dle protokolu výrobce kitu. Tato měření probíhala bez mé účasti.

4.2.4. Odběr vzorků

Myši byly po *in vivo* testování utraceny a byly jim odebrány následující orgány:

- Slepé střevo

Obsah slepého střeva byl odebrán pipetou do předem zvážené zkumavky a zředěn sterilním PBS trojnásobkem hmotnosti odebraného vzorku. Vzorky byly ihned zmrazeny a skladovány v -80°C .

- Játra

Játra byla rozdělena do alikvot a zmrazena v -80°C do zpracování.

- Peyerovy pláty (PP)
- Mezenterické uzliny (MLN)
- Inguinální lymfatické uzliny (ILN)
- Pankreatické uzliny (PLN)
- Slezina (SPL)

Zpracování lymfatických orgánů viz v kapitole „4.7. Izolace lymfocytů a cytometrická analýza“.

4.3. Měření obsahu triglyceridů v játrech

Přibližně 100 mg jater bylo homogenizováno ve 2 ml 5% roztoku NP40 v přístroji TissueLyser LT (Qiagen, Německo) v režimu (5 minut při 95°C ; 10 min při pokojové teplotě; 5 minut v 95°C). Z homogenátu vzorku bylo odebráno 50 μl na určení koncentrace proteinů pomocí Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) podle návodu. Zbytek homogenátu byl centrifugován (3 min, 14 000 g) a supernatant byl odebrán a zředěn 1:9 ve vodě. Tento roztok byl použit pro stanovení koncentrace triglyceridů s využitím kitu Triglycerides (ERBA-Lachema Diagnostics, ČR) podle návodu výrobce. Absorbance byla naměřena na čtečce mikrotitračních destiček Synergy Mx (BioTek, USA). Koncentrace TAG byla vztažena k obsahu proteinů v játrech ($\mu\text{mol TAG/mg proteinů}$). Tato měření probíhala bez mé účasti

4.4. Izolace DNA a příprava knihovny

K přípravě knihovny na Illumina sekvenování byla využita modifikace protokolu přípravy knihovny od Illumina (*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*; Klindworth et al., 2013).

Pro první amplifikaci byly použity EMP (Earth Microbiome Project) primery 515F-806R navržené tak, aby vyhovovaly dvoustupňovému PCR protokolu (Genseq s.r.o., ČR). V tomto protokolu se využívá 16 párů primerů s unikátními značkami (tagy) (viz přílohu Tabulka 8-1). V druhé PCR byly využity komerční Nextera XT indexy (Nextera XT Index Kit V2, Set A + Set D, GeneTiCa, Illumina, USA), pro každou skupinu 16 vzorků označených specifickým tagem byl využit jeden unikátní Nextera index. Tímto postupem byl každý vzorek po proběhnutí dvou PCR reakcí označen jednou z možných 256 kombinací tagu a indexu (16 x 16).

4.4.1. Příprava DNA

Z alikvot dárcovského inokulátu a myších vzorků stolice a slepého střeva byla izolována celková DNA pomocí sady QIAmp PowerFecal DNA Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce kitu. Kvalita a koncentrace DNA ze stolice byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop One (ThermoFisher Scientific) podle návodu výrobce přístroje. Poté byla DNA ředěna na koncentraci přibližně 10 ng/μl.

4.4.2. První kolo PCR pro 16S rRNA

V prvním kole PCR byl pomocí specifických primerů (sekvence viz v příloze Tabulka 8-1) amplifikován V4 region bakteriálního genu 16S rRNA. Složení reakce viz v Tabulka 4-2.

Tabulka 4-2: Složení první PCR reakce. 2x Q5 HiFi Master Mix obsahuje připravenou směs obsahující Q5 High-Fidelity DNA Polymerase a směs dNTP a reakční pufr.

| komponent | objem | výrobce |
|--------------------------------|---------|------------------------------------|
| 2x Q5 HiFi Master Mix | 15 μl | iBiotech, New England Biolabs, USA |
| 10 μM Forward Primer | 0,6 μl | Genseq s.r.o., ČR |
| 10 μM Reverse Primer | 0,6 μl | Genseq s.r.o., ČR |
| Template DNA | 1 μl | |
| Nuclease-free H ₂ O | 12,8 μl | Roche Diagnostics, Švýcarsko |
| Objem jednoho vzorku | 30 μl | |

PCR reakce probíhala podle schématu v tabulce Tabulka 4-3.

Tabulka 4-3: Schéma první PCR

| | | | |
|----------------------|-------|-------|------------------|
| Počáteční denaturace | 95 °C | 5 min | Opakování 25x |
| Denaturace | 95 °C | 30 s | |
| Annealing primerů | 55 °C | 30 s | |
| Elongace | 72 °C | 10 s | |
| Závěrečná elongace | 72 °C | 2 min | |
| Zchlazení | 6 °C | ∞ | |

4.4.3. Přечиštění a ředění produktů

Po PCR byl proveden krok selekce produktů o délce přibližně 500 bp magnetickými kuličkami SPRIselect (Beckman Coulter, USA) dle protokolu výrobce kitu. Poté byla pro kontrolu kvality DNA amplifikátu provedena agarózová elektroforéza. Po kontrole byly vzorky zmrazeny a skladovány v -20°C.

Po rozmražení byla koncentrace vzorků měřena s využitím fluorimetrického kitu Qubit (dsDNA High-sensitivity Assay Kit, ThermoFisher Scientific, USA) na čtečce mikrotitračních destiček Synergy Mx (BioTek, USA) podle protokolu výrobce. Z kalibrační křivky standardy byla odvozena rovnice lineární regrese, kterou jsme využili k výpočtu koncentrace DNA v každém vzorku. DNA produkty jsme následně zředili vodou na přibližnou koncentraci 2 ng/ul. U náhodně vybraných ampliconů jsme provedli kontrolu kvality na Fragment analyseru 5300 Fragment Analyzer System podle postupu výrobce.

Vzorky jsme rozdělili do skupin po 16 vzorcích tak, aby každá skupina obsahovala vzorky s unikátními tagy 1-16. Vzorky v každé skupině jsme spojili do jednoho poolu tak, aby každý vzorek byl zastoupen v ekvimolární koncentraci. Tyto pooly sloužily jako templát druhého kola PCR.

4.4.4. Druhé kolo PCR (připojení indexů)

Produkty byly podrobeny dalšímu kolu PCR amplifikace. Složení reakce viz Tabulka 4-4.

Tabulka 4-4: Složení indexační PCR. 2X Kappa HiFi HotStart ReadyMix obsahuje KAPA High-Fidelity HotStart DNA Polymerázu, dNTP a reakční pufr.

| komponent | objem | výrobce |
|---------------------------------|--------|------------------------------|
| 10 µM Forward Primer | 1,5 µl | GeneTiCa, Illumina, USA |
| 10 µM Reverse Primer | 1,5 µl | GeneTiCa, Illumina, USA |
| Template DNA | 1,5 µl | |
| 2X Kappa HiFi HotStart ReadyMix | 7,5 µl | Roche Diagnostics, Švýcarsko |
| Nuclease-free H ₂ O | 3 µl | Roche Diagnostics, Švýcarsko |
| Objem jednoho vzorku | 15 µl | |

PCR reakce probíhala podle schématu v tabulce Tabulka 4-5.

Tabulka 4-5: Schéma indexační PCR

| | | | |
|----------------------|-------|-------|-----------------|
| Počáteční denaturace | 95 °C | 3 min | |
| Denaturace | 95 °C | 30 s | Opakování 8x |
| Annealing primerů | 55 °C | 30 s | |
| Elongace | 72 °C | 30 s | |
| Závěrečná elongace | 72 °C | 5 min | |
| Zchlazení | 6 °C | ∞ | |

Poté byly produkty opět podrobeny přečištění kuličkami SPRIselect (selekce podle velikosti fragmentu) a následně zmrazeny v -20°C. Po rozmražení bylo provedeno měření koncentrace pomocí fluorimetrického kitu Quant-iT High Sensitivity (ThermoFisher Scientific, USA) na čtečce mikrotitračních destiček Synergy Mx (BioTek, USA).

4.4.5. Pooling vzorků

Vzorky byly zředěny na přibližně stejnou koncentraci a ekvimolárně smíchány. Výsledná koncentrace knihovny byla 8 pM.

4.5. Sekvenování nové generace

Knihovny byly sekvenovány v rámci Infrastruktury RECETOX MUNI za využití kitu MiSeq Reagent Kit v2 2x 250 bp (Illumina, USA) a přístroje MiSeq (Illumina, USA). Před samotnou sekvenací bylo do knihovny přidáno 20% PhiX DNA (Illumina, USA).

4.6. Bioinformatická analýza mikrobiomu

Sekvenační data ve formátu FASTQ byla získána z párového sekvenování ve dvou souborech, R1.fastq a R2.fastq. Tato data byla demultiplexována a očištěna od primerů pomocí Python skriptu, kde byla rozdělena na jednotlivé vzorky a byly odstraněny sekvenční adaptéry. Po demultiplexaci byla data nahrána do prostředí R.

V R, pomocí balíčku DADA2, byla provedena filtrace readů funkcí filterAndTrim(), která odstranila ready s vysokým počtem chyb, ready shodné s genomem PhiX a krátké ready. Model chyb pro celý sekvenační běh byl vytvořen funkcí learnErrors na základě reálně sekvenovaných dat. Unikátní amplicon sequence variants (ASVs) byly vytvořeny funkcí dada pro forward a reverse ready, které byly následně spojeny funkcí mergePairs.

Chimérické sekvence byly identifikovány a odstraněny funkcí removeBimeraDenovo. Sekvence byly taxonomicky klasifikovány s využitím funkce assignTaxonomy z balíčku DADA2, která porovnávala naše sekvence s referenční databází Silva SSU verze 138.1. Výsledkem byla taxonomická klasifikace mikrobioty ze vzorků stolice a slepého střeva.

4.7. Izolace lymfocytů a cytometrická analýza

4.7.1. Použité materiály a protilátky

- Kompletní médium: RPMI-1640 (Lonza, USA) + 10% FBS (Gibco-Life Technologies, USA)
- Buněčné filtry: Falcon Cell strainers, Thermo Fisher Scientific, USA
- Lyzační pufr: 1X RBC Lysis Buffer, Invitrogen, USA
- FACS roztok: PBS (BD Biosciences, USA) + 0,1 % azidu sodného + 0,02% EDTA + 2% FBS
FACS s monensinem: FACS roztok + monensin (0,66 ul/ml BD GolgiStop, BD Biosciences, USA)
- Viabilní barvivo: Fixable Viability Dye, eFluor 780, eBiosciences, USA
- Fixační a permeabilizační roztok: BD Cytofix/Cytoperm Plus, BD Biosciences, USA
- Perm/Wash roztok: BD Perm/Wash Buffer, BD Biosciences, USA
- Kompenzační kuličky UltraComp eBeads, Invitrogen, USA
- Roztok trypanové modři: Trypan blue solution 0,4%, Sigma-Aldrich, USA

Tabulka 4-6: Protilátky použité při průtokové cytometrii

| | Fluorochrom | Hybridomový klon | Výrobce |
|----------------------|-------------------|------------------|-------------|
| Povrchový marker | | | |
| CD3 | PerCP-Cyanine 5.5 | 145-2C11 | eBioscience |
| CD4 | AlexaFluor | RM4-5 | Invitrogen |
| Vnitrobuněčný marker | | | |
| FoxP3 | PeCy7.5 | FJK-16s | eBioscience |
| IL-10 | PE | JES5-16E3 | eBioscience |
| IFN- γ | APC | XMG1.2 | eBioscience |

4.7.2. Postup

Vzhledem k náročnosti designu pokusu byly myši zpracovávány postupně v 7 měřeních přibližně po 10 myších. Po odběru byly orgány ihned přeneseny do Petriho misek s 3 ml kompletního média. Sleziny a MLN byly zpracovány v miskách po jedné, zatímco PLN, ILN a PP byly zpracovávány v poolech pocházejících od 2 až 3 myší stejné skupiny v jedné misce pro zajištění dostatku buněk na cytometrickou analýzu. Orgány byly následně rozmělněny třením krouživými pohyby pomocí pinzety o drsné mikroskopické sklo. Tato suspenze v médiu byla přefiltrována buněčnými filtry do zkumavek.

Po rozmělnění a filtraci sleziny stejným postupem byly ze suspenze odstraněny erytrocyty pomocí lyzačního pufru v poměru 1-2 ml lyzačního pufru na 1 ml suspenze. Lyzační reakce probíhala 5 minut a následně byla zastavena přidáním PBS do objemu 50 ml. Buňky byly stočeny na centrifuze 5 minut při rychlosti 200 G při pokojové teplotě. Poté byly buňky promyty FACS roztokem, supernatant byl odlit a peleta buněk resuspendována v 3 ml kompletního média.

K suspenzím sleziny a lymfatických uzlin byly přidány 2 ml FACS roztoku. Od každého vzorku bylo odebráno 20 ul na určení relativního počtu buněk pomocí barvení trypanovou modří, Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu. Vzorky byly rozděleny do zkumavek tak, aby obsahovaly požadovaný počet buněk vhodný k analýze.

Vzorky byly nadále zvortexovány a stočeny (1300 RPM, 4°C, 4 min). Supernatant byl odlit a pelet buněk rozvolněn ve zbytkovém supernatantu, k tomu byly přidány barviva povrchových markerů (viz Tabulka 4-6) a viabilní barvivo, objem byl doplněn do 100 ul FACS roztokem. Vzorky byly na ledu a ve tmě inkubovány s barvivem po dobu 30 minut. Po inkubaci byl přidán 1 ml roztoku FACS a vzorky byly opět promyty (1300 RPM, 4°C, 4 min).

K peletu buněk bylo přidáno 250 ul fixačního a permeabilizačního roztoku, vzorky byly zvortexovány po dobu 5 sekund a inkubovány ve tmě a na ledu po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 1,5 ml Perm/Wash pufru a vzorky byly dvakrát promyty (1300 RPM, 4°C, 4 min). K peletu byly přidány protilátky vnitrobuněčných markerů (viz Tabulka 4-6) a objem byl doplněn do 100 ul Perm/Wash pufrů. Vzorky byly následně ponechány inkubaci ve tmě a na ledu po dobu 30 minut. Poté byl naposledy proveden promývací postup (1300 RPM, 4°C, 4 min) s 1 ml Perm/Wash pufru a k buněčnému peletu bylo přidáno 120 ul FACS roztoku pro měření.

Pro nastavení kompenzace fluorescence byly použity kompenzační kuličky. Vzorky byly měřeny průtokovým cytometrem BS LSR II (BD Biosciences, USA) a analýza probíhala v programu FlowJo X.

4.8. Statistické zpracování výsledků

4.8.1. Analýza fyziologických parametrů

Data z fyziologických testů byla vyhodnocována v programu GraphPad Prism 9. Nejdříve byly odstraněny odlehle hodnoty pomocí metody ROUT a následně byly provedeny testy normality dat. Kvůli malým počtům opakování ve skupinách byl zvolen Shapiro-Wilk test normality. Data u většiny skupin podle testu nevykazovala normální rozdělení. Pro analýzu byl tedy zvolen neparametrický Kruskal-Wallis test a Dunnův post hoc test s Benjamini-Hochbergovou korekcí.

4.8.2. Analýza cytometrických dat

Data z cytometrické analýzy byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 9. Nejdříve byly provedeny Shapiro-Wilk testy normality. Data u většiny skupin nevykazovala normální rozdělení. Pro analýzu byl tedy zvolen neparametrický Kruskal-Wallis test a Dunnův post hoc test s Benjamini-Hochbergovou korekcí. Některé vzorky byly vyřazeny pro nedostatečnou kvalitu vzorku (rodičovský gate čítá méně než

200 buněk) nebo nedostatek živých buněk (méně než 2 %). Některé odlehlé hodnoty byly vyřazeny funkcí „remove outliers“.

4.8.3. Určení alfa diverzity

Pro analýzu alfa diverzity mikrobioty ve stolici a slepém střevě byl použit R balíček vegan. Data byla normalizována na 10 000 čtení a následně byl vypočítán Shannonův index každého vzorku. V R byla dále ověřena statistická významnost pomocí Kruskal-Wallisova testu a Dunnova post hoc testu s Benjamini-Hochbergovou korekcí p-hodnot.

4.8.4. Určení beta diverzity

Pro analýzu beta diverzity dietních skupin byla použita analýza hlavních komponent (PCA) a Permutační MANOVA (PERMANOVA) s využitím funkce adonis z balíčku vegan v jazyce R. Všechny datové sady byly před analýzou centrovány a škálovány. Byla provedena disperzní analýza k ověření homogenity rozptylu mezi skupinami. Pro hodnocení statistické významnosti byla provedena PERMANOVA s 10 000 iteracemi. V PCA a PERMANOVA byla použita eukleidovská vzdálenost. Pro párové srovnání PERMANOVA byl využit balíček R pairwiseAdonis s Benjamini-Hochbergovou korekcí pro mnohonásobné testování.

4.8.5. Univariační analýza mikrobioty

Za účelem zjištění, která konkrétní bakteriální taxa byla nejvíce diskriminující mezi skupinami, byla provedena pro každou taxonomickou úroveň jednofaktorová analýza pomocí R balíčku DESeq2 na základě nerarefikovaných dat. Pro zjištění, zda experimentální diety významně ovlivňují hojnost jednotlivých taxonů, byl proveden test pravděpodobnostního poměru (LRT) porovnávající statistické modely se zahrnutím a bez zahrnutí dietních skupin jako vysvětlující proměnné. V rámci DESeq2 byly použity párové Waldovy testy pro srovnání skupin mezi sebou a p-hodnoty byly následně upraveny pomocí Benjamini-Hochbergovy korekce. Dalším výstupem DESeq2 analýzy byly relativní změny v počtu čtení daného taxonu mezi dvěma skupinami, udávané jako $\log_2(FC)$, neboli $\log_2(\text{násobek změny})$.

4.8.6. Klasifikační modely

Byl vytvořen klasifikační model pro identifikaci taxonů nejvíce přispívajících k rozdílům mezi skupinami. Pro určení diskriminační schopnosti každé skupiny dat byly vytvořeny klasifikační modely pomocí Lasso logistické regrese, implementované v R balíčku glmnet. Klasifikační metriky byly získány pomocí trojnásobné křížové validace s 10 opakováními. Pro výběr co nejmenšího počtu proměnných v modelech byla použita $\lambda = 1 \text{ SE}$.

4.8.7. Korelační sítě

Možný vztah mezi steatózou jater a střevní mikrobiotou jsme testovali pomocí Spearman korelací. Do hodnocení jsme zařadili pouze taxony identifikované jako významné metodou univariátní analýzy. P-hodnoty odpovídající korelačním koeficientům byly upraveny pomocí Benjamini-Hochbergovy korekce a korelační sítě zahrnovaly pouze ty korelace s upravenou q-hodnotou $\leq 0,1$. V korelační síti úrovně L6 (species) byly zobrazeny pouze korelace s q-hodnotou $\leq 0,6$. Pro vizualizaci sítě byly použity R balíčky ggplot2 a ggraph.

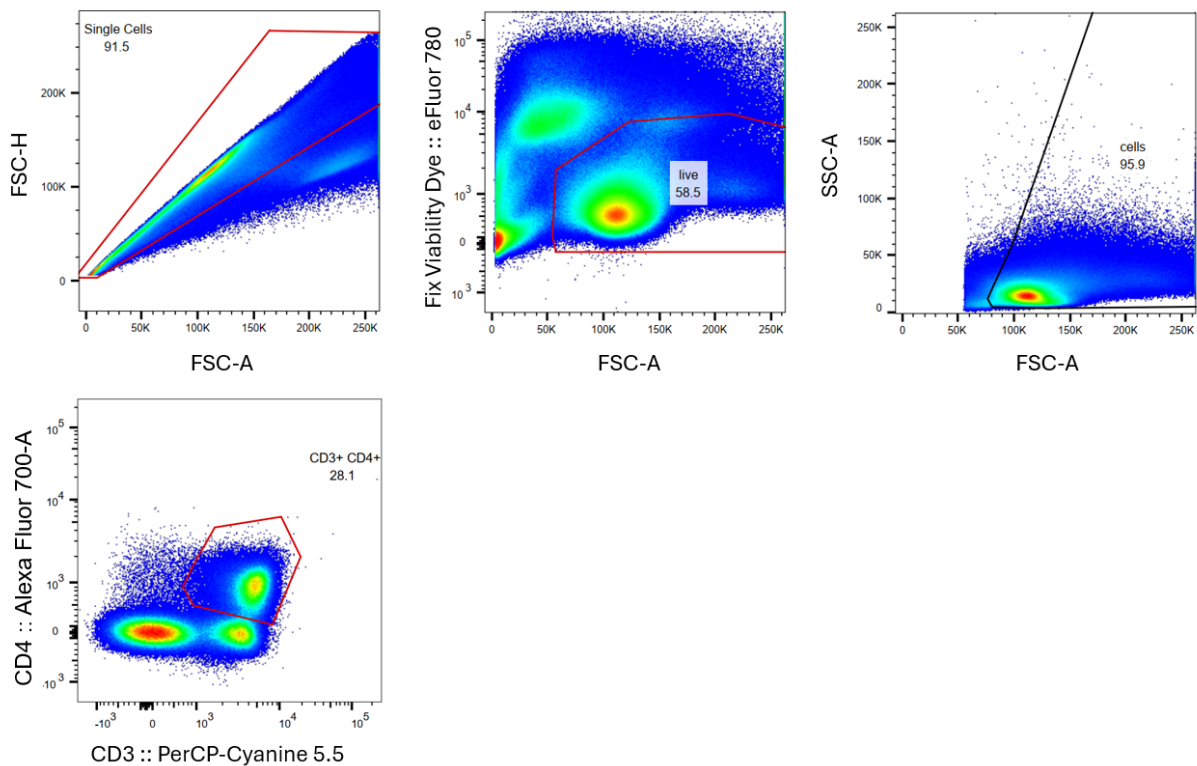
5. Výsledky

Ve zvoleném experimentálním uspořádání jsme nepozorovali protektivní vliv přenosu mikrobioty od veganských dárců na ex-GF myši před negativními účinky obezitogenní WD diety. Myši kmené WD vykazovaly zvýšenou tělesnou hmotnost a obsah triglyceridů v játrech, a to jak u konvenčních, tak u humanizovaných myší (viz přílohy Obrázek 8-4 a Obrázek 8-5). U humanizovaných VG myší však suplementace inulinem vedla k normalizaci obsahu triglyceridů v játrech a zlepšení parametrů glukózové homeostázy, i když neovlivnila dietně indukovaný přírůstek hmotnosti. U konvenčních myší efekt inulinu pozorován nebyl (viz přílohy Obrázek 8-6 a Obrázek 8-7). Data byla publikována v Nutrients (Daskova et al., 2023).

5.1. Cytometrická analýza

5.1.1. Gating strategie CD3+ CD4+ lymfocytů

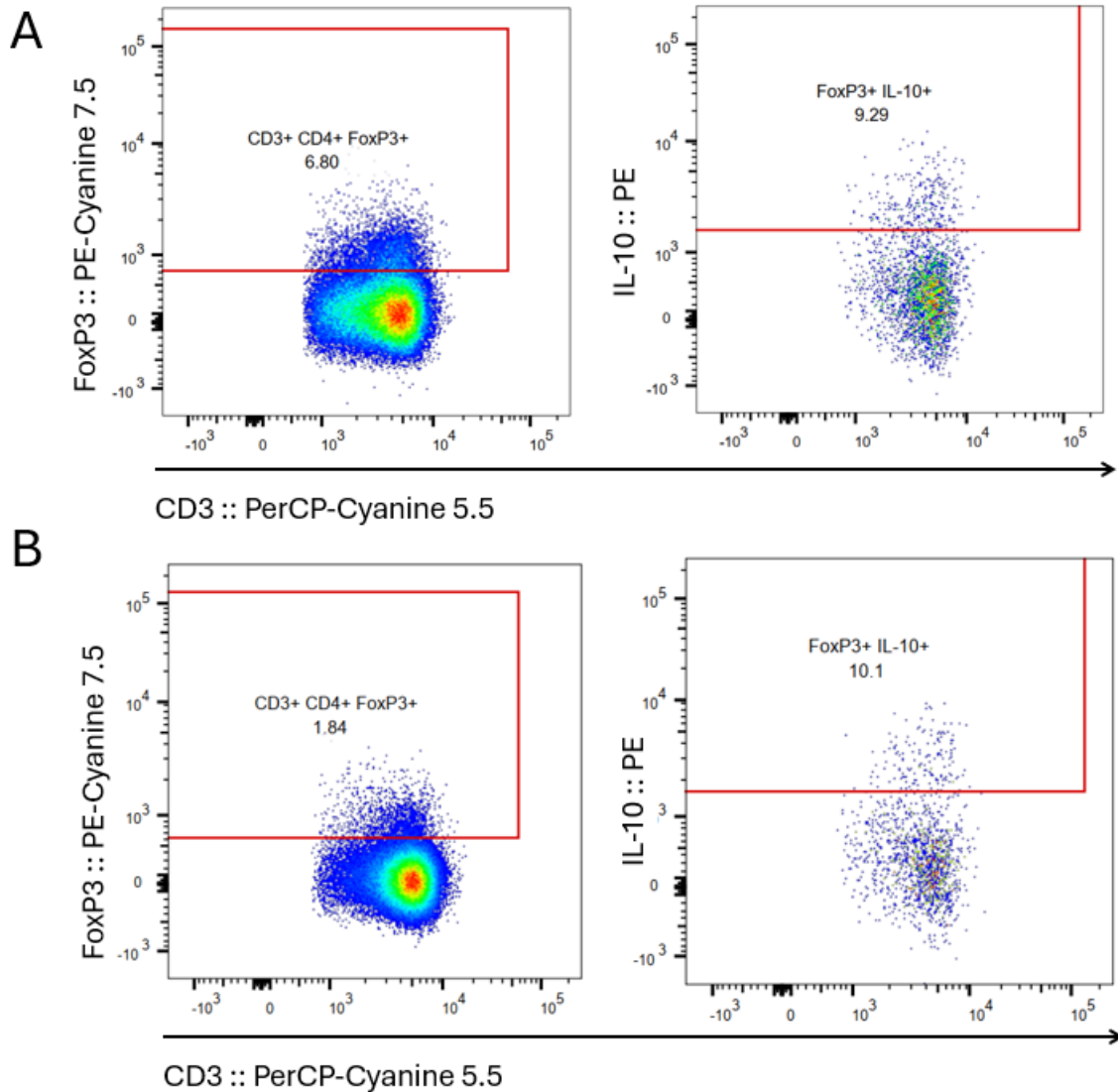
Jako první jsme gatovali CD3+ CD4+ lymfocyty, a definovali ta výchozí rodičovskou populaci pro následující subpopulace (viz Obrázek 5-1).



Obrázek 5-1 Gating strategie CD3+CD4+ lymfocytů, příklad na slezině kontrolní CV_SD myši

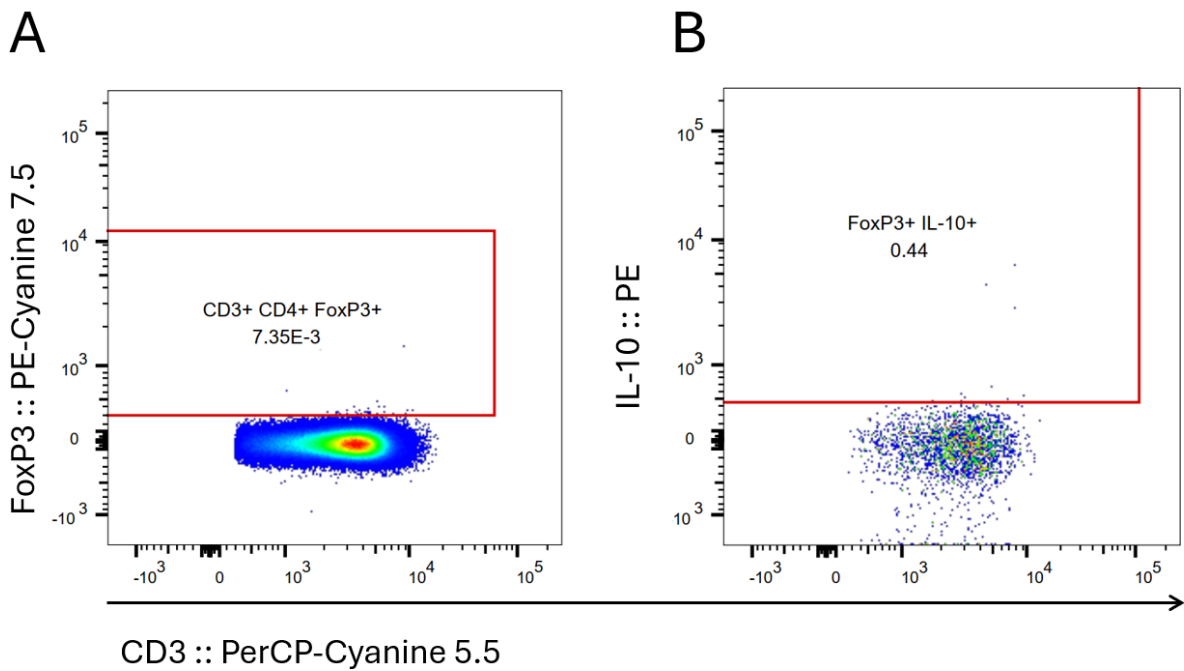
5.1.2. Gating strategie subpopulace FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+

Jako první jsme studovali Treg lymfocyty, které jsme charakterizovali jako FoxP3 pozitivní subpopulaci z rodičovské populace CD3+ CD4+ lymfocytů (viz Obrázek 5-1). Z této skupiny buněk jsme následně oddělili subpopulaci IL-10 pozitivních buněk, abychom určili, v jaké míře v daném místě probíhá aktivní protizánětlivá odpověď produkcí IL-10 (viz Obrázek 5-2).



Obrázek 5-2 Gating strategie FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ buněk v rodičovské populaci CD3+ CD4+ (viz obrázek 5-5). A: příklad gatingu na lymfocytech ze sleziny, B: příklad gatingu na lymfocytech z mezenterické uzliny

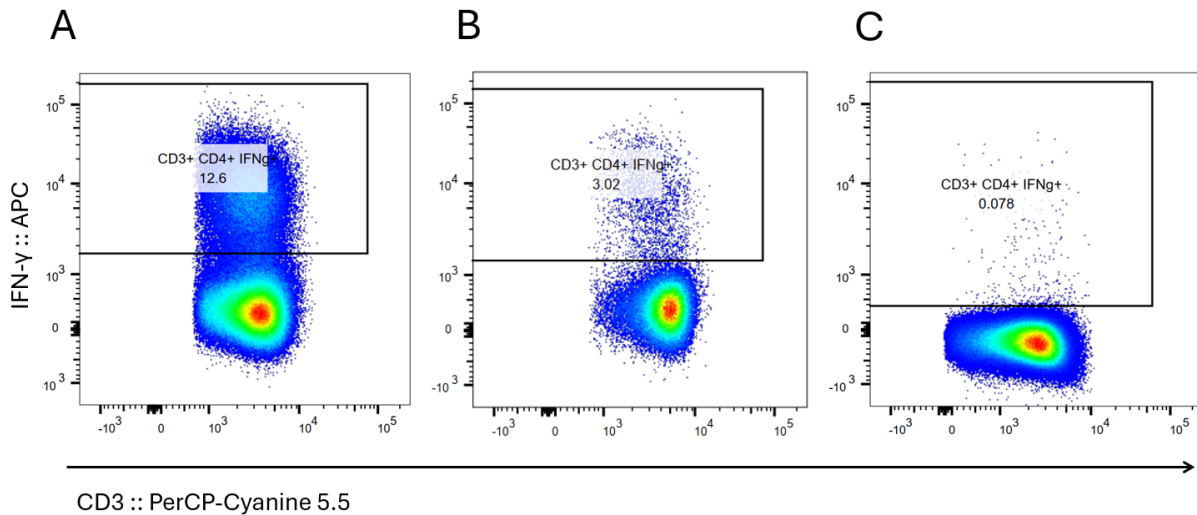
Hladiny rozdělující populaci určenou jako pozitivní na markery FoxP3 a IL-10 byly určeny s využitím FMO kontrol dané protilátky (viz Obrázek 5-3).



Obrázek 5-3: FMO kontroly gatingu populace FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+, příklad na slezině. A: kontrola bez barvení FoxP3, B: kontrola bez barvení IL-10, rodičovské populace odpovídají obrázku Obrázek 5-2

5.1.3. Gating strategie subpopulace CD3+ CD4+ IFN- γ +

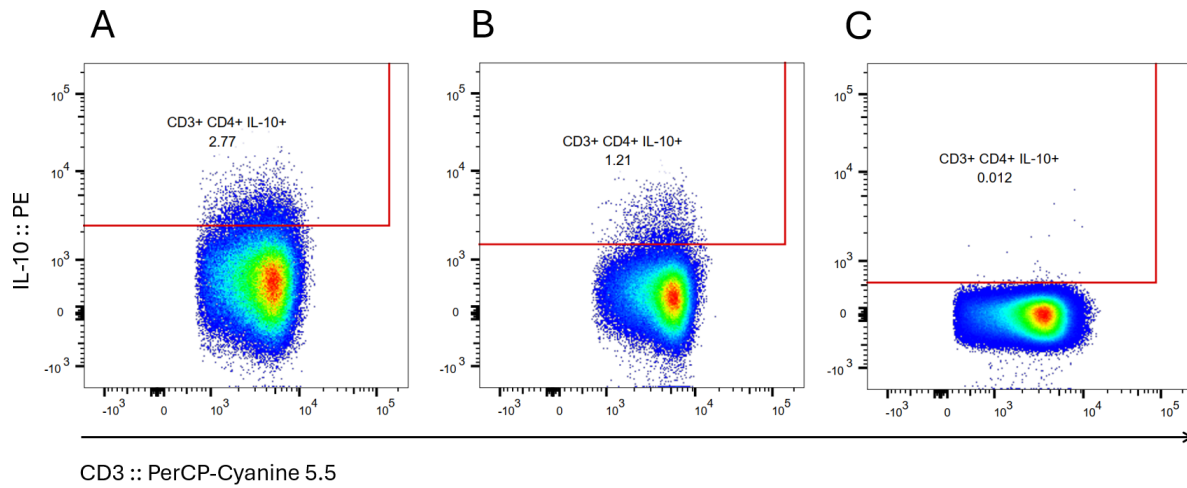
Na gating CD3+ CD4+ (viz Obrázek 5-1) navazuje také následující gating subpopulace IFN- γ , zaměřený na určení frekvence aktivně prozánětlivých lymfocytů v daném lymfatickém orgánu (viz Obrázek 5-4).



Obrázek 5-4 Gating IFN- γ + buněk v rodičovské populaci CD3+ CD4+ (viz Obrázek 5-1). A: příklad gatingu na lymfocytech ze sleziny, B: příklad gatingu na lymfocytech z mezenterické uzliny, C: FMO kontrola bez barvení IFN- γ

5.1.4. Gating strategie subpopulace CD3+ CD4+ IL-10+

Na gating CD3+ CD4+ (viz Obrázek 5-1) navazuje také následující gating subpopulace IL-10+ lymfocytů zaměřený na určení, zda v daném orgánu probíhá celková protizánětlivá produkce IL-10 (viz Obrázek 5-5).

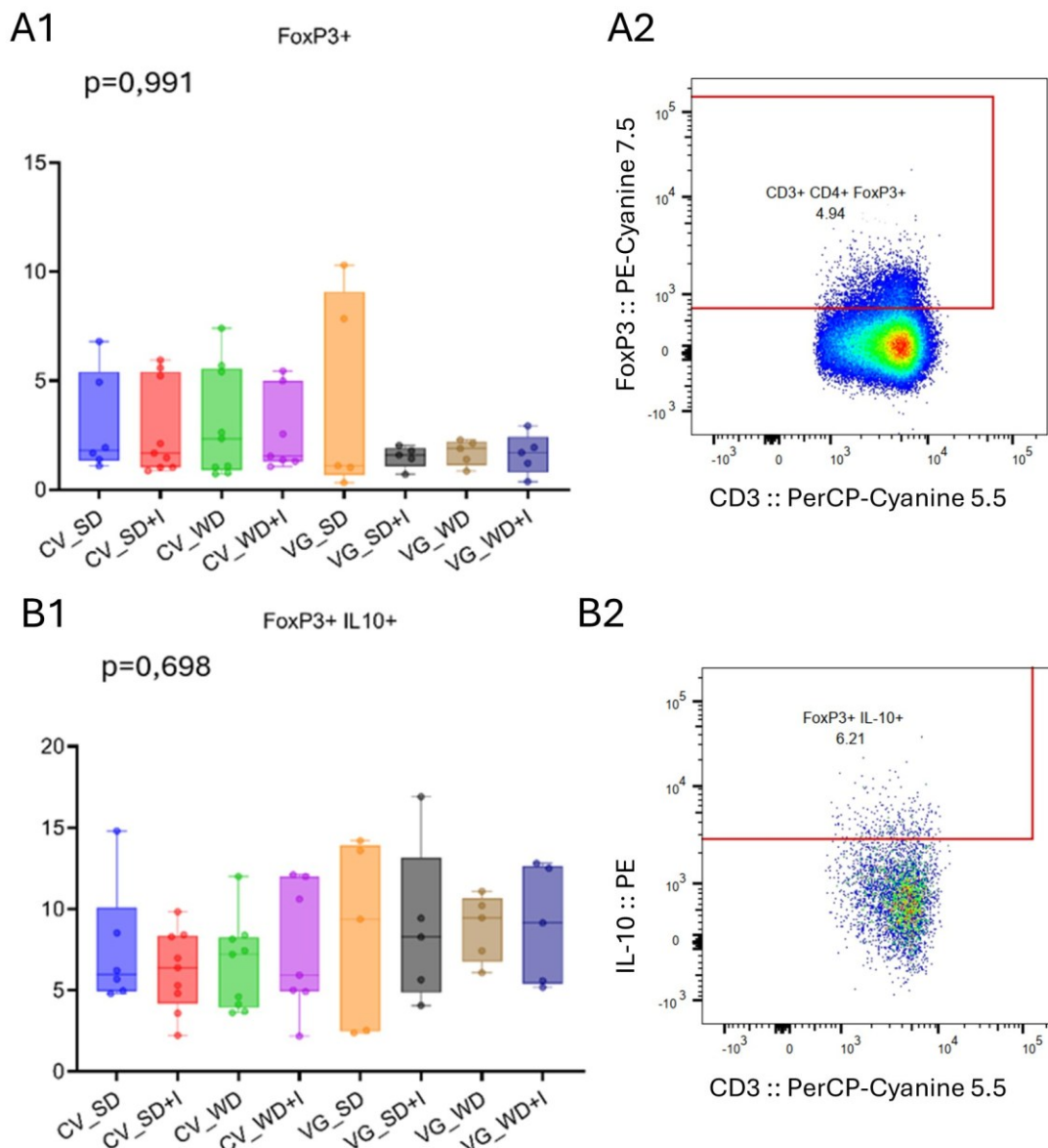


Obrázek 5-5: Gating IL-10+ buněk v rodičovské populaci CD3+ CD4+ (viz Obrázek 5-1). A: příklad gatingu na lymfocytech ze sleziny, B: příklad gatingu na lymfocytech z mezenterické uzliny, C: FMO kontrola bez barvení IL-10

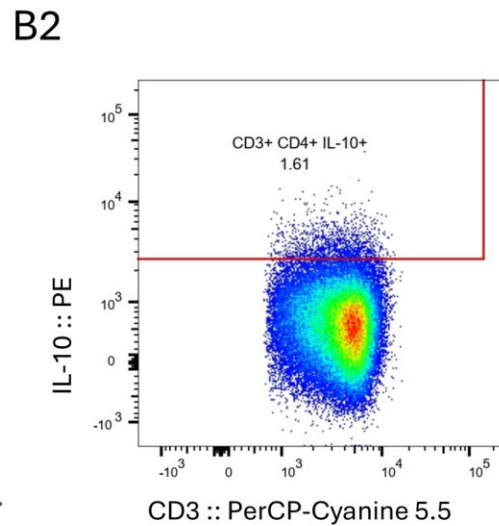
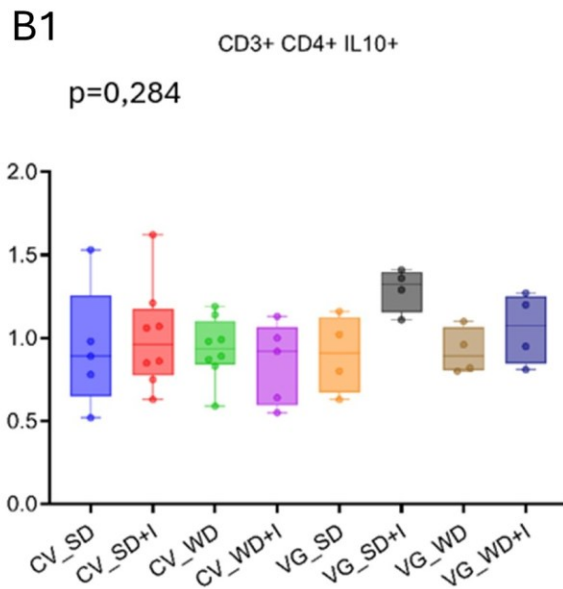
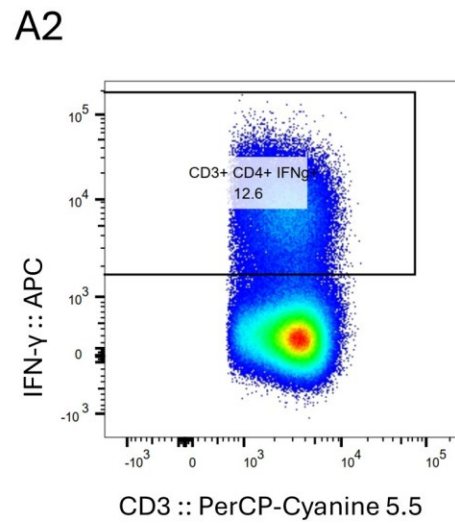
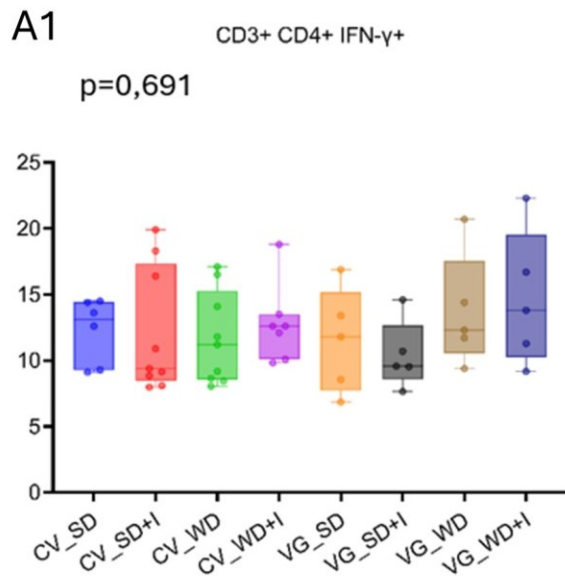
5.1.5. Vliv diet na zastoupení subpopulací lymfocytů v lymfatických uzlinách a slezině
 Srovnali jsme data z cytometrické analýzy, abychom určili vlivy jednotlivých diet a/nebo inulinu. Ve slezině se nepodařilo identifikovat žádné signifikantní rozdíly v subpopulacích lymfocytů (viz Obrázek 5-6 a Obrázek 5-7). Počty použitých měření viz Tabulka 5-1. Reprezentativní dotploty pro každou skupinu viz v přílohách Obrázek 8-8 a Obrázek 8-9.

Tabulka 5-1: Počty cytometrických měření sleziny ve skupinách zařazených do statistiky

| Slezina | SD | SD+I | WD | WD+I |
|---------|----|------|-----|------|
| CV | 6 | 9 | 9 | 7 |
| VG | 5 | 4-5 | 4-5 | 4-5 |



Obrázek 5-6: Zastoupení subpopulací lymfocytů FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ ve slezině s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence FoxP3+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci FoxP3+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_SD.

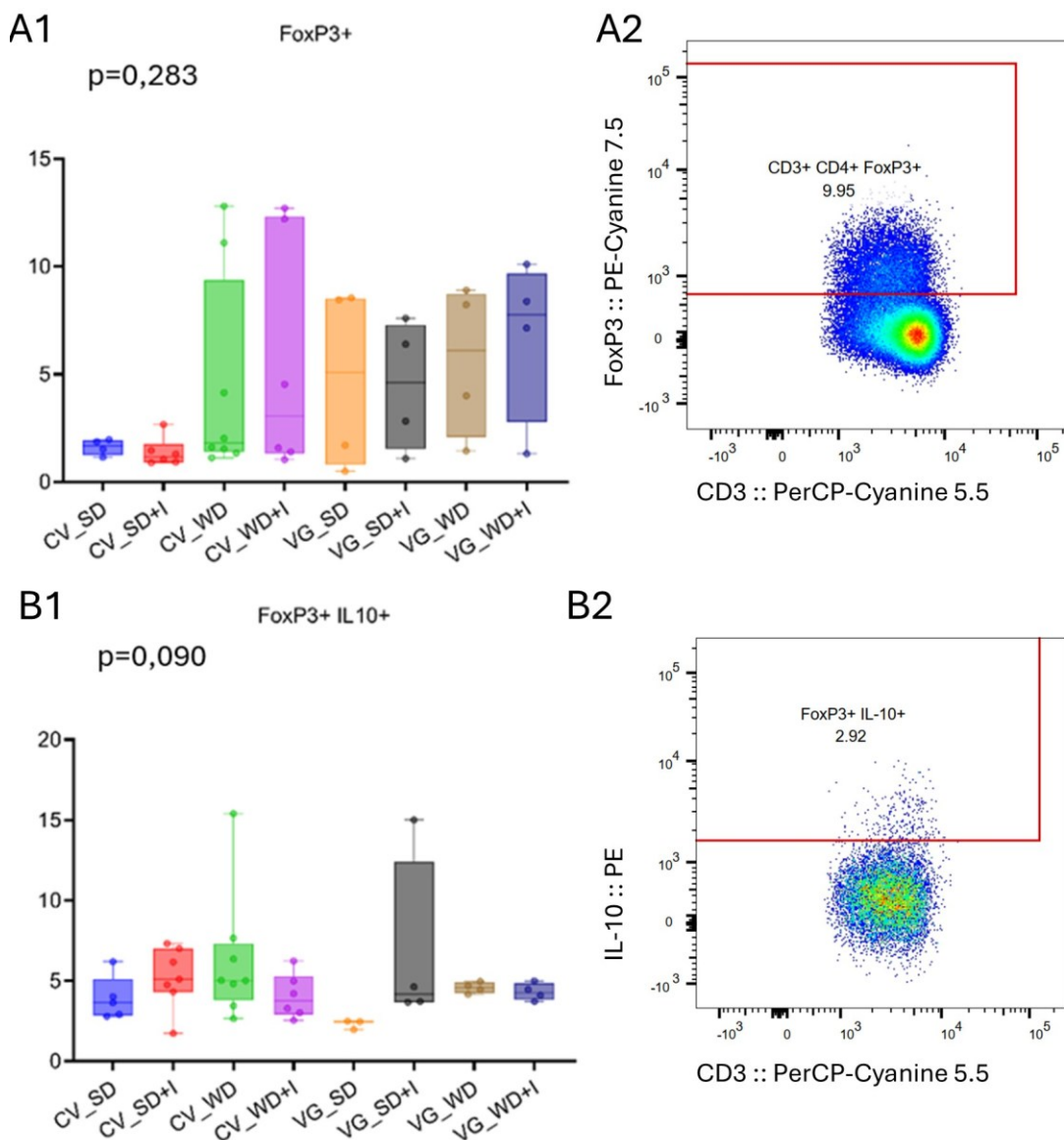


Obrázek 5-7 Zastoupení subpopulací lymfocytů IFN- γ + a IL-10+ v populacích CD3+CD4+ ve slezině s reprezentivními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence IFN- γ + lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentivní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-5; B2: reprezentivní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_SD.

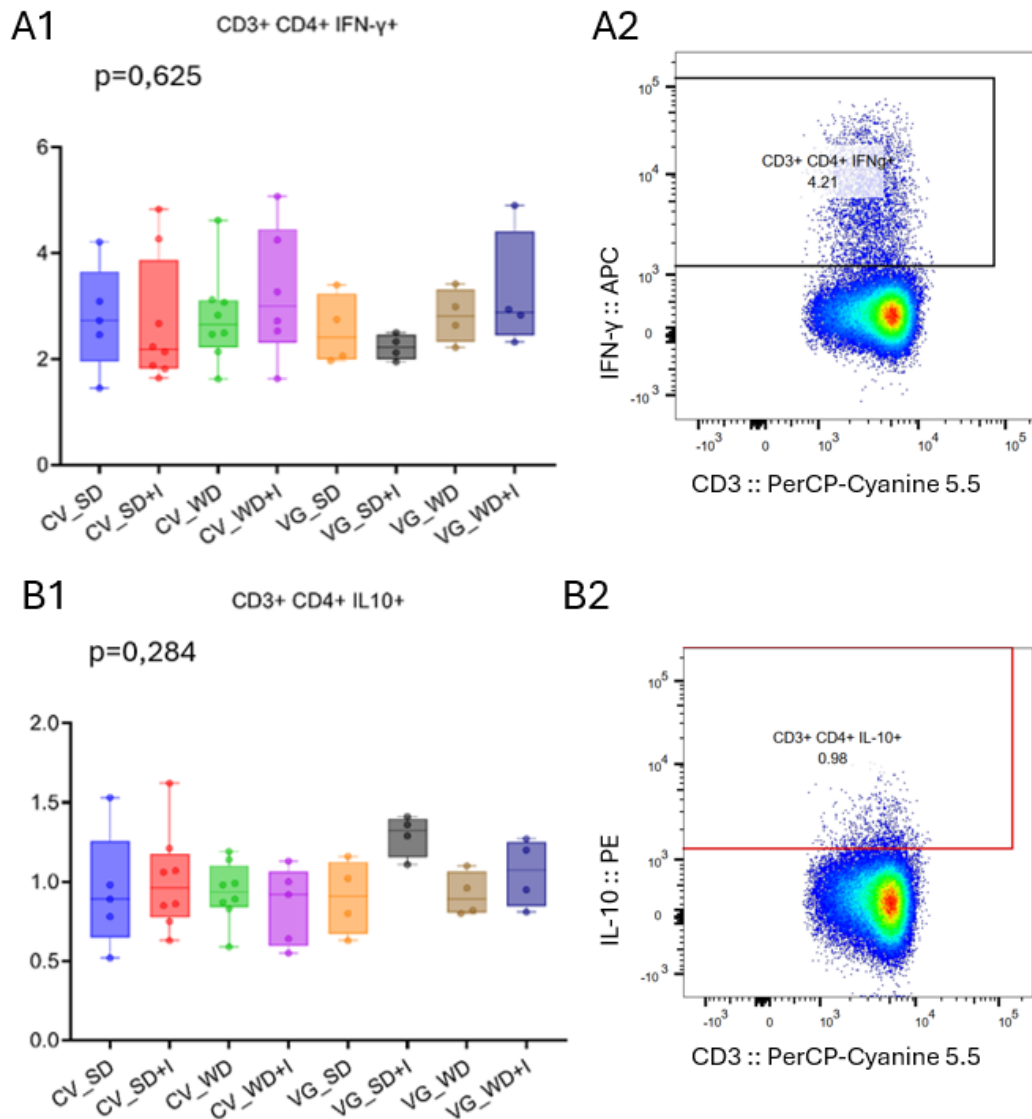
V inguinální uzlině se nepodařilo identifikovat žádné signifikantní rozdíly v subpopulacích lymfocytů (viz Obrázek 5-8 a Obrázek 5-9). Počty použitých měření viz Tabulka 5-2. Reprezentativní dotploty pro každou skupinu viz v přílohách Obrázek 8-10 a Obrázek 8-11.

Tabulka 5-2: Počty cytometrických měření ILN ve skupinách zařazených do statistiky

| ILN | SD | SD+I | WD | WD+I |
|-----|-----|------|-----|------|
| CV | 4-5 | 6-8 | 8-9 | 5-6 |
| VG | 3-4 | 4 | 4 | 4 |



Obrázek 5-8: Zastoupení subpopulací lymfocytů FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ v inguinální uzlině s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence FoxP3+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci FoxP3+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_SD.

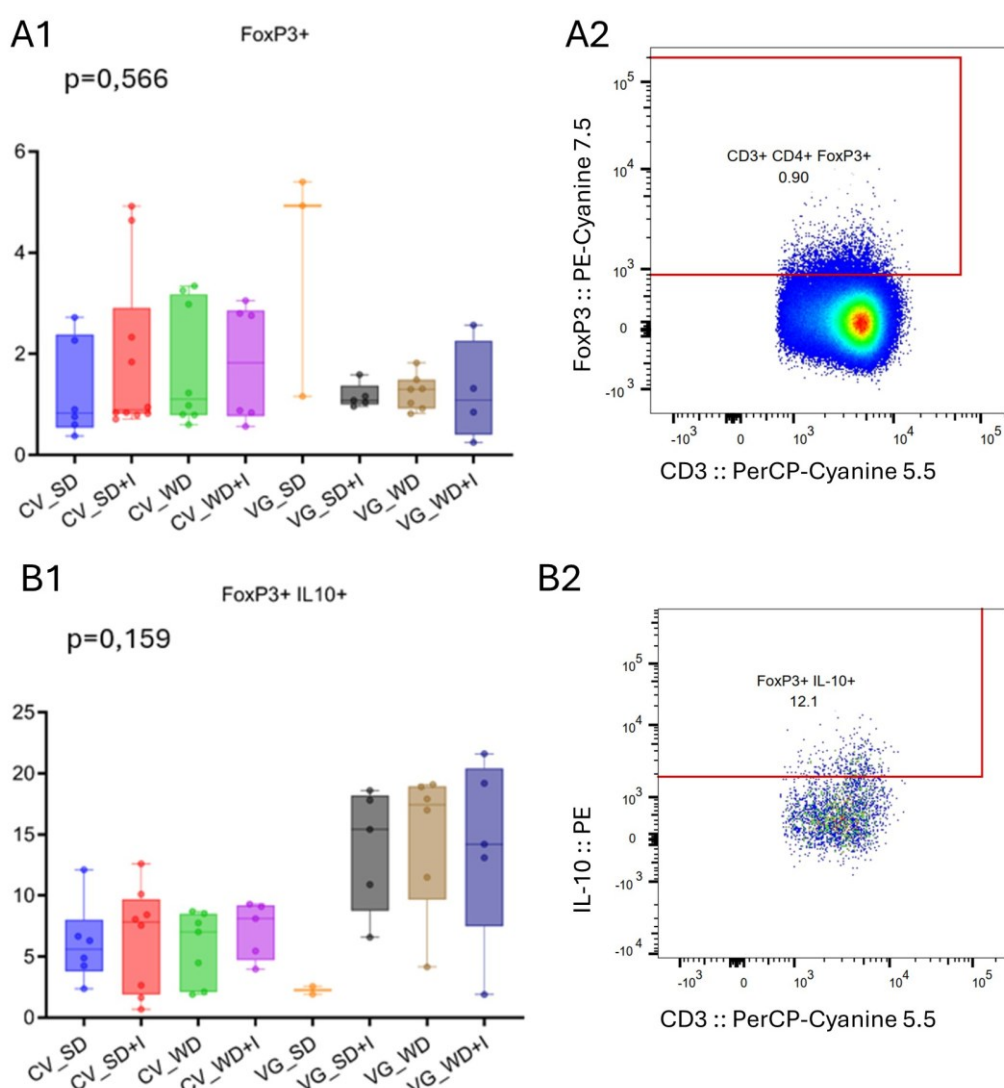


Obrázek 5-9: Zastoupení subpopulací lymfocytů IFN- γ a IL-10+ v populacích CD3+CD4+ v inguinální uzlině s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence IFN- γ + lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-4; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-5; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_SD.

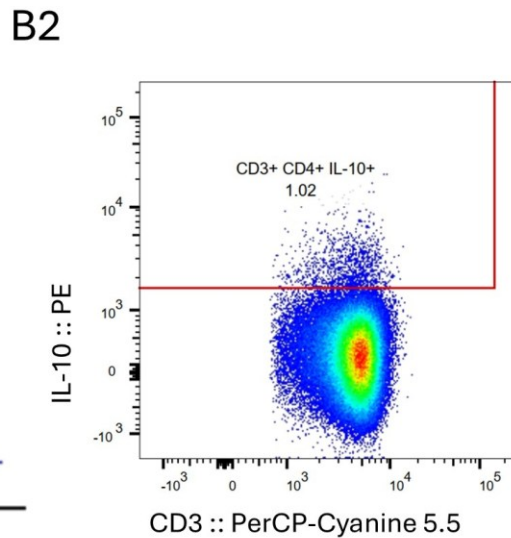
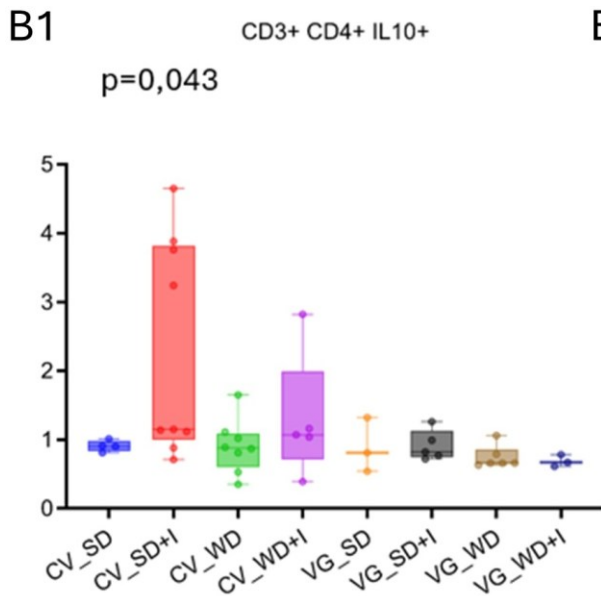
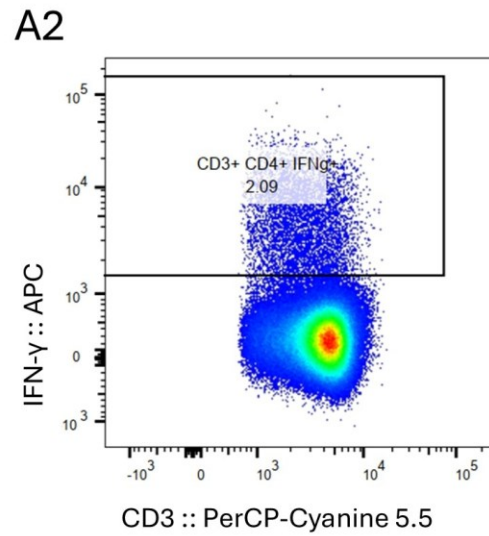
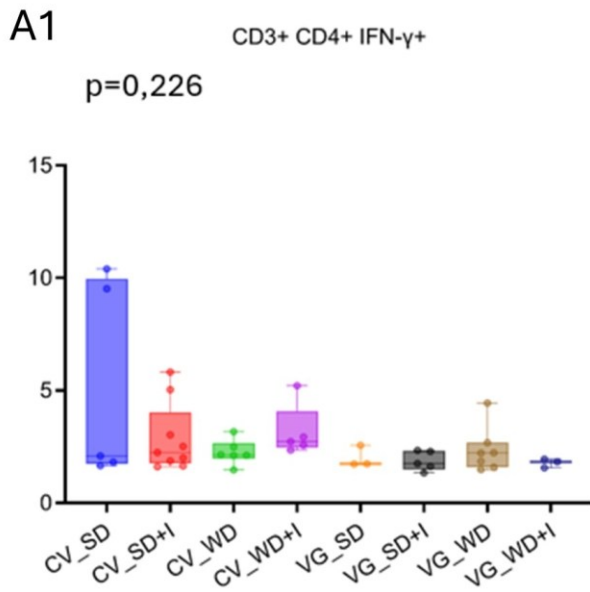
Při srovnání všech skupin v mezenterické skupině byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí skupin v subpopulaci CD3+ CD4+ IL10+. Nicméně, při následném porovnávání všech dvojic skupin nebyla nalezena žádná statisticky významná rozdílnost kvůli Benjamini-Hochbergově korekci p-hodnot pro vícenásobné testování (viz Obrázek 5-10 a Obrázek 5-11). Počty použitých měření viz Tabulka 5-3. Reprezentativní dotploty pro každou skupinu viz v přílohách Obrázek 8-12 a Obrázek 8-13.

Tabulka 5-3: Počty cytometrických měření MLN ve skupinách zařazených do statistiky

| MLN | SD | SD+I | WD | WD+I |
|-----|-----|------|-----|------|
| CV | 5-6 | 8-9 | 6-8 | 5-6 |
| VG | 3 | 5 | 6-7 | 3-5 |



Obrázek 5-10: Zastoupení subpopulací lymfocytů FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ v mezenterické uzlině s reprezentivními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence FoxP3+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentivní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci FoxP3+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; B2: reprezentivní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_WD.

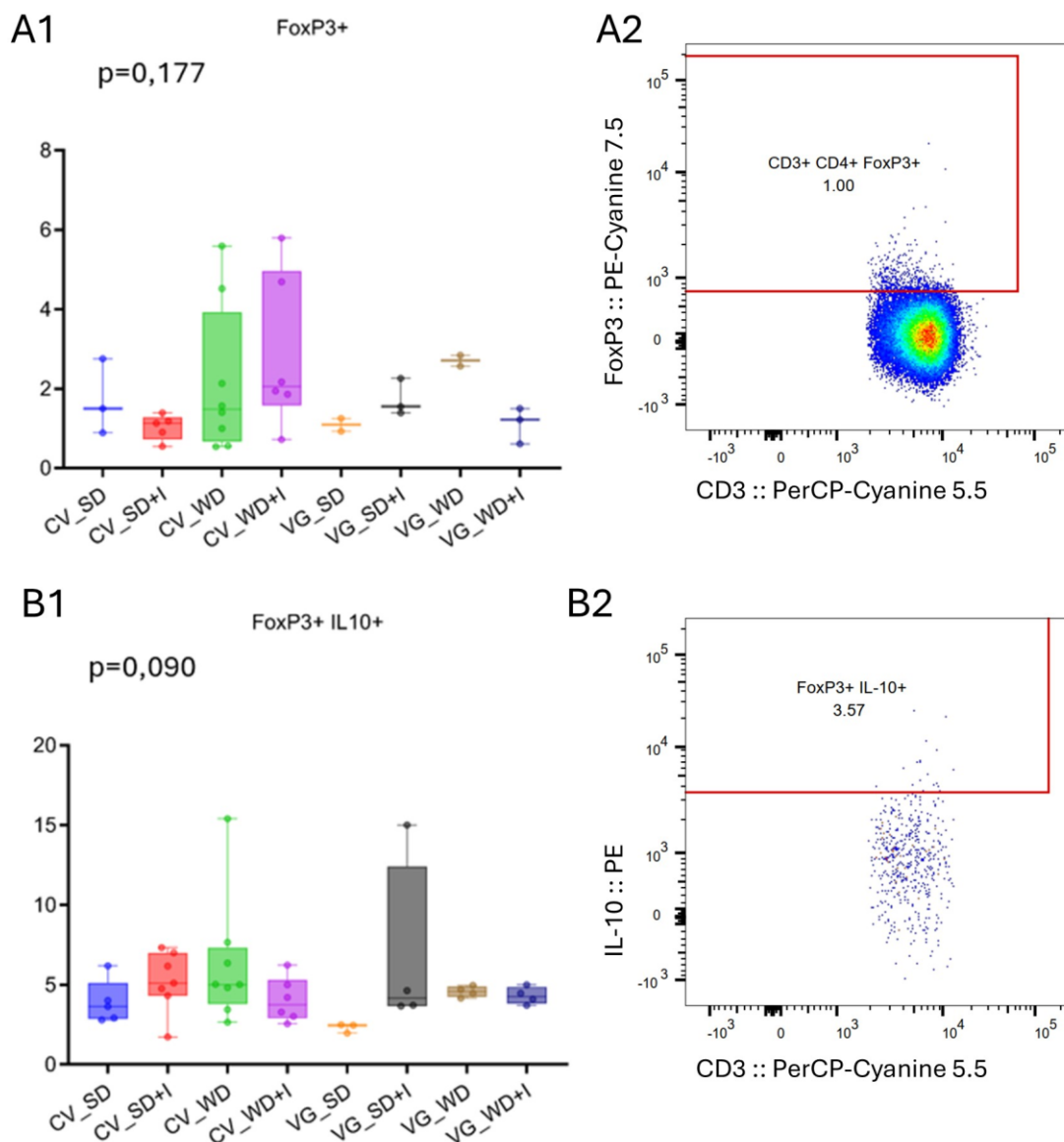


Obrázek 5-11: Zastoupení subpopulací lymfocytů IFN- γ + a IL-10+ v populacích CD3+CD4+ v mezenterické uzlině s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence IFN- γ + lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-4; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-5; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_SD.

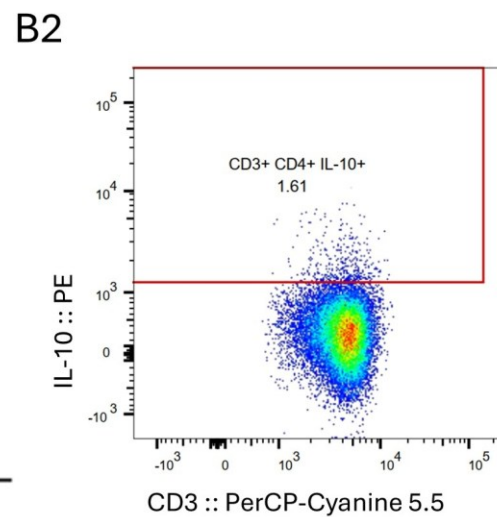
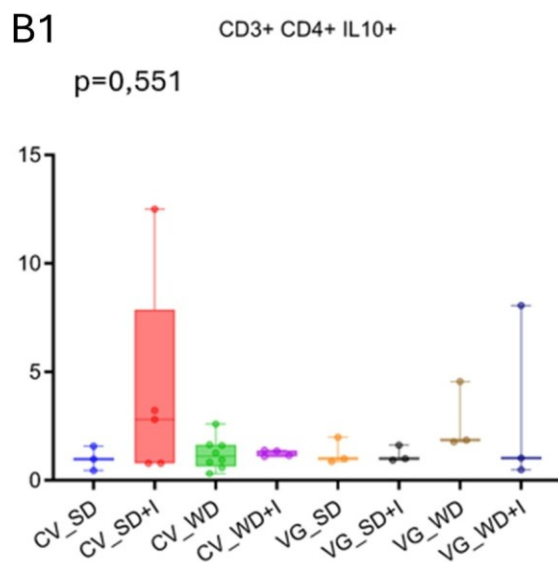
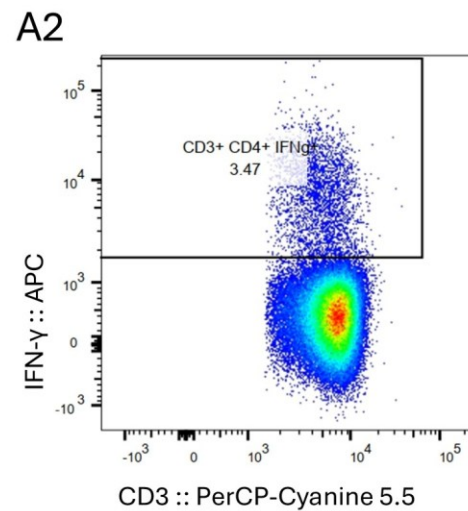
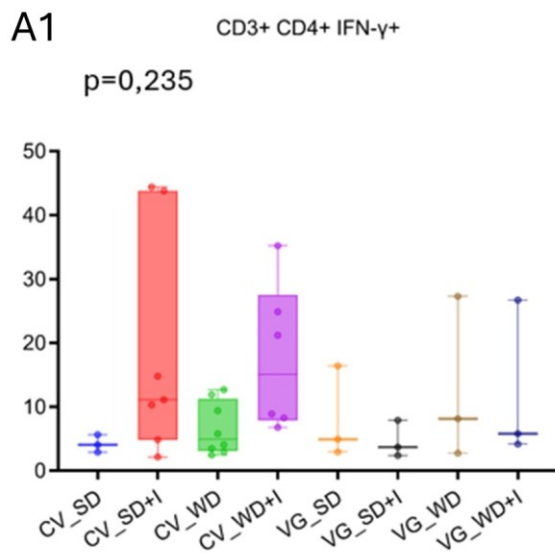
V pankreatické uzlině se nepodařilo identifikovat žádné signifikantní rozdíly v subpopulacích lymfocytů (viz Obrázek 5-12 a Obrázek 5-13). Počty použitých měření viz Tabulka 5-4. Reprezentativní dotploty pro každou skupinu viz v přílohách Obrázek 8-14 a Obrázek 8-15.

Tabulka 5-4: Počty cytometrických měření PLN ve skupinách zařazených do statistiky

| PLN | SD | SD+I | WD | WD+I |
|-----|-----|------|-----|------|
| CV | 3-5 | 5-7 | 8 | 4-6 |
| VG | 3 | 3-4 | 3-4 | 3-4 |



Obrázek 5-12: Zastoupení subpopulací lymfocytů FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ v pankreatických uzlinách s reprezentativními dotploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence FoxP3+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci FoxP3+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_WD.

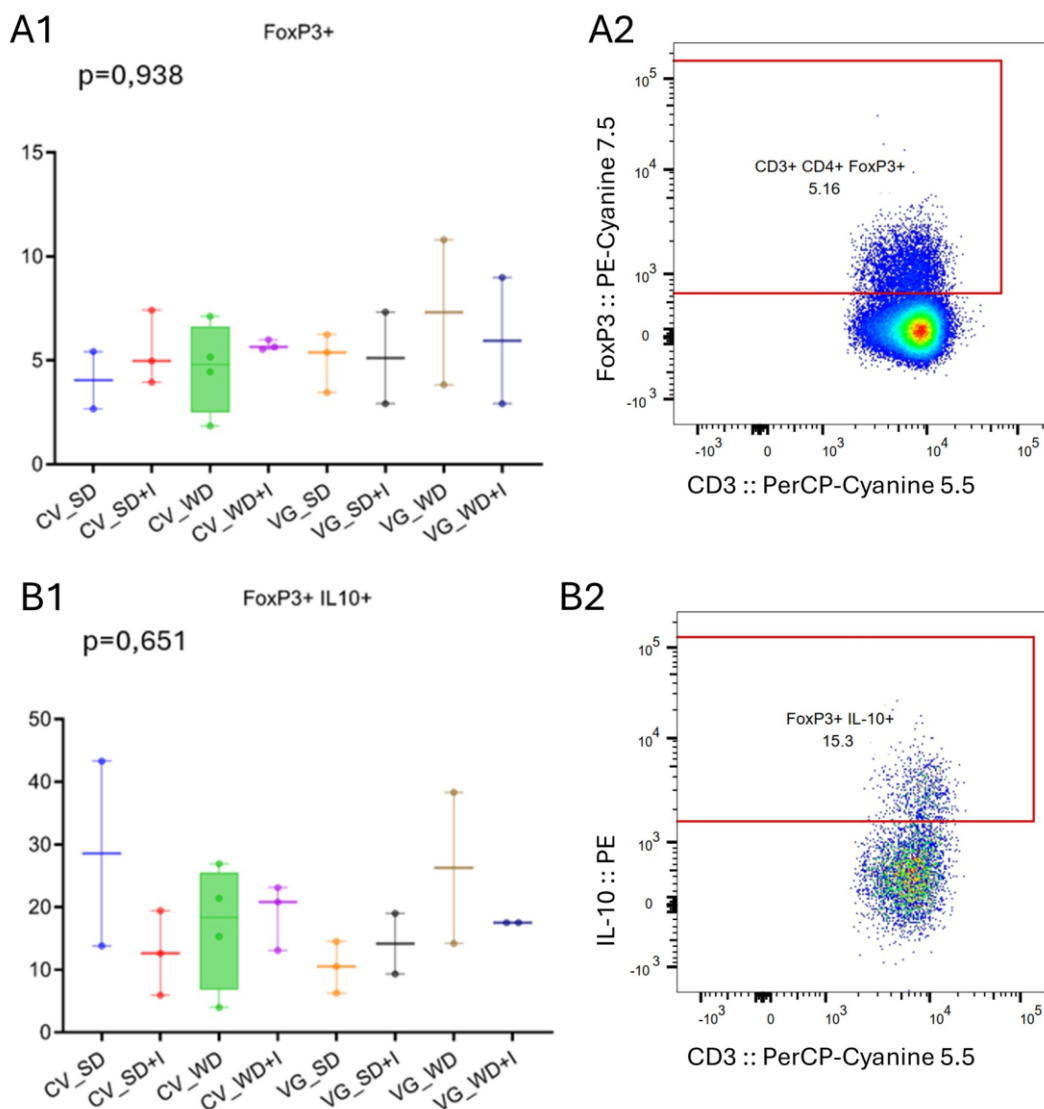


Obrázek 5-13: Zastoupení subpopulací lymfocytů IFN- γ + a IL-10+ v populacích CD3+CD4+ v pankreatických uzlinách s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence IFN- γ + lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-4; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_WD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-5; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_WD.

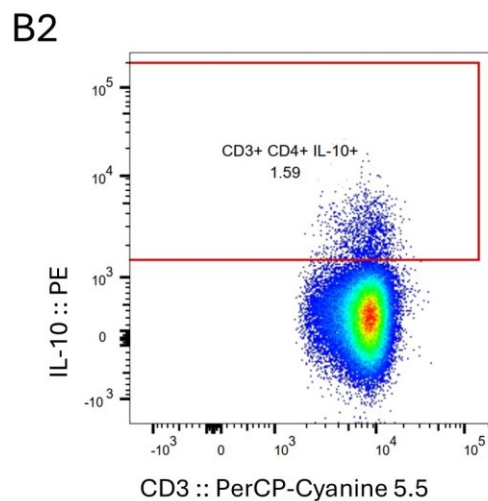
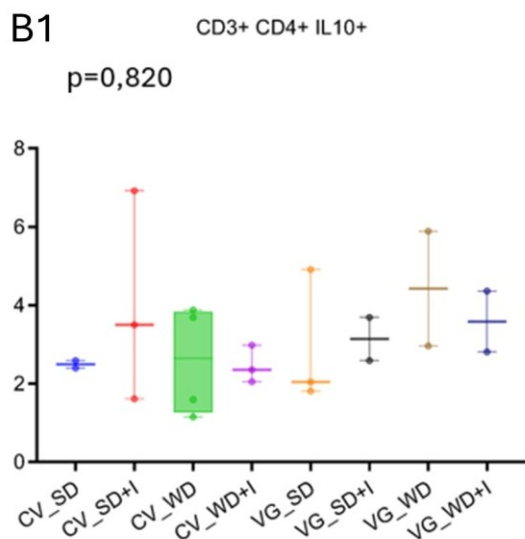
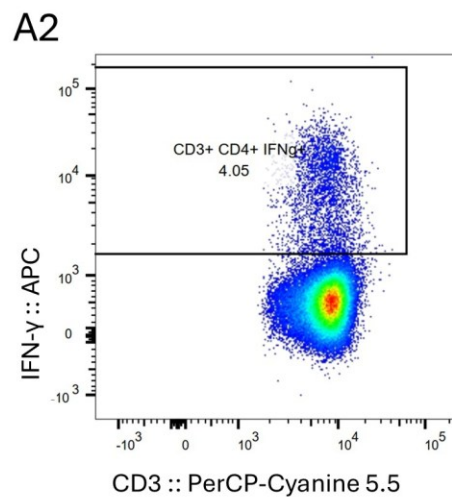
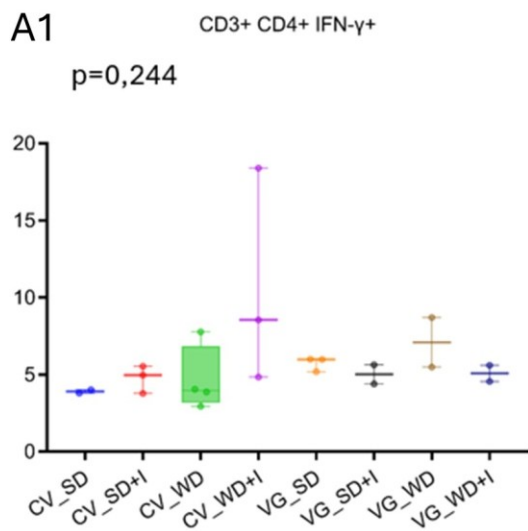
V Peyerových plátech se nepodařilo identifikovat žádné signifikantní rozdíly v subpopulacích lymfocytů (viz Obrázek 5-14 a Obrázek 5-15). Počty použitých měření viz Tabulka 5-5. Reprezentativní dotploty pro každou skupinu viz v přílohách Obrázek 8-16 a Obrázek 8-17.

Tabulka 5-5: Počty cytometrických měření PP ve skupinách zařazených do statistiky

| PP | SD | SD+I | WD | WD+I |
|----|-----|------|-----|------|
| CV | 2-3 | 3 | 3-4 | 3 |
| VG | 3 | 3 | 3 | 2-3 |



Obrázek 5-14: Zastoupení subpopulací lymfocytů FoxP3+ a FoxP3+ IL-10+ v Peyerových plátech s reprezentativními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence FoxP3+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; A2: reprezentativní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_SD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci FoxP3+, viz gating na obrázku Obrázek 5-2; B2: reprezentativní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_WD.



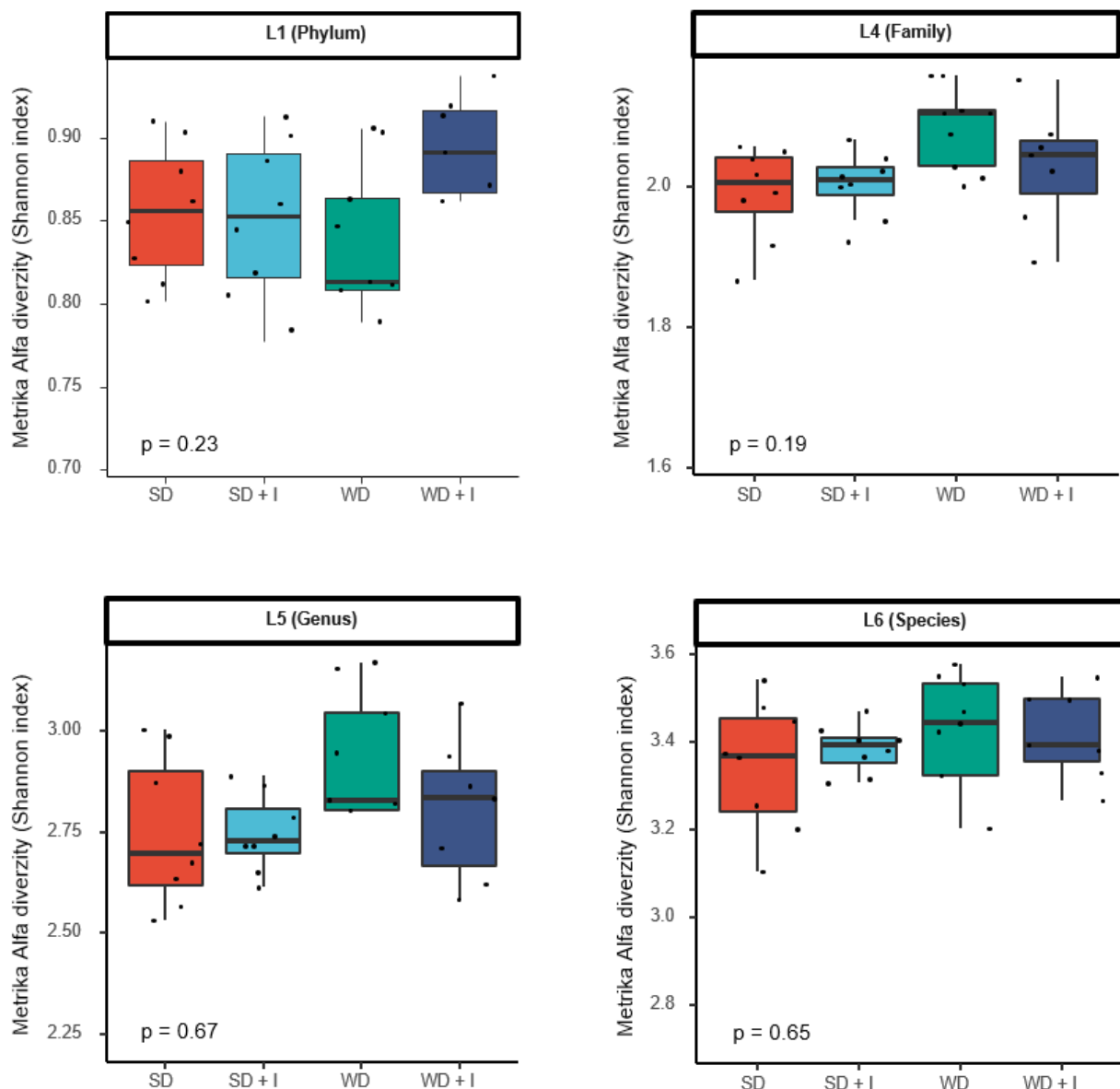
Obrázek 5-15: Zastoupení subpopulací lymfocytů IFN- γ a IL-10+ v populacích CD3+CD4+ v Peyerových plátech s reprezentivními dot ploty. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. A1: frekvence IFN- γ + lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-4; A2: reprezentivní dot plot subpopulace z A1, skupina CV_WD; B1: frekvence IL-10+ lymfocytů v populaci CD3+CD4+, viz gating na obrázku Obrázek 5-5; B2: reprezentivní dot plot subpopulace z B1, skupina CV_WD.

5.2. Analýza složení střevní mikrobioty

Vzhledem k minimálnímu vlivu inulinu na fyziologické parametry CV myši jsme se rozhodli dále zaměřit na analýzu mikrobioty pouze u modelu VG, abychom identifikovali klíčové faktory spojené s pozorovanými změnami. Protože výsledky cytometrické analýzy nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly, z další korelační analýzy jsme je rovněž vynechali.

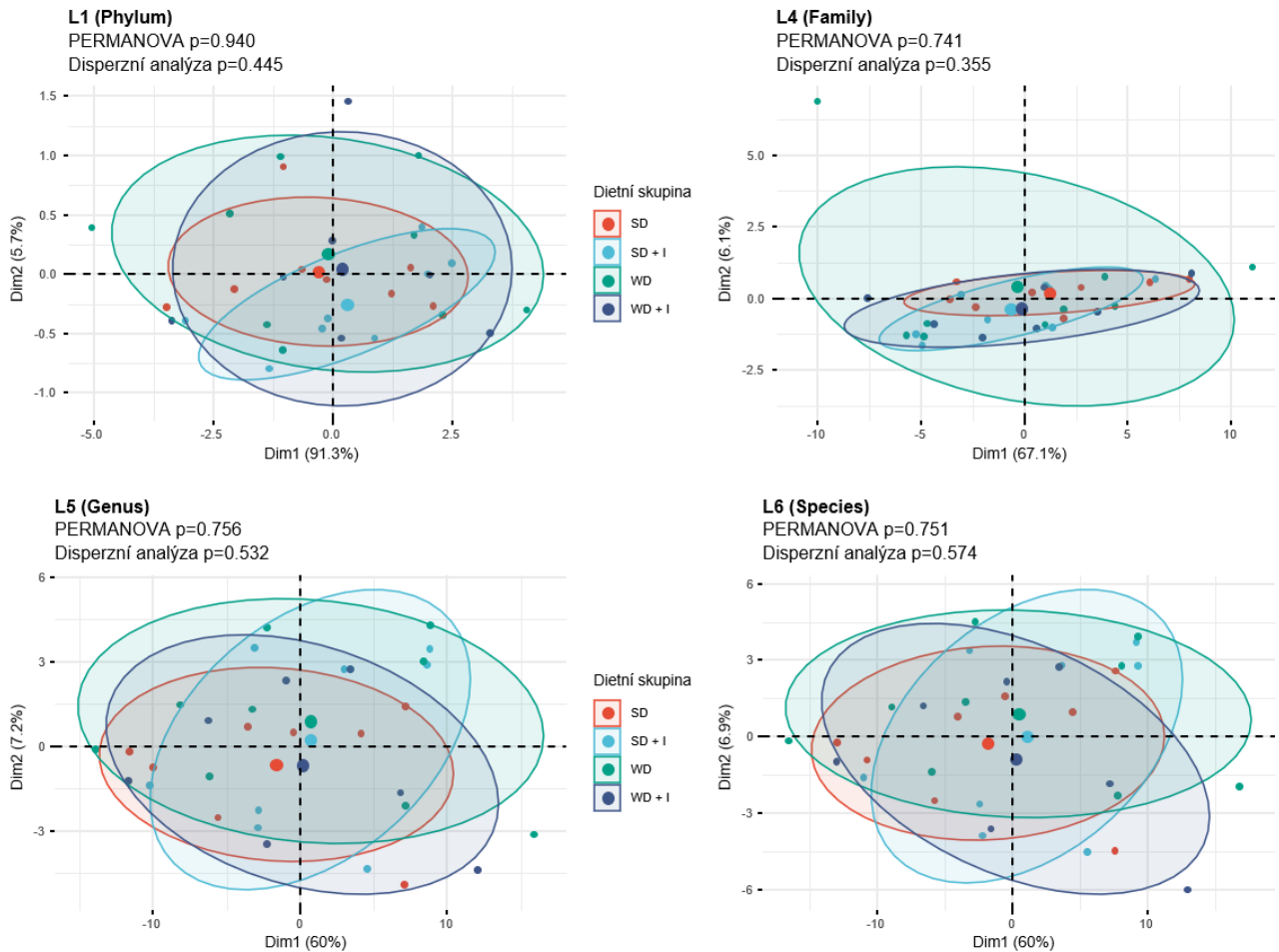
5.2.1. Složení střevní mikrobioty před dietní intervencí

V časovém bodu A se alfa diverzita mikrobioty ve stolici mezi skupinami signifikantně nelišila na žádné z taxonomických úrovní (viz Obrázek 5-16).



Obrázek 5-16: Alfa diverzita (Shannon index) VG myši před dietní intervencí na různých taxonomických úrovních. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

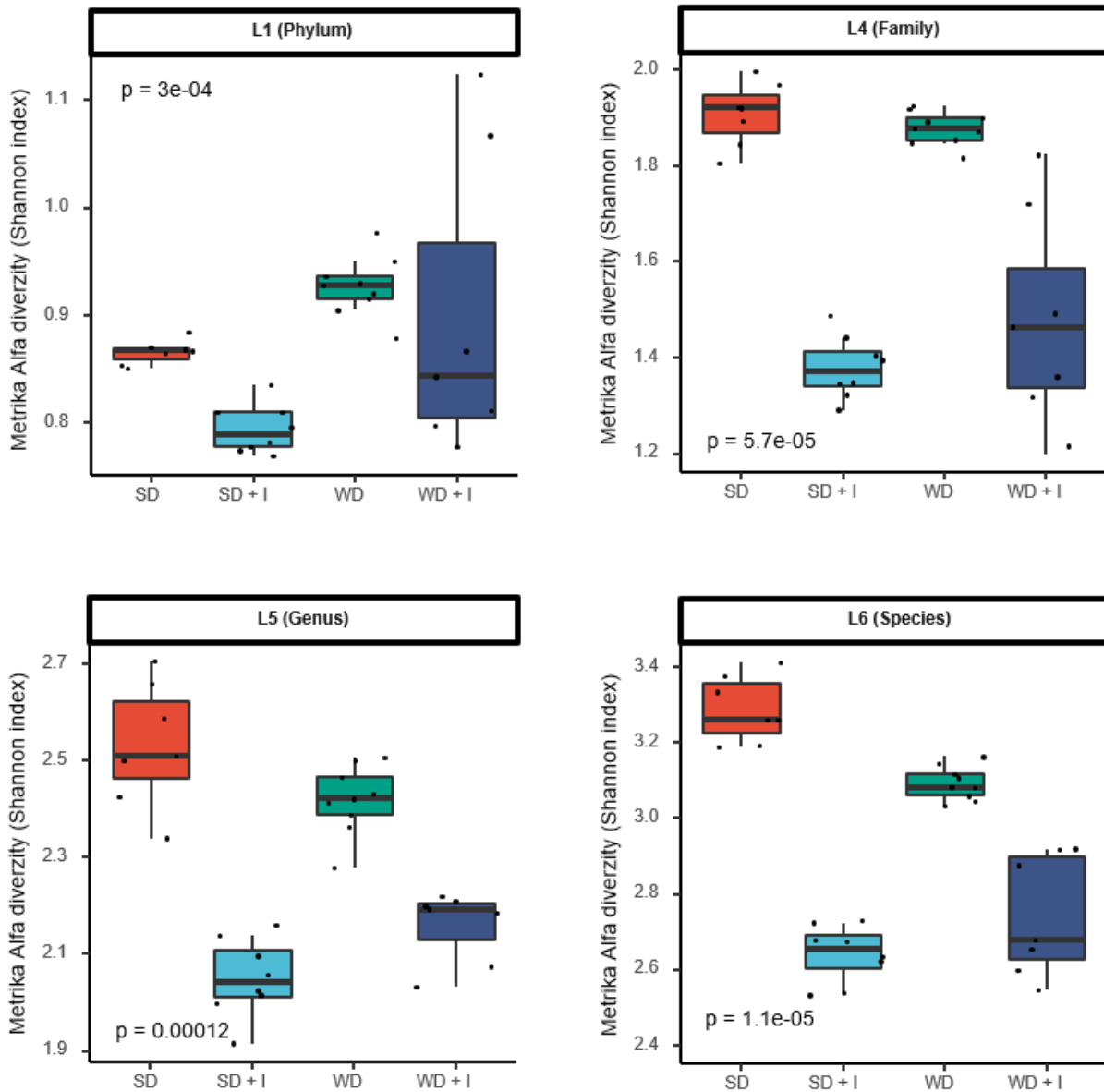
Dále byla stanovena beta diverzita srovnávající jednotlivé skupiny před dietní intervencí pomocí eukleidovské vzdálenosti. Rozdělení skupin podle variance v relativním zastoupení taxonů bylo vizualizováno pomocí PCA. Výrazný překryv skupin na PCA grafech naznačuje podobnost složení mikrobioty u všech skupin. Nevýznamné výsledky permanovy potvrzují, že mezi skupinami v tomto časovém bodě nejsou statistické rozdíly (viz Obrázek 5-17).



Obrázek 5-17: Beta diverzita mikrobioty před dietní intervencí na různých taxonomických úrovních. Grafy vizualizují první dvě komponenty zobrazující složení mikrobioty. Elipsy představují 95% intervaly spolehlivosti pro jednotlivé dietní skupiny. Dim1 a Dim2 reprezentují první a druhou hlavní komponentu, v závorkách je uvedeno procento vysvětlené variability. Malé tečky v PCA grafech představují jednotlivé vzorky myši. Velké tečky reprezentují centroidy skupin, tedy průměrné hodnoty hlavních komponent za celou dietní skupinu. Hodnoty byly porovnány pomocí statistického testu PERMANOVA. Grafy byly publikovány (Daskova et al., 2023).

5.2.2. Vliv dietní intervence na složení mikrobioty ve slepém střevě

Po dietní intervenci, v časovém bodu B, byly odebrány vzorky obsahu slepého střeva s cílem porovnat složení mikrobioty mezi dietními skupinami. Analyzovali jsme obsah slepého střeva, protože jej považujeme za nejreprezentativnější vzorek mikrobioty v distálním střevě. Alfa diverzita byla signifikantně rozdílná na všech taxonomických úrovních (viz Obrázek 5-18).



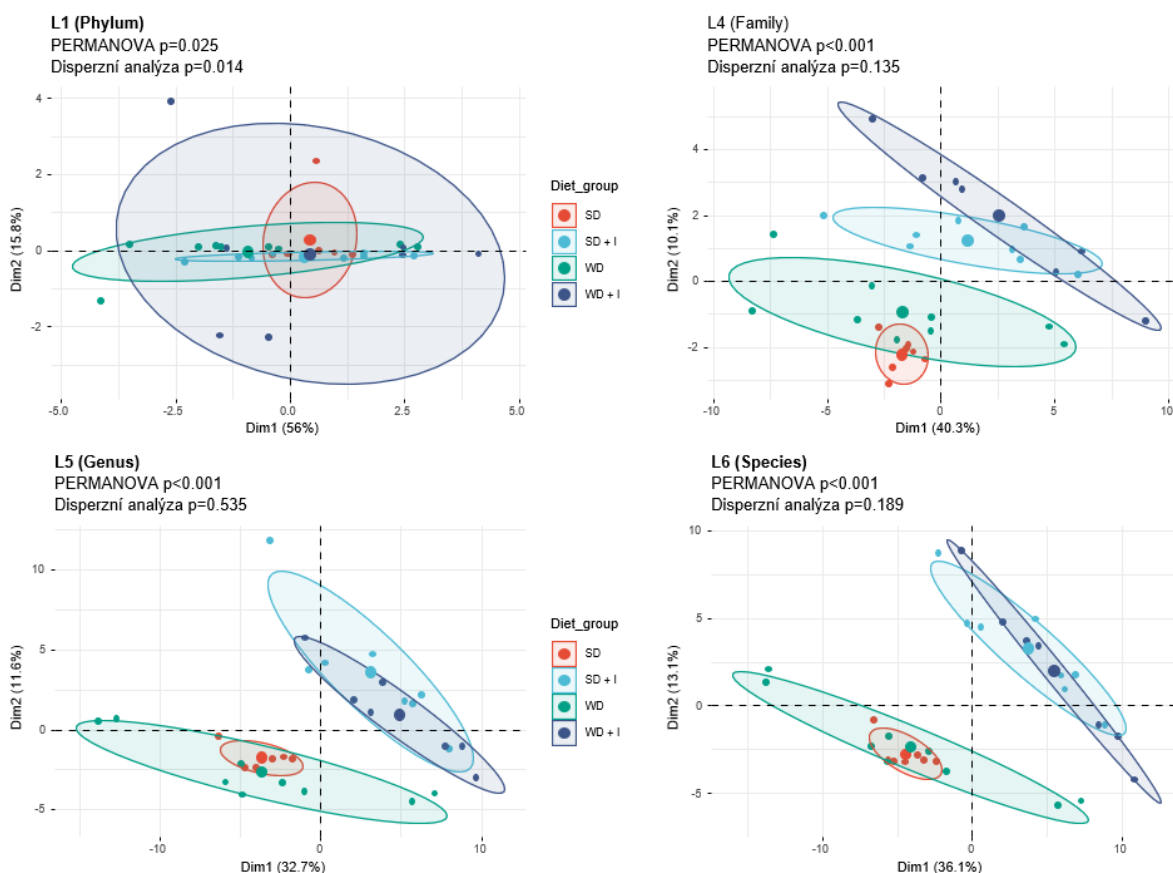
Obrázek 5-18: Alfa diverzita (Shannon index) VG skupin myší po dietní intervenci na různých taxonomických úrovních. P-hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v každém grafu. Jednotlivé p-hodnoty párových srovnání v Tabulce Tabulka 5-6. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

Dále jsme analyzovali beta diverzitu, tj. míru podobnosti složení střevní mikrobioty v jednotlivých skupinách. metodou PERMANOVA jsme našli statisticky významné rozdíly mezi skupinami SD vs SD+I a SD vs WD+I ve všech analyzovaných taxonomických úrovních kromě úrovně phylum. WD signifikantně zvýšila diverzitu na úrovni L1 (phylum), ale neovlivnila ostatní taxonomické úrovně. Suplementace inulinem (SD vs SD+I a WD vs WD+I) negativně ovlivnila beta diverzitu na všech úrovních kromě phyla a genus nezávisle na typu diety (SD vs SD+I a WD vs WD+I) (viz Tabulka 5-6).

Tabulka 5-6: Beta diverzita mikrobiálního složení na různých taxonomických úrovních. Uvedené hodnoty jsou výsledky PERMANOVA testu. Zeleně jsou zvýrazněny hodnoty $p < 0,05$.

| srovnání | phylum | family | genus | species |
|--------------|--------|--------|--------|---------|
| SD vs WD | 0,085 | 0,678 | 0,3 | 0,97 |
| SD vs SD+I | 0,059 | ≤0,001 | ≤0,001 | ≤0,001 |
| SD vs WD+I | 0,814 | 0,003 | 0,007 | ≤0,001 |
| WD vs WD+I | 0,063 | 0,007 | 0,079 | 0,027 |
| SD+I vs WD+I | 0,074 | 0,646 | 0,269 | 0,649 |

Analýza beta diverzity v časovém bodu B odhalila významný vliv podávání inulinu, který převýšil vliv diety (Obrázek 5-19).



Obrázek 5-19 Vliv diety na beta diverzitu mikrobioty jednotlivých skupin na různých taxonomických úrovních po dietní intervenci. Grafy vizualizují analýzu prvních dvou komponent zobrazující složení mikrobioty. Elipsy představují 95% intervaly spolehlivosti pro jednotlivé dietní skupiny. Dim1 a Dim2 reprezentují první a druhou hlavní komponentu, v závorkách je uvedeno procento vysvětlené variability. Malé tečky v PCA grafech představují jednotlivé vzorky myši. Velké tečky reprezentují centroidy skupin, tedy průměrné hodnoty hlavních komponent za celou dietní skupinu. Hodnoty byly porovnány pomocí statistického testu PERMANOVA, p -hodnoty srovnání mezi skupinami viz v tabulce Tabulka 5-7. Grafy byly publikovány (Daskova et al., 2023).

Test PERMANOVA prokázal statistické významné rozdíly ve složení mikrobioty mezi všemi testovanými skupinami, tedy prokázal nejen vliv inulinu, ale i vliv WD (viz Tabulka 5-7).

Tabulka 5-7: P-hodnoty PERMANOVA testu beta diverzity mikrobioty po dietní intervenci, upravené Bonferonniho korekcí. Zeleně jsou zvýrazněné $p \leq 0,05$.

| srovnávané skupiny | L1 (phylum) | L4 (family) | L5 (genus) | L6 (species) |
|--------------------|-------------|-------------|------------|--------------|
| SD vs SD + I | 0,100 | 0,002 | 0,001 | 0,001 |
| SD vs WD | 0,100 | 0,038 | 0,001 | 0,001 |
| SD vs WD + I | 0,424 | 0,002 | 0,001 | 0,001 |
| SD + I vs WD | 0,100 | 0,032 | 0,002 | 0,001 |
| SD + I vs WD + I | 0,244 | 0,144 | 0,006 | 0,009 |
| WD vs WD + I | 0,186 | 0,038 | 0,005 | 0,004 |

5.2.3. Složení mikrobioty jako prediktor příslušnosti ke skupině

Výsledky PERMANOVA testu naznačily, že v celkovém složení mikrobioty jednotlivých skupin jsou významné rozdíly. Rozhodli jsme se tento závěr ověřit dalším postupem, s využitím metod strojového učení. S využitím lasso logistické regrese jsme sestavili panel binárních klasifikačních modelů. Na úrovni L1 (phylum) jsme byli schopni spolehlivě rozlišit pouze skupiny VG_SD+I vs VG_SD a VG_WD vs VG_SD, ale rozlišení mezi ostatními skupinami bylo neuspokojivé (viz Tabulka 5-8). Přesnost separace se zvyšovala s dosažením nižších taxonomických úrovní. Na úrovni L6 (species) mohly být všechny páry skupin odděleny s přesností alespoň 90% (viz Tabulka 5-9).

Tabulka 5-8: Hodnoty vybraných parametrů klasifikačního modelu rozlišujícího vzorky experimentálních skupin na úrovni L1 (phylum). Data využita k vytvoření této tabulky byla publikována (Daskova et al., 2023).

| Srovnávané skupiny | SD vs SD+I | SD vs WD | SD vs WD+I | SD+I vs WD | SD+I vs WD+I | WD vs WD+I |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| Přesnost | 1 | 0,96 | 0,65 | 0,97 | 0,67 | 0,71 |
| 95% Interval spolehlivosti přesnosti | (0,97; 1) | (0,92; 0,99) | (0,56; 0,73) | (0,94; 0,99) | (0,59; 0,75) | (0,64; 0,79) |
| P-hodnota | $<2,2 \times 10^{-16}$ | $<2 \times 10^{-16}$ | 2×10^{-4} | $<2 \times 10^{-16}$ | 3×10^{-4} | $3,36 \times 10^{-5}$ |
| Citlivost | 1 | 1 | 0,85 | 0,98 | 0,8 | 0,8 |
| Specifická | 1 | 0,93 | 0,44 | 0,97 | 0,5 | 0,61 |

Tabulka 5-9: Hodnoty vybraných parametrů klasifikačního modelu rozlišujícího vzorky experimentálních skupin na úrovni L6 (species). Data využita k vytvoření této tabulky byla publikována (Daskova et al., 2023).

| Srovnávané skupiny | SD vs SD+I | SD vs WD | SD vs WD+I | SD+I vs WD | SD+I vs WD+I | WD vs WD+I |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Přesnost | 1 | 0,9438 | 1 | 0,9235 | 0,9667 | 0,925 |
| 95% Interval spolehlivosti přesnosti | (0,97; 1) | (0,9; 0,97) | (0,97; 1) | (0,87; 0,96) | (0,92, 0,99) | (0,87; 0,96) |
| P-hodnota | $<2,2 \times 10^{-16}$ | $<2,2 \times 10^{-16}$ | $<2,2 \times 10^{-16}$ | $<2 \times 10^{-16}$ | $<2 \times 10^{-16}$ | $<2 \times 10^{-16}$ |
| Citlivost | 1 | 1 | 1 | 0,89 | 0,94 | 0,89 |
| Specifická | 1 | 0,9 | 1 | 0,9556 | 1 | 0,9714 |

5.2.4. Analýza diskriminačních taxonů mezi dietními skupinami

Vzhledem k výsledkům PERMANOVA a klasifikačních modelů, které indikovaly podstatnou rozdílnost střevní mikrobioty v jednotlivých skupinách, jsme přistoupili k identifikaci konkrétních bakteriálních taxonů rozlišující mezi skupinami. Podle testu pravděpodobnostního poměru (LRT) měly diety na zastoupení jednotlivých kmenů s výjimkou Campylobacterota a Proteobacterota signifikantní vliv (viz tabulku 5-5). Dále jsme se zaměřili na signifikantní rozdíly v zastoupení taxonů u klíčových dvojic diet:

- SD+I vs. SD: Ukazuje, jaký vliv má inulin na pozadí SD
- WD vs. SD: Ukazuje, jaký vliv má samotná WD
- WD+I vs. SD: Ukazuje kombinovaný vliv WD a inulinu oproti SD
- WD+I vs. WD: Ukazuje, jak inulin moduluje vliv WD

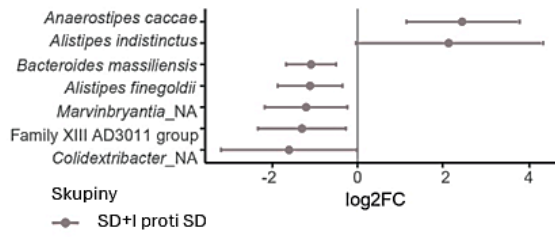
Dle výsledků Waldova testu (Tabulka 5-10: Výsledky LRT a párového Waldova testu a q hodnoty jednotlivých srovnání na úrovni L1 (phylum). Hodnoty q párových srovnání jsou zvýrazněny zeleně u signifikantních rozdílů. Tabulka 5-10 a Tabulka 8-2 v příloze) jsme identifikovali, mezi kterými dvojicemi byly signifikantní rozdíly. Dalším výsledkem analýzy byly rozdíly mezi skupinami uvedenými jako \log_2 (násobek změny) (Tabulka 5-10 a Tabulka 8-2 v příloze). Na úrovni L1 (phylum) (Tabulka 5-10) Byla skupina VG_WD charakterizována vyšším zastoupením Bacteroidota, Actinobacteriota a Verrucomicrobiota a sníženým zastoupením Bacillota ve srovnání se skupinou VG_SD. Suplementace inulinem působila proti účinku WD na Bacillota a zvyšovala abundanci Verrucomicrobia. Dále suplementace inulinem vedla ke snížení Desulfobacterota jak u myši krmených SD, tak WD.

Tabulka 5-10: Výsledky LRT a párového Waldova testu a q hodnoty jednotlivých srovnání na úrovni L1 (phylum). Hodnoty q párových srovnání jsou zvýrazněny zeleně u signifikantních rozdílů. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

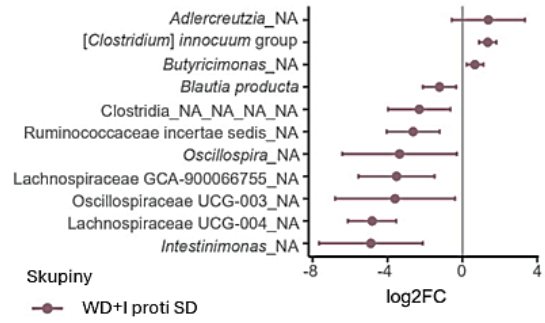
| Phyla | LRT | \log_2 (násobek změny) | | | | Waldův test ($q=$) | | | |
|---------------------------|----------|--------------------------|--------|---------|---------|----------------------|-------|---------|---------|
| | ($p=$) | SD+I_SD | WD_SD | WD+I_SD | WD+I_WD | SD+I_SD | WD_SD | WD+I_SD | WD+I_WD |
| Bacteroidota | 0,002 | -0,038 | 0,336 | -0,252 | 0,084 | 0,861 | 0,002 | 0,026 | 0,476 |
| Bacillota (Firmicutes) | 0,001 | 0,677 | -0,658 | 0,536 | 1,194 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Desulfobacterota | 0,001 | -1,628 | -0,122 | -0,708 | -0,586 | 0,001 | 0,66 | 0,001 | 0,007 |
| Campylobacterota | 0,831 | -1,435 | -1,833 | 1,091 | 2,925 | 0,861 | 0,66 | 0,804 | 0,481 |
| Verrucomicrobiota | 0,038 | 0 | 16,03 | 25,66 | 9,63 | 1 | 0,001 | 0,001 | 0,042 |
| Actinobacteriota | 0,001 | -0,257 | 2,483 | 1,82 | -0,663 | 0,861 | 0,001 | 0,001 | 0,275 |
| Proteobacteria | 0,006 | 0,303 | -0,074 | -0,292 | -0,218 | 0,164 | 0,66 | 0,118 | 0,275 |

Na úrovni L6 (species) (viz Tabulka 8-2 v příloze) jsme identifikovali 76 statisticky významně odlišně zastoupených taxonů (při $FDR < 0,1$.) tj. 64 % ze všech identifikovaných druhů. Za použití těchto údajů jsme taxony rozdělili do šesti skupin (viz Obrázek 5-20).

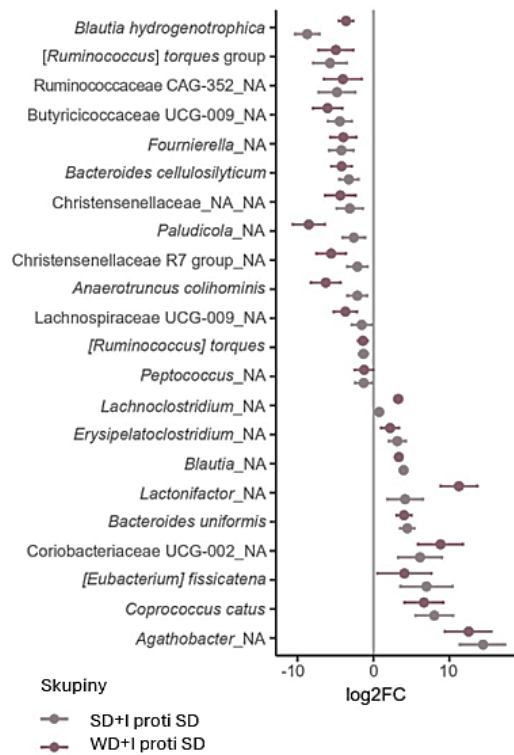
A Taxa ovlivněná inulinem v kombinaci s SD



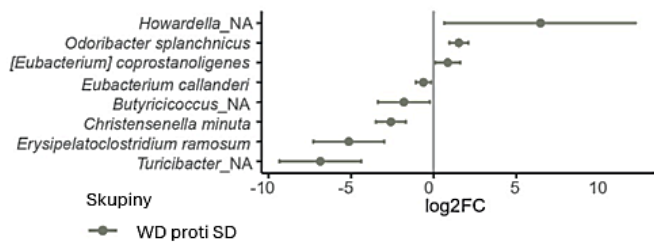
B Taxa ovlivněná inulinem v kombinaci s WD



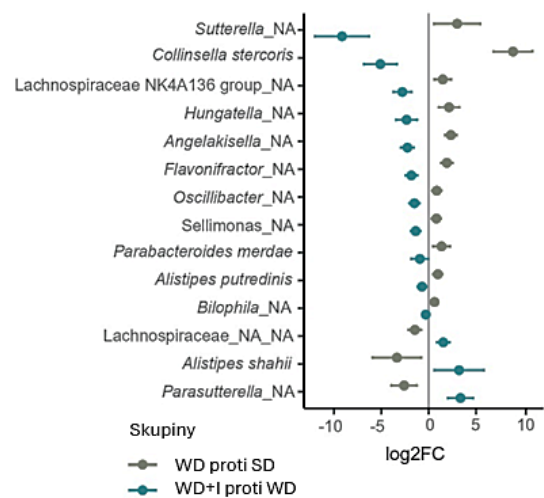
C Taxa ovlivněná inulinem nezávisle na dietě



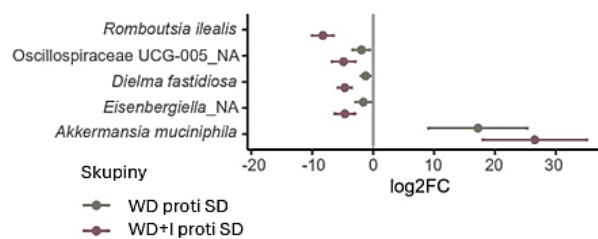
D Taxa ovlivněná pouze WD



F Taxa ovlivněná WD a inulinem s neutralizačním efektem



E Taxa ovlivněná WD a inulinem s aditivním efektem

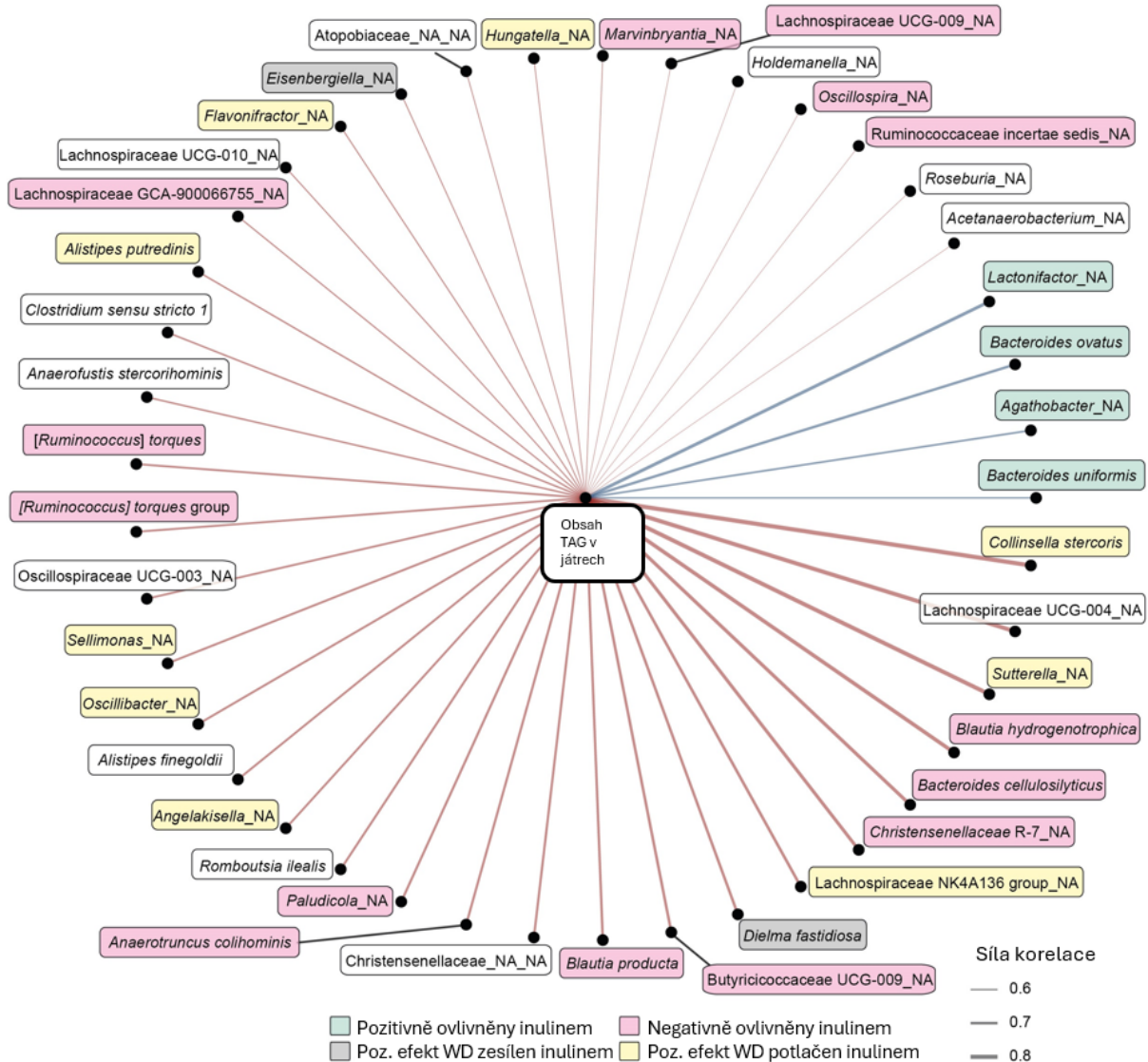


Obrázek 5-20: Bakteriální taxony významně ovlivněné dietní intervencí. Graf ukazuje velikost účinku vyjádřený jako \log_2 (násobek změny), tj. \log_2FC . Grafy byly publikovány (Daskova et al., 2023).

Sedm taxonů bylo ovlivněno inulinem pouze v kombinaci s SD, z toho dva taxony byly inulinem stimulovány, pět taxonů bylo při suplementaci inulinem méně abundantních. Analogicky, 11 taxonů bylo ovlivněno inulinem pouze na pozadí WD, z toho tři stimulovány a 8 potlačeno. Vliv inulinu se projevil nezávisle na typu diety u 22 taxonů, přičemž devět taxonů bylo inulinem stimulováno, abundance 13 taxonů byla v přítomnosti inulinu ve srovnání se samotnou dietou snižena. Podávání WD ovlivnilo abundanci osmi taxonů, tři pozitivně, pět negativně. V případě pěti taxonů byl vliv WD a inulinu aditivní, u čtyř taxonů se jednalo o represi, u jednoho o stimulaci. Celkem 14 taxonů bylo WD a inulinem ovlivněno protichůdně. Jedenáct taxonů z této kategorie bylo stimulováno WD, a naopak potlačeno při suplementaci inulinem. Tři taxony byly méně abundantní na WD a stimulovány inulinem.

5.2.5. Integrativní analýza

Nejvýznamnější klinicky významný efekt inulinu spočíval v eliminaci jaterní steatózy indukované podáváním WD. V dalším kroku jsme proto hledali asociace mezi konkrétními taxony a tímto efektem na základě Spearmanových korelací mezi obsahem TAG v játrech a přítomností bakteriálních taxonů v slepém střevě ve skupinách VG_WD a VG_WD+I. Steatóza jater negativně korelovala s abundancí čtyř taxonů bakterií (*Agathobacter*, *Lactonifractor*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*), z nichž všechny byly pozitivně stimulovány inulinem. Třicet sedm taxonů korelovalo pozitivně s obsahem TAG v játrech, včetně devíti bakterií, jejichž hojnost byla pozitivně ovlivněna WD a negativně inulinem a dvanácti bakterií, které byly negativně modulovány inulinem (viz Obrázek 5-21).



Obrázek 5-21. Korelační síť mezi obsahem TAG a mikrobiotou slepého střeva. Tloušťka čáry je úměrná hodnotě Spearmanova korelačního koeficientu. Zobrazeny jsou korelace s absolutní hodnotou větší než 0,6. Graf byl publikován (Daskova et al., 2023).

6. Diskuse

Střevní mikrobiota hraje zásadní roli v metabolických a imunologických procesech (Yoo et al., 2020). Výzkumy ukazují, že řada patologických stavů je asociována se střevní dysbiózou. Populární pokus s dvojčaty ukázal, střevní mikrobiota je jedním z faktorů podmiňujících rozvoj obezity. „Obézní“, resp. „štíhlý“ fenotyp je možné reprodukovat u GF myši po kolonizaci střeva odpovídající mikrobiotou. (Ridaura et al., 2013). Kromě toho naše studie potvrzuje předpoklad, že výsledný efekt složení mikrobioty na fenotyp příjemce je do velké míry závislý i na dietě (Ridaura et al., 2013).

Výsledky rozsáhlých prospektivních studií ukázaly, že diety založené převážně nebo úplně na rostlinné stravě mají protektivní účinek vzhledem k různým metabolickým onemocněním, zejména kardiovaskulárním chorobám a T2D (Appleby and Key, 2016). Toto pozorování vedlo k formulaci hypotézy, že mikrobiota asociovaná s veganskou dietou by mohla být přínosná k léčbě metabolických poruch spojených s obezitou. Transplantace mikrobioty od veganských dárců se nabízí jako možnost, jak benefiční účinky této diety přenést na pacienty s obezitou. Několik studií se na tuto možnost zaměřilo. Jejich výsledky ukazují, že přes zlepšení některých metabolických parametrů samotná mikrobiota od veganských dárců nemusí být dostatečně účinná v ochraně před důsledky západní diety a závěry jsou tedy nejednoznačné (Stols-Gonçalves et al., 2023; Witjes et al., 2020).

Jako možným důvodem neuspokojivých výsledků a vodítkem k řešení se jeví vliv stravy po FMT zákroku. Je známo, že prebiotická vláknina, například inulin, je významným faktorem přispívajícím k tvorbě prospěšných metabolitů (Song et al., 2020). Několik studií se zaměřilo na to, jak reaguje metabolismus příjemce FMT v kombinaci s prebiotickou vlákninou podávanou po přenosu mikrobioty. V jednom z těchto pokusů bylo například zjištěno, že experimentální skupiny myši, kterým byla podávána vláknina po FMT zákroku, měla signifikantně lepší výsledky měřených metabolických parametrů (glukózová homeostáza a obsah tuku v séru) oproti FMT skupině bez vlákniny (Zhong et al., 2022). V další ze studií, tentokrát na lidských pacientech s obezitou, bylo podávání „nízkofermentovatelné“ vlákniny po FMT rovněž spojeno s výrazným zlepšením inzulínové rezistence, oproti skupinám přijímající „vysocefermentovatelnou“ vlákninu a bez intervence dietní vlákninou (Mocanu et al., 2021). Výsledky tedy naznačují, že samotná FMT nemusí být dostatečně účinná v ochraně před metabolickými důsledky západní diety, avšak pokud je doplněna „správným“ typem vlákniny, může přinést významné změny.

Jelikož veganská strava je charakteristická zvýšeným příjmem vlákniny, lze vycházet z předpokladu, že mikrobiota od dárce – vegana bude na přítomnost inulinu ve stravě obzvláště responsivní (Sidhu et al., 2023). Proto jsme se rozhodli uplatnit kombinaci FMT s mikrobiotou od veganského dárce a suplementace inulinem.

Na zvířecím modelu jsme prokázali, že mikrobiota od veganských dárců sama o sobě nepůsobí proti metabolicky a imunologicky škodlivým účinkům stravy západního typu, avšak vykazuje schopnost chránit před jaterní steatózou a zhoršením glukózové homeostázy, pokud je dieta doplněna prebiotickým inulinem. Konzistentní pozorování zlepšení většiny metabolických parametrů u skupiny WD+I je v souladu s výše zmíněným výsledkem jednoho z pokusů zkoumajících efekt kombinace FMT a vlákniny (Zhong et al., 2022). V projektu, jehož součástí je i předložená diplomová práce, byl studován i metabolismus obsahu slepého střeva experimentálních zvířat. Suplementace inulinem u VG myši způsobila významnou změnu metabolismu s důrazem na sacharolytickou fermentaci a její produkty (Daskova et al., 2023), jejichž protektivní účinek v T2D je znám a intenzivně zkoumán (Wang et al., 2024). Navzdory očekávání a pozitivním výsledkům většiny podobných pokusů s inulinem (Huang et al., 2023; Rao et al., 2019; Zhu et al., 2023) se jeho účinek projevil pouze v kombinaci s mikrobiotou lidských dárců – veganů u humanizovaných myši, ne s běžnou myší mikrobiotou. Toto zjištění upozorňuje na skutečnost, že lidská mikrobiota se od té myši velmi liší a konkrétní výsledek manipulace

se střevní mikrobiotou je vysoce individuální a je výrazně ovlivněn interakcí hostitel – mikrobiota – dieta.

U skupin se suplementací inulinem byla pozorována snížená abundance kmene *Desulfobacterota*, které metabolizují sírné sloučeniny na potenciálně škodlivé metabolity (například H₂S) spojované se zvýšeným rizikem IBD a střevními záněty (Rajput et al., 2022). Tyto změny jsou v souladu s experimenty, kdy podávání inulinu a snižovalo abundanci kmene *Desulfobacterota* (Feng et al., 2021; Xie et al., 2024). Při hodnocení důsledků na střevní epitel u myšího modelu obstrukce byl pozorován příznivý vliv inulinu na expresi proteinů těsných spojů epitelu a mucinu oproti pokusným myším, kterým inulin podáván nebyl (Xie et al., 2024).

Našli jsme významné korelace mezi určitými bakteriálními taxony a obsahem TAG v játrech. Většina korelací mezi bakteriemi a obsahem jaterních TAG byla pozitivní. Čtrnáct druhů bakterií, jejichž abundance pozitivně koreluje s obsahem TAG v játrech, bylo negativně ovlivněno inulinem; u 9 druhů byl vliv WD a inulinu opačný. Všechny čtyři taxony negativně korelované s obsahem TAG (*Lactonifactor sp.*, *Agathobacter sp.*, *B. ovatus*, *B. uniformis*) byly zároveň pozitivně stimulovány inulinem, což naznačuje možný mechanismus, jakým inulin působil protektivně proti jaterní steatóze. Z analýzy metabolitů navazující na tento experiment vyplývá, že tyto druhy bakterií produkují prospěšné metabolity s antioxidačními, protizánětlivými a antidiabetickými vlastnostmi (Prochazkova et al., 2022) a podle jedné studie provedené na kohortě 2294 dospělých pacientů s obezitou, některé z nich (např. enterolakton a enterodiol) negativně korelují s výskytem NAFLD u lidí (Xiong et al., 2022). *Agathobacter* byl druh nejvíce stimulován inulinem. Jeho zvýšená abundance a produkce butyrátu (SCFA) je korelována se sníženým rizikem obezity a kardiovaskulárních a metabolických onemocnění (Iversen et al., 2022). Bakteriální druh *B. uniformis* v kombinaci s vlákninou přispívá k redukci tělesné hmotnosti a viscerálního tuku, zlepšuje metabolické funkce a obnovuje imunitní rovnováhu střeva (například normalizuje hladiny IFN- γ) u obézních myší (López-Almela et al., 2021). Navíc dle výzkumů je zvýšená abundance *B. ovatus* a *B. uniformis* asociována se zmírněním projevů metabolických onemocnění při podávání diety s vysokým obsahem tuků (Wu et al., 2023). Tyto důkazy naznačují, že změna složení střevní mikrobioty v důsledku suplementace inulinem může být zodpovědná za zmírnění steatózy.

V souladu s literaturou se nám podařilo potvrdit předpoklady o vlivu WD stravy na některé druhy bakterií a následně na fyziologické parametry. Například *Collinsella sp.* a *Suterella sp.* jsou rody asociovány se zvýšeným příjmem tuků (dieta příbuzná WD) a zároveň se zvýšeným rizikem obezity a NAFLD (Wang et al., 2022; Xu et al., 2022).

V imunologické části práce jsme na základě údajů z literatury formulovali několik hypotéz:

1. U myší, u nichž dochází ke zmírnění symptomů inzulinové rezistence a nealkoholové steatohepatitidy (NAFLD), dojde ke zvýšení frekvence protizánětlivých subpopulací lymfocytů (FoxP3+ a IL-10+).
2. Ve skupině VG_WD+I bude pozorována zvýšená frekvence FoxP3+ T lymfocytů produkujících IL-10 v mezenterických lymfatických uzlinách (MLN) a Peyerových placích (PP).
3. U myší vykazujících projevy NAFLD bude přítomna zvýšená frekvence lymfocytů produkujících IFN- γ v mezenterických lymfatických uzlinách a Peyerových placích.

Nepodařilo se nám však nalézt žádné důkazy poukazující na probíhající zánětlivou anebo protektivní reakci na diety ve slizničních kompartmentech, pankreatu, ani na systémové úrovni.

Dalším z nedostatků byl silný „batch efekt“, neboli efekt série, způsobený prováděním experimentu v průběhu dvou let. V našem projektu jsme se snažili minimalizovat tento vliv pečlivým plánováním a standardizací postupů, nicméně i přesto existuje riziko, že vedl k neúmyslným variacím ve výsledcích a ovlivnil některé naše výsledky a závěry. Tento efekt se projevil nejvíce na výsledcích cytometrické

analýzy. Data vykazovala vysokou míru variability, která zásadně komplikovala statistické vyhodnocení. Při hledání spojitosti mezi „extrémními“ hodnotami z cytometrických dat a hodnotami z fyziologických testů nebyla nalezena žádná spojitost, předpokládáme tedy, že tyto artefakty vznikly v průběhu cytometrické části experimentu. Vzniklá variabilita hodnot nebyla odstranitelná ani funkcí pro odstranění odlehlých hodnot, ani logaritmickou transformací hodnot. Je nutné tedy konstatovat, že data získaná z cytometrických měření nebyla průkazná.

Při izolaci lymfocytů z orgánů jsme naráželi na úskalí zvolené metodiky. Lymfocyty izolované z mezenterických a pankreatických uzlin vykazovaly vysokou míru úmrtnosti, pravděpodobně kvůli vysokému obsahu tuku v břišní oblasti. Lymfocyty z Peyerových plátů také vykazovaly extrémní úmrtnost, pravděpodobně kvůli vysoké enzymatické aktivitě přítomných enterocytů. Tento problém nám byl již dopředu znám, avšak i přes přijatá opatření se nám nepodařilo v některých případech izolovat dostatečný počet buněk pro cytometrickou analýzu, proto byly některé vzorky vyřazeny.

Lymfocyty jsou jen jednou z mnoha součástí imunitní regulace při etiologii inzulinové rezistence a NAFLD a zároveň IL-10 nejsou jediným mechanismem, jak Treg regulují prozánětlivou odpověď. Náš experiment měl v tomto zaměření explorativní charakter a v případě, že by se tento projekt s úspěchem opakoval a přinesl pozitivní výsledky, nabízí se mnohé další možnosti, jak ho rozšířit.

Treg produkují mimo jiné cytokiny TGF- β který by mohl k IL-10 doplnit informaci o jejich aktivitě. Je také často zmiňován v kontextu interakce imunita-mikrobiom (Asarat et al., 2016; Hu et al., 2022; Martin-Gallausiaux et al., 2018).

V tomto experimentu navíc chybělo barvení pro CD25+, který je u Treg buněk znakem aktivity a používá se rutinně k přesnějšímu oddělení relevantní subpopulace aktivních Treg (Asarat et al., 2016; Qiao et al., 2016). Navíc by se tím zamezilo chybnému přidělení FoxP3+ buněk, které nepatří do konvenčních Treg, jako například subpopulace ROR γ t+ Treg a Tr1.

Subpopulace ROR γ t+ Treg je také typicky přítomná ve střevech a je také indukována mikrobiálními metabolity, jako SCFA (Cosovanu and Neumann, 2020) a její analýza by tak mohla přinést ještě zajímavější vhledy do aktivace regulačních lymfocytů.

Je nutné v této souvislosti upozornit na určité slabiny projektu. Optimální kontrolní skupinou by byly ex-GF myši kolonizované lidskou mikrobiotou od dárce s obezitou, nikoli myši z konvenčního chovu osídlené obvyklou myší mikrobiotou. Mikrobiota myši je zásadně odlišná od lidské a při použitím uspořádání pokusu nemůžeme zjistit, zda suplementace inulinem má protektivní účinek pouze v kombinaci s mikrobiotou od veganského dárce, nebo zda by se projevil i v kombinaci mikrobiotou jiného lidského dárce. Dále byl v našem pokusu využit čekankový inulin, který představuje pouze jeden druh dietní vlákniny. Přes mnohé důkazy o tom, že inulin má pozitivní účinky a přispívá k tvorbě prospěšných metabolitů (Akram et al., 2019; Guimarães et al., 2024; Huang et al., 2023; Song et al., 2020), jeho výhradní zastoupení a vysoká dávka v experimentálních dietách (10 %) nepředstavují realistickou reprezentaci veškeré vlákniny ve stravě člověka. Běžná strava člověka západního světa obsahuje 1-4 g inulinu denně, což je zanedbatelný podíl (Bosscher, 2009), přesnější odhady, obzvláště u různých druhů jídelniček nejsou známé.

Suplementace inulinem u VG myši vedla k významné změně mikrobiálního složení ve slepém střevě – inulin vyvolal eutrofizaci úzké skupiny bakterií a tím snižoval alfa diverzitu mikrobioty (Ďásková et al., 2023), což je považováno za rizikový faktor (Levy et al., 2017; Lozupone et al., 2012; Marietta et al., 2020). Podávání směsi vláknin (rozpustná kukuřičná vláknina, rezistentní pšeničný škrob a akáciová guma) při dávce 27 g (ženy)/33 g (muži) vedlo ke zvýšení alfa diverzity, naopak podávání jednoho druhu vlákniny (mikrokrytalická celulóza) při stejné dávce nezpůsobilo žádnou změnu alfa diverzity (Mocanu et al., 2021). Lze se tedy domnívat, že zvolením směsi vláknin a adekvátní dávky lze eutrofizačnímu efektu předejít. Výsledky zmíněné studie mimo jiné také ukázaly, že podávání směsi vláknin způsobilo signifikantní zlepšení inzulinové sensitivity, avšak podávání jednoho druhu vlákniny

taková zlepšení nevykazovalo (Mocanu et al., 2021). Dle tohoto výsledku je možné soudit, že pozitivní výsledky po podávání inulinu mohou být zkreslené kvůli podávání nepřiměřeně vysoké dávky jednoho druhu vlákniny. Náš výsledek tedy poukazuje na důležitost vyváženosti stravy a velikosti dávky suplementu a pro získání realističtějších výsledků se nabízí možnost zopakování experimentu s využitím směsi vláknin s menší dávkou jednotlivých složek.

Výsledky pozorování mohou být dále ovlivněny například menším počtem zvířat, než bylo plánováno. Při odchovu myší byla u matek VG myší malá porodnost, pravděpodobně způsobená stresem z FMT zákroku, což snížilo počet dostupných experimentálních zvířat. Vzhledem k těmto důvodům se lze domnívat, že zopakování pokusu s větším počtem experimentálních zvířat by mohlo potvrdit statistickou významnost v některých srovnáních, kde jsme pozorovali určitý trend, ale nebyli jsme schopni ho statisticky prokázat. V neposlední řadě by zvýšení počtu experimentálních zvířat pomohlo v případech, kdy byly orgány poolovány.

Výsledky studie nás vedou k úvahám o tom, jak silně jsou propojeny mikrobiota a dieta a jak můžeme tento vztah využít pro terapeutické účely. Ačkoliv je stále mnoho nejasností, je zřejmé, že stravovací návyky mohou mít hluboký vliv na zdraví, a to nejen prostřednictvím přímých účinků na metabolismus hostitele, ale také prostřednictvím změn ve střevní mikrobiotě. Budoucí výzkum se bude muset zaměřit na přesnější definici toho, co je zdravá mikrobiota, a jak optimalizovat dietní intervence pro dosažení nejlepšího možného zdraví.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zkoumat vliv mikrobioty od veganských dárců na metabolické a imunologické parametry v pro-diabetogenním prostředí. K tomu jsme použili model humanizovaných myší, které byly inokulovány mikrobiotou od veganských dárců a následně vystaveny dietě západního typu (WD), u části zvířat suplementované prebiotikem inulinem.

Výsledky ukázaly, že samotná transplantace mikrobioty od veganských dárců nechránila myši před negativními účinky obezitogenní WD diety. Avšak suplementace inulinem vedla u humanizovaných VG k normalizaci některých parametrů (obsahu triglyceridů v játrech), i když neovlivnila dietně indukovaný přírůstek hmotnosti. U konvenčních myší efekt inulinu pozorován nebyl.

Cytometrická analýza neprokázala signifikantní rozdíly v subpopulacích lymfocytů mezi jednotlivými skupinami, což naznačuje, že imunologické změny indukované dietou jsou jemné a vyžadují další podrobnější studium.

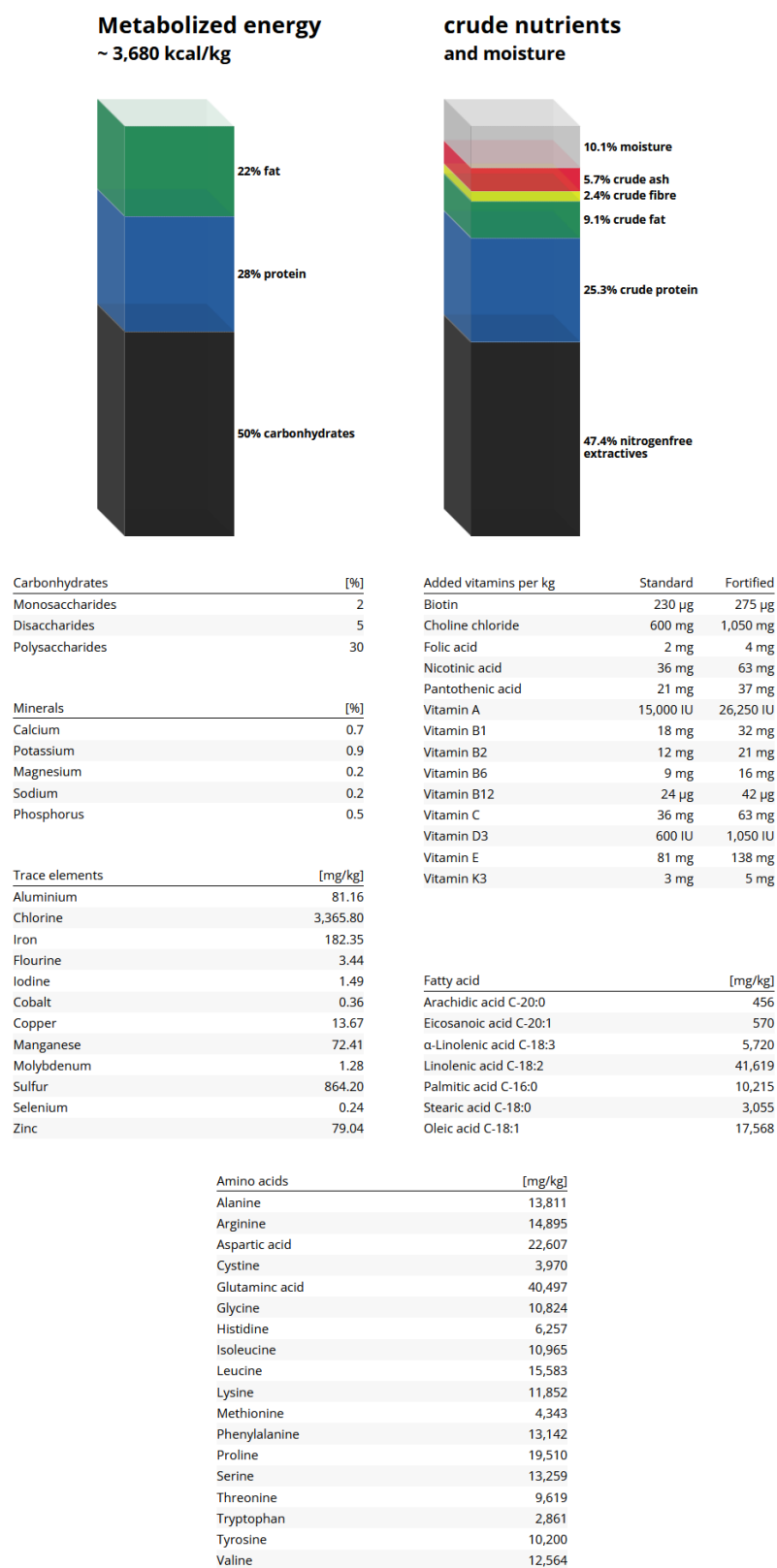
Suplementace standardní i WD diety inulinem se promítla do významné změny ve složení střevní mikrobioty. Identifikovali jsme bakteriální taxony, které významně korelují s pozorovaným snížením jaterní steatózy u humanizovaných myší krmených WD dietou s inulinem.

Pro lepší pochopení mechanismů, jakými mikrobiota od veganských dárců a inulin ovlivňují metabolické a imunologické parametry, by bylo užitečné rozšířit experimentální modely zahrnutím dalších typů lidské mikrobioty, jako je mikrobiota subjektů s obezitou a mikrobiota zdravých štíhlých omnivorů. Dále je nezbytné se věnovat podrobnější analýze změn v dalších relevantních subpopulacích imunitních buněk. Rovněž je důležité provést dlouhodobé studie, které by zkoumaly trvalé účinky dietních intervencí a stabilitu transplantované mikrobioty v čase. Zařazení metabolické analýzy mikrobiálních metabolitů v krevním oběhu a tkáních může přispět k lepšímu pochopení, jak mikrobiota ovlivňuje hostitelský metabolismus na molekulární úrovni.

Výsledky této diplomové práce poskytují poznatky o interakci mezi dietou, střevní mikrobiotou a imunitním systémem. Ukazují, že kombinace mikrobioty od veganských dárců a inulinu může být slibnou strategií pro prevenci a léčbu a metabolických onemocnění, avšak další výzkum je nezbytný pro plné pochopení a optimalizaci této terapeutické metody.

8. Přílohy

8.1. Přílohy k metodám



Obrázek 8-1: Složení chovné diety 1410, Altromin, Německo, zdroj obrázku: <https://altromin.com/products/standarddiets/mice/1410>

Control to Western

ssniff

Low fat control diet to the Western diets | CD.88137

Description

This diet has been designed as control diet to the Western diets. It is characterized by low sugar and fat contents; the butter fat has been exchanged by soybean oil.

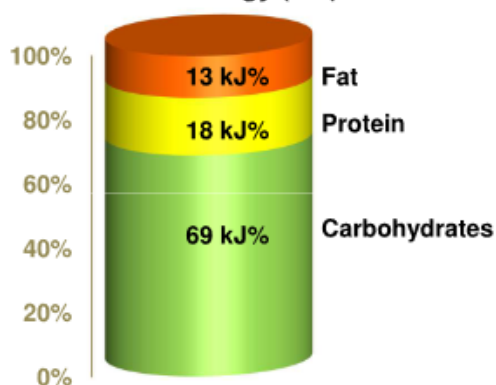
The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.



Gross Energy (GE) 18.3 MJ/kg

Metabolizable Energy (ME) ¹⁾ 15.7 MJ/kg

¹⁾ = Physiological fuel value (Atwater); correspond to 3,750 kcal/kg



| Crude Nutrients | [%] |
|--------------------------|------|
| Crude protein (N x 6.25) | 17.3 |
| Crude fat | 5.1 |
| Crude fibre | 5.0 |
| Crude ash | 3.9 |
| Starch | 38.5 |
| Sugar | 11.0 |
| N free extracts | 64.7 |

| Minerals | [%] | Amino acids | [%] | Vitamins | per kg |
|--------------------|------------|---------------|------|------------------------------|---------------|
| Calcium | 0.76 | Lysine | 1.43 | Vitamin A | 15,000 IU |
| Phosphorus | 0.48 | Methionine | 0.73 | Vitamin D ₃ | 1,500 IU |
| Ca / P | 1.57 : 1 | Cystine | 0.27 | Vitamin E | 150 mg |
| Sodium | 0.16 | Met+Cys | 1.00 | Vitamin K (as MNB) | 20 mg |
| Magnesium | 0.10 | Threonine | 0.76 | Thiamine (B ₁) | 26 mg |
| Potassium | 0.55 | Tryptophan | 0.22 | Riboflavin (B ₂) | 16 mg |
| | | Arginine | 0.67 | Pyridoxine (B ₆) | 16 mg |
| Fatty acids | [%] | Histidine | 0.52 | Cobalamin (B ₁₂) | 30 µg |
| C 12:0 | — | Valine | 1.20 | Nicotinic acid | 49 mg |
| C 14:0 | 0.02 | Isoleucine | 0.97 | Pantothenic acid | 55 mg |
| C 16:0 | 0.61 | Leucine | 1.71 | Folic acid | 16 mg |
| C 17:0 | 0.01 | Phenylalanine | 0.89 | Biotin | 300 µg |
| C 18:0 | 0.19 | Phe+Tyr | 1.80 | Choline | 920 mg |
| C 20:0 | 0.02 | Glycine | 0.34 | | |
| C 16:1 | 0.01 | Glutamic acid | 3.88 | Trace elements | per kg |
| C 18:1 | 1.27 | Aspartic acid | 1.28 | Iron | 49 mg |
| C 18:2 | 2.63 | Proline | 1.97 | Manganese | 22 mg |
| C 18:3 | 0.29 | Serine | 1.03 | Zinc | 41 mg |
| | | Alanine | 0.52 | Copper | 11 mg |
| | | | | Iodine | 0.3 mg |
| Cholesterol | — mg/kg | | | Selenium | 0.2 mg |

Obrázek 8-2: Složení diety CD – Control to western, Ssniff, Německo,

zdroj: https://www.ssniff.com/documents/03-05%20%20Purified%20%20Western%20&%20Control_v.pdf

Western diet – 0.21 % Cholesterol

ssniff

HF / High cholesterol diet for mice | corresponds to TD.88137

Description

The Western diet contains 21 % butter fat and app. 0.21 % cholesterol (0.15 % supplemented). This diet will therefore induce hyperlipidemic disorders, hypercholesterolemia and atherosclerosis, i.e. plaque formation, in ApoE- and Ldlr-deficient mice.

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.



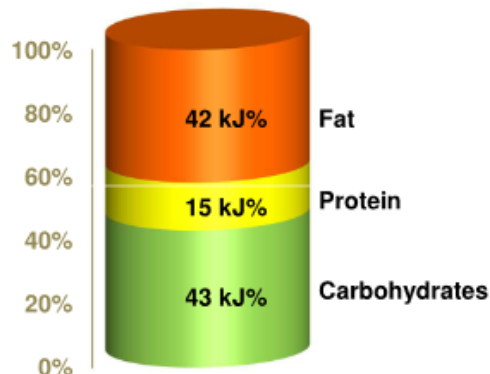
Gross Energy (GE)

21.8 MJ/kg

¹⁾ = Physiological fuel value (Atwater); correspond to 4,575 kcal/kg

Metabolizable Energy (ME) ¹⁾

19.1 MJ/kg



| Crude Nutrients | [%] |
|--------------------------|------|
| Crude protein (N x 6.25) | 17.3 |
| Crude fat | 21.1 |
| Crude fibre | 5.0 |
| Crude ash | 4.2 |
| Starch | 14.4 |
| Sugar | 34.3 |
| N free extracts | 49.8 |

| Minerals | [%] | Amino acids | [%] | Vitamins | per kg |
|------------|----------|---------------|-------------|------------------------------|---------------|
| Calcium | 0.76 | Lysine | 1.43 | Vitamin A | 15,000 IU |
| Phosphorus | 0.45 | Methionine | 0.93 | Vitamin D ₃ | 1,500 IU |
| Ca / P | 1.69 : 1 | Cystine | 0.07 | Vitamin E | 150 mg |
| Sodium | 0.24 | Met+Cys | 1.00 | Vitamin K (as MNB) | 20 mg |
| Magnesium | 0.10 | Threonine | 0.76 | Thiamine (B ₁) | 26 mg |
| Potassium | 0.54 | Tryptophan | 0.22 | Riboflavin (B ₂) | 16 mg |
| | | Arginine | 0.67 | Pyridoxine (B ₆) | 16 mg |
| | | Histidine | 0.52 | Cobalamin (B ₁₂) | 30 µg |
| | | Valine | 1.20 | Nicotinic acid | 49 mg |
| | | Isoleucine | 0.97 | Pantothenic acid | 55 mg |
| | | Leucine | 1.71 | Folic acid | 16 mg |
| | | Phenylalanine | 0.89 | Biotin | 300 µg |
| | | Phe+Tyr | 1.80 | Choline | 920 mg |
| | | Glycine | 0.34 | | |
| | | Glutamic acid | 3.88 | Trace elements | per kg |
| | | Aspartic acid | 1.28 | Iron | 49 mg |
| | | Proline | 1.97 | Manganese | 22 mg |
| | | Serine | 1.03 | Zinc | 41 mg |
| | | Alanine | 0.52 | Copper | 11 mg |
| | | Cholesterol | 2,070 mg/kg | Iodine | 0.3 mg |
| | | | | Selenium | 0.2 mg |

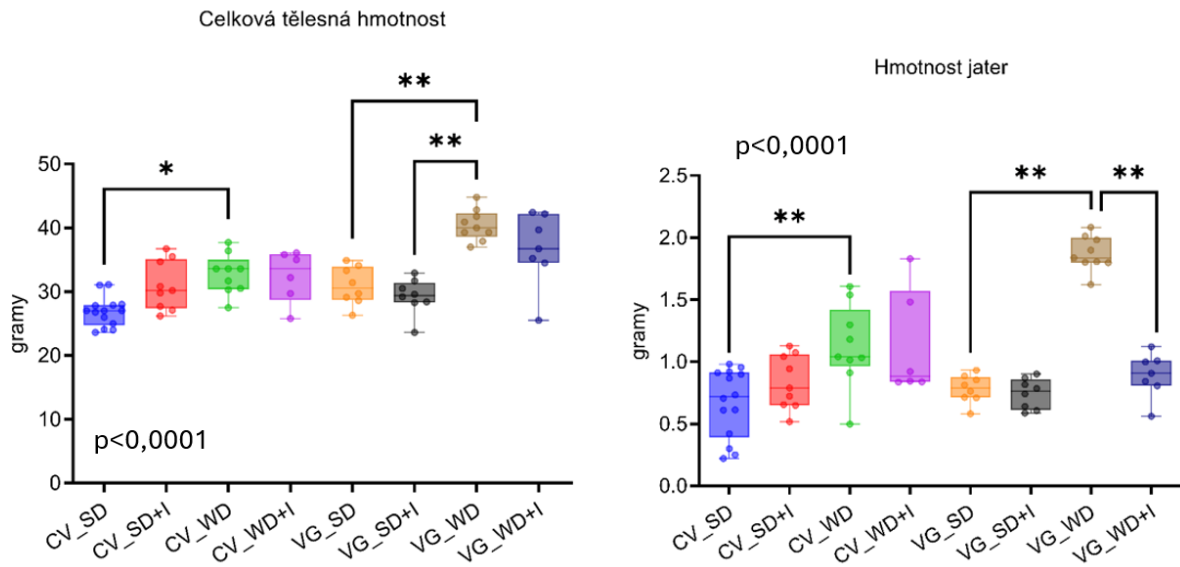
Obrázek 8-3: Složení diety WD – Western Diet 0,21% cholesterol, Ssniff, Německo,

zdroj: https://www.ssniff.com/documents/03-05%20Purified%20Western%20&%20Control_v.pdf

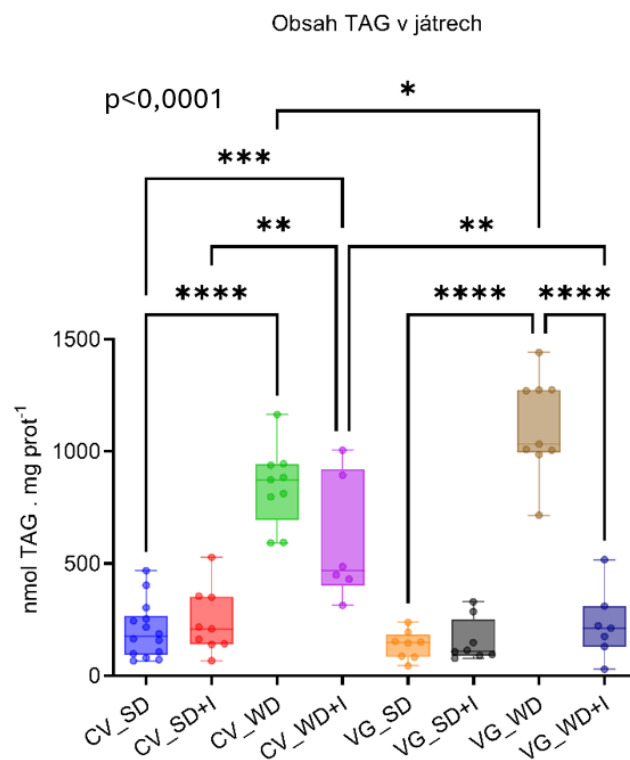
Tabulka 8-1: Kompletní sekvence použitých primerů pro první kolo PCR

| název | Overhang (33 b) + tag (12b) + spacer (GT) + primer (19b) |
|--------------|--|
| 16S_EMP-F_1 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCTTCGTCGCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_2 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCATACCGGAAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_3 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCCTGCTACAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_4 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGACCCTACAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_5 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTTGGTGTAAAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_6 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTACGTATCATGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_7 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACGCAGTCTACGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_8 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGCACGCCATGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_9 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCGGACAAGAAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_10 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGCTGGACGCTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_11 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACTAACGCGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_12 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCGATCACACCTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_13 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAAACGCACTAAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_14 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGAGGGTTGAGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_15 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGTGGTCTGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-F_16 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTACACAAAGGCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA |
| 16S_EMP-R_1 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAACGGTCCACCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_2 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGCGCCTTAAACCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_3 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTATGGTACCCAGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_4 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTCTACGTGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_5 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTACTGAGGATCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_6 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATTCACCTCCTCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_7 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTATAAATGCGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_8 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCTGCAACACCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_9 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTCGCTCGCTGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_10 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTCCTTAGTAGTCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_11 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTCCGTATGAACCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_12 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACGTGAGGAACGCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_13 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTTGCCCTGTACCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_14 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATATAGCCCGACCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_15 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTATGAGATCCCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |
| 16S_EMP-R_16 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGTGAAGGGACCGGACTACNVGGGTWTCTAAT |

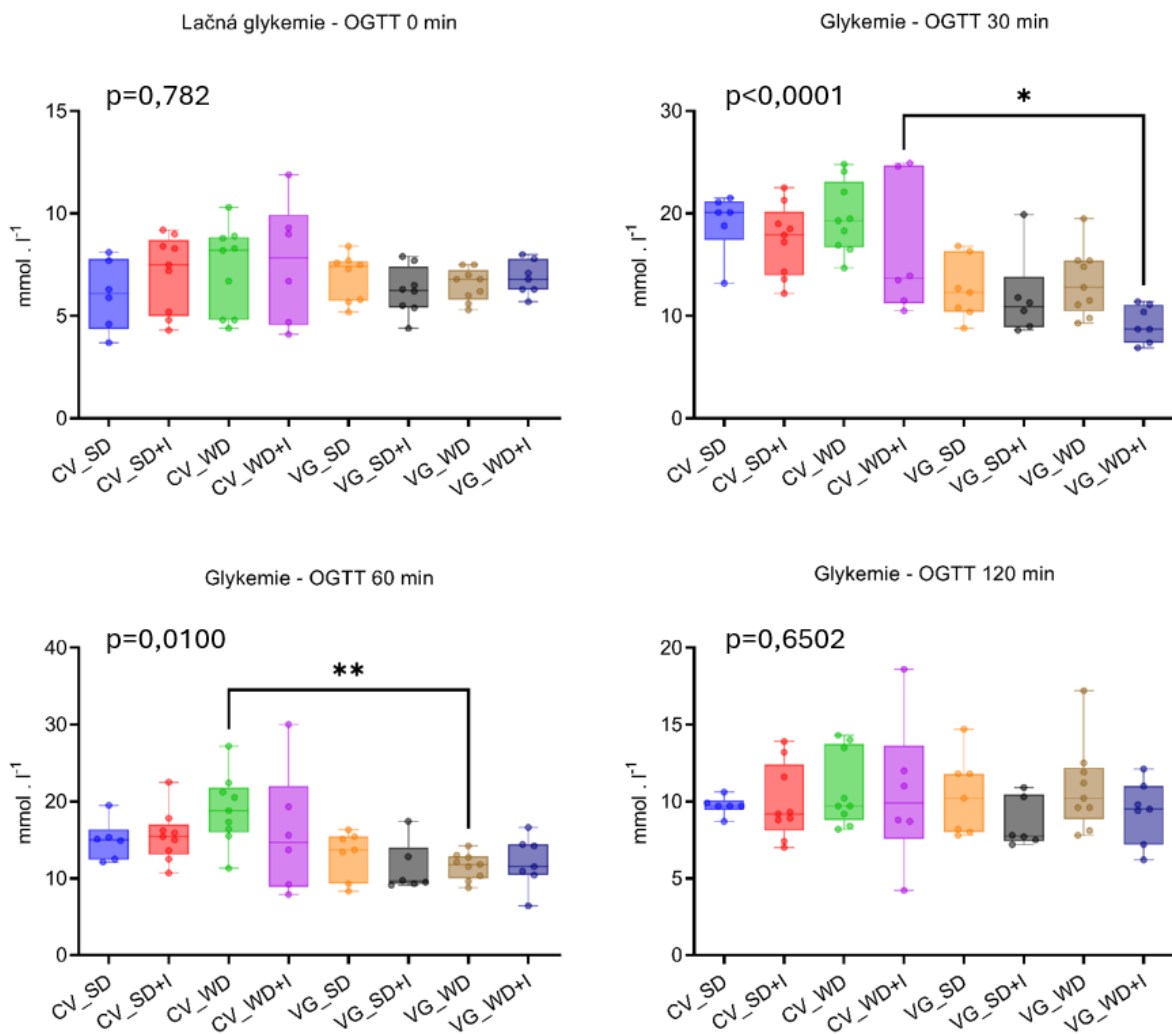
8.2. Přílohy k výsledkům



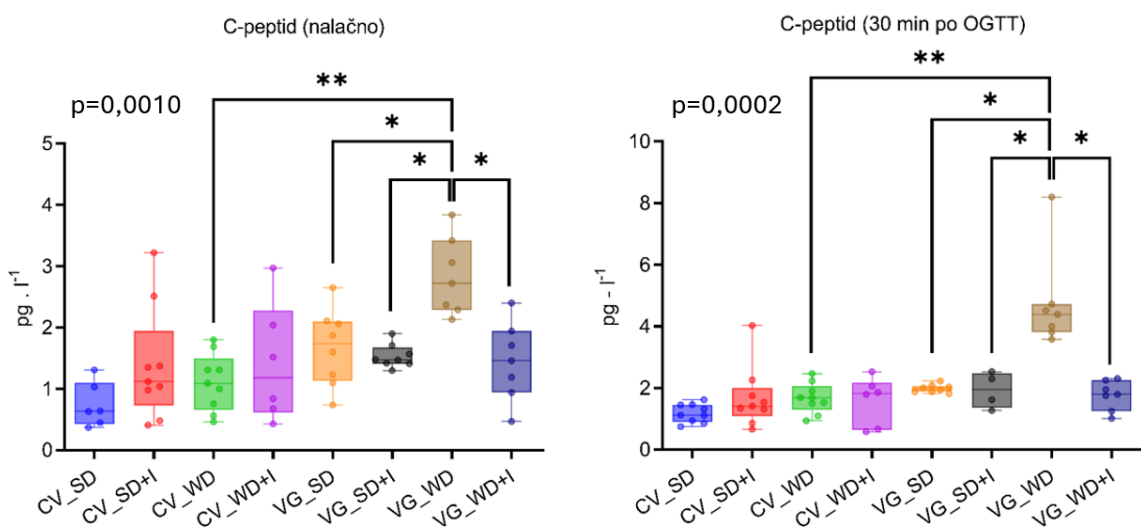
Obrázek 8-4: Tělesná hmotnost a váha jater. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. Párové srovnání bylo provedeno pomocí Dunova post-hoc testu a adjustováno na mnohonásobné porovnávání. * $q \leq 0,05$; ** $q \leq 0,01$. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).



Obrázek 8-5: Obsah TAG v játrech. P hodnota Kruskal-Wallis testu je uvedena v grafu. Párové srovnání bylo provedeno pomocí Dunova post-hoc testu a adjustováno na mnohonásobné porovnávání. * $q \leq 0,05$; ** $q \leq 0,01$; *** $q \leq 0,001$; **** $q \leq 0,0001$. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

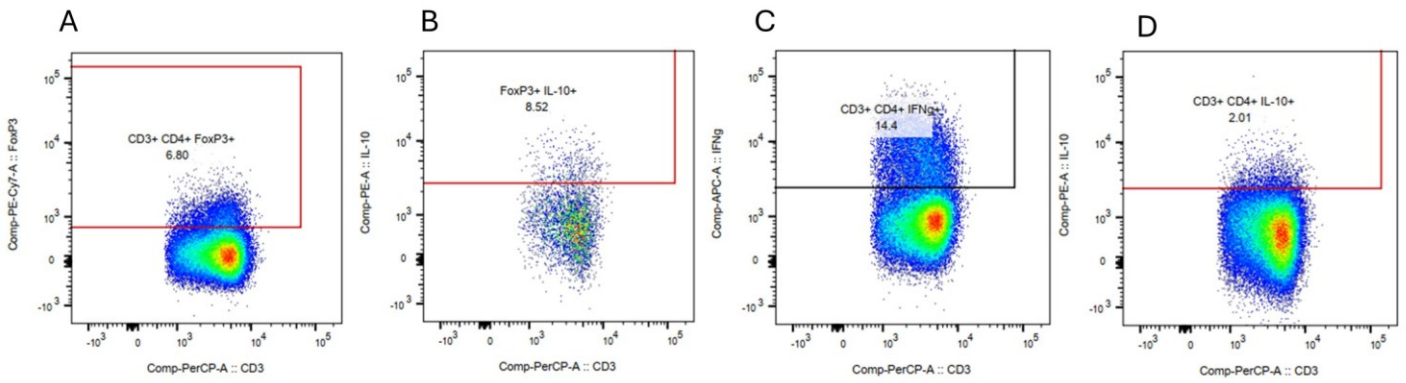


Obrázek 8-6 Glykémie v různých časových bodech OGTT. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. Párové srovnání bylo provedeno pomocí Dunova post-hoc testu a adjustováno na mnohonásobné porovnávání. *.*q≤0,05; **q≤0,01. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

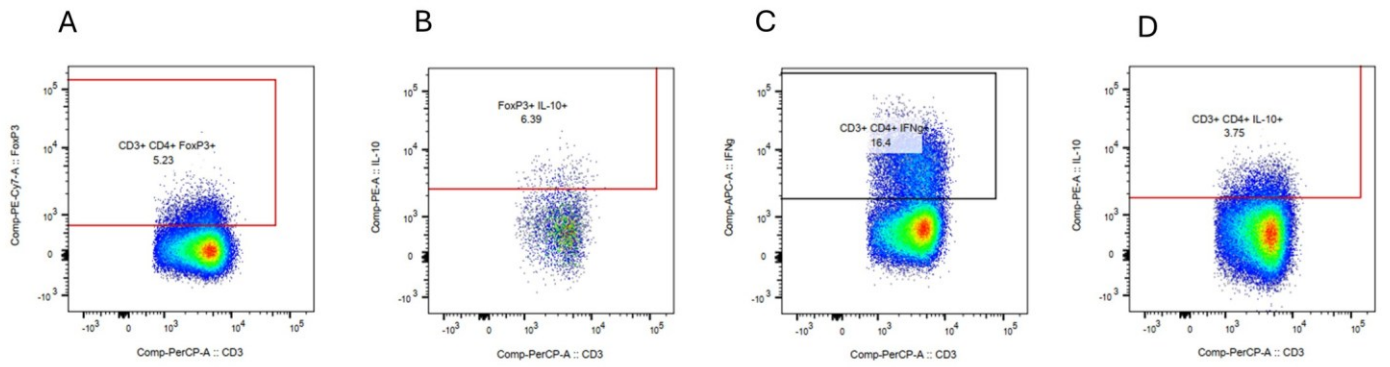


Obrázek 8-7: Koncentrace C-peptidu v séru nalačno a ve 30. minutě OGTT. P hodnoty Kruskal-Wallis testů jsou uvedeny v jednotlivých grafech. Párové srovnání bylo provedeno pomocí Dunova post-hoc testu a adjustováno na mnohonásobné porovnávání. *.*q≤0,05; **q≤0,01. Data byla publikována (Daskova et al., 2023).

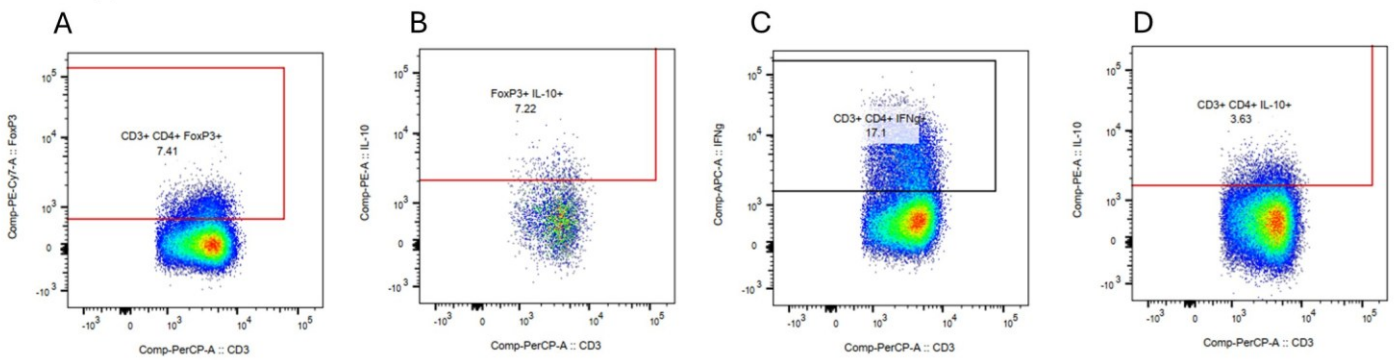
CV_SD



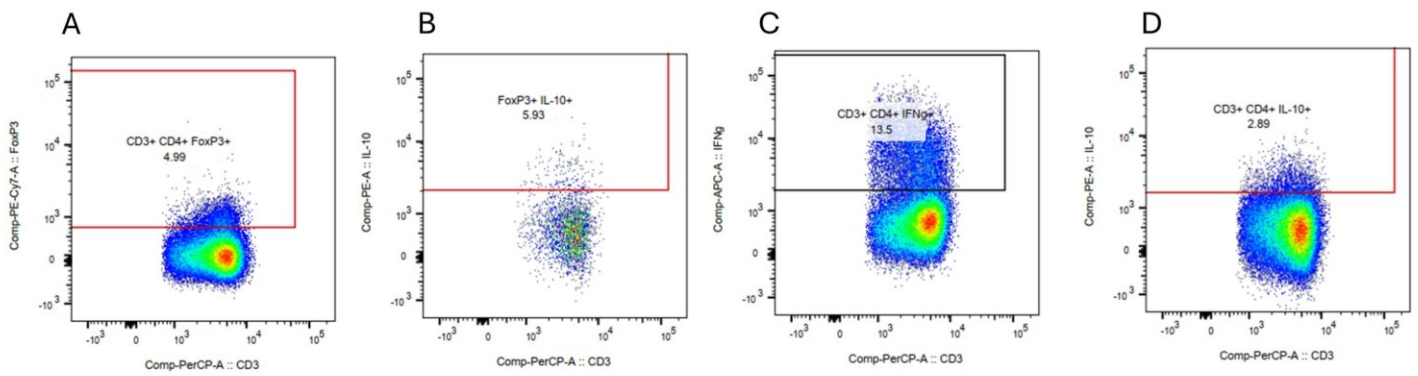
CV_SD+I



CV_WD

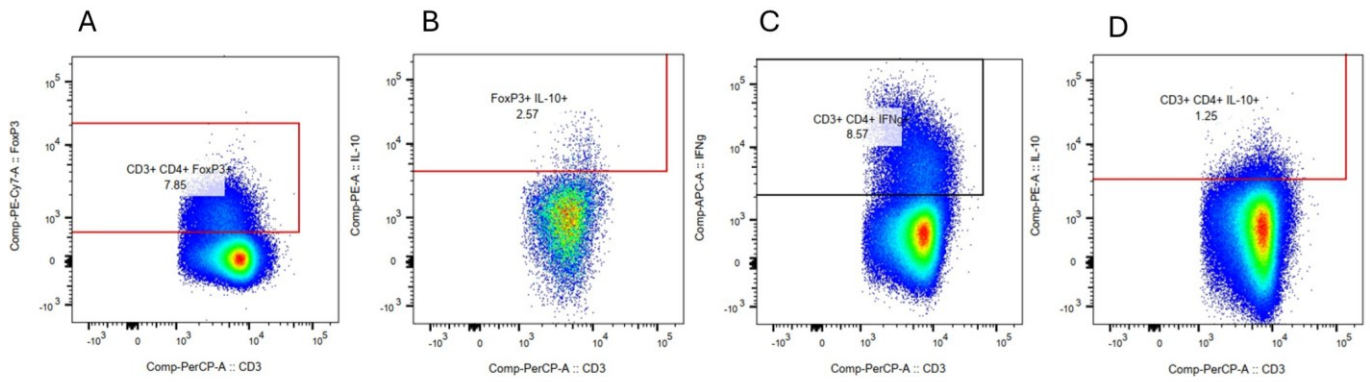


CV_WD+I

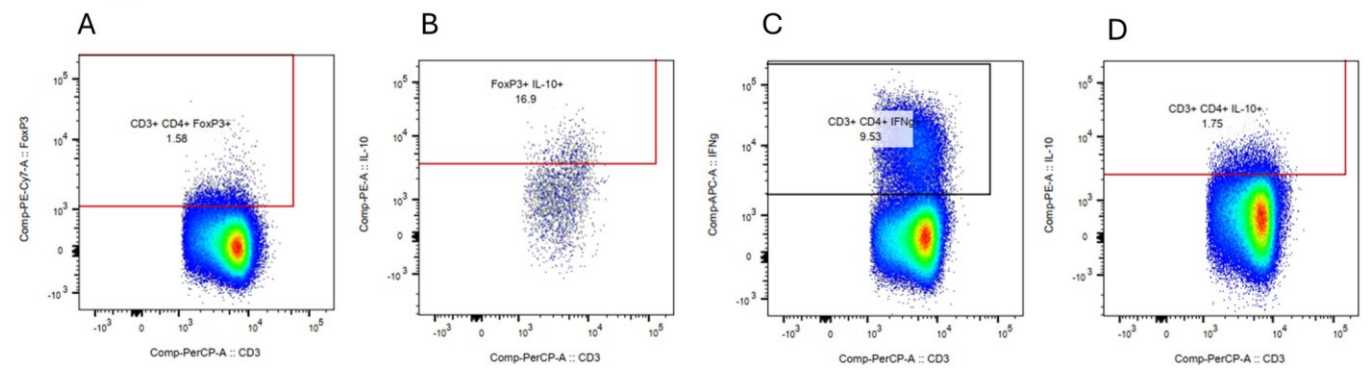


Obrázek 8-8 Reprezentativní dotploty vzorků sleziny myši s CV mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

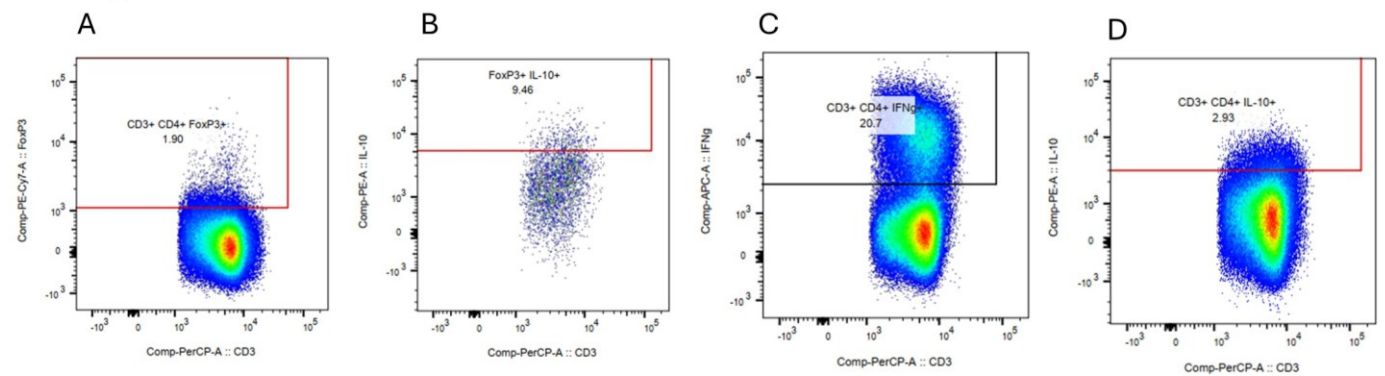
VG_SD



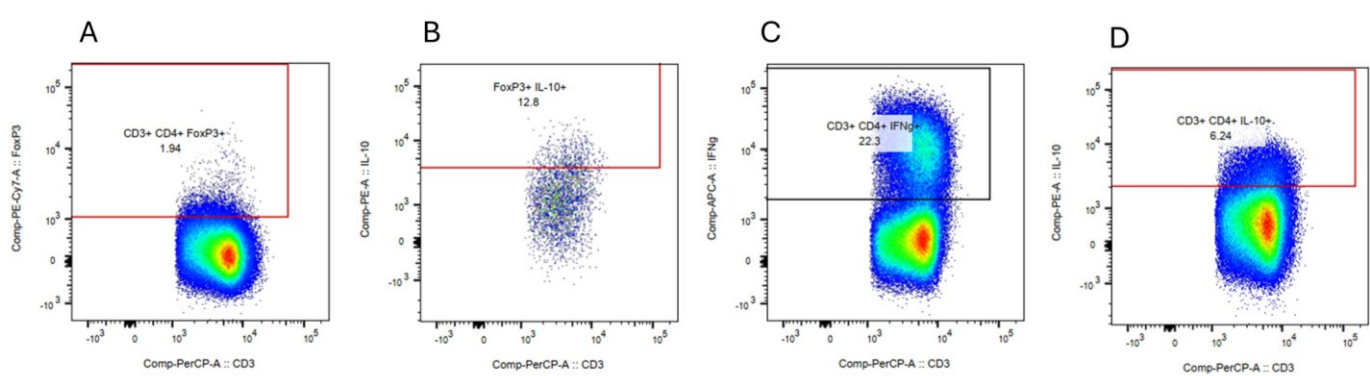
VG_SD+I



VG_WD

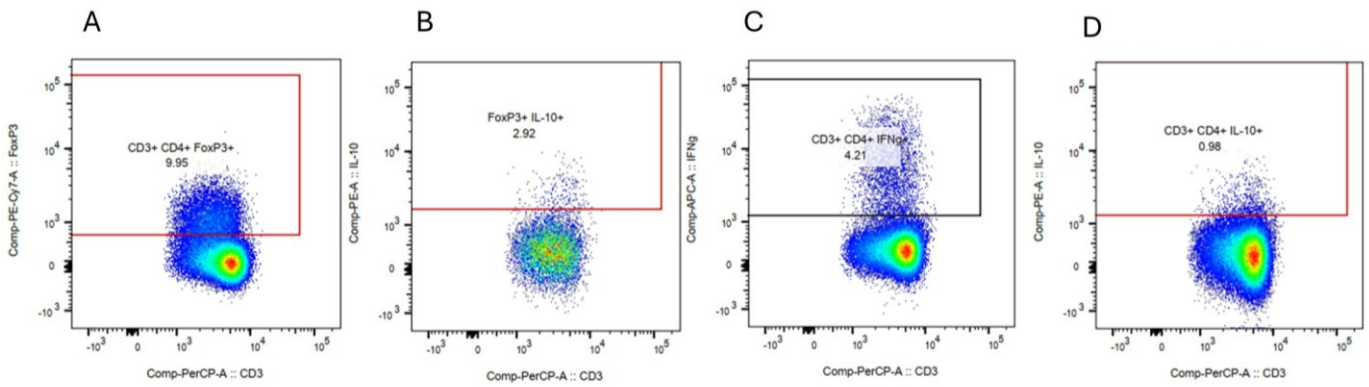


VG_WD+I

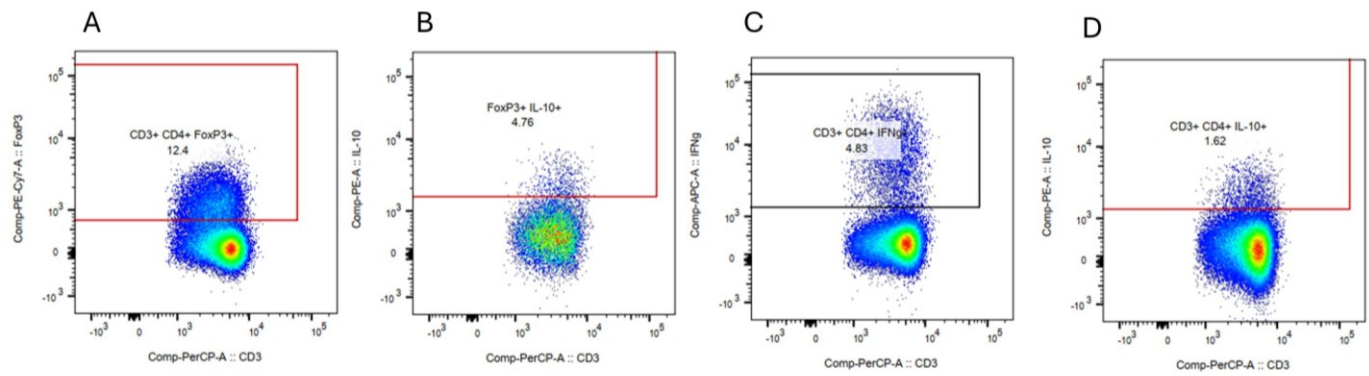


Obrázek 8-9 Reprezentivní dotploty vzorků sleziny myši s VG mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

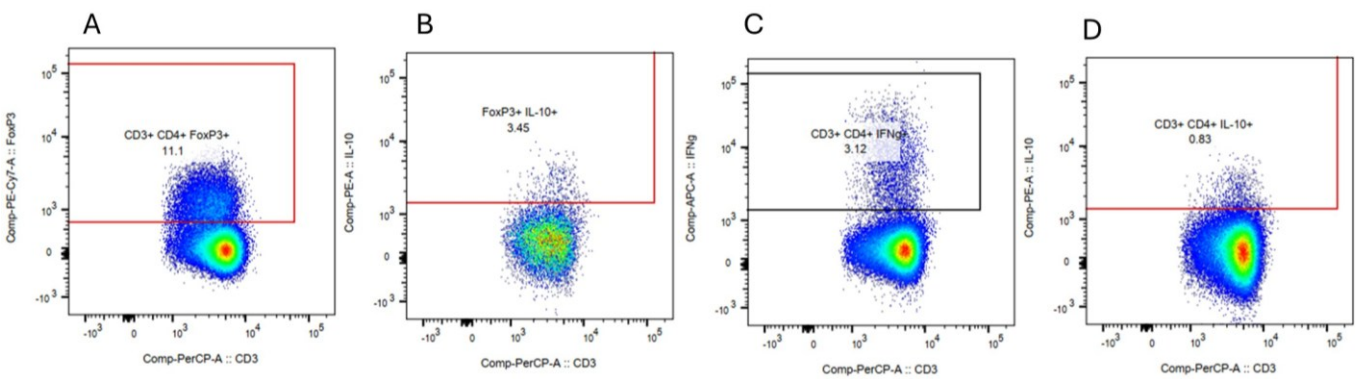
CV_SD



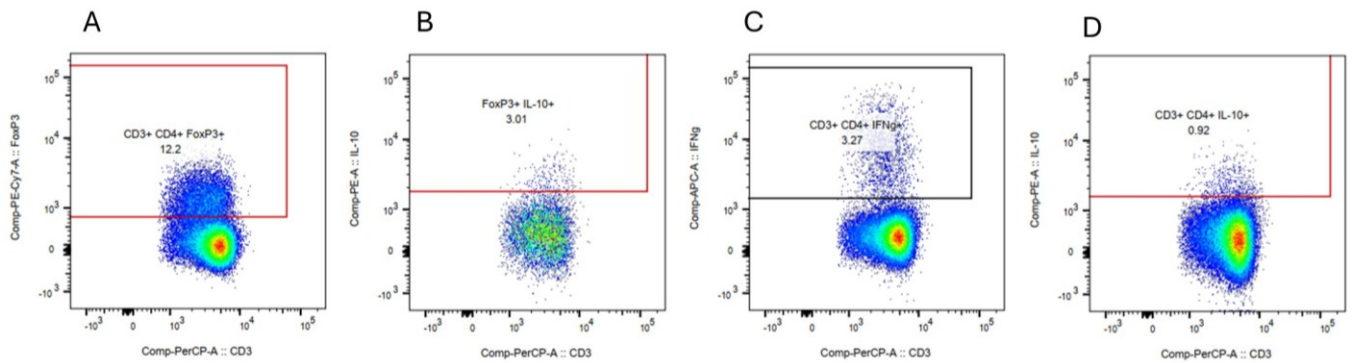
CV_SD+I



CV_WD



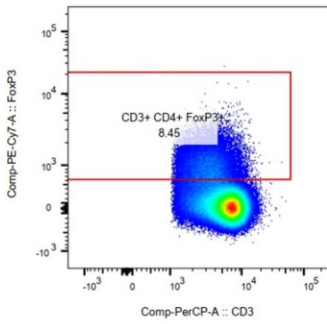
CV_WD+I



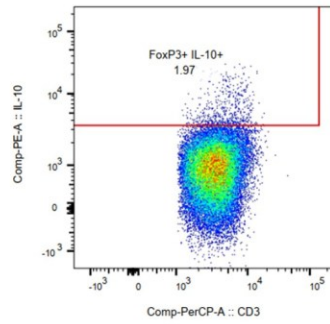
Obrázek 8-10 Reprezentivní dotploty vzorků ILN myši s CV mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

VG_SD

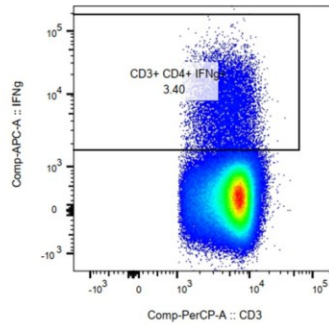
A



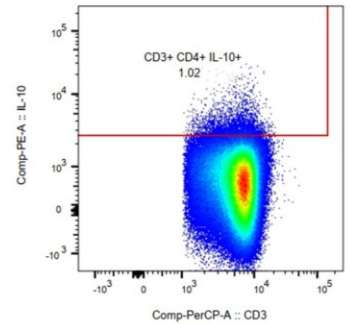
B



C

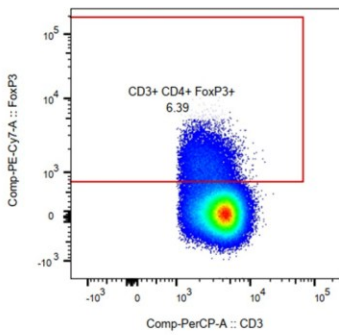


D

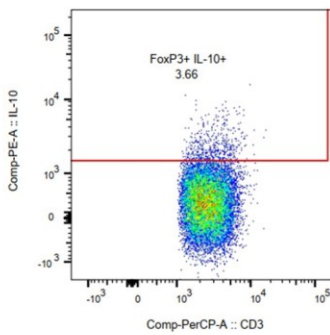


VG_SD+I

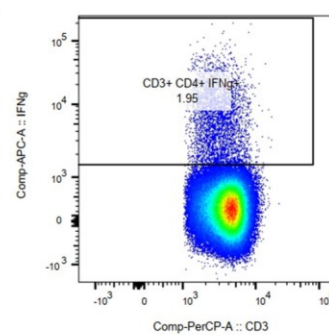
A



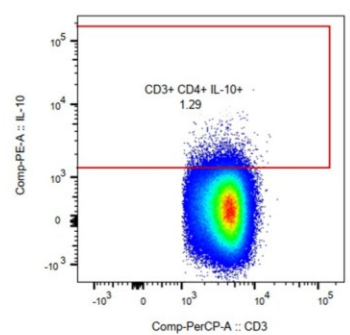
B



C

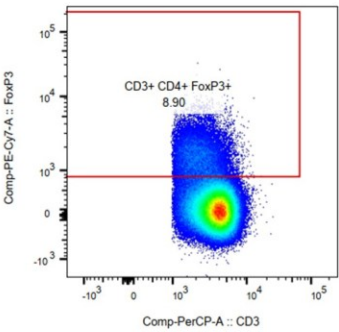


D

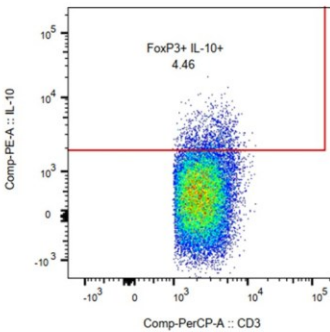


VG_WD

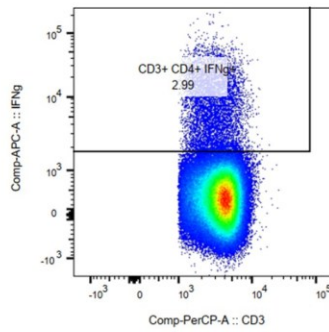
A



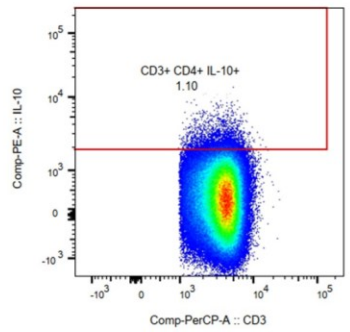
B



C

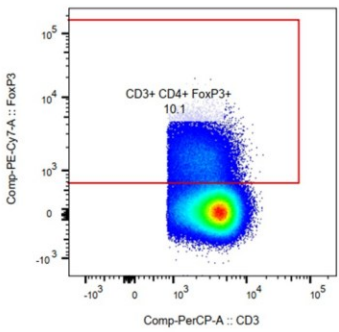


D

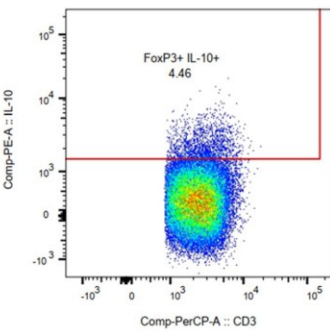


VG_WD+I

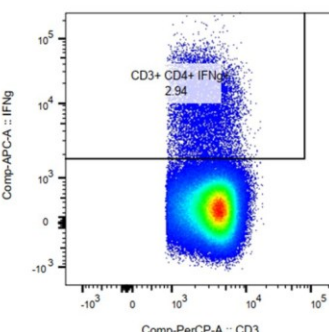
A



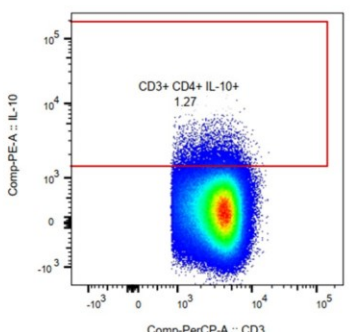
B



C

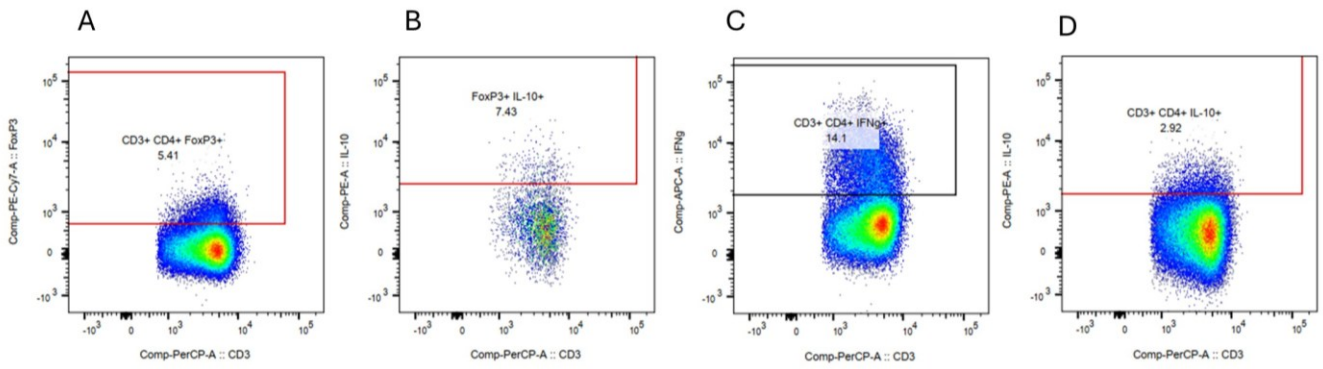


D

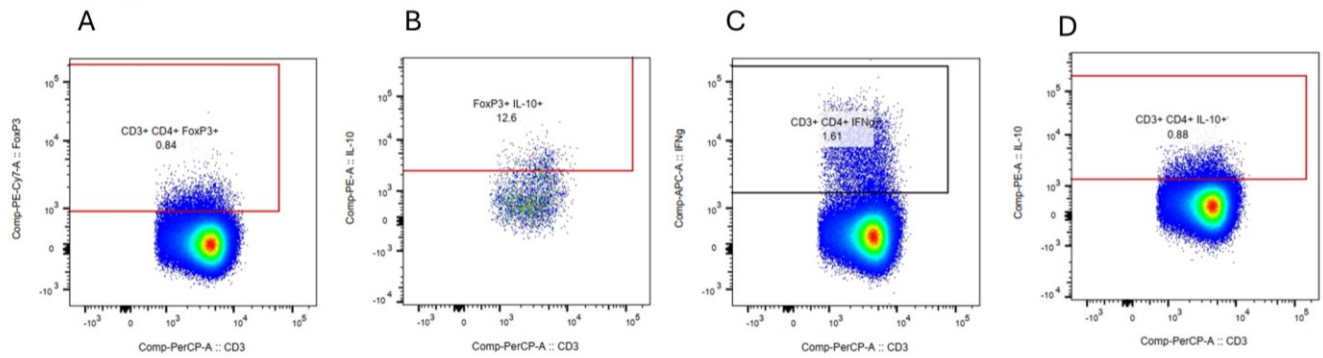


Obrázek 8-11 Reprezentivní dotploty vzorků ILN myši s VG mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

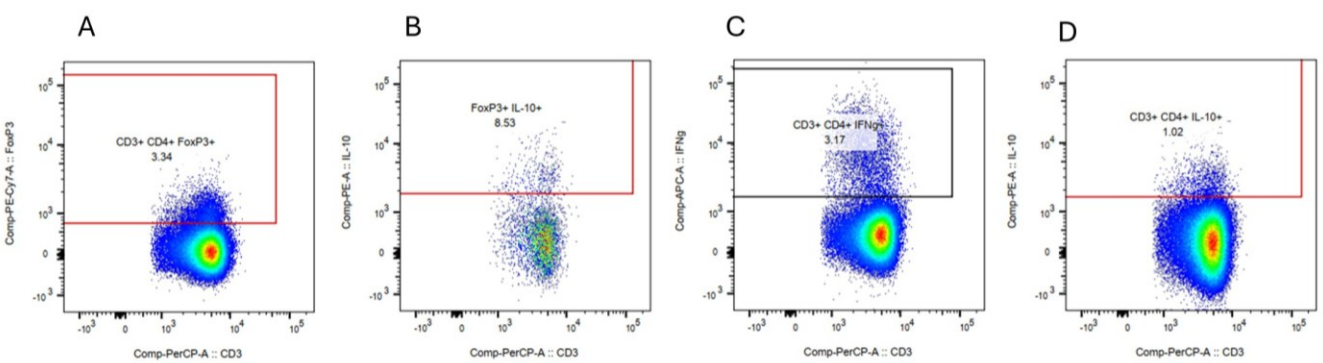
CV_SD



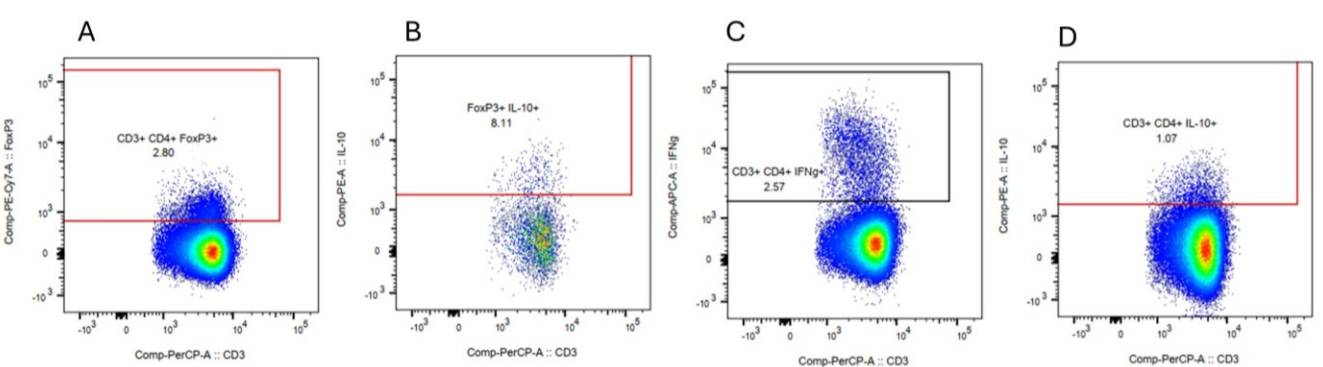
CV_SD+I



CV_WD

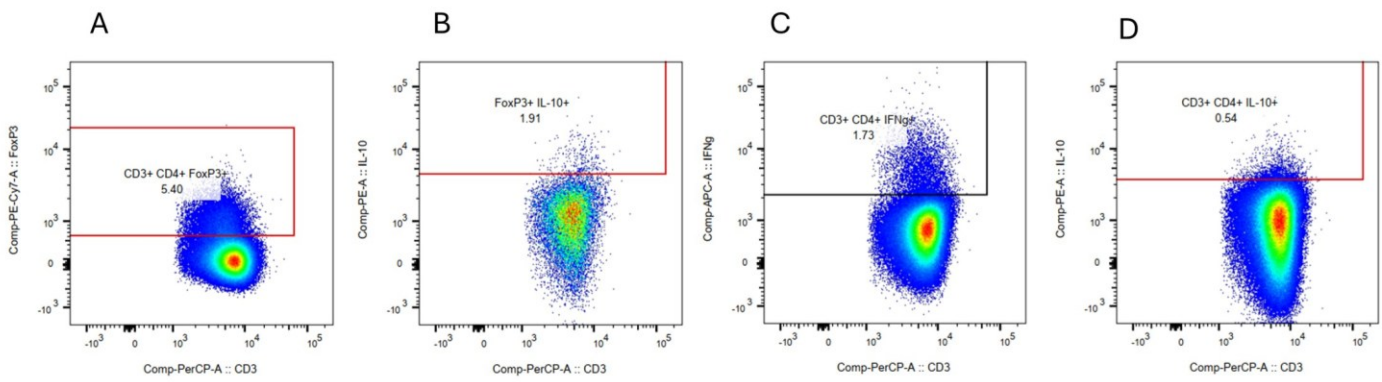


CV_WD+I

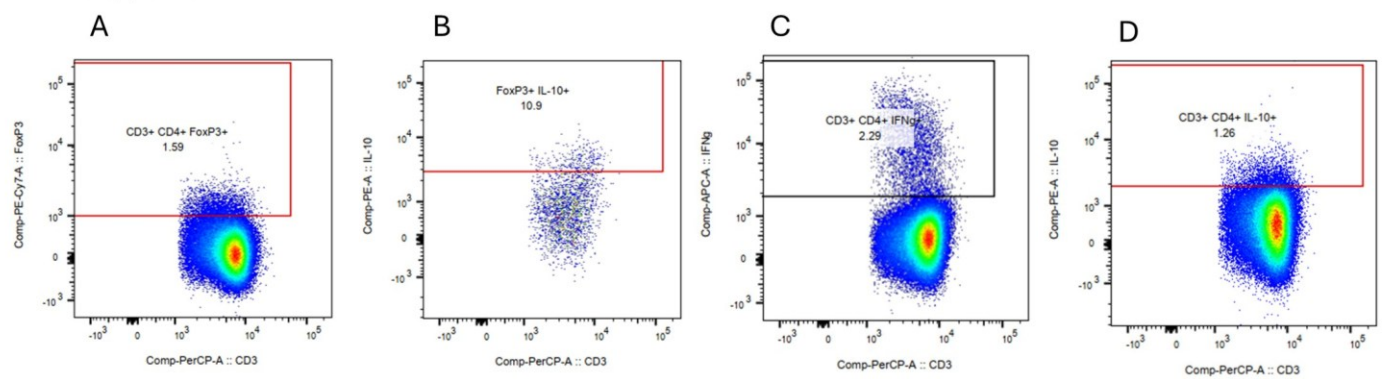


Obrázek 8-12 Reprezentativní dotploty vzorků MLN myši s CV mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

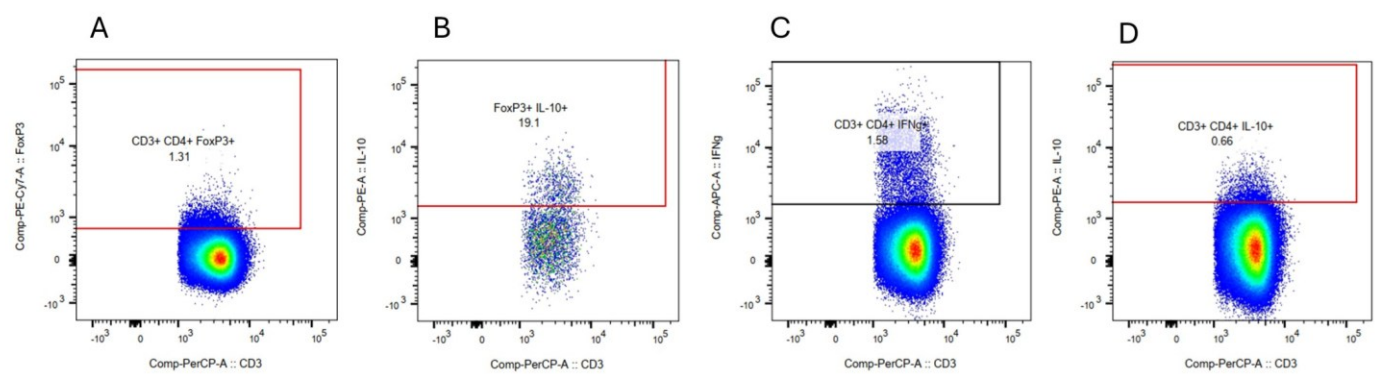
VG_SD



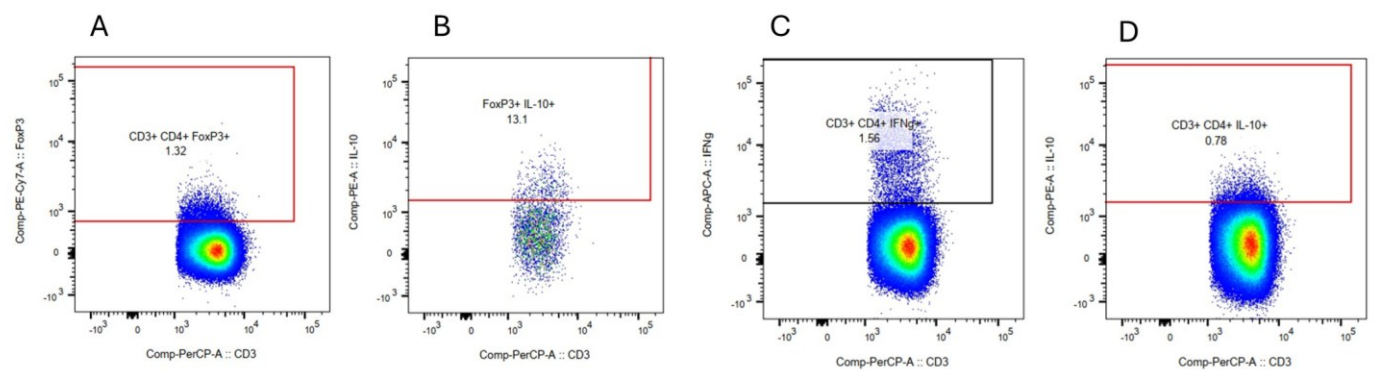
VG_SD+I



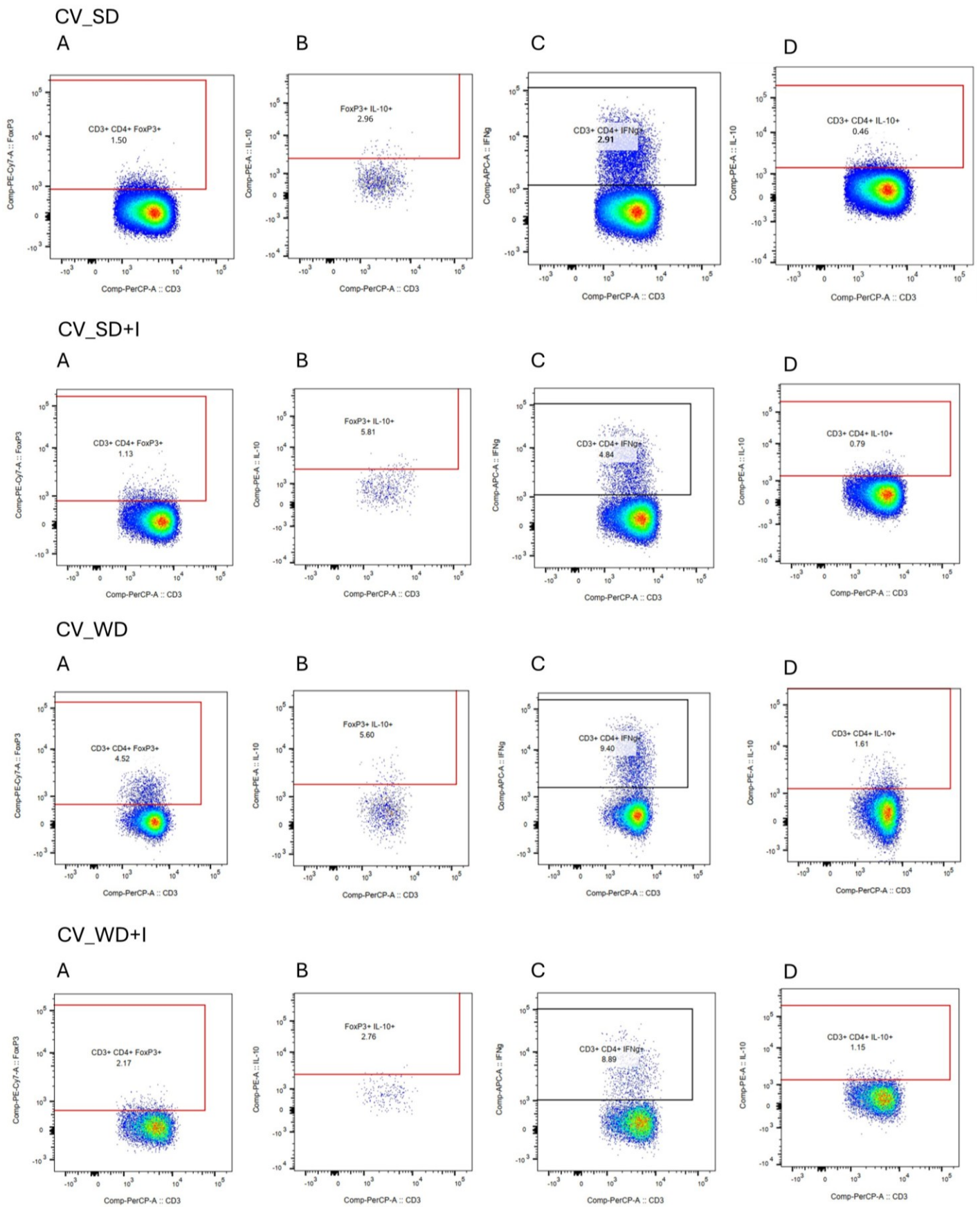
VG_WD



VG_WD+I

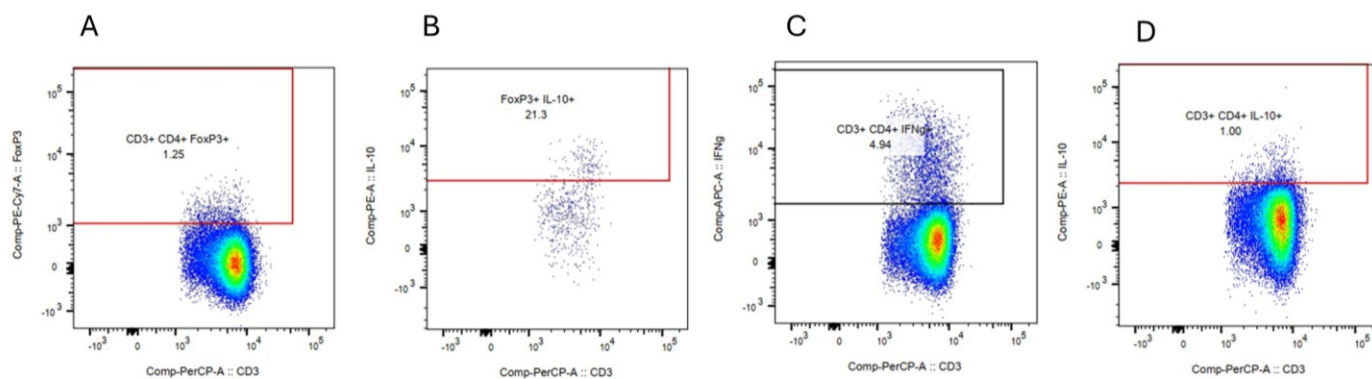


Obrázek 8-13 Reprezentativní dotploty vzorků MLN myši s VG mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

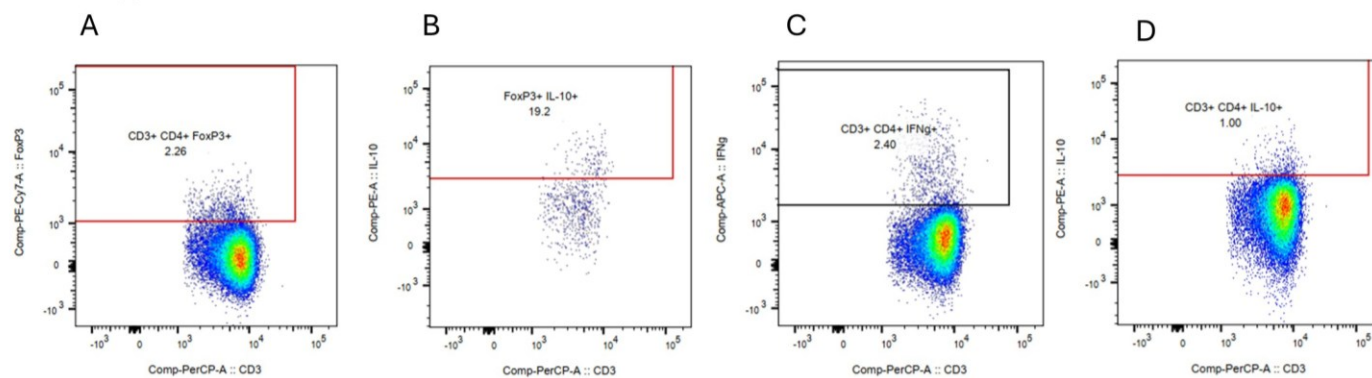


Obrázek 8-14 Reprezentativní dotploty vzorků PLN myši s CV mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

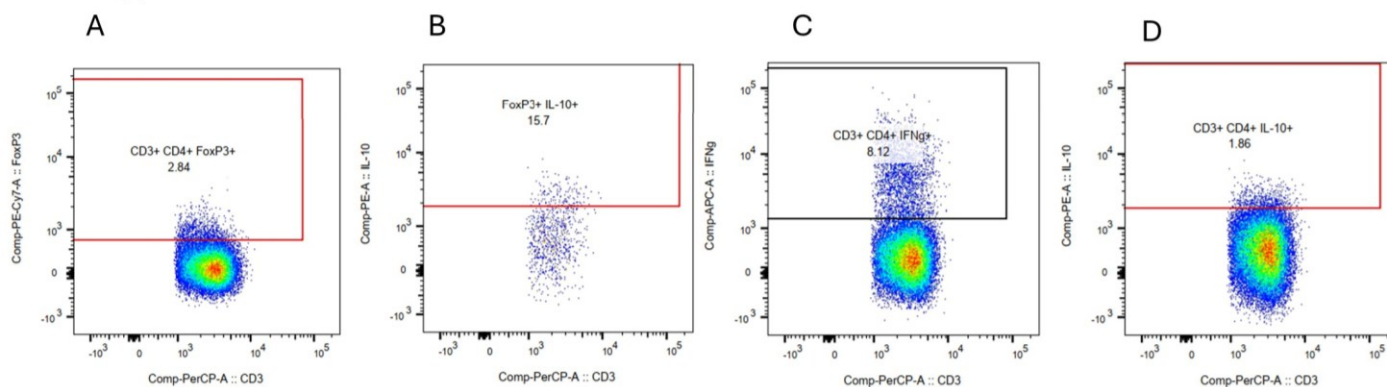
VG_SD



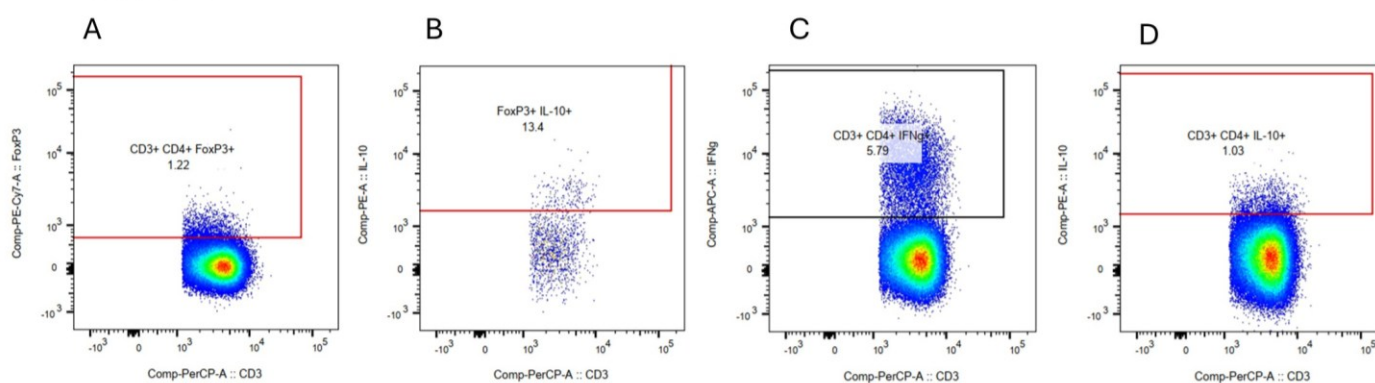
VG_SD+I



VG_WD

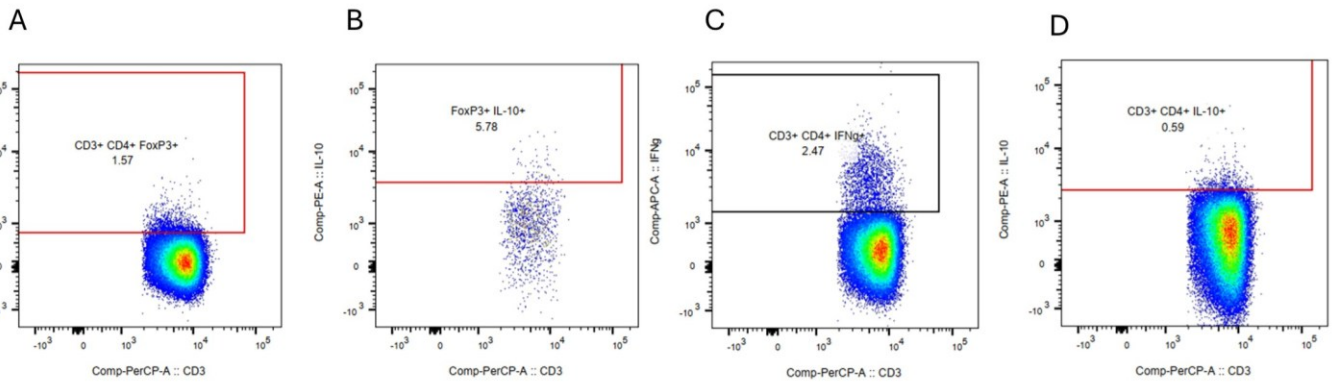


VG_WD+I

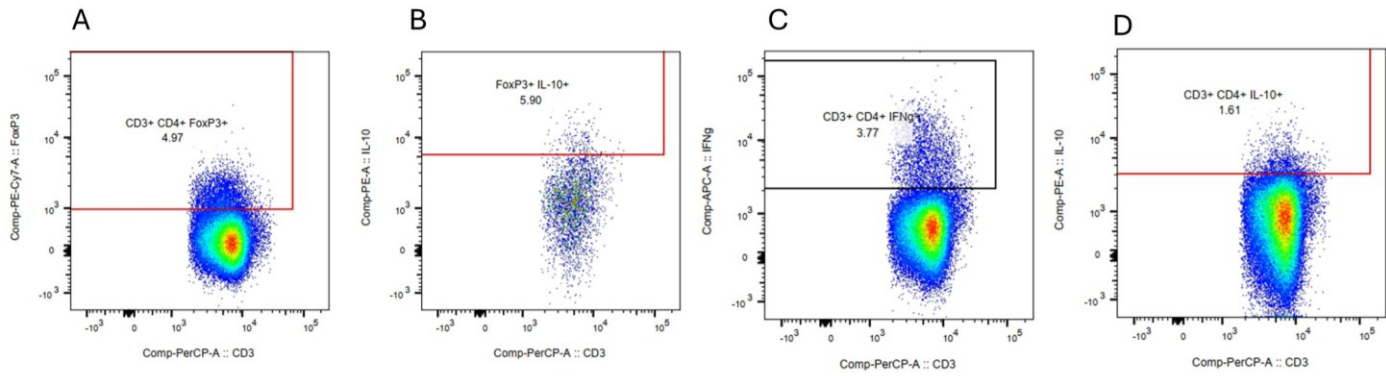


Obrázek 8-15 Reprezentivní dotploty vzorků PLN myši s VG mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

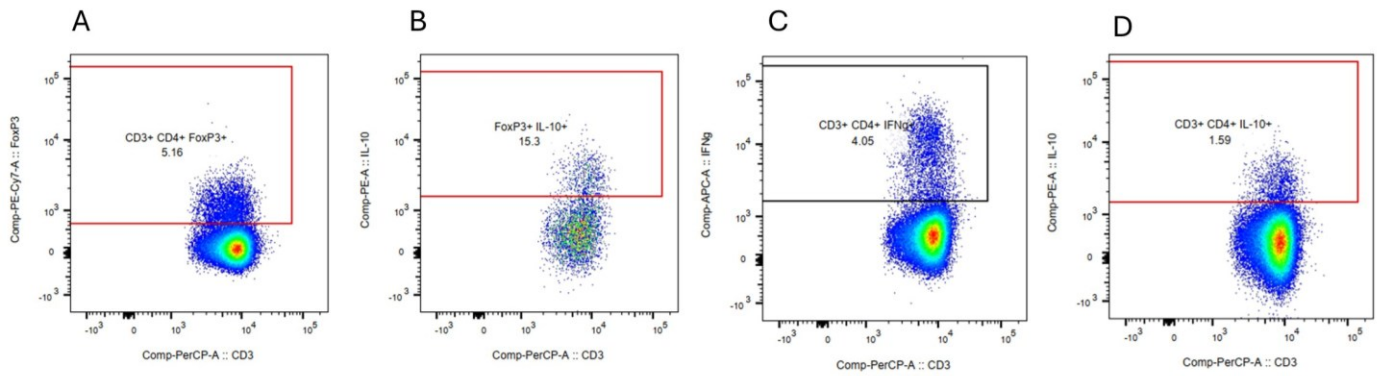
CV_SD



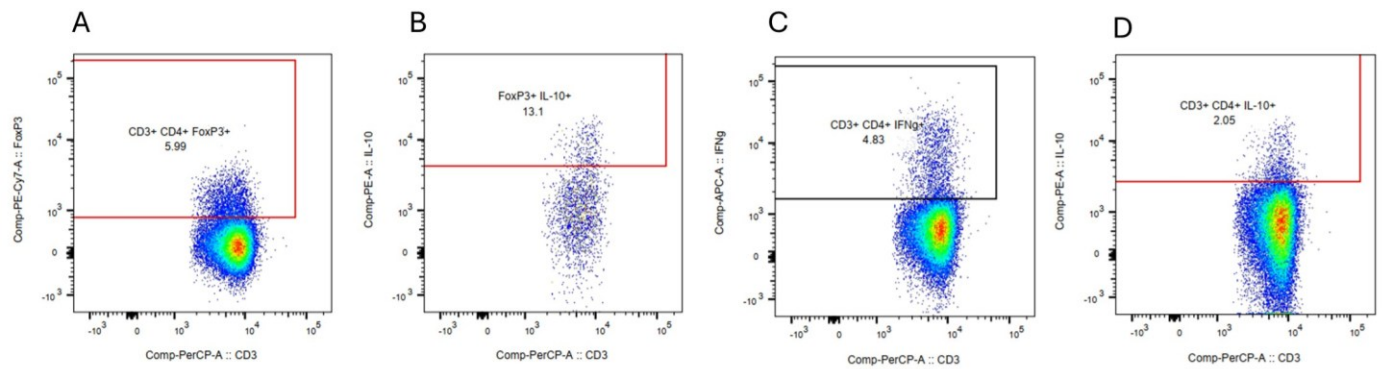
CV_SD+I



CV_WD

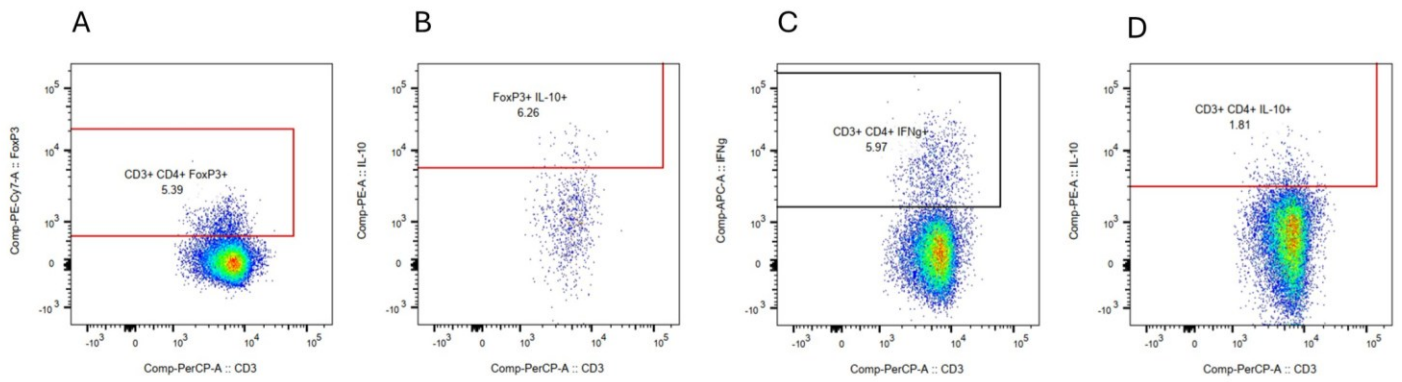


CV_WD+I

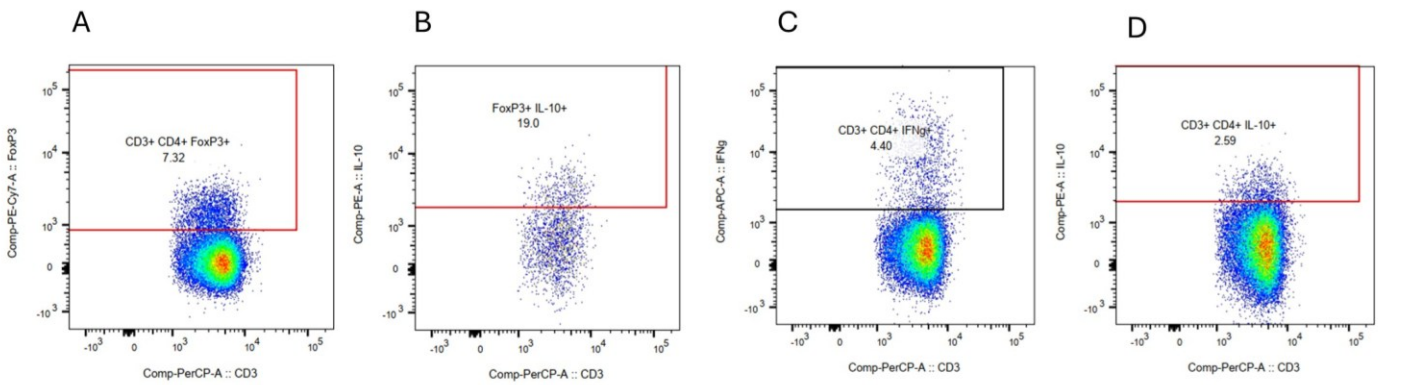


Obrázek 8-16 Reprezentativní dotploty vzorků PP myši s CV mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

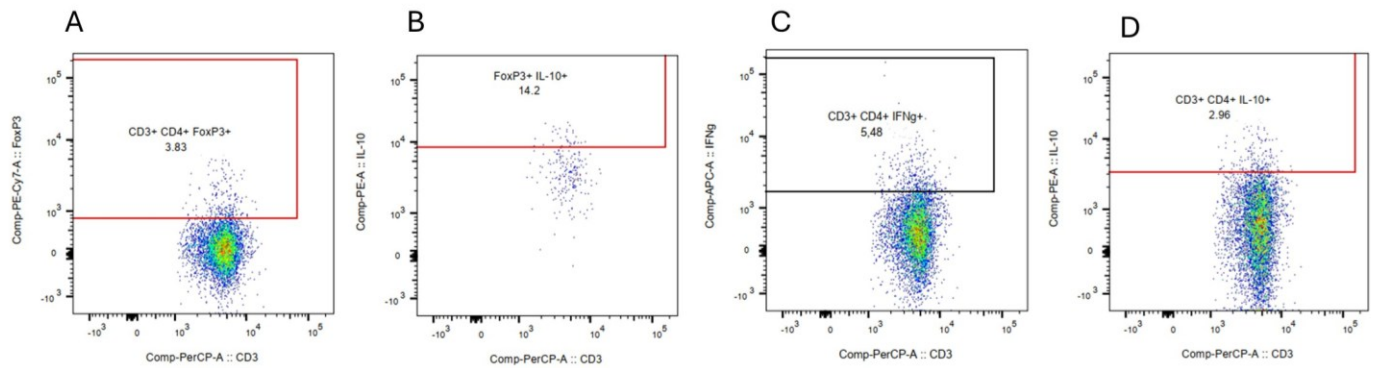
VG_SD



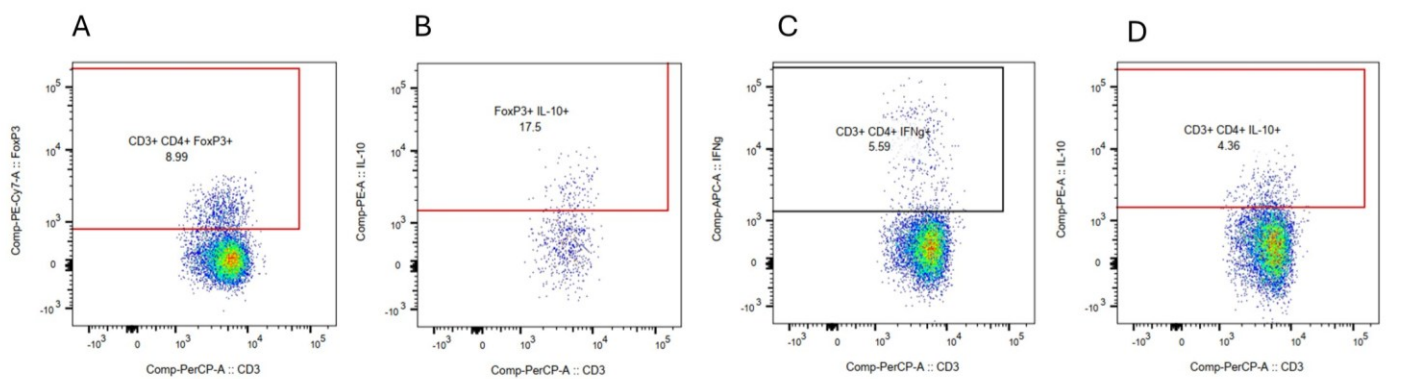
VG_SD+I



VG_WD



VG_WD+I



Obrázek 8-17 Reprezentativní dotploty vzorků PP myši s VG mikrobiotou, rozděleny podle dietních skupin. A: gating populace CD3+CD4+FoxP3+, B: gating populace CD3+CD4+FoxP3+IL-10+, C: gating populace CD3+CD4+IFN- γ +, D: gating populace CD3+CD4+IL-10.

Tabulka 8-2: Výsledky LRT a párového Waldova testu a p hodnoty jednotlivých srovnání druhů, u kterých byla upravená p(LRT) <0,1. Výsledky Waldova testu jsou vyjádřeny jako Log2(násobek změny). Hodnoty p jednotlivých srovnání jsou zvýrazněny zeleně u signifikantních rozdílů (p <0,1).

| Species | LRT | log2(násobek změny) | | | | Waldův test (p=) | | | |
|---|-------|---------------------|-------|---------|---------|------------------|-------|---------|---------|
| | p= | SD+I_SD | WD_SD | WD+I_SD | WD+I_WD | SD+I_SD | WD_SD | WD+I_SD | WD+I_WD |
| <i>Blautia_NA</i> | 0,000 | 3,97 | 0,39 | 3,36 | 2,96 | 0,001 | 0,222 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Lachnospiraceae_NA</i> | 0,000 | 0,76 | 0,24 | 3,27 | 3,03 | 0,006 | 0,572 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Angelakisella_NA</i> | 0,000 | -3,27 | 2,34 | 0,10 | -2,25 | 0,001 | 0,001 | 0,873 | 0,001 |
| <i>Blautia_hydrogenotrophica</i> | 0,000 | -8,70 | -0,36 | -3,60 | -3,24 | 0,001 | 0,588 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Bacteroides_uniformis</i> | 0,000 | 4,46 | -0,46 | 4,03 | 4,50 | 0,001 | 0,572 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Collinsella_stercoris</i> | 0,000 | -1,11 | 8,91 | 3,81 | -5,10 | 0,489 | 0,001 | 0,002 | 0,001 |
| <i>Flavonifractor_NA</i> | 0,000 | -1,36 | 1,92 | 0,10 | -1,82 | 0,001 | 0,001 | 0,858 | 0,001 |
| <i>Lactonifractor_NA</i> | 0,000 | 4,17 | 1,25 | 11,27 | 10,01 | 0,002 | 0,544 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Bacteroides_ovatus</i> | 0,000 | 1,29 | -4,47 | 0,09 | 4,56 | 0,037 | 0,001 | 0,934 | 0,001 |
| <i>Butyricocaceae_UCG-009_NA</i> | 0,000 | -4,42 | 0,52 | -6,03 | -6,55 | 0,001 | 0,618 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Lachnospiraceae_UCG-004_NA</i> | 0,000 | 0,66 | -0,75 | -4,82 | -4,07 | 0,206 | 0,231 | 0,001 | 0,001 |
| <i>[Clostridium]_innocuum_group_NA</i> | 0,000 | -0,43 | 0,12 | 1,36 | 1,24 | 0,103 | 0,765 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Alistipes_putredinis</i> | 0,000 | -1,15 | 0,97 | 0,27 | -0,69 | 0,001 | 0,001 | 0,384 | 0,015 |
| <i>Agathobacter_NA</i> | 0,000 | 14,45 | 3,08 | 12,55 | 9,47 | 0,001 | 0,154 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Bilophila_NA</i> | 0,000 | -0,72 | 0,62 | 0,32 | -0,30 | 0,001 | 0,001 | 0,124 | 0,141 |
| <i>Dielma_fastidiosa</i> | 0,000 | -1,21 | -1,22 | -4,66 | -3,43 | 0,010 | 0,012 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Romboutsia_ilealis</i> | 0,000 | -2,43 | -1,56 | -8,26 | -6,70 | 0,002 | 0,079 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Oscillibacter_NA</i> | 0,000 | 1,42 | 0,85 | -0,65 | -1,50 | 0,001 | 0,004 | 0,055 | 0,001 |
| <i>Paludicola_NA</i> | 0,000 | -2,58 | -1,09 | -8,50 | -7,42 | 0,002 | 0,295 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Eisenbergiella_NA</i> | 0,000 | 1,27 | -1,62 | -4,64 | -3,03 | 0,090 | 0,045 | 0,001 | 0,001 |
| <i>[Ruminococcus]_torques_group_torques</i> | 0,000 | -1,32 | 0,39 | -1,37 | -1,77 | 0,001 | 0,364 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Sutterella_NA</i> | 0,000 | -6,92 | 3,01 | -6,14 | -9,15 | 0,001 | 0,062 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Lachnospiraceae_NK4A136_group_NA</i> | 0,000 | 2,04 | 1,49 | -1,28 | -2,78 | 0,001 | 0,005 | 0,025 | 0,001 |
| <i>Erysipelatoclostridium_NA</i> | 0,000 | 3,15 | -0,19 | 2,20 | 2,39 | 0,001 | 0,838 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Lachnospiraceae_NA_NA</i> | 0,000 | 0,87 | -1,46 | 0,08 | 1,54 | 0,032 | 0,001 | 0,892 | 0,001 |
| <i>Bacteroides_cellulosilyticus</i> | 0,000 | -3,23 | -0,84 | -4,18 | -3,34 | 0,001 | 0,361 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Anaerotruncus_colihominis</i> | 0,000 | -2,11 | -1,05 | -6,27 | -5,22 | 0,004 | 0,238 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Coprococcus_catus</i> | 0,000 | 8,02 | 1,62 | 6,66 | 5,04 | 0,001 | 0,405 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Sellimonas_NA</i> | 0,000 | -0,54 | 0,81 | -0,55 | -1,37 | 0,080 | 0,007 | 0,091 | 0,001 |
| <i>[Ruminococcus]_torques_group_NA</i> | 0,000 | -5,71 | -0,99 | -4,94 | -3,94 | 0,001 | 0,477 | 0,001 | 0,002 |
| <i>Odoribacter_splanchnicus</i> | 0,000 | 0,42 | 1,52 | 1,50 | -0,02 | 0,272 | 0,001 | 0,001 | 1,000 |
| <i>Coriobacteriaceae_UCG-002_NA</i> | 0,000 | 6,14 | 2,56 | 8,83 | 6,27 | 0,001 | 0,226 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Christensenellaceae_R-7_group_NA</i> | 0,000 | -2,11 | -0,94 | -5,56 | -4,62 | 0,005 | 0,293 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Christensenella_minuta</i> | 0,000 | -0,74 | -2,59 | -1,70 | 0,89 | 0,169 | 0,001 | 0,002 | 0,157 |
| <i>Sutterella_wadsworthensis</i> | 0,000 | 8,90 | 6,95 | 8,67 | 1,72 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,178 |
| <i>Fournierella_NA</i> | 0,000 | -4,21 | -1,07 | -3,96 | -2,88 | 0,001 | 0,346 | 0,001 | 0,002 |
| <i>Christensenellaceae_NA_NA</i> | 0,000 | -3,11 | 0,00 | -4,36 | -4,36 | 0,001 | 1,000 | 0,001 | 0,001 |
| <i>Oscillospiraceae_UCG-005_NA</i> | 0,000 | 0,39 | -1,93 | -4,85 | -2,92 | 0,686 | 0,033 | 0,001 | 0,008 |
| <i>Holdemanella_NA</i> | 0,000 | 3,50 | 2,41 | 2,27 | -0,15 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,915 |
| <i>Eubacterium_callanderi</i> | 0,000 | 0,41 | -0,62 | -0,76 | -0,14 | 0,139 | 0,036 | 0,011 | 0,742 |

| | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Blautia_producta</i> | 0,000 | -0,81 | 0,81 | -1,22 | -2,03 | 0,103 | 0,152 | 0,015 | 0,001 |
| <i>Erysipelatoclostridium_amosum</i> | 0,000 | -0,11 | -5,14 | -3,72 | 1,42 | 0,975 | 0,001 | 0,003 | 0,369 |
| <i>Parasutterella_NA</i> | 0,000 | 1,04 | -2,59 | 0,77 | 3,36 | 0,206 | 0,001 | 0,367 | 0,001 |
| <i>Turicibacter_NA</i> | 0,000 | -1,10 | -6,86 | -4,47 | 2,39 | 0,489 | 0,001 | 0,002 | 0,121 |
| <i>Alistipes_finegoldii</i> | 0,000 | -1,12 | 0,57 | -0,72 | -1,29 | 0,010 | 0,284 | 0,124 | 0,003 |
| <i>Anaerostipes_caccae</i> | 0,000 | 2,46 | -0,32 | 1,22 | 1,54 | 0,001 | 0,782 | 0,130 | 0,052 |
| <i>Ruminococcaceae_CAG-352_NA</i> | 0,000 | -4,79 | -0,81 | -4,01 | -3,20 | 0,001 | 0,628 | 0,004 | 0,026 |
| <i>Hungatella_NA</i> | 0,000 | 1,18 | 2,15 | -0,18 | -2,34 | 0,076 | 0,001 | 0,856 | 0,001 |
| <i>Lachnospiraceae_UCG-009_NA</i> | 0,000 | -1,53 | -1,30 | -3,69 | -2,39 | 0,049 | 0,138 | 0,001 | 0,005 |
| <i>[Eubacterium] fissicatena_group_NA</i> | 0,000 | 7,00 | -0,18 | 4,08 | 4,26 | 0,001 | 0,992 | 0,049 | 0,032 |
| <i>Oscillospiraceae_NA</i> | 0,000 | -0,50 | 0,37 | 0,49 | 0,11 | 0,077 | 0,249 | 0,092 | 0,781 |
| <i>Bacteroides_massiliensis</i> | 0,000 | -1,09 | -0,13 | 0,18 | 0,31 | 0,001 | 0,800 | 0,681 | 0,457 |
| <i>Bacteria_Firmicutes_Clostridia_Oscillospirales...</i> | 0,000 | -1,47 | -1,27 | -0,75 | 0,52 | 0,001 | 0,003 | 0,099 | 0,276 |
| <i>Alistipes_onderdonkii</i> | 0,000 | 5,98 | 4,81 | 6,17 | 1,36 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,339 |
| <i>Parabacteroides_distasonis</i> | 0,001 | -1,11 | -0,59 | -0,33 | 0,27 | 0,001 | 0,073 | 0,313 | 0,457 |
| <i>Intestinimonas_butyrificiproducens</i> | 0,001 | 7,77 | 5,39 | 7,15 | 1,76 | 0,001 | 0,004 | 0,001 | 0,339 |
| <i>[Eubacterium] coprostanoligenes_group_NA</i> | 0,001 | 0,13 | 0,85 | 1,45 | 0,60 | 0,838 | 0,095 | 0,001 | 0,224 |
| <i>Bacteroides_vulgatus</i> | 0,002 | 1,71 | 1,21 | 1,47 | 0,26 | 0,001 | 0,012 | 0,002 | 0,680 |
| <i>Family XIII AD3011_group_NA</i> | 0,003 | -1,31 | -0,24 | 0,79 | 1,03 | 0,032 | 0,782 | 0,209 | 0,092 |
| <i>Parabacteroides_merdae</i> | 0,005 | -0,05 | 1,37 | 0,44 | -0,93 | 0,975 | 0,012 | 0,453 | 0,092 |
| <i>Lachnospiraceae_GCA-900066755_NA</i> | 0,010 | -1,64 | -0,74 | -3,52 | -2,78 | 0,114 | 0,605 | 0,002 | 0,015 |
| <i>Ruminococcaceae_Incertae_Sedis_NA</i> | 0,011 | -0,79 | -1,01 | -2,63 | -1,62 | 0,315 | 0,261 | 0,001 | 0,045 |
| <i>Intestinimonas_NA</i> | 0,017 | -0,69 | -0,64 | -4,89 | -4,25 | 0,664 | 0,765 | 0,001 | 0,005 |
| <i>Butyricoccus_NA</i> | 0,023 | -1,42 | -1,80 | -2,69 | -0,89 | 0,140 | 0,086 | 0,007 | 0,473 |
| <i>Butyricimonas_NA</i> | 0,025 | 0,10 | 0,34 | 0,67 | 0,33 | 0,755 | 0,249 | 0,007 | 0,224 |
| <i>Marvinbryantia_NA</i> | 0,026 | -1,21 | 0,09 | -0,89 | -0,98 | 0,035 | 0,950 | 0,129 | 0,092 |
| <i>Oscillospiraceae_UCG-003_NA</i> | 0,030 | -1,16 | 1,21 | -3,60 | -4,81 | 0,527 | 0,605 | 0,054 | 0,006 |
| <i>Alistipes_indistinctus</i> | 0,030 | 2,14 | -0,77 | 2,06 | 2,83 | 0,099 | 0,699 | 0,124 | 0,032 |
| <i>Oscillospira_NA</i> | 0,030 | -1,47 | 1,00 | -3,35 | -4,35 | 0,396 | 0,630 | 0,059 | 0,010 |
| <i>Adlercreutzia_NA</i> | 0,041 | -0,66 | -1,28 | 1,39 | 2,67 | 0,601 | 0,362 | 0,232 | 0,014 |
| <i>Akkermansia_muciniphila</i> | 0,049 | 0,00 | 17,20 | 26,53 | 9,33 | 1,000 | 0,001 | 0,001 | 0,050 |
| <i>Howardella_NA</i> | 0,067 | 0,00 | 6,47 | 0,00 | -4,89 | 1,000 | 0,097 | 1,000 | 0,182 |
| <i>Alistipes_shahii</i> | 0,067 | 0,44 | -3,35 | -0,14 | 3,21 | 0,833 | 0,043 | 0,958 | 0,038 |
| <i>Clostridia_NA</i> | 0,087 | -0,88 | -0,67 | -2,30 | -1,64 | 0,315 | 0,572 | 0,014 | 0,098 |
| <i>Colidextribacter_NA</i> | 0,096 | -1,61 | 0,33 | 0,40 | 0,07 | 0,090 | 0,800 | 0,725 | 0,986 |
| <i>Peptococcus_NA</i> | 0,099 | -1,27 | -0,32 | -1,22 | -0,90 | 0,057 | 0,738 | 0,092 | 0,245 |

9. Seznam zdrojů

- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation [WWW Document], n.d. URL https://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html (accessed 6.18.24).
- Akram, W., Garud, N., Joshi, R., 2019. Role of inulin as prebiotics on inflammatory bowel disease. *Drug Discov Ther* 13, 1–8. <https://doi.org/10.5582/ddt.2019.01000>
- Amarante, M.K., Ariza, C.B., Oliveira, C.E.C. de, Gualtieri, K. de A., Oda, J.M.M., Watanabe, M.A.E., 2018. Inulin Induces IL-10 Secretion and Increased FOXP3 Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.
- Anand, S., Mande, S.S., 2022. Host-microbiome interactions: Gut-Liver axis and its connection with other organs. *npj Biofilms Microbiomes* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00352-6>
- Ang, Z., Ding, J.L., 2016. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation – Protective or Causative? *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00028>
- Appleby, P.N., Key, T.J., 2016. The long-term health of vegetarians and vegans. *Proceedings of the Nutrition Society* 75, 287–293. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004334>
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A., Jobin, C., 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123. <https://doi.org/10.1126/science.1224820>
- Asarat, M., Apostolopoulos, V., Vasiljevic, T., Donkor, O., 2016. Short-Chain Fatty Acids Regulate Cytokines and Th17/Treg Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. *Immunological Investigations* 45, 205–222. <https://doi.org/10.3109/08820139.2015.1122613>
- Bagnati, M., Ogunkolade, B.W., Marshall, C., Tucci, C., Hanna, K., Jones, T.A., Bugliani, M., Nedjai, B., Caton, P.W., Kieswich, J., Yaqoob, M.M., Ball, G.R., Marchetti, P., Hitman, G.A., Turner, M.D., 2016. Glucolipotoxicity initiates pancreatic β -cell death through TNFR5/CD40-mediated STAT1 and NF- κ B activation. *Cell Death Dis* 7, e2329–e2329. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.203>
- Bastos, R.M., Rangel, É.B., 2022. Gut microbiota-derived metabolites are novel targets for improving insulin resistance. *World J Diabetes* 13, 65–69. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i1.65>
- Baunwall, S.M.D., Terveer, E.M., Dahlerup, J.F., Erikstrup, C., Arkkila, P., Vehreschild, M.J., Ianiro, G., Gasbarrini, A., Sokol, H., Kump, P.K., Satokari, R., De Looze, D., Vermeire, S., Nakov, R., Brezina, J., Helms, M., Kjeldsen, J., Rode, A.A., Kousgaard, S.J., Alric, L., Trang-Poisson, C., Scanzi, J., Link, A., Stallmach, A., Kupcinskis, J., Johnsen, P.H., Garborg, K., Rodríguez, E.S., Serrander, L., Brummer, R.J., Galpérine, K.T., Goldenberg, S.D., Mullish, B.H., Williams, H.R., Iqbal, T.H., Ponsioen, C., Kuijper, E.J., Cammarota, G., Keller, J.J., Hvas, C.L., 2021. The use of Faecal Microbiota Transplantation (FMT) in Europe: A Europe-wide survey. *Lancet Reg Health Eur* 9, 100181. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100181>
- Bell, K.J., Saad, S., Tillett, B.J., McGuire, H.M., Bordbar, S., Yap, Y.A., Nguyen, L.T., Wilkins, M.R., Corley, S., Brodie, S., Duong, S., Wright, C.J., Twigg, S., de St Groth, B.F., Harrison, L.C., Mackay, C.R., Gurzov, E.N., Hamilton-Williams, E.E., Mariño, E., 2022. Metabolite-based dietary supplementation in human type 1 diabetes is associated with microbiota and immune modulation. *Microbiome* 10, 9. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01193-9>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., Souza, R.S.C.D., Van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., Schloter, M., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bhaskaran, N., Quigley, C., Paw, C., Butala, S., Schneider, E., Pandiyan, P., 2018. Role of Short Chain Fatty Acids in Controlling Tregs and Immunopathology During Mucosal Infection. *Front Microbiol* 9, 1995. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01995>

- Bosscher, D., 2009. Fructan Prebiotics Derived from Inulin, in: Charalampopoulos, D., Rastall, R.A. (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer, New York, NY, pp. 163–205. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_6
- Butcher, M.J., Trevino, M.B., Imai, Y., Galkina, E.V., 2020. Characterization of islet leukocyte populations in human and murine islets by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2076, 185–197. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9882-1_10
- Caballero-Flores, G., Pickard, J.M., Núñez, G., 2023. Microbiota-mediated colonization resistance: mechanisms and regulation. *Nat Rev Microbiol* 21, 347–360. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00833-7>
- Cani, P.D., Osto, M., Geurts, L., Everard, A., 2012. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279–288. <https://doi.org/10.4161/gmic.19625>
- Causes of death statistics [WWW Document], n.d. URL https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics (accessed 5.13.24).
- Cavaglieri, C.R., Nishiyama, A., Fernandes, L.C., Curi, R., Miles, E.A., Calder, P.C., 2003. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci* 73, 1683–1690. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00490-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00490-9)
- Chen, L., Guo, L., Feng, S., Wang, C., Cui, Z., Wang, S., Lu, Q., Chang, H., Hang, B., Snijders, A.M., Mao, J.-H., Lu, Y., Ding, D., 2023. Fecal microbiota transplantation ameliorates type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota in db/db mice. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 11, e003282. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2022-003282>
- Chen, Z., Zuurmond, M.G., van der Schaft, N., Nano, J., Wijnhoven, H.A.H., Ikram, M.A., Franco, O.H., Voortman, T., 2018. Plant versus animal based diets and insulin resistance, prediabetes and type 2 diabetes: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol* 33, 883–893. <https://doi.org/10.1007/s10654-018-0414-8>
- Chow, J., Mazmanian, S.K., 2010. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 7, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.004>
- Clancy, A.K., Lee, C., Hamblin, H., Gunaratne, A.W., LeBusque, A., Beck, E.J., Dawson, M.V., Borody, T.J., 2021. Dietary Intakes of Recipients of Faecal Microbiota Transplantation: An Observational Pilot Study. *Nutrients* 13, 1487. <https://doi.org/10.3390/nu13051487>
- Cosovanu, C., Neumann, C., 2020. The Many Functions of Foxp3+ Regulatory T Cells in the Intestine. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600973>
- Coyte, K.Z., Rakoff-Nahoum, S., 2019. Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Curr Biol* 29, R538–R544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.017>
- Darnaud, M., De Vadder, F., Bogeat, P., Boucinha, L., Bulteau, A.-L., Bunescu, A., Couturier, C., Delgado, A., Dugua, H., Elie, C., Mathieu, A., Novotná, T., Ouattara, D.A., Planel, S., Saliou, A., Šrůtková, D., Yansouni, J., Stecher, B., Schwarzer, M., Leulier, F., Tamellini, A., 2021. A standardized gnotobiotic mouse model harboring a minimal 15-member mouse gut microbiota recapitulates SOPF/SPF phenotypes. *Nat Commun* 12, 6686. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26963-9>
- Daskova, N., Heczko, M., Modos, I., Hradecký, J., Hudcovic, T., Kuzma, M., Pelantova, H., Buskova, I., Sticova, E., Funda, D., Golias, J., Drabonova, B., Jarkovska, J., Kralova, M., Cibulkova, I., Gojda, J., 2023. Protective Effect of Vegan Microbiota on Liver Steatosis Is Conveyed by Dietary Fiber: Implications for Fecal Microbiota Transfer Therapy. *Nutrients* 15, 454. <https://doi.org/10.3390/nu15020454>
- Ďásková, N., Modos, I., Krbcová, M., Kuzma, M., Pelantová, H., Hradecký, J., Heczková, M., Bratová, M., Videňská, P., Šplíchalová, P., Králová, M., Heniková, M., Potočková, J., Ouřadová, A., Landberg, R., Kühn, T., Cahová, M., Gojda, J., 2023. Multi-omics signatures in new-onset diabetes predict metabolic response to dietary inulin: findings from an observational study followed by an interventional trial. *Nutr. Diabetes* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41387-023-00235-5>

- de Candia, P., Prattichizzo, F., Garavelli, S., De Rosa, V., Galgani, M., Di Rella, F., Spagnuolo, M.I., Colamatteo, A., Fusco, C., Micillo, T., Bruzzaniti, S., Ceriello, A., Puca, A.A., Matarese, G., 2019. Type 2 Diabetes: How Much of an Autoimmune Disease? *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 451. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00451>
- Demaria, T.M., Crepaldi, L.D., Costa-Bartuli, E., Branco, J.R., Zancan, P., Sola-Penna, M., 2023. Once a week consumption of Western diet over twelve weeks promotes sustained insulin resistance and non-alcoholic fat liver disease in C57BL/6 J mice. *Sci Rep* 13, 3058. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30254-2>
- Donath, M.Y., Shoelson, S.E., 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98–107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>
- Du, H.-X., Yue, S.-Y., Niu, D., Liu, C., Zhang, L.-G., Chen, J., Chen, Y., Guan, Y., Hua, X.-L., Li, C., Chen, X.-G., Zhang, L., Liang, C.-Z., 2022. Gut Microflora Modulates Th17/Treg Cell Differentiation in Experimental Autoimmune Prostatitis via the Short-Chain Fatty Acid Propionate. *Front. Immunol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.915218>
- Du, J.-P., Wang, G., Hu, C.-J., Wang, Q.-B., Li, H.-Q., Xia, W.-F., Shuai, X.-M., Tao, K.-X., Wang, G.-B., Xia, Z.-F., 2016. IFN- γ secretion in gut of Ob/Ob mice after vertical sleeve gastrectomy and its function in weight loss mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 36, 377–382. <https://doi.org/10.1007/s11596-016-1595-6>
- Dywicki, J., Buitrago-Molina, L.E., Noyan, F., Davalos-Misslitz, A.C., Hupa-Breier, K.L., Lieber, M., Hapke, M., Schlue, J., Falk, C.S., Raha, S., Prinz, I., Koenecke, C., Manns, M.P., Wedemeyer, H., Hardtke-Wolenski, M., Jaeckel, E., 2021. The Detrimental Role of Regulatory T Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* 6, 320–333. <https://doi.org/10.1002/hep4.1807>
- Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G.S., Kauvar, A.J., 1958. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 44, 854–859.
- Feng, Y., Feng, J., Wang, L., Meng, A., Wei, S., Cui, J., Hu, X., Yan, L., 2021. Short-Chain Inulin Modulates the Cecal Microbiota Structure of Leptin Knockout Mice in High-Fat Diet. *Front Microbiol* 12, 703929. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703929>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., Ohno, H., 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gallagher, C.T., Hanley, P., Lane, K.E., 2022. Pattern analysis of vegan eating reveals healthy and unhealthy patterns within the vegan diet. *Public Health Nutrition* 25, 1310–1320. <https://doi.org/10.1017/S136898002100197X>
- Glick-Bauer, M., Yeh, M.-C., 2014. The Health Advantage of a Vegan Diet: Exploring the Gut Microbiota Connection. *Nutrients* 6, 4822–4838. <https://doi.org/10.3390/nu6114822>
- Guimarães, J.B., Rodrigues, V.F., Pereira, Í.S., Manso, G.M. da C., Elias-Oliveira, J., Leite, J.A., Waldetario, M.C.G.M., de Oliveira, S., Gomes, A.B.D.S.P., Faria, A.M.C., Ramos, S.G., Bonato, V.L.D., Silva, J.S., Vinolo, M.A.R., Sampaio, U.M., Clerici, M.T.P.S., Carlos, D., 2024. Inulin prebiotic ameliorates type 1 diabetes dictating regulatory T cell homing via CCR4 to pancreatic islets and butyrogenic gut microbiota in murine model. *J Leukoc Biol* 115, 483–496. <https://doi.org/10.1093/jleuko/qiad132>
- Guo, X., Tang, R., Yang, S., Lu, Y., Luo, J., Liu, Z., 2018. Rutin and Its Combination With Inulin Attenuate Gut Dysbiosis, the Inflammatory Status and Endoplasmic Reticulum Stress in Paneth Cells of Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Front Microbiol* 9, 2651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02651>
- Hamilton, M.J., Weingarden, A.R., Sadowsky, M.J., Khoruts, A., 2012. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 107, 761–767. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.482>

- Hanssen, N.M.J., Nieuwdorp, M., 2021. Fecal microbiota transplantation and fiber supplementation, better together? *Cell Rep Med* 2, 100403. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100403>
- Hasan, N., Yang, H., 2019. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* 7, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Hernández-Ceballos, W., Cordova-Gallardo, J., Mendez-Sanchez, N., 2021. Gut Microbiota in Metabolic-associated Fatty Liver Disease and in Other Chronic Metabolic Diseases. *J Clin Transl Hepatol* 9, 227–238. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2020.00131>
- Hong, E.-G., Ko, H.J., Cho, Y.-R., Kim, H.-J., Ma, Z., Yu, T.Y., Friedline, R.H., Kurt-Jones, E., Finberg, R., Fischer, M.A., Granger, E.L., Norbury, C.C., Hauschka, S.D., Philbrick, W.M., Lee, C.-G., Elias, J.A., Kim, J.K., 2009. Interleukin-10 Prevents Diet-Induced Insulin Resistance by Attenuating Macrophage and Cytokine Response in Skeletal Muscle. *Diabetes* 58, 2525–2535. <https://doi.org/10.2337/db08-1261>
- Hu, M., Alashkar Alhamwe, B., Santner-Nanan, B., Miethe, S., Harb, H., Renz, H., Potaczek, D.P., Nanan, R.K., 2022. Short-Chain Fatty Acids Augment Differentiation and Function of Human Induced Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci* 23, 5740. <https://doi.org/10.3390/ijms23105740>
- Huang, S., Dong, S., Lin, L., Ma, Q., Xu, M., Ni, L., Fan, Q., 2023. *Frontiers | Inulin ameliorates metabolic syndrome in high-fat diet-fed mice by regulating gut microbiota and bile acid excretion.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1226448>
- Ivanov, I.I., Tuganbaev, T., Skelly, A.N., Honda, K., 2022. T Cell Responses to the Microbiota. *Annual review of immunology* 40, 559. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101320-011829>
- Iversen, K.N., Dicksved, J., Zoki, C., Fristedt, R., Pelve, E.A., Langton, M., Landberg, R., 2022. The Effects of High Fiber Rye, Compared to Refined Wheat, on Gut Microbiota Composition, Plasma Short Chain Fatty Acids, and Implications for Weight Loss and Metabolic Risk Factors (the RyeWeight Study). *Nutrients* 14, 1669. <https://doi.org/10.3390/nu14081669>
- Jagannathan-Bogdan, M., McDonnell, M.E., Shin, H., Rehman, Q., Hasturk, H., Apovian, C.M., Nikolajczyk, B.S., 2011. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. *The Journal of Immunology* 186, 1162–1172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002615>
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., Ruan, B., 2015. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* 48, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>
- Joos, R., Boucher, K., Lavelle, A., Arumugam, M., Blaser, M.J., Claesson, M.J., Clarke, G., Cotter, P.D., De Sordi, L., Dominguez-Bello, M.G., Dutilh, B.E., Ehrlich, S.D., Ghosh, T.S., Hill, C., Junot, C., Lahti, L., Lawley, T.D., Licht, T.R., Maguin, E., Makhalanyane, T.P., Marchesi, J.R., Matthijssens, J., Raes, J., Ravel, J., Salonen, A., Scanlan, P.D., Shkoporov, A., Stanton, C., Thiele, I., Tolstoy, I., Walter, J., Yang, B., Yutin, N., Zhernakova, A., Zwart, H., Doré, J., Ross, R.P., 2024. Examining the healthy human microbiome concept. *Nat Rev Microbiol* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01107-0>
- Kehrmann, J., Effenberg, L., Wilk, C., Schoemer, D., Phuong, N.N.T., Adamczyk, A., Pastille, E., Scholtysik, R., Klein-Hitpass, L., Klopffleisch, R., Westendorf, A.M., Buer, J., 2019. Depletion of Foxp3+ regulatory T cells is accompanied by an increase in the relative abundance of Firmicutes in the murine gut microbiome. *Immunology* 159, 344. <https://doi.org/10.1111/imm.13158>
- Kei, N., Lauw, S., Wong, V.W.S., Cheung, P.C.K., 2024. A mini-review on prebiotic inulin to prevent and treat non-alcoholic fatty liver disease. *Food Bioscience* 61, 104679. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104679>
- Kelly, C.R., Yen, E.F., Grinspan, A.M., Kahn, S.A., Atreja, A., Lewis, J.D., Moore, T.A., Rubin, D.T., Kim, A.M., Serra, S., Nersesova, Y., Fredell, L., Hunsicker, D., McDonald, D., Knight, R., Allegretti, J.R., Pekow, J., Absah, I., Hsu, R., Vincent, J., Khanna, S., Tangen, L., Crawford, C.V., Mattar, M.C., Chen, L.A., Fischer, M., Arsenescu, R.I., Feuerstadt, P., Goldstein, J., Kerman, D., Ehrlich, A.C., Wu, G.D., Laine, L., 2021. Fecal Microbiota Transplantation Is Highly Effective in Real-World

- Practice: Initial Results From the FMT National Registry. *Gastroenterology* 160, 183-192.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.038>
- Khan, I., Bai, Y., Zha, L., Ullah, N., Ullah, H., Shah, S.R.H., Sun, H., Zhang, C., 2021. Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716299>
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A.-M., Knippschild, U., Hombach, V., Marx, N., 2008. T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. *ATVB* 28, 1304–1310. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165100>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B.S., Buffa, J.A., Org, E., Sheehy, B.T., Britt, E.B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J.D., DiDonato, J.A., Chen, J., Li, H., Wu, G.D., Lewis, J.D., Warrier, M., Brown, J.M., Krauss, R.M., Tang, W.H.W., Bushman, F.D., Lusi, A.J., Hazen, S.L., 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19, 576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Kopp, W., 2019. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12, 2221–2236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaïss, C.A., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17, 219–232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- Li, B., Gurung, P., Malireddi, R.K.S., Vogel, P., Kanneganti, T.-D., Geiger, T.L., 2015. IL-10 engages macrophages to shift Th17 cytokine dependency and pathogenicity during T-cell-mediated colitis. *Nat Commun* 6, 6131. <https://doi.org/10.1038/ncomms7131>
- López-Almela, I., Romani-Pérez, M., Bullich-Vilarrubias, C., Benítez-Páez, A., Gómez Del Pulgar, E.M., Francés, R., Liebisch, G., Sanz, Y., 2021. *Bacteroides uniformis* combined with fiber amplifies metabolic and immune benefits in obese mice. *Gut Microbes* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1865706>
- Losasso, C., Di Cesare, A., Mastroianni, E., Patuzzi, I., Cibin, V., Eckert, E.M., Fontaneto, D., Vanzo, A., Ricci, A., Corno, G., 2018. Assessing antimicrobial resistance gene load in vegan, vegetarian and omnivore human gut microbiota. *International Journal of Antimicrobial Agents* 52, 702–705. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.023>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Luu, M., Visekruna, A., 2019. Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. *European Journal of Immunology* 49, 842–848. <https://doi.org/10.1002/eji.201848009>
- Lv, Y., Rong, S., Deng, Y., Bao, W., Xia, Y., Chen, L., 2023. Plant-based diets, genetic predisposition and risk of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Medicine* 21, 351. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03028-w>
- Marietta, E., Mangalam, A.K., Taneja, V., Murray, J.A., 2020. Intestinal Dysbiosis in, and Enteral Bacterial Therapies for, Systemic Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573079>
- Martin-Gallausiaux, C., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Jamet, A., Ledue, F., Blottière, H.M., Lapaque, N., 2018. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF- β 1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28048-y>
- McGillicuddy, F.C., Chiquoine, E.H., Hinkle, C.C., Kim, R.J., Shah, R., Roche, H.M., Smyth, E.M., Reilly, M.P., 2009. Interferon γ Attenuates Insulin Signaling, Lipid Storage, and Differentiation in

- Human Adipocytes via Activation of the JAK/STAT Pathway. *J Biol Chem* 284, 31936–31944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061655>
- McLaughlin, T., Liu, L.-F., Lamendola, C., Shen, L., Morton, J., Rivas, H., Winer, D., Tolentino, L., Choi, O., Zhang, H., Hui Yen Chng, M., Engleman, E., 2014. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2637–2643. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304636>
- Metwaly, A., Reitmeier, S., Haller, D., 2022. Microbiome risk profiles as biomarkers for inflammatory and metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19, 383–397. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00581-2>
- Mocanu, V., Zhang, Z., Deehan, E.C., Kao, D.H., Hotte, N., Karmali, S., Birch, D.W., Samarasinghe, K.K., Walter, J., Madsen, K.L., 2021. Fecal microbial transplantation and fiber supplementation in patients with severe obesity and metabolic syndrome: a randomized double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Nat Med* 27, 1272–1279. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01399-2>
- Muske, J., Knoop, K., 2023. Contributions of the microbiota to the systemic inflammatory response. *Microbiota and Host* 1. <https://doi.org/10.1530/MAH-23-0018>
- Nakamura, Y.K., Janowitz, C., Metea, C., Asquith, M., Karstens, L., Rosenbaum, J.T., Lin, P., 2017. Short chain fatty acids ameliorate immune-mediated uveitis partially by altering migration of lymphocytes from the intestine. *Scientific Reports* 7, 11745. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12163-3>
- Ney, L.-M., Wipplinger, M., Grossmann, M., Engert, N., Wegner, V.D., Mosig, A.S., 2023. Short chain fatty acids: key regulators of the local and systemic immune response in inflammatory diseases and infections. *Open Biology* 13, 230014. <https://doi.org/10.1098/rsob.230014>
- Nikparast, A., Mirzaei, P., Tadayoni, Z.S., Asghari, G., 2024. The Association Between Overall, Healthy, and Unhealthy Plant-Based Diet Index and Risk of Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrition Reviews* nuae049. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae049>
- O’Hearn, M., Lara-Castor, L., Cudhea, F., Miller, V., Reedy, J., Shi, P., Zhang, J., Wong, J.B., Economos, C.D., Micha, R., Mozaffarian, D., 2023. Incident type 2 diabetes attributable to suboptimal diet in 184 countries. *Nat Med* 29, 982–995. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02278-8>
- Pagnini, C., Cominelli, F., 2021. Tumor Necrosis Factor’s Pathway in Crohn’s Disease: Potential for Intervention. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 10273. <https://doi.org/10.3390/ijms221910273>
- Pappachan, J.M., Fernandez, C.J., Ashraf, A.P., 2024. Rising tide: The global surge of type 2 diabetes in children and adolescents demands action now. *World Journal of Diabetes* 15, 797. <https://doi.org/10.4239/wjd.v15.i5.797>
- Park, J., Kim, M., Kang, S.G., Jannasch, A.H., Cooper, B., Patterson, J., Kim, C.H., 2015. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal Immunol* 8, 80–93. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.44>
- Pinheiro-Machado, E., Gurgul-Convey, E., Marzec, M.T., 2020. Immunometabolism in type 2 diabetes mellitus: tissue-specific interactions. *Arch Med Sci* 19, 895–911. <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.92674>
- Podlesny, D., Durdevic, M., Paramsothy, S., Kaakoush, N.O., Högenauer, C., Gorkiewicz, G., Walter, J., Fricke, W.F., 2022. Identification of clinical and ecological determinants of strain engraftment after fecal microbiota transplantation using metagenomics. *CR Med* 3. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100711>
- Prochazkova, M., Budinska, E., Kuzma, M., Pelantova, H., Hradecky, J., Heczko, M., Daskova, N., Bratova, M., Modos, I., Videnska, P., Splichalova, P., Sowah, S.A., Kralova, M., Henikova, M., Selinger, E., Klima, K., Chalupsky, K., Sedlacek, R., Landberg, R., Kühn, T., Gojda, J., Cahova, M., 2022. Vegan Diet Is Associated With Favorable Effects on the Metabolic Performance of

- Intestinal Microbiota: A Cross-Sectional Multi-Omics Study.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.783302>
- Qiao, Y., Shen, J., He, L., Hong, X., Tian, F., Pan, Y., Liang, L., Zhang, X., Zhao, H., 2016. Changes of Regulatory T Cells and of Proinflammatory and Immunosuppressive Cytokines in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res* 2016, 3694957. <https://doi.org/10.1155/2016/3694957>
- Rafey, A., Jahan, S., Farooq, U., Akhtar, F., Irshad, M., Nizamuddin, S., Parveen, A., 2023. Antibiotics Associated With *Clostridium difficile* Infection. *Cureus* 15, e39029. <https://doi.org/10.7759/cureus.39029>
- Rajput, M., Momin, T., Singh, A., Banerjee, S., Villasenor, A., Sheldon, J., Paudel, P., Rajput, R., 2022. Determining the association between gut microbiota and its metabolites with higher intestinal Immunoglobulin A response. *Vet Anim Sci* 19, 100279. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100279>
- Rakhra, V., Galappaththy, S.L., Bulchandani, S., Cabandugama, P.K., 2020. Obesity and the Western Diet: How We Got Here. *Mo Med* 117, 536–538.
- Rangan, P., Mondino, A., 2022. Microbial short-chain fatty acids: a strategy to tune adoptive T cell therapy. *J Immunother Cancer* 10, e004147. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004147>
- Rao, M., Gao, C., Xu, L., Jiang, L., Zhu, J., Chen, G., Law, B.Y.K., Xu, Y., 2019. Effect of Inulin-Type Carbohydrates on Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Diabetes Research* 2019, 5101423. <https://doi.org/10.1155/2019/5101423>
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., 2013. Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science* 341, 10.1126/science.1241214. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Rios-Covian, D., Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C.G., 2017. Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00376>
- Riva, A., Rasoulimehrabani, H., Cruz-Rubio, J.M., Schnorr, S.L., von Baeckmann, C., Inan, D., Nikolov, G., Herbold, C.W., Hausmann, B., Pjevac, P., Schintlmeister, A., Spittler, A., Palatinszky, M., Kadunic, A., Hieger, N., Del Favero, G., von Bergen, M., Jehmlich, N., Watzka, M., Lee, K.S., Wiesenbauer, J., Khadem, S., Viernstein, H., Stocker, R., Wagner, M., Kaiser, C., Richter, A., Kleitz, F., Berry, D., 2023. Identification of inulin-responsive bacteria in the gut microbiota via multi-modal activity-based sorting. *Nat Commun* 14, 8210. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43448-z>
- Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., Libby, P., 2008. Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation. *Circulation Research* 103, 467–476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177105>
- Roshan, N., Clancy, A.K., Borody, T.J., 2020. Faecal Microbiota Transplantation is Effective for the Initial Treatment of *Clostridium difficile* Infection: A Retrospective Clinical Review. *Infect Dis Ther* 9, 935–942. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00339-w>
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., Mazmanian, S.K., 2011. The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 332, 974–977. <https://doi.org/10.1126/science.1206095>
- Ruze, R., Liu, T., Zou, X., Song, J., Chen, Y., Xu, R., Yin, X., Xu, Q., 2023. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front. Endocrinol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521>
- Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., Uschner, F.E., Reul, W., Boor, P., Nickenig, G., Strassburg, C.P., Trautwein, C., Plat, J., Lütjohann, D., Sauerbruch, T., Tacke, F., Trebicka, J., 2015. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice

- induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep* 5, 12931. <https://doi.org/10.1038/srep12931>
- Selinger, E., Neuenschwander, M., Koller, A., Gojda, J., Kühn, T., Schwingshackl, L., Barbaresko, J., Schlesinger, S., 2023. Evidence of a vegan diet for health benefits and risks – an umbrella review of meta-analyses of observational and clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 63, 9926–9936. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2075311>
- Šestan, M., Marinović, S., Kavazović, I., Cekinović, Đ., Wueest, S., Turk Wensveen, T., Brizić, I., Jonjić, S., Konrad, D., Wensveen, F.M., Polić, B., 2018. Virus-Induced Interferon- γ Causes Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Derails Glycemic Control in Obesity. *Immunity* 49, 164-177.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.005>
- Shen, E.P., Surawicz, C.M., 2008. Current Treatment Options for Severe *Clostridium difficile*–associated Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 4, 134–139.
- Sidhu, S.R.K., Kok, C.W., Kunasegaran, T., Ramadas, A., 2023. Effect of Plant-Based Diets on Gut Microbiota: A Systematic Review of Interventional Studies. *Nutrients* 15, 1510. <https://doi.org/10.3390/nu15061510>
- Silbernagl, S., Despopoulos, A., Jandová, K., Langmeier, M., Kittnar, O., Kuriščák, E., Mlčková, P., Nedbalová, M., Riljak, Vladimír., Wittner, M., 2016. Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání, 4. české vydání. ed. Grada Publishing, Praha.
- Singh, P., Alm, E.J., Kelley, J.M., Cheng, V., Smith, M., Kassam, Z., Nee, J., Iturrino, J., Lembo, A., 2022. Effect of antibiotic pretreatment on bacterial engraftment after Fecal Microbiota Transplant (FMT) in IBS-D. *Gut Microbes* 14, 2020067. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2020067>
- Ślebioda, T.J., Kmieć, Z., 2014. Tumour Necrosis Factor Superfamily Members in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators of Inflammation* 2014, e325129. <https://doi.org/10.1155/2014/325129>
- Smith, B.J., Piceno, Y., Zydek, M., Zhang, B., Syriani, L.A., Terdiman, J.P., Kassam, Z., Ma, A., Lynch, S.V., Pollard, K.S., El-Nachef, N., 2022. Strain-resolved analysis in a randomized trial of antibiotic pretreatment and maintenance dose delivery mode with fecal microbiota transplant for ulcerative colitis. *Sci Rep* 12, 5517. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09307-5>
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., Garrett, W.S., 2013. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 10.1126/science.1241165. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Smits, L.P., Kootte, R.S., Levin, E., Prodan, A., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., Wang, Z., Levison, B.S., Cleophas, M.C.P., Kemper, E.M., Dallinga-Thie, G.M., Groen, A.K., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Stroes, E.S.G., de Vos, W.M., Hazen, S.L., Nieuwdorp, M., 2018. Effect of Vegan Fecal Microbiota Transplantation on Carnitine- and Choline-Derived Trimethylamine-N-Oxide Production and Vascular Inflammation in Patients With Metabolic Syndrome. *Journal of the American Heart Association* 7, e008342. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008342>
- Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11, 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Song, C., Long, X., He, J., Huang, Y., 2023. Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Front. Pharmacol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1081334>
- Song, J., Li, Q., Everaert, N., Liu, R., Zheng, M., Zhao, G., Wen, J., 2020. Dietary Inulin Supplementation Modulates Short-Chain Fatty Acid Levels and Cecum Microbiota Composition and Function in Chickens Infected With *Salmonella*. *Front Microbiol* 11, 584380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584380>
- Stols-Gonçalves, D., Mak, A.L., Madsen, M.S., van der Vossen, E.W.J., Bruinstroop, E., Henneman, P., Mol, F., Scheithauer, T.P.M., Smits, L., Witjes, J., Meijnikman, A.S., Verheij, J., Nieuwdorp, M., Holleboom, A.G., Levin, E., 2023. Faecal Microbiota transplantation affects liver DNA methylation in Non-alcoholic fatty liver disease: a multi-omics approach. *Gut Microbes* 15, 2223330. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2223330>

- Su, L., Wu, Z., Chi, Y., Song, Y., Xu, J., Tan, J., Cong, X., Liu, Y., 2019. Mesenteric lymph node CD4+ T lymphocytes migrate to liver and contribute to non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Immunol* 337, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.005>
- Sun, M., Wu, W., Chen, L., Yang, W., Huang, X., Ma, Caiyun, Chen, F., Xiao, Y., Zhao, Y., Ma, Chunyan, Yao, S., Carpio, V.H., Dann, S.M., Zhao, Q., Liu, Z., Cong, Y., 2018. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat Commun* 9, 3555. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05901-2>
- Tan, J., Taitz, J., Sun, S.M., Langford, L., Ni, D., Macia, L., 2022. Your Regulatory T Cells Are What You Eat: How Diet and Gut Microbiota Affect Regulatory T Cell Development. *Frontiers in Nutrition* 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.878382>
- Tang, R., Li, L., 2021. Modulation of Short-Chain Fatty Acids as Potential Therapy Method for Type 2 Diabetes Mellitus. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2021, e6632266. <https://doi.org/10.1155/2021/6632266>
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., Marsland, B.J., 2014. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 20, 159–166. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>
- Tsai, S., Clemente-Casares, X., Revelo, X.S., Winer, S., Winer, D.A., 2015. Are Obesity-Related Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Autoimmune Diseases? *Diabetes* 64, 1886–1897. <https://doi.org/10.2337/db14-1488>
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Usami, M., Kishimoto, K., Ohata, A., Miyoshi, M., Aoyama, M., Fueda, Y., Kotani, J., 2008. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr Res* 28, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.012>
- van der Beek, C.M., Canfora, E.E., Kip, A.M., Gorissen, S.H.M., Olde Damink, S.W.M., van Eijk, H.M., Holst, J.J., Blaak, E.E., Dejong, C.H.C., Lenaerts, K., 2018. The prebiotic inulin improves substrate metabolism and promotes short-chain fatty acid production in overweight to obese men. *Metabolism* 87, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.06.009>
- van Exel, E., Gussekloo, J., de Craen, A.J.M., Frölich, M., Bootsma-van der Wiel, A., Westendorp, R.G.J., 2002. Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes : The Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 51, 1088–1092. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1088>
- Větrovský, T., Baldrian, P., 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS ONE* 8, e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Wali, J.A., Thomas, H.E., Sutherland, A.P., 2014. Linking obesity with type 2 diabetes: the role of T-bet. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 331–340. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S51432>
- Wang, S., Li, X.-Y., Ji, H.-F., Shen, L., 2022. Modulation of gut microbiota by glycyrrhizic acid may contribute to its anti-NAFLD effect in rats fed a high-fat diet. *Life Sciences* 310, 121110. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121110>
- Wang, Z., Peters, B.A., Yu, B., Grove, M.L., Wang, T., Xue, X., Thyagarajan, B., Daviglius, M.L., Boerwinkle, E., Hu, G., Mossavar-Rahmani, Y., Isasi, C.R., Knight, R., Burk, R.D., Kaplan, R.C., Qi, Q., 2024. Gut Microbiota and Blood Metabolites Related to Fiber Intake and Type 2 Diabetes. *Circulation Research* 134, 842–854. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.323634>
- Wiechers, C., Zou, M., Galvez, E., Beckstette, M., Ebel, M., Strowig, T., Huehn, J., Pezoldt, J., 2021. The microbiota is dispensable for the early stages of peripheral regulatory T cell induction within mesenteric lymph nodes. *Cell Mol Immunol* 18, 1211–1221. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00647-2>

- Wilke, C.M., Wang, L., Wei, S., Kryczek, I., Huang, E., Kao, J., Lin, Y., Fang, J., Zou, W., 2011. Endogenous interleukin-10 constrains Th17 cells in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Translational Medicine* 9, 217. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-217>
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Chng, M.H.Y., Engleman, E.G., 2012. B lymphocytes as emerging mediators of insulin resistance. *Int J Obes Supp* 2, S4–S7. <https://doi.org/10.1038/ijosup.2012.2>
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., Maezawa, Y., Drucker, D., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H.-M., 2009. Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nat Med* 15, 921–929. <https://doi.org/10.1038/nm.2001>
- Witjes, J.J., Smits, L.P., Pekmez, C.T., Prodan, A., Meijnikman, A.S., Troelstra, M.A., Bouter, K.E.C., Herrema, H., Levin, E., Holleboom, A.G., Winkelmeijer, M., Beuers, U.H., van Lienden, K., Aron-Wisnewky, J., Mannisto, V., Bergman, J.J., Runge, J.H., Nederveen, A.J., Dragsted, L.O., Konstanti, P., Zoetendal, E.G., de Vos, W., Verheij, J., Groen, A.K., Nieuwdorp, M., 2020. Donor Fecal Microbiota Transplantation Alters Gut Microbiota and Metabolites in Obese Individuals With Steatohepatitis. *Hepatology* 4, 1578–1590. <https://doi.org/10.1002/hep4.1601>
- Wong, N., Fam, B.C., Cempako, G.R., Steinberg, G.R., Walder, K., Kay, T.W., Proietto, J., Andrikopoulos, S., 2011. Deficiency in Interferon- γ Results in Reduced Body Weight and Better Glucose Tolerance in Mice. *Endocrinology* 152, 3690–3699. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0288>
- Wu, L., Park, S.-H., Kim, H., 2023. Direct and Indirect Evidence of Effects of *Bacteroides* spp. on Obesity and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 438. <https://doi.org/10.3390/ijms25010438>
- Wu, Z., Zhang, B., Chen, F., Xia, R., Zhu, D., Chen, B., Lin, A., Zheng, C., Hou, D., Li, X., Zhang, S., Chen, Y., Hou, K., 2022. Fecal microbiota transplantation reverses insulin resistance in type 2 diabetes: A randomized, controlled, prospective study. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 1089991. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1089991>
- Wysham, C., Shubrook, J., 2020. Beta-cell failure in type 2 diabetes: mechanisms, markers, and clinical implications. *Postgraduate Medicine* 132, 676–686. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1771047>
- Xia, C., Rao, X., Zhong, J., 2017. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. *Journal of Diabetes Research* 2017, e6494795. <https://doi.org/10.1155/2017/6494795>
- Xie, C., Gao, W., Liang, X., Chye, F.Y., 2024. Effects of garlic-derived fructan and oligofructose mixtures on intestinal health and constipation relief in mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* n/a. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13567>
- Xiong, G., Huang, C., Zou, Y., Tao, Z., Zou, J., Huang, J., 2022. Associations of Urinary Phytoestrogen Concentrations with Nonalcoholic Fatty Liver Disease among Adults. *J Healthc Eng* 2022, 4912961. <https://doi.org/10.1155/2022/4912961>
- Xiong, X., Li, X., 2023. Type 2 diabetes originated from non-alcoholic fatty liver disease. *Life Metabolism* 2, load007. <https://doi.org/10.1093/lifemeta/load007>
- Xu, A.A., Kennedy, L.K., Hoffman, K., White, D.L., Kanwal, F., El-Serag, H.B., Petrosino, J.F., Jiao, L., 2022. Dietary Fatty Acid Intake and the Colonic Gut Microbiota in Humans. *Nutrients* 14, 2722. <https://doi.org/10.3390/nu14132722>
- Yang, M., Qi, X., Li, N., Kaifi, J.T., Chen, S., Wheeler, A.A., Kimchi, E.T., Ericsson, A.C., Rector, R.S., Staveley-O'Carroll, K.F., Li, G., 2023. Western diet contributes to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in male mice via remodeling gut microbiota and increasing production of 2-oleoylglycerol. *Nat Commun* 14, 228. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35861-1>
- Yoo, J.Y., Groer, M., Dutra, S.V.O., Sarkar, A., McSkimming, D.I., 2020. Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms* 8, 1587. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101587>

- Yuan, N., Zhang, H., Wei, Q., Wang, P., Guo, W., 2018. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells, Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 126, 96–101. <https://doi.org/10.1055/s-0043-113454>
- Zhao, M., Chu, J., Feng, S., Guo, C., Xue, B., He, K., Li, L., 2023. Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 164, 114985. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114985>
- Zhong, Y., Cao, J., Ma, Y., Zhang, Y., Liu, J., Wang, H., 2022. Fecal Microbiota Transplantation Donor and Dietary Fiber Intervention Collectively Contribute to Gut Health in a Mouse Model. *Frontiers in Immunology* 13, 842669. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842669>
- Zhou, Y., Zhang, H., Yao, Y., Zhang, X., Guan, Y., Zheng, F., 2022. CD4+ T cell activation and inflammation in NASH-related fibrosis. *Front. Immunol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.967410>
- Zhu, Y., Yang, H., Zhang, Y., Rao, S., Mo, Y., Zhang, H., Liang, S., Zhang, Z., Yang, W., 2023. Dietary fiber intake and non-alcoholic fatty liver disease: The mediating role of obesity. *Front Public Health* 10, 1038435. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1038435>