

VETERINÁRNA A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Děkanát fakulty farmaceutické



KULTIVAČNÉ VLASTNOSTI A KRYOPROTEKTIVITA STRIKTNE
ANAERÓBNÝCH MIKROBIOT ČREVA

Diplomová práce

Brno 2020

Vedoucí diplomové práce

Patrik Sivulič

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Farmaceutická fakulta

Děkanát fakulty farmaceutické

Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Patrik SIVULIČ**
Osobní číslo: **F15137**
Studijní program: **M5206 Farmacie**
Studijní obor: **Farmacie**
Téma práce: **Kultivačné vlastnosti a kryoprotektivita striktne anaerobných mikrobiot čreva.**

Zásady pro vypracování

1. Studium literatury zaměřené na danou problematiku 2. Konzultace s odborníky, lékaři na dané téma 3. Zpracování výsledků 4. Zpracování diplomové práce, odevzdání a obhajoba

Seznam doporučené literatury:

České a zahraniční odborné publikace, monografie a články

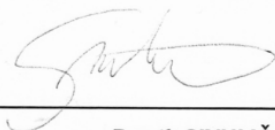
Vedoucí diplomové práce:

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie

Datum zadání diplomové práce: **14. května 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **17. dubna 2020**



Patrik SIVULIČ
student



PharmDr. Tünde Ambrus, Ph.D.
vedoucí katedry



doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová,
Ph.D., MBA
děkan



Děkanát
Farmaceutické fakulty
Veterní a farmaceutické univerzity Brno
Palackého tř. 1946/1
612 42 Brno

②

V Brně dne 14. května 2018

Abstrakt

Anaeróbne komenzálne baktérie čreva sú jednou z najslubnejších metód liečby rady autoimunitných chorôb v budúcnosti. V súčasnej dobe nebolo napísaných veľa publikácií zameraných na transport striktne anaeróbných bakteriálnych kultúr do ľudského čreva. Aby sa zaistilo ich úspešné vpravenie až do hrubého čreva, je nutné pochopiť ich senzitivitu na kultivačné médiá a zaistiť životaschopnosť baktérií po ich exponovaní mrazu.

Naším cieľom bolo nájsť kryoprotekčné médiá, ktoré znížia straty živých baktérií počas uchovávaní v nízkych teplotách. Boli použité 3 typy baktérií *Anaerobutyricum hallii* (DSM 3353), *Blautia obeum* (DSM 25238) a *Faecalibacterium prausnitzii* (DSM 17677) oddelene zmiešané s intracelulárnymi a extracelulárnymi kryoprotektantmi (glycerol, sacharóza, trehalóza, inulín, pektín, želatína) a zamrazené na teploty -20°C a -75°C v aeróbných a anaeróbných podmienkach. Následne bola meraná viabilita baktérií po rozmrazení v rôznych časových intervaloch.

Mierne znížené počty baktérií boli nájdené pri uchovávaní v teplotných podmienkach -75°C , čo kontrastuje s uchovávaním v podmienkach -20°C , ktoré boli nezlučiteľné so životom pre väčšinu baktérií po dobe zmrazenia dlhšej ako 60 dní. Na rozdiel od teplôt -75°C , v teplote -20°C boli pozorované väčšie rozdiely v uskladnení baktérií anaeróbne.

Kľúčové slová: Striktne anaeróbne baktérie, Kryoprotekcia, Total plate count, *Anaerobutyricum hallii*, *Blautia obeum*, *Faecalibacterium prausnitzii*

Abstract

Anaerobic commensal gut microbiota are one of the most promising treatment for a number of autoimmune diseases in the future. Because of their cultivation requirements, scarce number of studies focus on transporting strictly anaerobic bacterial cultures to the human gut. To be sure that delivery into colon is successful, bacterial susceptibility in cultivation media and viability after cryopreservation has to be known.

The aim was to find cryoprotective media which can lower damage done on viable bacterial cells during storage in low temperatures. The process consisted of mixing three types of bacteria, *Anaerobutyricum hallii* (DSM 3353), *Blautia obeum* (DSM 25238) and *Faecalibacterium praustnitzii* (DSM 17677), separately with intracellular and extracellular cryoprotectants (glycerol, sucrose, trehalose, inuline, pektine, gelatine) and freezing them at -20°C and -75°C in aerobic and anaerobic conditions to measure bacterial viability after defreezing at different time intervals.

Slightly decreased counts of bacteria were observed after storage at -75°C in contrast to storage at -20°C that were lethal for most of the bacteria after a period longer than 60 days. An anaerobic seal was more efficient in protection of bacteria at -20°C compared to at -75°C.

Keywords: Strictly anaerobic bacteria, Cryoprotection, Total plate count, *Anaerobutyricum hallii*, *Blautia obeum*, *Faecalibacterium praustnitzii*

Prehlásenie

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu napísal samostatne a s použitím uvedenej literatúry.

V Brne dňa 29.4.2020

.....

Patrik Sivulič

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí všetkým, ktorí sa podieľali na vzniku tejto diplomovej práce. Predovšetkým môjmu vedúcemu, Prof. MVDr. Aloisovi Čížkovi, CSc., za jeho cenné rady, odborné pripomienky a priateľský prístup, ktoré mi pomáhali napredovať nielen pri práci v laboratóriu, ale aj počas písania diplomovej práce. Ďalej ďakujem Projektu IGA 306/2019/faf za finančnú podporu, ktorá z časti hradila experimentálnu časť mojej diplomovej práce. Tiež by som rád pod'akoval tímu v laboratóriu a to hlavne Ing. Karolíne Kislíkovej a Mgr. Magdaléne Uhlířové, tiež môjmu bratovi, Richardovi Sivuličovi a Teleri James za pomoc s korektúrou textu.

Obsah

1.	Úvod	11
2.	Cieľ diplomovej práce	12
3.	Teoretická časť	13
3.1.	Mikrobióm zdravého človeka	13
3.2.	Mikrobióm chorého človeka	14
3.3.	<i>Clostridium difficile</i>	15
3.4.	IBS a IBD	15
3.4.1.	Syndróm dráždivého čreva	15
3.4.2.	Zápalové ochorenie čreva	16
3.4.3.	Ulcerózna kolitída	17
3.4.4.	Crohnová choroba	17
3.5.	Diagnostika IBD	19
3.6.	Liečba IBD	19
3.6.1.	Aminosalicyláty	19
3.6.2.	Antibiotické chemoterapeutika	20
3.6.3.	Glukokortikoidy	20
3.6.4.	Liečivá ovplyvňujúce imunitnú odpoveď	20
3.7.	Fekálna mikrobiálna transplantácia	21
3.7.1.	História fekálnej mikrobiálnej transplantácie	21
3.7.2.	Procedúra FMT	22
3.7.3.	Negatíva FMT	22
3.8.	Nové metódy v liečení IBD	23
3.9.	Kryoprezervácia	23
3.10.	Bakteriálne kultúry	24
3.10.1.	<i>Blautia obeum</i>	24
3.10.2.	<i>Anaerobutyricum hallii</i>	25
3.10.3.	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	26
4.	Praktická časť	28

4.1.	Materiál	28
4.1.1.	Kultivačné médiá a riediace roztoky	28
4.1.2.	Bakteriálne kultúry	35
4.1.3.	Kryoprotektívne médiá a matrice	36
4.1.4.	Matrice.....	36
4.2.	Použité prístroje.....	37
4.3.	Pomôcky	38
4.4.	Metodika.....	39
4.4.1.	Kultivačné vlastnosti zbierkových kultúr.....	39
4.4.2.	Elektrónová mikroskopia zbierkových kultúr.....	39
4.4.3.	Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Úvodný experiment.....	40
4.4.4.	Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Hlavný experiment	42
5.	Výsledky a diskusia	44
5.1.	Úvod	44
5.2.	Kultivačné vlastnosti striktných anaeróbov čreva	45
5.3.	Elektrónová mikroskopia.....	54
5.4.	Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Úvodný experiment.....	58
5.5.	Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Hlavný experiment	60
5.5.1.	Kultivácia <i>A. hallii</i> DSM 3353 pri -75°C	60
5.5.2.	Kultivácia <i>A. hallii</i> DSM 3353 pri -20°C	62
5.5.3.	Kultivácia <i>B. obeum</i> DSM 25238 pri -75°C.....	63
5.5.4.	Kultivácia <i>B. obeum</i> DSM 25238 pri -20°C.....	65
5.5.5.	Kultivácia <i>F. praustnitzii</i> DSM 17677 pri -75°C	67
5.5.6.	Kultivácia <i>F. praustnitzii</i> DSM 17677 pri -20°C	68
5.5.7.	Zhrnutie výsledkov hlavného experimentu.....	70
5.5.8.	Zameranie ďalšieho výskumu na podklade získaných výsledkov	72
6.	Záver	73

7.	Referencie	74
8.	Zoznam použitých skratiek.....	79
9.	Zoznam grafov	80
10.	Zoznam obrázkov	81
11.	Zoznam schém.....	81
12.	Zoznam tabuliek	82
13.	Prílohy.....	83

1. Úvod

Každým rokom sa uisťujeme v tvrdení, že epigenóm je pre správne fungovanie a homeostázu organizmu jednou z esenciálnych súčastí. Ľudské telo ho nadobúda už počas pôrodu, následne sa obohacuje a mení svoje zloženie v priebehu dospievania [1]. V dnešnej modernej dobe, kde sa na hygienu kladie veľký dôraz, veľká časť epigenómu, mikrobióm, stráca na rozmanitosti, čo sekundárne vedie k rôznym komplikáciám v zdraví.

Mikrobiómom sa rozumejú všetky mikrobiálne organizmy a ich genetický materiál, ktoré ľudské telo obsahuje. Na základe vetvy mikrobiálneho organizmu sa mikrobióm delí na viacero subtypov ako parazitóm, bakterióm a iné. Bakterióm ľudského tela je z dlhodobého hľadiska stabilný a vysoko špecifický v závislosti od jedinca, na druhú stranu paradoxne ľahko vychýlitelný z krátkodobého hľadiska zmenou potravy, životného štýlu a samozrejme nadužívaním antibakteriálnych chemoterapeutík (pre jednoduchosť budem ďalej používať termín mikrobióm). Deti do piateho roku života svoje črevné baktérie nadobúdajú rozšírením druhov prijímanej potravy, ale nízka diverzita v strave a tiež aj častejšie použitie antibiotík v tomto období môže viesť k závažnému, často ireverzibilnému, výkyvu mikrobiálnej flóry čreva, čo môže vyústiť do zdravotných komplikácií v dospelosti [1]. Dysbiózou v podobe kolonizácie čreva patogénnymi baktériami, ako *Clostridioides* (predtým *Clostridium*) *difficile* (*Clostridium Difficile* Infection - CDI) prípadne vyústiť až do autoimunitných zápalových ochorení gastrointestinálneho traktu (*Inflammatory Bowel Disease* - IBD), z ktorých najrozšírenejšie sú Crohnova choroba (*Crohn's Disease* - CD) a ulcerózna kolitída (*Ulcerative Colitis* - UC), ktorým sa budem bližšie venovať nižšie. V terapií týchto ochorení bolo využité široké spektrum liečiv a terapeutických prípravkov, z ktorých miesto obsadila aj fekálna mikrobiálna transplantácia a využitie probiotík so zámerom rekolonizácie intestinálneho systému a navrátenia homeostázy [2]. Priama súvislosť bola dokázaná medzi zdravou mikroflórou oproti človeku trpiacemu IBD a neprítomnosťou zástupcov probiotických baktérií ako napríklad *Faecalibacterium prausnitzii* [3], *Anaerobutyricum halii* [4] a *Blautia obeum* [5].

2. Cieľ diplomovej práce

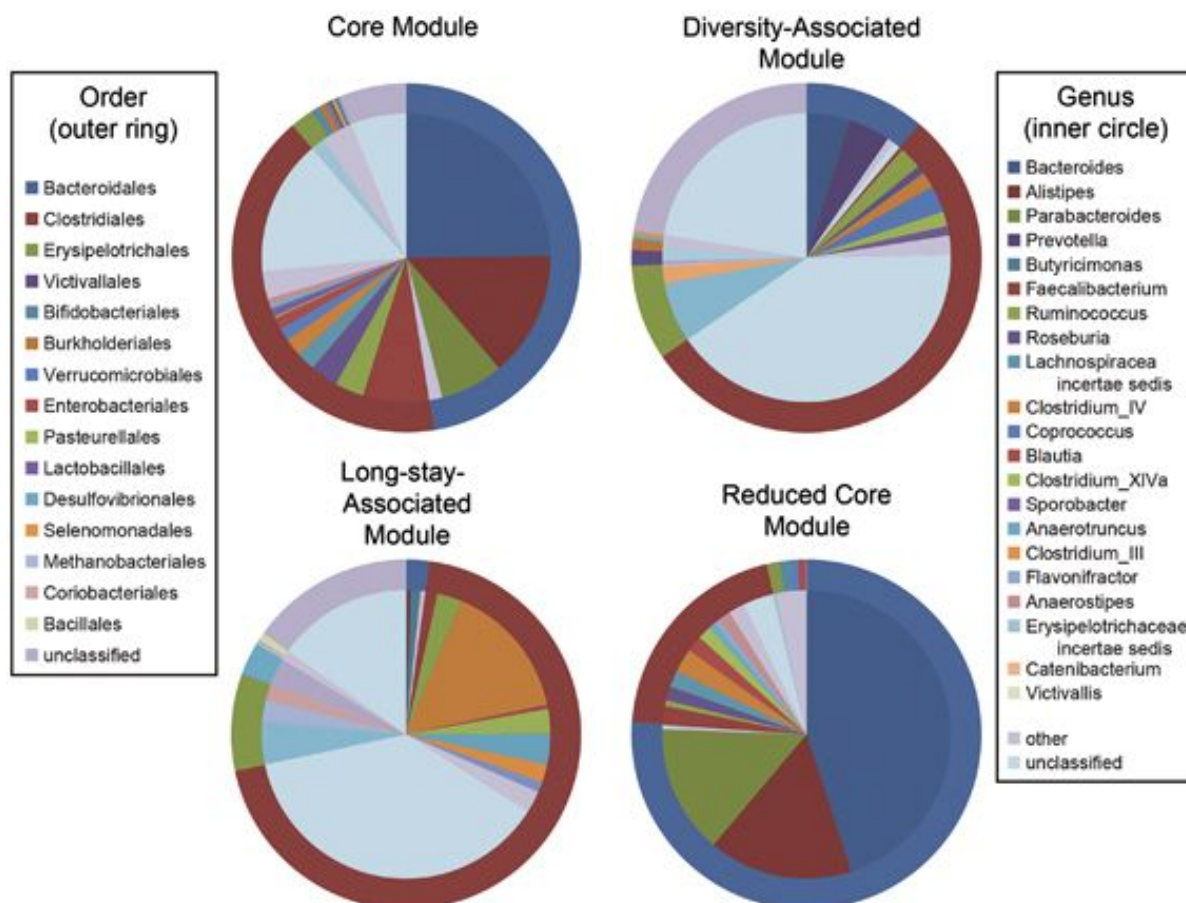
V mojej diplomovej práci sa venoval pozorovaniu troch baktériálnych kmeňov: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia obeum* a *Anaerobutyricum halii*. Zameral som sa na kultivačné vlastnosti v tekutých a agarových médiách, ďalej na ich životaschopnosť v rôznych protektívnych médiách a podmienkach uchovávania. Hlavným cieľom môjho skúmania bolo porovnať kryoprotekčné vlastnosti médií a podmienky uchovávania kultúr, aby bola zabezpečená ich viabilita počas zmrazenia a následného uchovávania.

3. Teoretická časť

3.1. Mikrobióm zdravého človeka

Ľudský mikrobióm bol zmapovaný pod záštitou projektu Human Microbiome Project (HMP), ktorý identifikoval bakteriálne subtypy vyskytujúce sa u širokej vzorky obyvateľstva. Výsledky sekvenovania mikrobiálnych genotypov ukázali, že z 10-100 biliónov baktérií nachádzajúcich sa v gastrointestinálnom trakte sú najhojnejšími druhmi práve kmene Firmicutes a Bacteroidetes [6]. Firmicutes v črevnom zastúpení s najväčším výskytom v Európskej a Americkej vzorke obyvateľstva zastupoval z 95%. Rad Clostridiales, ktorý zahŕňa potrebné, baktérie produkujúce mastné kyseliny s krátkym reťazcom hlavne producentov butyrátu. Potom sú tu pomenej zastúpené *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (napr. *E.coli*) [7].

Prestížny vedecký časopis Nature publikoval v roku 2016 článok z univerzity Cork, kde mapovali črevný mikrobióm na základe vzoriek faeces rôznych skupín obyvateľstva. Vyhodnotili 732 vzoriek z 371 geriatrických subjektov. *Obrázok 1* ukazuje zastúpenie mikrobiot po sekvenovaní vzoriek v operačných taxonomických jednotkách (OTUs, s 97% podobnosťou sekvencie jednotky). Prvý diagram znázorňuje „jadro“ (Core Module), ktoré bolo prítomné u majoritného počtu sledovaných pacientov. Diversity-Associated Module znázorňuje zloženie mikrobiómu pri diete s vysokým obsahom vlákniny. Long-stay Associated Module sa vyskytoval hlavne u pacientov s rezidenčnou starostlivosťou, teda kontrolovanou, ale zle vyváženou diétou bohatou na nasýtené mastné kyseliny, cukor, nízky príjem rastlinných produktov, teda aj vlákniny a časté terapie antibiotikami. Posledný Reduced Core Module má indikovať zníženú diverzitu mikroorganizmov, teda majoritu Bacteroides [8].



Obrázok 1: Zastúpenie mikrobiot osídľujúcich ľudské črevo [8].

3.2. Mikrobióm chorého človeka

Pri chorobných stavoch sa mikrobióm môže meniť v závislosti na diéte, použitej farmakoterapii, ktorá môže pozostávať z niekoľkých fáz liečby antibiotikami (pri dokázanej rezistencii až rezervnými širokospektrálnymi antibiotikami) s následným oslabením črevnej mikroflóry natoľko, že sa ľahko kolonizuje rôznymi patogénnymi druhmi baktérií, ako *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter concisus* prípadne aj vírusmi (cytomegalovírus, vírus Epstein-Barr a ešte zriedkavejšie vírusom osýpok) [9].

3.3. *Clostridium difficile*

Clostridium difficile je gram pozitívna spóry tvoriaca tyčinka. V bežnej mikroflóre zdravého človeka sa vyskytuje do 5% (tieto počty zvyknú byť o niečo vyššie u detí). Tento anaerób je prirodzene rezistentný voči rôznym druhom antibiotík napr. cefoxitínu (ten sa využíva ako selektívna zložka do médií k izolácií týchto baktérií) alebo klindamycínu, prípadne beta-laktámových antibiotík, penicilínových, ale aj cefalosporínových [10]. Keďže tieto antibiotiká sú užívané v terapii bežných respiračných bakteriálnych ochorení a často až zneužívané, pri znížení počtu komenzálnych baktérií spóry *C. difficile* pretrvávajú a úspešne zaplnia životný priestor vytvorený v črevnom mikrobióme.

Základom ich patogénneho pôsobenia sú 2 typy toxínov, ktoré *C. difficile* vylučuje a to enterotoxín (Toxín A), ktorý znižuje imunitnú odpoveď organizmu a poškodzuje črevný epitel a cytotoxín (Toxín B), ktorý má nekrotizujúce a ulcerogénne pôsobenie na bunky črevného epitelu. Týmto nežiadúcim pôsobením je *C. difficile* a vyššie menované patogény zodpovedné za zápalové ochorenia gastrointestinálneho traktu (IBD) [11].

3.4. IBS a IBD

3.4.1. Syndróm dráždivého čreva

Irritable Bowel Syndrom (IBS) je chronické ochorenie združujúce symptómy ako bolesti v nižšom abdomene, nafukovanie s pridruženými infekciami čreva. Subtypy sa dajú rozdeliť na IBS prejavujúce sa diarhoeou, opačne zápchou alebo zmiešané. Hlavným rozdielom medzi IBD a IBS je, že IBS nevyvoláva zápal ani povrchový, ani intramurálny. Pacienti teda netrpia haemodiarhoeou, ulceráciami a nižšie spomenutými komplikáciami ako to býva u IBD [12]. Tým sa znejasňuje etiológia tohto ochorenia, ktorá ale preukázateľne súvisí so stresom, keďže najväčší počet exacerbácií syndrómu dráždivého čreva zažívajú pacienti vystavení v dohľadnej dobe vyššej psychickej alebo fyzickej záťaži a dysbiózou, ktorú popísal Rajilić-Stojanović et al. S použitím qPCR a fylogenetických microarrays prišiel na významný rozdiel v zastúpení črevných baktérií u pacientov trpiacich IBS v porovnaní so zdravou vzorkou obyvateľstva. Výsledky poukázali na dvojnásobne zvýšený pomer Firmicutes k Bacteroidetes [13]. Ďalší zdroj rovnakou metódou dokazuje naopak 12-krát vyššie hodnoty niektorých zástupcov Bacteroidetes.

Naopak zdravá vzorka mala oproti chorej 35-krát zvýšených zástupcov rôznych probiotických klostrídií [14].

3.4.2. Zápalové ochorenie čreva

Zápalové ochorenie čreva (Inflammatory Bowel Disease – IBD) je zhrnuté pomenovanie pre idiopatické zápalové ochorenia zväčša hrubého a tenkého čreva, teda nižšieho GIT-u. Genetické faktory sú pre rozvoj kľúčové rovnako ako epigenetické. Výskyt idiopatických črevných zápalov sa koncentruje hlavne vo vyspelých krajinách, ako sú Európa a Severná Amerika, kde sú hygienické nároky posunuté miestami až príliš vysoko na úkor kontaktu so širokou škálou bakteriálnych a parazitárnych antigénov.

Hypotéza známa pod názvom “Old friends hypothesis” hovorí o tom, že bunky črevného systému majú receptory aktivovateľné rôznymi kolonizátormi čreva od červov, ktoré boli pre deti v minulosti bežným ochorením, po laktobacily a butyrát produkujúce druhy baktérii. Črevný epitel spolu s imunitným systémom sa týmto „starým priateľom“ symbioticky sprevádzajúcich tráviacu sústavu tisícky rokov prispôbil a vybudoval si receptory reagujúce priamo na dané typy baktérií za následkom oslabenia imunitnej reakcie, ktorá nie je nutná. Zvyšovaním hygieny ochudobnená mikroflóra hrubého čreva nie je schopná obsadiť špecifickými antigénmi receptory na dendritických bunkách, ktoré by pomohli pri ich maturácii. Imunitná reaktivita sa zvyšuje. Nerozvinuté dendritické bunky reagujú senzitívnejšie tiež na alergény v potrave a ovplyvňujú kaskádu, ktorá vedie k nepomerom Th1 a Th2 lymfocytov, tj. zvýšeniu mediátorov zápalu TNF-alfa, IL-2, 6 a iných. Dôsledkom je precitlivosť a autoimunitne vyvolaný zápal.

Vo väčšine prípadov je tento zápal indukovaný drastickým oslabením črevnej mikroflóry spôsobeným silnou antibiotickou liečbou alebo zlou intervenciou dojčiacich matiek o správnom užívaní antibiotík, zlým životným štýlom (nepravidelná strava, stres...) ale aj inými autoimunitnými prejavmi (silná alergická reakcia). V čase zníženia kritických populačných skupín baktérií, ako sú butyrát produkujúce baktérie, môže začať dominovať im podobné a vyššie spomínané *C. difficile*. Dôsledkom sú intramurálne zápaly črevnej steny alebo iných častí GIT-u [15].

3.4.3. Ulcerózna kolitída

Ulcerózna kolitída (Ulcerative Colitis – UC) je ochorenie postihujúce dolný GIT . Všeobecne sa na vzniku ochorenia môže podieľať viacero faktorov, ako genetická predispozícia, zmena v mikrobiálnej flóre čreva, zvýšená imunitná odpoveď alebo faktory prostredia. Tieto faktory sa zdajú byť etiologicky vzdialené, ale zmenou z vonka (environmentálny faktor) alebo vnútra (genetický faktor) spôsobí narušenie homeostázy imunitného systému a črevnej mikroflóry. Boli zistené znížené množstvá *F. praustnitzii* a *R. hominis* u pacientov s diagnostikovanou UC v porovnaní so zdravými ľuďmi [16].

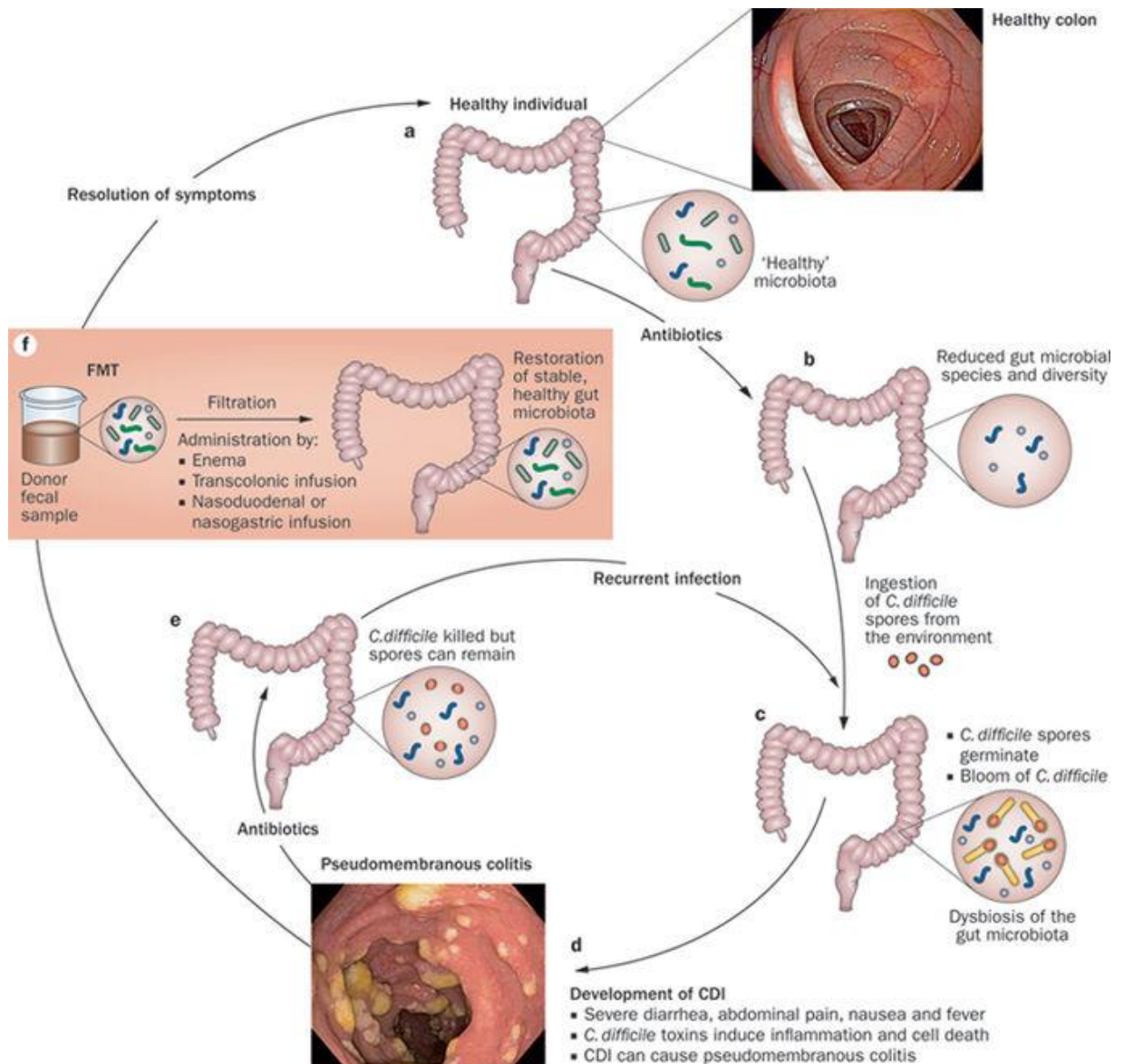
Lokalizovaná zo začiatku v okolí rekta zápalová reakcia môže pokračovať buď v segmentoch alebo zriedkavejšie prestúpiť celý kolón. Zasahuje do mukózy a submukózy s ohraničenou zónou zdravého a postihnutého tkaniva. Napadnutá časť čreva môže trpieť ulceráciou, neskôr premenou na fragilnejšie fibrotizované tkanivo so sklonom ku krvácaniu. Vredy často produkujú hnisavý exudát. Vo vážnejších, ale zriedkavejších prípadoch môže zápal alebo transmuralná ulcerácia prestúpiť až do muskulárnej vrstvy, ktorá v časovom intervale hodín až dní začne strácať tonus, dilatuje a prechádza do toxického megakolónu. Fistuly ani abscesy sa nevyskytujú. Ochorenie má bolestivé prejavy spojené s častou nutkavou haemodiarhoeou s prímiesou hnisu, následnou drastickou stratou hmotnosti a častými exacerbáciami.

3.4.4. Crohnová choroba

Crohnová choroba (Crohn Disease – CD) je ochorenie postihujúce ileum (ileitis, 35% prípadov), ileum a segmenty zväčša pravej časti kolónu (ileocolitis, 45% prípadov), distálnu časť hrubého čreva a konečník (granulomatózna kolitída, 20% prípadov), ale vyskytovať sa môže v celom gastrointestinálnom trakte (tj. od ústnej dutiny až po konečník).

Je kategorizovaná do troch štádií: (1.) Primárny zápal, ktorý trvá niekoľko rokov a následne prechádza do (2.) primárnej obštrukcie alebo stenózy, či (3.) primárnej penetrácie alebo fistulácie. Od tuberkulózy dolného GIT ju odlišuje typ zápalu, ktorý je transmuralný s výskytom sarkoidózných granulómov, ktoré sa okrem črevnej mukózy objavujú aj v lymfatických uzloch, pečeni peritoneu. Okrem nich môžeme pozorovať často sa vyskytujúce abscesy a fistuly väčšinou penetrujúce do priľahlých miest, slučiek čreva, močový mechúr, peritoneum a iné tkanivá. Nezávisle na vnútročrevnom zápale sa v 25% až 33% prípadov vyskytujú perianálne fistuly a abscesy [17].

Rovnako ako u všetkých IBD aj pri CD významnú rolu hrá dysbióza črevnej mikroflóry, resp. je v čreve výrazne znížená diverzita a naopak od UC výskyt zväčša pozitívne pôsobiaceho *F. praustnitzii* je zvýšený [18], čo poukazuje na nutnosť rovnováhy zástupcov aj benefičiálnych kmeňov. Dysbióza a fibrotizácia tkanív majú za následok znížené vstrebávanie živín viditeľné v malabsorpcii vit D a B12. Z dlhodobého hľadiska predstavuje CD zvýšené riziko vzniku kolorektálneho karcinómu rovnako ako ulcerózna kolitída [17].



Obrázok 2: Schéma vzniku IBD zapríčinenej dybiózou v GIT a porovnanie klasickej terapie antibiotikami (e) a aplikácie FMT (f) [19].

3.5. Diagnostika IBD

Medzi príznaky privádzajúce pacienta na podrobnejšie vyšetrenie patria nutkavá diarhoea, haemodiaroea, kožné problémy a v neposlednom rade, rapídny úbytok hmotnosti.

Na diagnostiku IBD ochorení sa v dnešnej dobe používajú enteroskopia alebo kapsulová enteroskopia, Báriový RTG snímok čreva, CT dutiny brušnej aj MR. V rámci diagnostiky sa pozorujú hlavne zápalové markery a komplexné symptómy, ale odoberajú sa aj vzorky na biopsiu, pacient sa testuje na prítomnosť *C. difficile* toxínov v stolici. Lekári sa tiež zaoberajú predošlou medikáciou pacienta a to: terapia antibiotikami, vysadenie imunosupresív, vysadenie perorálnych kontraceptív (kontraceptívami indukovaná kolitída spôsobená hormonálnou dysbalanciou) [17].

3.6. Liečba IBD

Liečba sa opiera o konkrétne štádium choroby a jej aktivite. Za primárny cieľ sa pokladá dosiahnutie a udržanie remisie. Pokračuje sa hojením poškodených slizníc, zlepšením nutriécie a zvyšovaním kvality života. Liečebný postup sa opiera o „Step-up“ princíp, pri ktorom sa začína bezpečnými liečivami pre mierne štádia IBD a postupuje sa k silnejším, účinnejším, ale taktiež toxickejšim liečivám s väčším množstvom nežiadúcich účinkov [15].

3.6.1. Aminosalicyláty

Aminosalicyláty sú liekom prvej voľby ochorení terminálneho ilea a distálnejších partií intestinálneho systému. Lieky vyvinuté k liečbe reumatoidnej artritídy sú deriváty kyseliny salicylovej s pridanou aminoskupinou (kys. 5-aminosalicylová). Táto molekula býva podávaná vo forme sulfasalazínu, olsalazínu alebo mesalazínu. Sulfasalazin je hojne využívaný, keďže jeho účinok zužuje na hrubé črevo, kde je bakteriálnymi enzýmami rozkladaný na aktívnu 5-ASA. S rovnakým mechanizmom účinku ako iné salicyláty prichádzajú aj nežiadúce účinky a interakcie s inými liečivami tým, že zvyšujú antitrombotický účinok antikoagulancií a tým krvácanosť. Sulfapyridínová zložka zvyšuje náchylnosť ku kožným alergickým prejavom [15].

3.6.2. Antibiotické chemoterapeutika

Antibiotická liečba sa používa za účelom zníženia zápalu pri hnisavých perianálnych komplikáciách a infekcie spôsobenej *C. difficile*. Zo zástupcov sa hojne využíva ciprofloxacín, metronidazol, klaritromycín, rifaximin alebo kotrimoxazol [15].

3.6.3. Glukokortikoidy

Glukokortikoidy, prevažne budesonid, sa používa na terapiu IBD prevažne lokalizovanú v terminálnych častiach hrubého čreva a rekte. Registrovanými prípravkami sú klyzmy alebo rektálne peny, ale zriedkavejšie sa využívajú čípky s obsahom budesonidu pripravované *magistraliter* a taktiež sa využívajú tobolky a granuláty s využitím polyakrylátu. Tobolka tak vydrží transport do distálneho ilea alebo tračníku, prípadne systémová terapia. Nežiaduce účinky v podobe dyspepsií, nausea, vomitus, diarrhoea sa objavujú po zahájení pulznej terapie. Medzi nežiaduce účinky dlhodobej terapie patrí neslávne známy Cushingov syndróm a menej časté zmeny nálad a nespavosť, hypokalémia [15].

3.6.4. Liečivá ovplyvňujúce imunitnú odpoveď

Imunosupresíva sa začali v liečbe IBD používať v pred necelými tridsiatimi rokmi. Medzi ich zástupcov zaradujeme thiopuríny (azathioprim, 6-merkaptopurín), metotrexát a kalcineuritové inhibítory (tarkolimus, cyklosporín A). Nasadzujú sa pri ťažších prípadoch IBD ako záchranná liečba po glukokortikoidoch, ktoré sa môžu vylúčiť s úspešnosťou remisie u 60% pacientov. Negatívom ostáva fakt, že imunitná odpoveď je potlačená centrálna a znížená proliferácia buniek je spojená s hepatotoxicitou, znížením plodnosti atd.

Biologická liečba je nákladná, ale účinná, keďže sa cieľi na mediátory zápalových procesov, ako sú receptory pre interleukíny a TNF-alfa. Molekulárne protilátky špecificky blokujú cytokíny (adalimumab, golimumab, infliximab) a receptory pre vnútrobunkové zápalové kaskády (ustekinumab) na ich aktívnych miestach. Samozrejme ide o symptomatickú liečbu, ktorá vedie k remisii, keďže sa utlmí imunitná odpoveď. Nevýhodou ostáva oslabenie imunitných reakcií systémovo, rovnako ako u predošlej skupiny liečiv, z čoho vyplývajú aj nežiaduce účinky, ako infekčné komplikácie (najčastejšie oportúnne infekcie) alebo prípadná reaktivácia latentných štádií vírusových a bakteriálnych ochorení (vírus hepatitídy typ B, tuberkulóza). Zvyšuje sa aj

riziko maligného bujnenia. Každopádne tento typ liečby dosahuje dobrých výsledkov, ktoré zatieňujú potencionálne riziká nežiadúcich účinkov. Z ekonomického hľadiska je však biologická liečba nákladná a podľa protokolov zdravotných poisťovní v SR a ČR ostáva poslednou možnosťou, v prípade, že ostatné druhy liečby zlyhajú [15].

3.7. Fekálna mikrobiálna transplantácia

3.7.1. História fekálnej mikrobiálnej transplantácie

Prvá zmienka o fekálnej mikrobiálnej transplantácii (FMT) sa objavuje v Číne začiatkom 4. storočia ako súčasť tradičnej čínskej medicíny vo forme „žltej polievky“ resp. „zlatého sirupu“, ktorá bola podávaná ľuďom trpiacim dlhodobou diarhoeou alebo pri otrave jedlom.

V 16. storočí nachádzame pramene o tradičnej medicíne u beduínov, ktorí podávali ťaví trus ako liek pri bakteriálnej nerovnováhe. Taktiež taliansky chirurg Acquapedente začal praktikovať fekálnu transplantáciu vo veterine z chorého zvierat'a do zdravého koncom 16. storočia. Na prelome 17. storočia popísal nemecký doktor terapeutický potenciál ľudských exkrementov. Nesmieme vynechať ruského zoológa Mechnikova, ktorý v 19. storočí inšpirovaný bulharskými farmármi popísal priaznivý vplyv fermentovaných produktov obsiahnutých v jeho diéte s hypotézou opisujúcou ovplyvnenie rovnováhy črevných mikroorganizmov pomocou zvýšenia počtu laktogénnych baktérií (stále pod názvom *Lactobacillus bulgaricus*). Metchnikovove baktérie zožali úspech na pôde vedy aj v praktickom použití a boli obchodované a rozširované.

Rakúsky pediater Theodor Escherich popísal v roku 1885 *Bacterium coli*, ktoré nemecký praktik Alfred Nissle izoloval a z pozorovaní pripisoval protektívny účinok voči infekciám zástupcami rodu *Shigella*. Tá spôsobuje pri premnožení časté gastroenteritídy a neskôr nachádzame spojitost' s chronickým zápalovými ochoreniami.

Počas druhej svetovej vojny bol v Afrike nemeckými doktormi popisovaný ťažký priebeh dyzentérie nemeckých vojakov na rozdiel od domácich preventívne pojedajúcich čerstvý ťaví trus. Po analýze bola izolovaná kultúra *Bacillus subtilis* a pri následnom podaní vojakom izolovanej kultúry sa zdravotný stav vojakov zlepšil [19].

Koncom 20. storočia a zistenia, že patogenéza autoimunitných a zápalových ochorení, rovnako ako diabetes a niektoré formy rakoviny, sú úzko späté s kompozičnými zmenami v

mikrobióme, narástla popularita experimentovania s obohacovaním čreva o prospešné baktérie a o transplantáciu črevných mikróbov.

Úspešnosť liečby imunitou indukovaných ochorení čreva metódou FMT osciluje okolo 55%, u ktorých zaznamenávame klinickú pozitívnu odpoveď a u 24% pacientov bola dosiahnutá remisia. Tieto výsledky sa zlepšili, keď boli pred procesom FMT použité antibiotiká z 55% na 67% a u 32% pacientov bola zaznamenaná remisia [21].

3.7.2. Procedúra FMT

Oboznámením pacientom sa aplikuje perorálne vankomycín (125mg; 4 krát denne), následne sa podávanie vankomycínu ukončí 12 hodín pred zákrokom. Pacientom sa následne podá inhibítor vodíkovej pumpy, ktorého pričinením sa elevuje pH v tráviacej trubici.

Zdraví darcovia stolice prejdú krvnými testami, testom na syfilis a enteropatogény. Zozbieraná stolica sa následne nariedi fyziologickým roztokom a rozmixuje. Výsledná hmota sa môže sfiltrovať a následne aplikovať nasogastrickou sondou v niektorých prípadoch kolonoskopom. Sonda je odstránená bezprostredne po ukončení výkonu. Pacient je hospitalizovaný noc po výkone a na druhý deň prepustený domov [22].

3.7.3. Negatíva FMT

Zárok nie je príjemný a pacienti ho zväčša odmietajú z etických dôvodov. Zárok je invazívny a fekáliami môžu byť kontaminované aj iné časti GIT pri iatrogennej perforácii čreva. Keďže zo stolice nikdy nevieme presne určiť momentálne zloženie mikrobiot, FMT sa nedoporučuje ľuďom so zníženou vlastnou imunitou, ktorá je bežne znížená behom liečby IBD ochorení. Sú hlásené prípady, v ktorých sa stav pacientov ešte skomplikoval infekciou spôsobenou transplantom obsahujúcim Norovirus, ktorý sa prejavil silnou diarhoeou už druhý deň po FMT, len u pacienta. Darca bol testovaný na prítomnosť Norovíru, kde bol výsledok negatívny a darca bol asymptomatický. Boli hlásené bakteriémie spôsobené infekcie *E. coli* a tiež, prípad pacienta nakazeného *Serratia sp.* Infekt trval 12 dní, pričom do 30 dní od procedúry pacient zomrel na VAP (pneumóniu spojenú s umelou pľúcnou ventiláciou). Ďalej boli hlásené prípady vysokých horúčiek, ktoré sú na druhú stranu pri transplantáciach bežne očakávané. Exacerbrácia IBD bola zaznamenaná v 6 prípadoch, z toho 4 ľudí bolo potrebné hospitalizovať po dobu 12 týždňov. Tri ďalšie smrteľné prípady boli iatrogénne zavinené počas FMT, kde sa uvádza jeden prípad

penetrácie črevnej steny sondou, čo vo výsledku vyústilo do septického šoku s neskorším vývinom dekompenzovaného toxického megakolónu. Ostatné 2 prípady úmrtí mali pôvod v aspirácii fekálneho materiálu počas transplantácie, ktoré vyústili do aspiračnej pneumónie a septického šoku [23].

3.8. Nové metódy v liečení IBD

Poznatok, že fekálna transplantácia funguje, je lacnejšie uskutočniteľná a stabilizuje zápalové črevné ochorenia na autoimunitnom základe, je kľúčový pre postup touto cestou. Stále však ostáva veľké množstvo nevýhod a komplikácií, ktoré sa musia zmierniť alebo odstrániť pre menej invazívne a prínosnejšie naočkovanie čreva novou mikrobiotou.

Zjednodušenie prevedenia fekálnej mikrobiálnej transplantácie a zníženie počtu možných komplikácií je možné vpravením kontrolovaných bakteriálnych kultúr do čreva. Čistá kultúra jedného bakteriálneho druhu, o ktorej vieme, že je terapeuticky prínosná s garantovaným počtom baktérií v danej liekovej forme, či neskôr v liečivom prípravku, neohrozí zdravie imunosuprimovaného pacienta skrytými kontaminantmi na rozdiel od fekálnej transplantácie. Baktérie potrebujeme namnožiť do vysokých počtov a preniesť do média, ktoré svojim kryoprotektívnym účinkom ochráni kultúru počas skladovania v nízkych teplotách a zabezpečí vhodné podmienky pre udržanie životaschopnosti baktérií aj po rozmrazení.

3.9. Kryoprezervácia

Pre zachovanie bakteriálnej kultúry počas zamrazenia je kritických viacero faktorov, ako:

- 1) Stupeň a doba zmrazenia a spôsob rozmrazenia.
- 2) Kompozícia kryoprotektívneho média.
- 3) Typ a koncentrácia kryoprotektantu.
- 4) Morfológia bunkovej steny a špeciálne podmienky daného druhu baktérie.
- 5) Koncentrácia a druh antioxidantu a prítomnosť kyslíka počas zamrazenia.
- 6) Stav kultúry a jej fyziologická vitalita pred a počas zmrazenia.

Pri zmrazovaní vzoriek faeces je postup jednoduchší, keďže prítomnosť matrix a mucínu v stolici pôsobí kryoprotektívne. Čisté bakteriálne kultúry sa zamrazujú zväčša pozvoľne s ohľadom na charakteristiku a morfologické vlastnosti danej kultúry.

Zmrazovanie následne prebieha pozvoľne do teploty -100°C alebo pulzne použitím tekutého dusíka do teploty $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$, kde na druhej strane musí byť pridané na kryoprotektívnej látke pre zachovanie bunkových štruktúr bez ujmy. Viacero autorov sa zmienilo o aranžovaní teploty pod -80°C , pri ktorej sa preruší kaskáda metabolických procesov a voda prestáva rekryštalizovať a viac nenaruša štruktúry bakteriálnych buniek.

Kryoprezervačné látky vieme rozdeliť do dvoch druhov:

- 1) Kryoprotektíva penetrujúce bunkovú stenu, medzi ktoré patrí glycerol a DMSO (dimethylsulfoxid). Sú často používané v rozmedzí koncentrácií 5-15%. Svojou štruktúrou znemožňujú tvorbu kryštálov vody.
- 2) Kryoprotektíva nepenetrujúce bunkovú stenu radíme molekuly s vyššími molárnymi hmotnosťami, sacharidy ako sacharózu, trehalózu, inulín ďalej polyetylénglykol, levan, želatínu, mucín.

Ďalej sa do médií pridávajú antioxidanty ako cysteín a riboflavín pre zníženie oxidačného stresu počas resuscitácie bakteriálnej kultúry po rozmrazení [24].

3.10. Bakteriálne kultúry

3.10.1. *Blautia obeum*

Blautia obeum, reklasifikovaný *Ruminococcus obeum*, je taktiež gram-pozitívnou baktériou z radu Clostridiales a čeľade Lachnospiraceae [25]. Do tejto rodiny sa nachádzajú baktérie metabolizujúce polysacharidy a oligosacharidy na mastné kyseliny s krátkym reťazcom, ktoré, ako bolo už spomenuté, premieňajú na mastné kyseliny s krátkym reťazcom. Nachádza sa v stolici novorodencov už 24 hodín po pôrode a na rozdiel od druhu *Lactobacillus*, ktorý tam nachádzame vo veľkom zastúpení. Na rozdiel od laktobacilov, *B. obeum* v čreve zastáva miesto aj po ukončení kojenia, kedy je početnosť laktobacilov značne redukovaná [27, 28].

Po metabolickej stránke *B. obeum* prispieva ľudskému organizmu produkciou mastných kyselín s krátkym reťazcom (propionátu, butyrátu a iných). V neposlednom rade produkuje lantibiotické látky.

Lantibiotiká sú malé amfifilné polycyklické molekuly peptidov obsahujúce thio-ether-aminokyselinu lantionin alebo metyllantionin, aminomaslovú kyselinu a dehydroalanin. Sú produkované gram-pozitívnymi baktériami a vplyvajú baktericídne na iné gram-pozitívne druhy. Lantibiotické molekuly rozdeľujeme do 2 kategórií podľa mechanizmu účinku na baktérie.

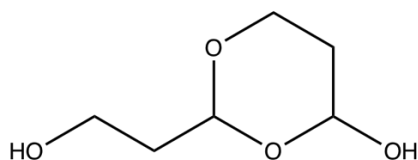
Kategória A, ktorá vytvára póry v bakteriálnych bunkách a kategória B, ktorá inhibuje syntézu peptidoglykanov v bunkovej stene.

B. obeum je významný producent nišínu A, ktorý napáda bunkovú stenu niektorých patogénnych druhov z radu Clostridiales (*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*), ďalej *Lactococcus lactis* a dokonca aj vlastnú *B. obeum*. Vzhľadom na senzitivitu baktérie na jej vlastný baktericín sa v súčasnej dobe skúma *quorum sensing* v kolóniách *B. obeum*, ktoré zvyšuje ich viabilitu [5].

3.10.2. *Anaerobutyricum hallii*

Eubacterium hallii, zástupca rodiny Eubacteriaceae (preradené do rodiny Lachnospiraceae) alebo novo reklasifikované *Anaerobutyricum hallii*, je striktne anaeróbna gram pozitívna tyčinka s tuhú bunkovou stenou [25]. Rovnako ako iní zástupcovia Firmicutes, aj táto baktéria sa bežne nachádza v ľudskom tráviacom systéme. Jej prínos pre ľudský organizmus spočíva v premene glycerol na 3-hydroxypropionaldehyd alebo reuterín. Kľúčovým enzýmom k tejto syntéze je glycerol/diol dehydratáza. Reuterín, prvýkrát vyizolovaný z *Lactobacillus reuteri*, je pojem pre dynamickú zmes molekúl 3-HPA, jeho diméru, hydrátu a akroleínu. Je rozpustný vo vode s toxickými vlastnosťami pre patogénne druhy gram pozitívne aj gram negatívne, taktiež pre plesne a kvasinky [28, 29].

A. hallii je producentom mastných kyselín s krátkym reťazcom a vďaka adaptívnemu metabolizmu dokáže meniť zdroj uhlíka podľa dostupných živín. Utilizáciou glycerolu produkuje propanol, propanal a vyššie spomínaný propionát. Zaujímavým faktom je, že počas IBD ochorení je produkcia metabolitov odvodených od trojuhlíkatých alkoholov zvýšená, teda aj produkcia reuterínu [28].



Obrázok 3: Chemická štruktúra diméru 3-hydroxypropionaldehydu formujúceho reuterín.

Rovnako ako spracúvať dokáže tiež produkovať laktát, ale predovšetkým butyrát z glukózy dokonca v ekvimolárnych množstvách. K syntéze kyseliny maslovej nepriamo prispievajú aj bifidobaktérie, ktoré sú schopné u prirodzene porodených detí začať metabolizovať mucín na hexózy a fukózy prakticky hneď po narodení, čím pripraví substrát *Anaerobutyricum hallii*, ktoré nie je schopné autonómne štiepiť oligo a polysacharidy. Pri nedostatku monosacharidov

syntetizuje butyrát z laktátu a acetátu. Vďaka týmto významným vlastnostiam dokáže osídliť GIT novorodenca hneď po laktobaciloch a bifidobaktériach [30, 31, 32].

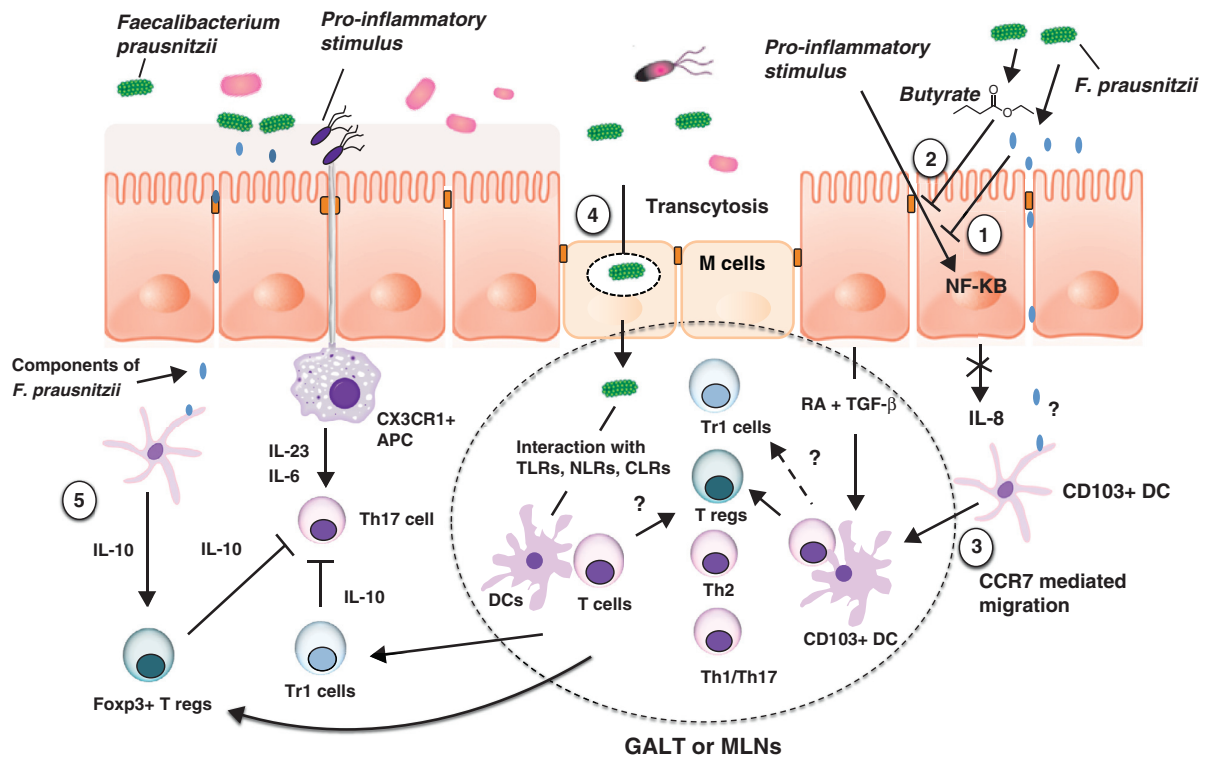
3.10.3. *Faecalibacterium prausnitzii*

Táto baktéria bola až do roku 1996 radená medzi Fusobacteria. Sekvenovanie odhalilo, že má bližšie k rodu Eubacteriales s (Skupina Clostridium IV) rodiny Oscillospiraceae, kam sa dnes radí[25]. Gram-pozitívna tyčinka je striktne anaeróbna a ťažko kultivovateľná aj v podmienkach bez kyslíka. Majoritným produktom jej metabolizmu glukózy je metanolát (formát), D-laktát a v menších množstvách (>10 mM in vitro) butyrát. Nachádza sa v gastrointestinálnom trakte (GIT) širokého počtu živočíšnych druhov, od cicavcov až po šváby.

U človeka je taktiež súčasťou komenzálnej bakteriálnej flóry čreva v zastúpení od 5-20% celkového počtu mikroorganizmov u jedincov so zdravým mikrobiómom. Vďaka vysokému percentu výskytu v ľudskom čreve sa *F. prausnitzii* stal najväčším producentom butyrátu z mikroflóry. Butyrát má priaznivé imunomodulačné účinky pozorovateľné znížením prozápalových mediátorov IL-6, IL-12 bez efektu na TNF- α a MCP-1 [3, 33]. Tieto efekty sú nezávislé na Toll like receptore spojenom s G-proteínom, ale priamou inhibíciou histón-deacetylázy butyrátom. Down-regulácia zápalových mediátorov ústi k zníženiu sensibility makrofágov pre črevné komenzálne baktérie. Tiež produkuje metabolity znižujúce sekréciu IL-8 a bolo identifikovaných 7 peptidov v bunkovom lyzáte *F. prausnitzii*, ktoré boli derivátmi Mikrobiálnej protizápalovej molekuly (Microbial anti-inflammatory molecule – MAM. Tieto proteíny v dĺžke 15 kDa interagujú s cDNA v črevných epiteliárnych bunkách za výsledku zníženia produkcie NF- κ B bunkou. Rovnaké pôsobenie bolo zaznamenané pri podaní *Lactococcus lactis* obsahujúcich plasmid nesúcich gén pre syntézu MAM molekuly myšiam trpiacich kolitídou indukovanou dinitrobenzénom a sulfónovou kyselinou (DNBS-induced colitis, používa sa na simulácie patogenézy IBD). Výsledkom bolo zlepšenie chorobných stavov u myší [33, 35].

Poznatok, že *Faecalibacterium prausnitzii* dokáže redukovať zápalové procesy v GIT je kľúčový pri procese vzniku IBD. Priama spojitosť bola nájdená medzi výskytom CD a UC pri nedostatočnej kolonizovanosti čreva *F. prausnitzii* (Konkrétne <1.10⁹ baktérií/ml spolu s normovým počtom leukocytov >30 leukocytov/10⁴ μ m²). Počas štúdií na zdravých aj chorých pacientoch, ktorých ostatné stravovacie návyky boli nahradené diétou s väčším podielom vlákniny, bol zaznamenaný nárast probiotických kultúr fekalobaktérií a bifidobaktérií, rovnako ako obsah SFCA v stolici aj u chorých pacientov [36, 37].

Taktiež terapia rifaximínom viedla k zvýšeniu početnosti bifidobaktérií a tiež *F. prausnitzii* v čreve, čo dopomáha k udržaniu stabilných stavov CD pacientov s nižším počtom remisíí. Chemoterapia a interferón alpha-2-b dokázali zvrátiť depléciu *F. prausnitzii* a dokonca terapie s vysokými dávkami kortizolu a taktiež infliximab dokázali kompletne obnoviť populáciu *Faecalibacterium prausnitzii* na $1,4 \cdot 10^{10}$ baktérií/ml. Značí to, že znížený výskyt baktérie nemusí byť nutne príčinou, ale prehĺbením začínajúceho IBD [38].



Obrázok 4: Schéma supresie imunitnej reakcie v čreve pôsobením *F. prausnitzii* [33].

4. Praktická časť

4.1. Materiál

4.1.1. Kultivačné média a riediace roztoky

Wilkins-Chalgren anaerobe agar (WCHA) (Oxoid, CM0619, UK)

Tabuľka 1: Zloženie sušeného základu WCHA agaru v g/l roztoku.

Tryptón	10,0
Peptón želatíny	10,0
Extrakt z kvasníc	5,0
Glukóza	1,0
Chlorid sodný	5,0
L-Arginín	1,0
Pyruvát sodný	1,0
Menadion	0,005
Hemín	0,005
Agar	10,0
pH 7,1 ± 0,2	

Príprava: Suspenduje sa 43 g pevnej WCHA zmesi v 1 litri destilovanej vody. Roztok sa privedie k varu a dohliadne sa, aby sa rozpustili všetky zložky. Následne sa sterilizuje v autokláve na 121°C po dobu 15 minút a nechá sa schladnúť na 50°C. WCHA bolo následne obohatené 5 mg/l hemínu; 1 mg/l cellobiosy; 0,5 g/l rozpustným škrobom; 1 mg/ml maltózy; 0,2 ml roztoku vitamínu K₁ (0,1 ml filtrom sterilizovaný vitamín K₁ v 20 ml 95% etanolu) a 0,5 mg/ml L-cysteínu. Dobre premiešame a rozlejeme do Petriho misiek.

Wilkins-Chalgren anaeróbny bujón (WCHB) (Oxoid, CM0643, UK)

Tabuľka 2: Zloženie sušeného základu WCHA bujónu (WCHB) v g/l roztoku.

Tryptón	10,0
Peptón želatíny	10,0
Extrakt z kvasníc	5,0
Glukóza	1,0
Chlorid sodný	5,0
L-Arginín	1,0
Pyruvát sodný	1,0
Menadion	0,005
Hemín	0,005
pH 7,1 ± 0,2	

Príprava: Suspenduje sa 33 g pevnej zmesi v 1 litri destilovanej vody a dobre sa premieša. Sterilizuje sa v autokláve na 121°C po dobu 15 minút.

Wilkins-Chalgren anaeróbny agar/bujón (WCHA/WCHB) obohatený o 30% vodný roztok bachorovej tekutiny

Bachorová tekutina

Už podľa názvu tento vnútorný sekret sa nachádza v bachore prežúvavcov, ktorý obsahuje amoniak, mastné kyseliny s dlhším reťazcom, prchavé mastné kyseliny kratších reťazcov (kys. octová, kys. propiónová, kys. maslová). Vďaka prebytku kyslých zložiek sa pH posúva ku kyslejšiemu a nadobúda hodnoty 6,2-6,8. Za fyziologických hodnôt je bachorová tekutina farbou olivovo zelená, slabo viskózna, špecificky zápachajúca a vykazuje redukčnú aktivitu. Vďaka týmto vlastnostiam je bachor optimálne prostredie pre mikroorganizmy. Anaeróbne baktérie a nálevníky vyskytujúci sa v bachorovej tekutine umožňujú dobytku tráviť vlákninu a zložitejšie sacharidy. Bachor je tiež centrom fermentačných procesov sprostredkovaných protozoami a baktériami. Nálevníky zodpovedajú 20% bachorového metabolizmu a bakteriálnemu pôsobeniu je počítaných 80%. Môže tu dochádzať k hydrolýze bielkovín ešte pred vstupom do dvanástniku [39].

Tabuľka 3: Fyziologické hodnoty bachorovej tekutiny [39].

Mastné kys. s krátkym reťazcom (SFCA)	80–120 mmol/l	
	Kys. octová	65%
	Kys. propiónová	25%
	Kys. maslová	10%
Kys. mliečna	<3,3 mmol/l	
Amoniak	6–17 mmol/l	
Nálevníci	2–4 .10 ⁵ /ml	

Príprava: Bachorová tekutina bola získavaná z kráv pomocou orálnej sondy, filtrovaná cez gázu, centrifugovaná na 8000 g po dobu 30 minút a sterilizovaná mikrofiltráciou pomocou 0,22 µm filtra. Alikvótna tekutina bola uschovávaná v teplote -20°C.

Brain heart infusion agar (BHI)

Je typ agaru obsahujúci infúziu získanú varením hovädzieho alebo bravčového mozgu a srdečnej svaloviny, ktoré sú bohaté na rôzne nutrienty. Práve z tohto dôvodu sa považuje za vysoko výživný a teda vhodný pre náročnejšie mikroorganizmy.

Tabuľka 4: Zloženie sušeného základu BHI agaru v g/l roztoku.

Infúzia z mozgu	12,5
Infúzia zo srdca	5,0
Peptón	10,0
Chlorid sodný	5,0
Glukóza	2,0
Hydrogenfosforečnan sodný	2,5
Agar	10,0
pH 7,4 ± 0,2	

Príprava: Suspenduje sa 52 gramov zmesi v 1 litri destilovanej vody. Roztok sa zahreje k varu v topnom hniezde, až do rozpustenia všetkých zložiek. Následne sa sterilizuje v autokláve

pri teplote 121°C po dobu 15 minút. Médium sa nechá schladnúť a temperuje sa na 50°C. Rozplní sa do Petriho misiek.

Brain heart infusion broth (BHI bujón)

Tabuľka 5: Zloženie sušeného základu BHI bujónu v g/l roztoku.

Infúzia z mozgu	12,5
Infúzia zo srdca	5,0
Peptón	10,0
Chlorid sodný	5,0
Glukóza	2,0
Hydrogenfosforečnan sodný	2,5
pH 7,4 ± 0,2	

Príprava: Suspenduje sa 42 g zmesi v 1 litri destilovanej vody. Roztok sa zahreje k varu v topnom hniezde, až do rozpustenia všetkých zložiek. Následne sa sterilizuje v autokláve pri teplote 121°C po dobu 15 minút. Nechá sa schladnúť.

LYHBHI médium

Tabuľka 6: Zloženie sušeného základu LYHBHI média v g/l roztoku.

Extrakt z kvasníc	2,5
Celobióza	0,5
Maltóza	0,5
Cysteín	0,125
Agar	8
BHI	52

Príprava: Suspenduje sa 52 g BHI média spolu s kvasnicovým extraktom, celobiózou, maltózou, cysteínom a agarom v 1 litri destilovanej vody. Roztok sa zahreje k varu a sterilizuje sa v autokláve pri teplote 121°C po dobu 15 minút. Nechá sa vychladnúť a temperuje sa na 45°C. Potom sa asepticky pridá 10 ml roztoku hemínu (50mg na 100ml) a 0,2 ml roztoku vitamínu K₁

(0,1 ml filtrom sterilizovaný vitamín K₁ v 20 ml 95% etanolu) premieša sa a rozlieva sa do Petriho misiek v laminárnom boxe.

Brucella agar pre anaeróby (Brucella Medium Base) (Oxoid, CM0169, UK)

Brucella agar je bežné kultivačné médium, ktoré podporuje rast selektívnejších mikroorganizmov. Kvasnicový extrakt zastupuje komplex B-vitamínov, peptóny sú bohatým zdrojom dusíka, glukóza ako zdroj energie. Hydrogénsiričitan sodný je redukčné činidlo nutné na zaistenie redukovaného prostredia v živnej pôde pre anaeróby, ako som už opisoval vyššie. Po obohatení hemínom a vit. K₁ má použitie ako selektívne médium na izoláciu rôznych druhov anaerobných baktérií [40].

Tabuľka 7: Zloženie sušeného základu Brucella agaru v g/l roztoku.

Peptón kaseínu	10,0
„Lab-Lemco“ extrakt z hov.mäsa	5,0
Glukóza	10,0
Chlorid sodný	5,0
Hydrogénsiričitan sodný	0,1
Agar	15,0
pH 7,5 ± 0,2	

Príprava: Suspenderuje sa 45 g Brucella Medium Base (CM0169, Oxoid) v 1000ml destilovanej vody. Pridajú sa 2 g Kvasnicového extraktu (Yeast extrakt, Oxoid). Zmes sa zahreje k varu vo vodnom kúpeli, kým sa rozpustia všetky zložky. Následne sa sterilizuje v autokláve po dobu 15 minút pri 121°C. Temperuje sa v kúpeli na teplote 45°C. Po vytemperovaní asepticky sa pridá 5% (50 ml) ovčej krvi (defibrinovanej), 10 ml roztoku hemínu (50mg na 100ml), 0,2 ml roztoku vitamínu K₁ (0,1 ml filtrom sterilizovaný vitamín K₁ v 20 ml 95% etanolu). Plní sa do sterilných Petriho misiek v laminárnom boxe.

PRAS (pre-reduced anaerobically sterilized)

Anaeróbne organizmy vyžadujú pre svoj rast atmosféru bez prítomnosti kyslíka. Pre veľký počet zástupcov anaeróbnych baktérií len bezkyslíkatá atmosféra nestačí a potrebujú taktiež redukované prostredie, v ktorom budú prosperovať. Môžeme mať prostredie s molekulami oxidovanými, teda bez valenčných elektrónov, v atmosfére bez prístupu kyslíka. V takomto prostredí sa striktným anaerómom nebude dariť. Avšak, keď zredukujeme molekuly aj v médiu, do ktorého ich prevedieme, budú životaschopné.

Pre-redukovaný riediaci roztok pre anaeroby (PRAS Dillution Blanks)

Tabuľka 8: Zloženie riediaceho roztoku PRAS

Síran horečnatý heptahydrát	0,1
Fosforečnan draselný	0,2
Chlorid draselný	0,2
Hydrogenfosforečnan sodný	1,15
Chlorid sodný	3,0
Thioglykolát sodný	1,0
L-cysteín	0,5
Destilovaná voda	1000,0
pH 7.5 ± 0.5	

Táto formulácia bola pripravená za účelom vytvorenia prostredia, ktoré je vhodné pre viabilitu majoritnej skupiny mikroorganizmov bez významného rastu kultúry. Roztoky na riedenie (Dilution Blanks) boli vytvorené za účelom udržať životné funkcie a náležitosti anaeróbnych organizmov. Médium je pripravené, rozplnené a balené za podmienok bez prístupu kyslíka, aby sa predišlo obsahu reaktívnych foriem kyslíka alebo oxidovaných látok v preparáte.

Médium pre uchovávanie zamrazených kultúr

1. Najprv sa pripraví sterilný roztok 20% glycerolu (Sigma) v deionizovanej vode.
2. Potom sa pridá krvná zložka bujónu, ovčia krv zbavená fibrínu.
3. Na prípravu média pre zamrazenie sa zmieša v rovnakom pomere roztok 20% glycerolu a krv do 15ml BD Falcon skúmavky.
4. Zmiešaný roztok glycerolu a krvi sa vloží do anaeróbnej komory s povoleným uzáverom, aby sa roztok zbavil kyslíka. Deoxigenovanú krv indikujeme prechodom zo sýtej červenej na tmavú bordovú (12 hodinový interval je ideálny).
5. Vyberie sa 4-5 izolovaných kolónií z Petriho misky s 24-48 hodinovým kultivátom na krvnom agare a použitím sterilnej kľučky (preferovaná je 24 hodín stará kultúra, z dôvodu väčšej viability buniek).
6. Pomocou sterilných jednorazových pipiet presunieme 2-5 kvapiek do sterilnej mikroskúmavky.
7. Mikroskúmavka sa následne uzavrie parafilmom a prenesie do mraziaceho boxu s teplotou -75°C .
8. Po 24 hodinovom zamrazení otestujeme jednu zo zmrazených vzoriek na čistotu využitím vhodného média.

Reinforced Clostridial Medium (RCM) (Oxoid, CM0149, UK)

Tabuľka 9: Zloženie sušeného základu v g/l roztoku.

Kvasnicový extrakt	13,0
Peptón	10,0
Glukóza	5,0
Rozpustný škrob	1,0
Chlorid sodný	5,0
Octan sodný	3,0
Cysteín hydrochlorid	0,5
Agar	0,5
pH $6,8 \pm 0,2$	

Príprava: Suspenduje sa 38 gramov média v 1 litri destilovanej vody. Voda sa privedie k varu a var sa udržuje do úplného rozpustenia. Následne sa médium sterilizuje v autokláve po dobu 15 minút pri teplote 121°C.

4.1.2. Bakteriálne kultúry

K overeniu postupov boli na prevedenie predpokusu dva izoláty striktne anaeróbnych baktérií z čreva kura domáceho, ktoré boli súčasťou laboratórnej zbierky Ústavu infekčných chorôb a mikrobiologie FVL VFU Brno, a to *Anaerobutyricum hallii* An3 a *Blautia producta* An81. Pre vlastný experiment boli získané lyofilizované kultúry zbierkových kmeňov z DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Leibnitz Institute, Nemecko, a to *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353; *Blautia obeum* DSM25238 a *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677. Vyššie uvedené kultúry boli po oživení následne uchovávané v multiplikátoch v 100 µl redukovanej ovčej krvi s 20% roztokom glycerolu v kryoskúmavkách (Nunc, Dánsko) pri -75°C [41].

4.1.3. Kryoprotektívne médiá a matrice

Vstupné zložky: inulín, sacharóza, trehalóza, L-cysteín, želatína, pektín, glycerol (Sigma, Česká republika)

Príprava: Pracovné roztoky cukrov a L-cysteínu boli rozpustené samostatne v 100 ml destilovanej vody a sterilizované filtráciou (membránovým filtrom 0,45 µm) a uchovávané v chladničke. Želatína a pektín boli rozpustené v destilovanej vode pomocou vodného kúpeľa pri teplote 80°C a následne sterilizované v autokláve po dobu 15 minút pri 121°C.

4.1.4. Matrice

PREDPOKUS

Matrica A – PRAS

Matrica B – PRAS s 5% inulínu (Sigma, ČR)

Matrica C – PRAS s 5% inulínu a 0,1% L-cysteínu (Sigma, ČR)

Matrica D – PRAS s 5% inulínu, 0,1% L-cysteínu (Sigma, ČR) a 5% želatíny

Matrica E – PRAS s 5% inulínu a 3% pektínu (Sigma, ČR)

HLAVNÝ POKUS

Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu

Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy

Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode

Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom

4.2. Použité prístroje

Anaeróbna komora Concept 400 (Baker Ruskinn, USA)



Obrázok 5: Box s udržovanou atmosférou 10% CO₂; 5% H₂ a 85% N₂, teplotou 37°C a regulovanou vlhkosťou.

Autokláv (CertoClav, Rakúsko)

Centrifúga

Densilameter

Laminárny box (Steril-Antares, Taliansko)

Mraziaci box -20°C (Liebherr, Nemecko)

Mraziaci box -75°C (Dairei, Dánsko)

Topné hniezdo

4.3. Pomôcky

Drigalskeho tyčinky 65-1010 (Biologix, Čína)
Inokulačné kľučky (Biologix, Čína)
Kryobox 50 miestny (Dispolab, ČR)
Kryoskúmavky 2 ml (Dispolab, ČR)
Mikroskumavky typ Eppendorf 1,5ml (Dispolab, ČR)
Mikrotitračné doštičky 96 jamkové (Dispolab, Česko)
Parafilm (Nesco, Japonsko)
Pasteurové pipety (Biologix, Čína)
Petriho misky 90x15 mm (Biologix, Čína)
Pipeta 100-200 μ l (Gilson, Francúzsko)
Pipeta krokovacia 5000 μ l (Eppendorf, Nemecko)
Pipetové špičky (Dispolab, Česko)
Skúmavky BD Falcon 15 ml
Skúmavky kultivačné so šrúbovacím uzáverom
Skúmavky typu Hungate 15 ml (Bellco Glass, USA)
Skúmavky Urin 10 ml (Dispolab, ČR)
Stojan na mikroskúmavky
Stojan na skúmavky

4.4. Metodika

4.4.1. Kultivačné vlastnosti zbierkových kultúr

Bakteriálne kultúry *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353, *Blautia obeum* DSM 25238 a *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 boli v anaeróbnom boxe vyočkované zo zmrazovacieho média na WCHA s bachorovou tekutinou a inkubované po dobu 24-48 hodín pri teplote 37°C. Následne boli subkultivované na zostavenie kultivačných médií (WCHA s a bez bachorovej tekutiny, BHI agar s bachorovou tekutinou a bez, Brucella agar, WCHB s a bez bachorovej tekutiny, BHI bujón). V priebehu inkubácie bol hodnotený rast na agarových pôdach základe pozorovateľnosti a veľkosti kolónií. V tekutých pôdach sa pozorovala intenzita zrážania a tvorba sedimentu.

4.4.2. Elektrónová mikroskopia zbierkových kultúr

Kultúru sme získali pomnožením v tekutom WCHB s bachorovou tekutinou približne v polovici logaritmickú fázu rastu. Fixovaná bola 1:1 (objemovo) zmiešaním suspenzie s rovnakým dielom 3% glutaraldehydu vo fosfátovom pufrí a nechali sme ju 1 hodinu pri laboratórnej teplote fixovať. Vzorku sme ďalej filtrovali pomocou polykarbonátového filtra. Filter sa upevnil do zariadenia Swinnex „filter unit“ a najprv sa zvlhčil filtrovaním 2 ml fosfátového pufru z 3 ml injekčnej striekačky. Do 5 ml injekčnej striekačky sme natiahli 5 ml pufru a pridali 100µl vzorky, premiešali, pripevnili držiak filtra a filtrovali silou približne 1ml/min. V niektorých prípadoch je koncentrácia buniek príliš vysoká a filter preťaží, tj. tekutina neprechádza filtrom. VV takých prípadoch sa vzorka riedi 1:5 alebo 1:10 pokiaľ neprechádza tekutina cez filter. Po prefiltrovaní vzorky sme nasali do 3 ml striekačky vždy vzostupnej rady etanolu (20, 40, 60, 75, 96%) a dehydratovali vzorku 5 minút každým (v prípade 96% opakujeme dvakrát). Po poslednom premytí sa filter odobral z upínacieho zariadenia a nechal sa na vzduchu sušiť asi 30 minút. Ďalšie spracovanie prebehlo na pracovíšti elektrónovej mikroskopie Ústavu histológie a embryológie, Lekárskej fakulty, Masarykovej univerzity (Ing. Ladislav Ilkovic). Vzorky boli spracované a podrobené skenovacej elektrónovej mikroskopii (SEM).

4.4.3. Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Úvodný experiment

Boli pripravené nasledujúce kryoprotektívne matrice.

Matrica A – PRAS,

Matrica B – PRAS s 5% inulínu (Sigma, ČR),

Matrica C – PRAS s 5% inulínu a 0,1% L-cysteínu (Sigma, ČR),

Matrica D – PRAS s 5% inulínu, 0,1% L-cysteínu (Sigma, ČR) a 5% želatíny,

Matrica E – PRAS s 5% inulínu a 3% pektínu (Sigma, ČR).

Postup kryoprezervacie a kontroly viability

V anaeróbnom boxe boli suspenzie s upravenou denzitou na 1 stupeň McFarlandovej zákalovej škály vybraných kmeňov v PRASe zmiešané s jednotlivými kryoprotektívnymi matricami 1:1 v zamrazovacích ampulách (Dispolab, ČR) (pre anaeróbne uchovanie) a v mikroskúmavkách (typ Ependorff) (pre aeróbne uchovanie). Po dostatočnom premiešaní boli uskladnené do mraziaceho boxu pri teplote -20°C (*Schéma 1*).

1. Ku kontrole viability bola použitá metóda MPN (Most Probable Number), teda najpravdepodobnejší počet živých baktérií v modifikácii podľa Suttona (2010) (*Príloha 1*) [42].
2. Suspenzia kultúr v PRASe (matrica A) bola použitá ako kontrola viability pred zamrazením v čase t_0 . Kultúry zamrazené v jednotlivých matriciach boli po 7 dňoch rozmrazené v anaeróbnom boxe, riedené a jednotlivé riedenia kultivované do 5 jamiek mikrotitračnej doštičky s BHI bujónom obohateným o hemín, vitamín K_1 . Po inkubácii 24-48h boli počítané jamky s rastom kultúr z jednotlivých riedení (*Schéma 2*) a bola stanovená hodnota najpravdepodobnejšieho počtu živých baktérií výpočtom [42].

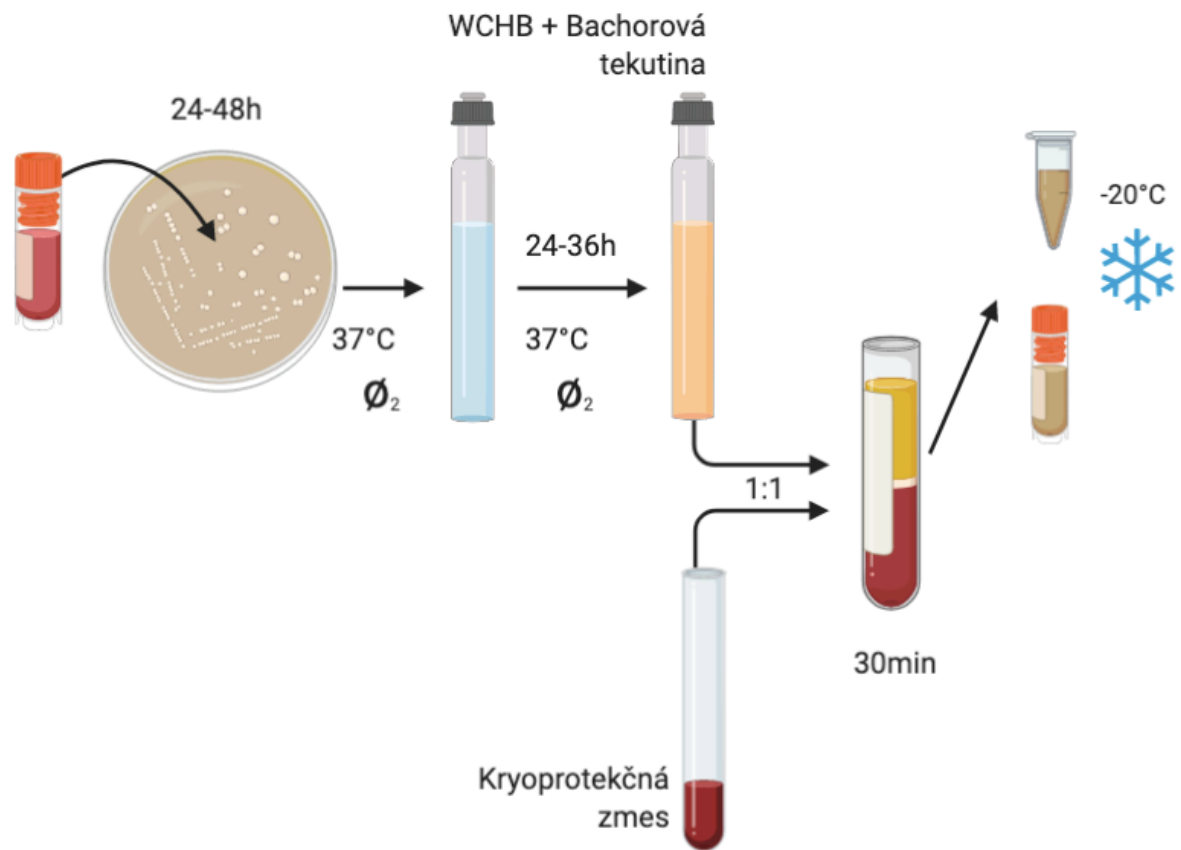


Schéma 1: Príprava kryoprotektickej matrice.

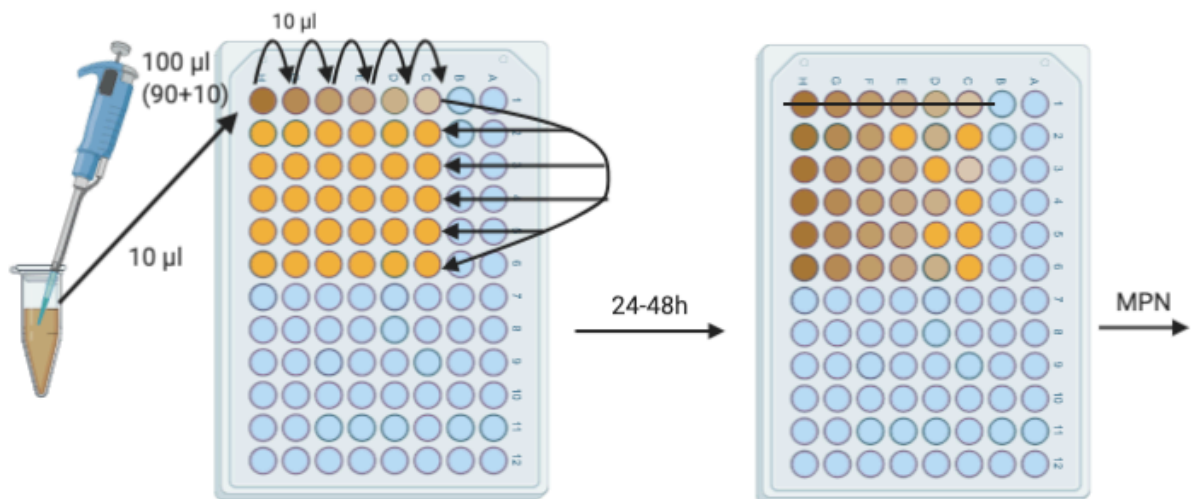


Schéma 2: Riedenie rozmrazenej matrice na mikrotitračnej jamke do BHI média s vit. K_1 a hemínom k následnému vyhodnoteniu počtu životaschopných baktérií pomocou MPN.

4.4.4. Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Hlavný experiment

Na základe skúseností získaných v predpokuse boli v hlavnom pokuse použité štyri kryoprotektívne matrice.

Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu

Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy

Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode

Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom

Matrice boli 24 hodín pred použitím vložené do anaeróbného boxu za účelom zníženia koncentrácie kyslíku rozpusteného v roztokoch. Bakteriálne kultúry *Anaerobutyricum hali* DSM 3353, *Blautia obeum* DSM 25238 a *Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677 boli v anaeróbnom boxe vyočkované zo zmrazovacieho média na WCHA s bachorovou tekutinou a inkubované 24-48 hodín pri teplote 37°C. Získané kultúry boli očkované do 10 ml WCHB s 20 % bachorovej tekutiny v Hungateových skúmavkách pri 37°C po dobu 24-36 hodín, čo odpovedalo vrcholu exponenciálnej fázy množenia uvedených kmeňov. Jednotlivé kultúry uvedených kmeňov boli premiešané opakovaným nasatím a vypustením jednorazovou sterilnou preredukovanou Pasteurovou pipetou a v sterilnej preredukovanej plastovej skúmavke bol zmiešaný jeden diel kultúry s jedným dielom príslušnej matrice. Po premiešaní Pasteurovou pipetou bola zmes po 30 minútach (čas potrebný k penetrácii kryoprotekčných zložiek média do bakteriálnych buniek) pipetovaná do 1 ml do 16 preredukovaných sterilných mikroskúmaviek (typ Eppendorf). Mikroskúmavky boli uzatvorené a 8 z nich bolo utesnených parafilom (Nesco, Japonsko) okolo ich uzáveru. Skúmavky boli následne uložené po štyroch: aeróbne (bez parafilu) pri -20°C a -75°C a anaeróbne pri -20°C a -75°C (*Schéma 3*). U získaných kultúr bol v čase t_0 pred zamrazením zistený počet kolóniu tvoriacich jednotiek (CFU v 1 ml). Vzorka bola v anaeróbnom boxe desaťnásobne riedená a 100 μ l zriedeného roztoku bolo ďalej rozriedené 10^{-3} až 10^{-6} s využitím automatickej pipety (Gilson 100-200 μ l, Francúzsko) a preredukovaných sterilných špičiek očkované na povrch WCHA s bachorovou tekutinou. Inokulum bolo rozotrené jednorazovou preredukovanou Drigalského tyčinkou (Biologix, Čína) po celom povrchu agaru (*Schéma 4*). Po inkubácii po dobu 48 až 72 hodín boli na miskách s počtom približne 10 až 150 kolónií spočítané CFU a prevedený výpočet vstupnej koncentrácie životaschopných baktérií vo WCHB a príslušne testované kryoprotektívnou matricou.

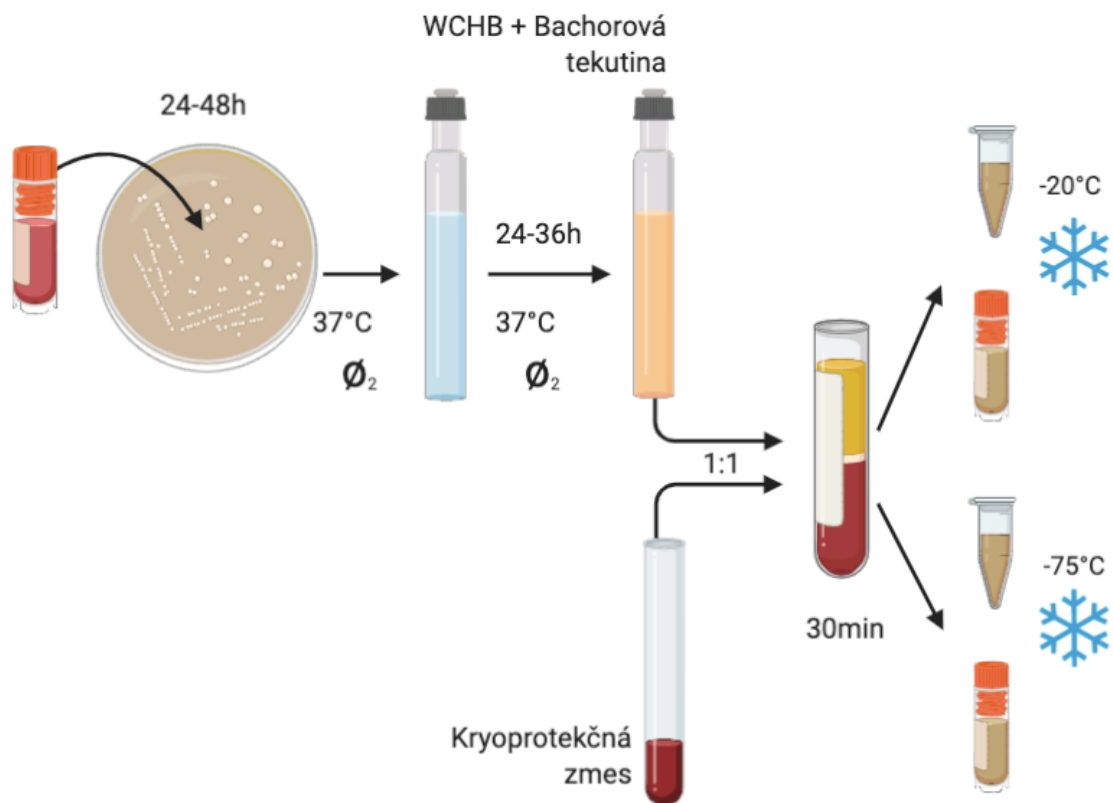


Schéma 3: Príprava kryoprotekčnej matrice.

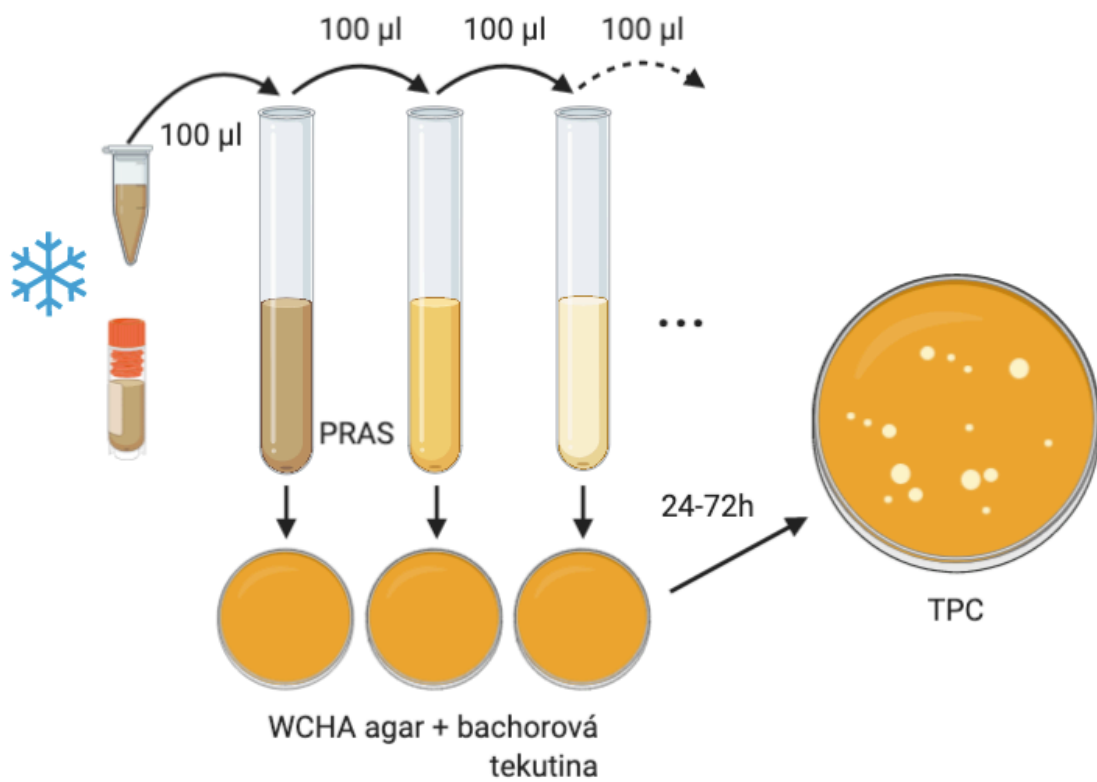


Schéma 4: Riedenie obsahu matrice pre následné určenie koncentrácie baktérií metódou TPC.

5. Výsledky a diskusia

5.1. Úvod

Ľudské črevo obsahuje široké spektrum probiotických baktérií, ktoré svojím pôsobením a metabolitmi potláčajú negatívne imunitné prejavy v čreve. Najrozšírenejšími v gastrointestinálnom trakte sú zástupcovia kmeňov Firmicutes a Bacteroidetes. Pri nesprávnej životospráve alebo zápalových ochoreniach čreva klesá diverzita, ako aj percentuálne zastúpenie v kmeni Firmicutes, z ktorého začnú prevládať baktérie typu *C. difficile* (rod Clostridioides) s typickými prejavmi. Na zvládnutie týchto chronických ochorení sa už využíva FMT, ktorú nemôžeme považovať za ideálnu, či už z hľadiska bezpečnosti vpravovanej vzorky a jej konkrétneho zloženia, rovnako z etickej stránky. Krokom v pred touto cestou sú účinnejšie probiotické bakteriálne kultúry deficitné v kolóne. Práve vďaka prospešnosti sme sa rozhodli pre použitie troch baktérií radu Clostridiales, čeľade Eubacteriaceae (*A. hallii*, *B. obeum*, *F. praustnitzii*), ktoré preukazujú výrazne pozitívny vplyv na zdravotný stav organizmu trpiaceho IBD a otvárajú možnosť nastavenia množstva a zloženia vpravovanej kultúry a výberu menej invazívnej cesty, formou tablety alebo enterosolventnej kapsuly.

K vytvoreniu probiotika nového typu je esenciálne zvládnuť a optimalizovať kultiváciu baktérií *in vitro*, overiť možnosti koncentrácie v laboratórnych podmienkach, ich správneho uchovávaní. Ďalej môžeme pokračovať prispôbením aplikačnej formy kultúry, prípadne kultivačného média aplikačnej forme.

Týmto smerom sa uberajú výskumné ústavy vo Francúzsku, Taliansku a V. Británii. *F. praustnitzii* bolo na ústave vo francúzskom Dijone lyofilizovaná a testovaná na viabilitu v pufroch imitujúcich prostredia počas putovania gastro-intestinálnym traktom. Ich experiment poukázal na vysokú citlivosť *F. praustnitzii* v prostredí nízkeho pH nachádzajúceho sa v žalúdku a tenkom čreve. Ostatné dve baktérie neboli doposiaľ podrobené podobnému testu ani podobným experimentom. Čo sa týka kryoprotekcie, doposiaľ sú len ojedinelé publikácie zahrňujúce vybrané bakteriálne kmene a skúmanie úbytku ich početnosti pri použití rôznych druhov kryoprotektantov [24, 43].

5.2. Kultivačné vlastnosti striktných anaeróbov čreva

Na pevné média boli vyočkované pozorované zbierkové kmene DSM a kultivované po dobu 72 hodín. V 24 hodinových intervaloch bol odmeraný priemer samostatnej kolónie (Tabuľka 10).

A. hallii dosiahlo najlepšie výsledky na LYHBHI médiu spolu s WCHA obohatenom o bachorovú tekutinu. V holandskej publikácii zaznamenali pre porovnanie nárast kolónií DSM 3353 na 4,5 mm za 48 hodín v Clostridial Reinforced Mediu (1% agare) [44]. Vzhľad kolónie bol rovnaký (Obrázok 8, 11, 14, 17), belasej farby kolónie s priehľadnými okrajmi, pravidelného tvaru. Najslabší výsledok dosialo *A. hallii* na Brucella agare, kde bol nameraný nárast 1 mm po 72 hodinách.

B. obeum (Obrázok 7, 10, 13, 16) dosiahla najlepšie výsledky, rovnako ako *A. hallii* na dvoch typoch agarov LYHBHI a WCHA s bachorovou tekutinou. Najmenší rast bol opäť nameraný u Brucella agaru. Kolónie sú pravidelné lesklé v strede výrazne biele po celom ich povrchu.

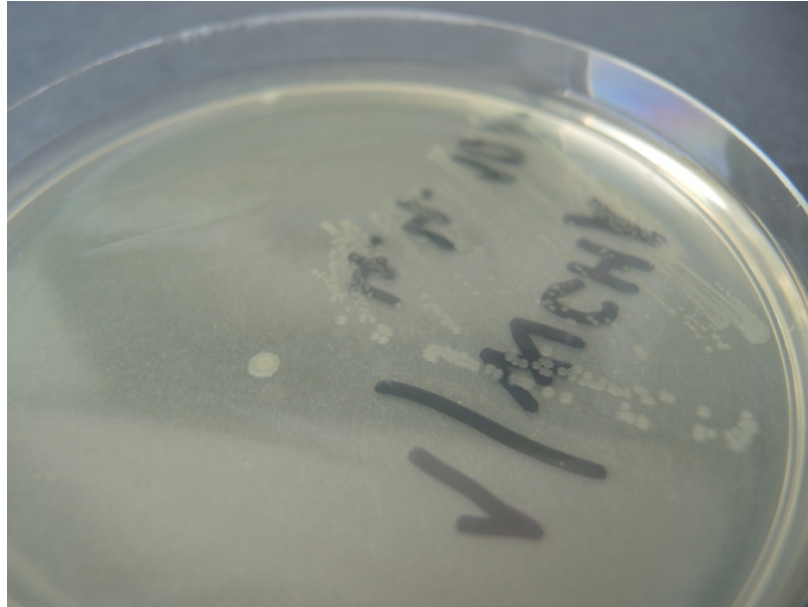
F. praustnitzii (Obrázok 6, 9, 12, 15) dosiahlo najlepších výsledkov na médiách WCHA a WCHA s bachorovou tekutinou s priemerom 72 hodín kultivovanej kolónie 2,5 mm. Formovali nepravidelné priliehavé kolónie jemnej bielej farby s ešte bledšími okrajmi. Najmenší priemer kolónii sa na rozdiel od ostatných dvoch kultúr nachádzal u LYHBHI s priemerom 0,1 mm.

Rast bol zreteľný u všetkých troch kmeňov rozlične, avšak pri Wilkins-Chalgrene agare obohatenom o bachorovú tekutinu sme pozorovali ideálny rast u všetkých troch testovaných kmeňov. *Nota bene*, čitateľnosť, veľkosť a viditeľnosť boli ideálne pre následnú kultiváciu na tomto médiu.

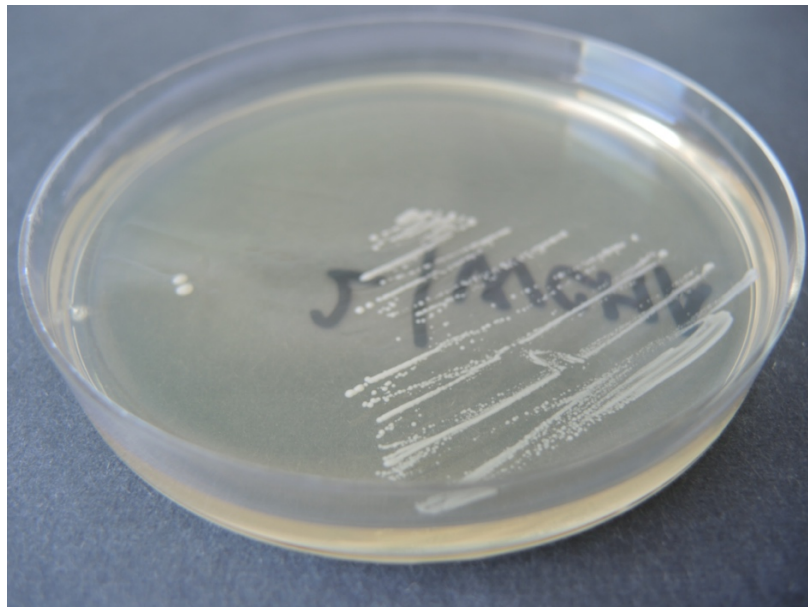
Dôvodom nedostatočného rastu v ostatných bola pravdepodobne nedostatočná redukcia prostredia vyhovujúca pomocou hydrogensíričitanu sodného v Brucella agare alebo žiadne redukčné činidlo v LYHBHI médiu. WCHA a WCHA s bachorovou tekutinou naopak obsahovali L-cystein.

Tabuľka 10: Hodnotenie rastu a kultivačných vlastností v priebehu inkubácie.

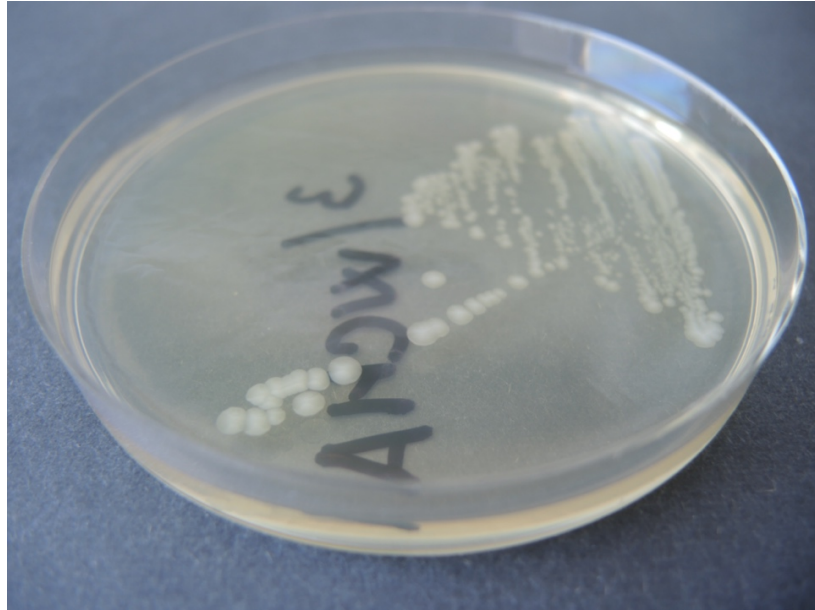
Médium	Doba inkubácie	Zbierkové kmene striktných anaeróbov čreva (priemer kolónie v mm)		
		<i>Anaerobutyricum hallii</i> DSM 3353	<i>Blautia obeum</i> DSM 25238	<i>Faecalibacterium praustnitzii</i> DSM 17677
WCHA	24h	1,2	0,2	0,75
	48h	2,5	1,25	2
	72h	3	2	2,5
WCHA + BT	24h	1,5	1	1
	48h	3	2	2
	72h	4	2,5	2,5
Brucella agar	24h	0,7	0,1	0,2
	48h	0,8	0,75	1,5
	72h	1	0,75	2
LYHBHI	24h	1,2	0,75	0,05
	48h	4	2	0,1
	72h	5	2,5	0,1



Obrázok 6: WCHA agar s kolóniami *Faecalibacterium prausnitzii*.



Obrázok 7: WCHA agar kolóniami *Blautia obeum*.



Obrázok 8: WCHA agar s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.



Obrázok 9: WCHA agar suplementovaný bacherovou tekutinou s kolóniami *Faecalibacterium prausnitzii*.

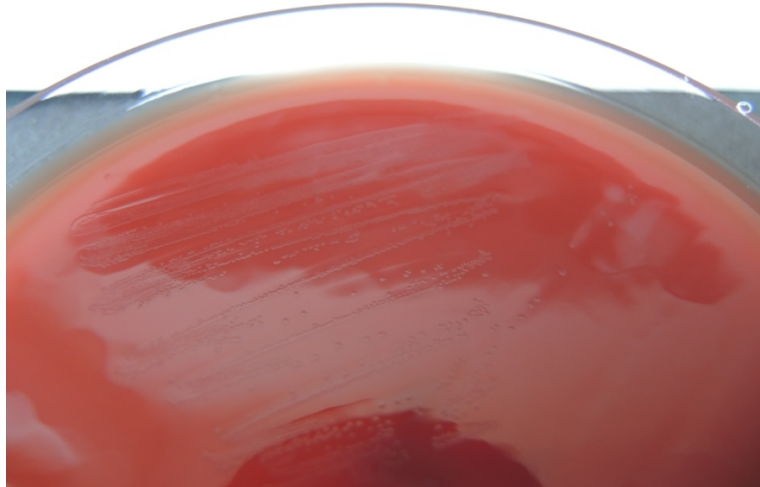


Obrázok 10: WCHA agar suplementovaný bachorovou tekutinou s kolóniami *Blautia obeum*.



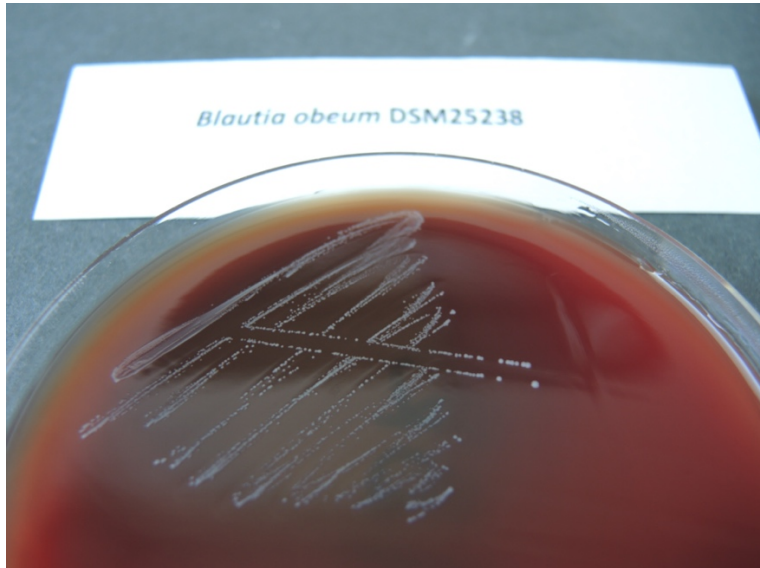
Obrázok 11: WCHA agar suplementovaný bachorovou tekutinou s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

Faecalibacterium praustnitzii DSM 17677

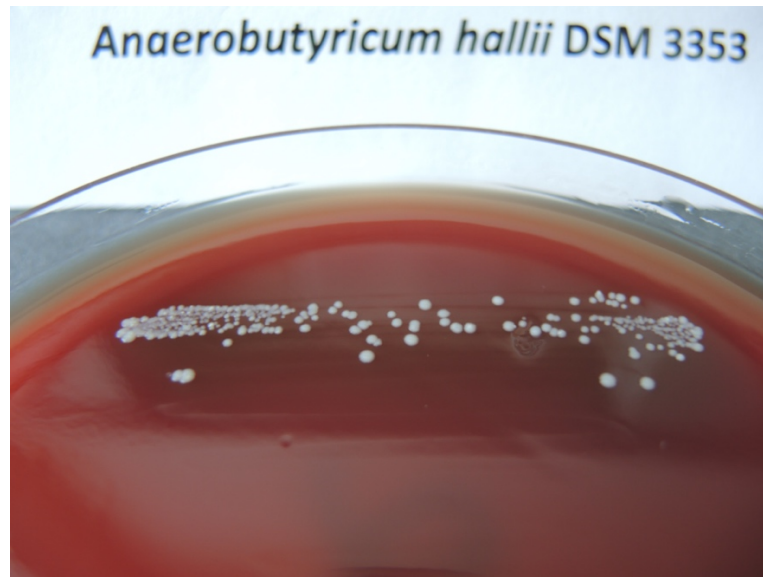


Obrázok 12: *Brucella* agar s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.

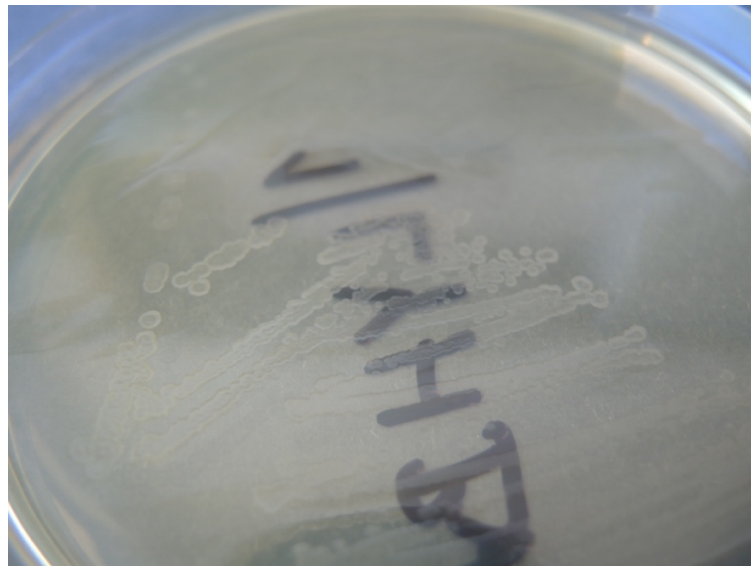
Blautia obeum DSM25238



Obrázok 13: *Brucella* agar s hemolyzujúcimi kolóniami *Blautia obeum*.



Obrázok 14: *Brucella* agar s hemolyzujúcimi kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.



Obrázok 15: LYHBHI médium s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.



Obrázok 16: LYHBHI médium s kolóniami *Blautia obeum*.



Obrázok 17: LYHBHI médium s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

V tekutých médiách (Tabuľka 11) nebol viditeľný rozdiel v zákale pri Wilkins-Chalgrene anaeróbnom bujóne ani obohatenom o bachorovú tekutinu a zákal sa tvoril u všetkých troch kultúr rovnako. U oboch sme pozorovali veľmi slabý zákal v kultúre *F. praustnitzii*, avšak viabilita bola zachovaná. U Brain Heart Infusion bujónu obohateným o hemín a vitamín K₁ sme pozorovali zvýšený rast *F. praustnitzii*, ale nízky rast kultúry *B. obeum*. Dôvodom mohli byť nedostatočné antioxidantné vlastnosti vitamínu K₁ pre kultúru *B. obeum*, čo bude viditeľnejšie v hlavnom pokuse. *A. hallii* rástlo vo všetkých médiách a silný zákal so sedimentom bol zreteľný už po 24 hodinách u WCHB a WCHB s bachorovou tekutinou. Na základe týchto výsledkov sme sa rozhodli pokračovať s používaním jedného tekutého bujónu a to WCHB s bachorovou tekutinou pre vyššie redukčné vlastnosti.

Tabuľka 11: Porovnanie intenzity zákalu a tvorby sedimentu v závislosti na type tekutého média a doby inkubácie.

Médium ¹	Doba inkubácie	Zbierkové kmene striktných anaeróbov čreva ²		
		<i>Anaerobutyricum hallii</i> DSM 3353	<i>Blautia obeum</i> DSM 25238	<i>Faecalibacterium praustnitzii</i> DSM 17677
WCHB	24h	4+	3+	±
	48h	4+	4+	±
	72h	4+	4+	±
WCHB + BT	24h	4+	3+	±
	48h	4+	4+	±
	72h	4+	4+	±
BHI+K ₁ +Hemín	24h	3+	1-	2+
	48h	4+	1-	3+
	72h	4+	3+	4+

¹ WCHB – Wilkins Chalgrene anaeróbný bujón, WCHB + BT – Wilkins Chalgrene anaeróbný bujón obohatený bachorovou tekutinou, BHI+K₁+Haemin – Brain heart infusion médium obohatené vitamínom K₁ a haeminom

² 1- - bez prejavu množenia, ± - veľmi slabý zákal, 1+ (+) – slabý zákal, 2+ (++) , 3+ (+++) – silný zákal, 4+ (++++) – silný zákal a sediment

5.3. Elektrónová mikroskopia

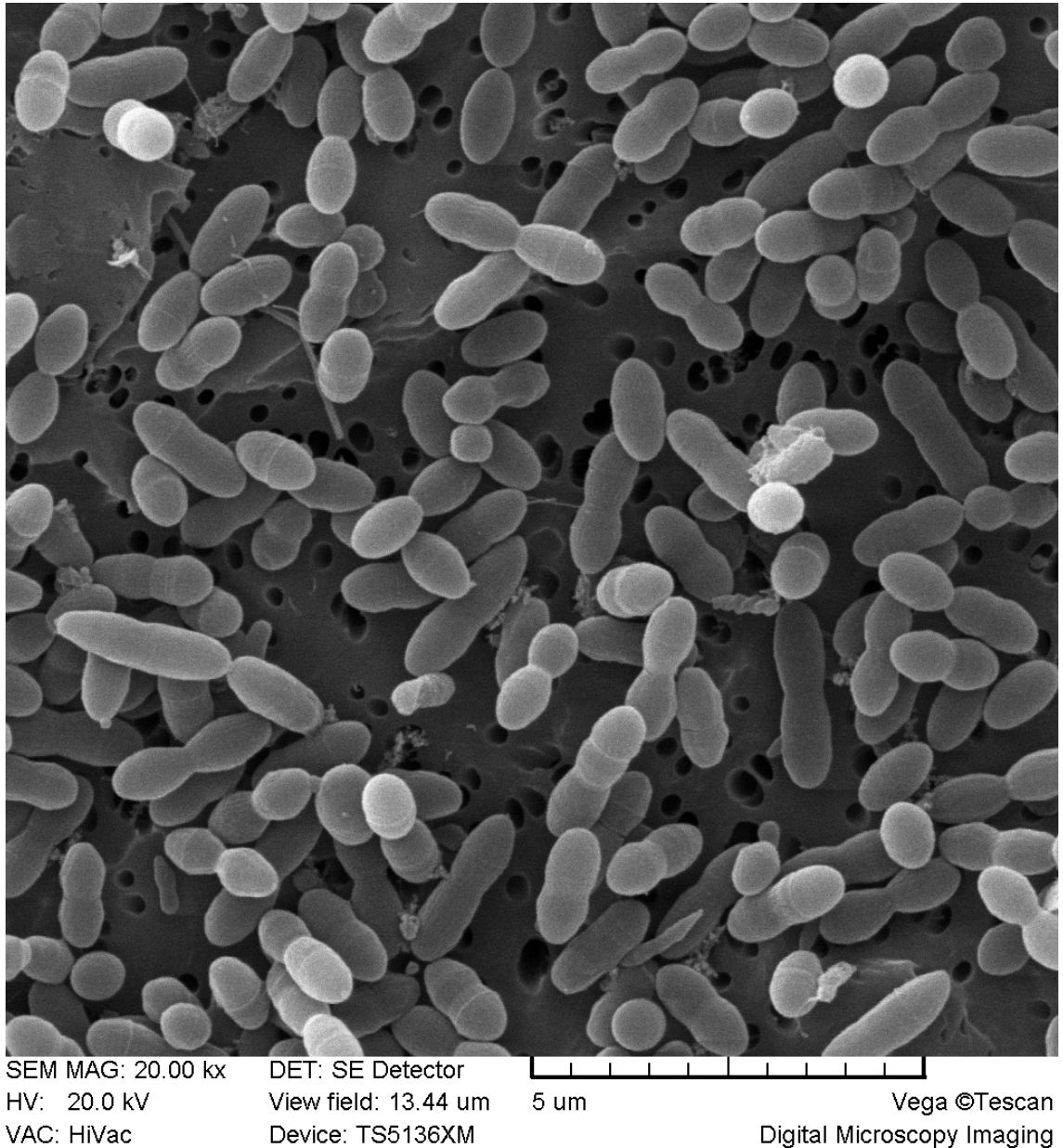
Skenovacou elektrónovou mikroskopiou boli v spolupráci s LF MU urobené snímky zbierkových kmeňov študovaných anaeróbov a jednej kultúry z laboratórnej zbierky, ktoré sú dokumentované na nasledujúcich snímkach.



Obrázok 18: *Anaerobutyricum hallii*, pleomorfné tyčinky $0,7 \times 4-7 \mu\text{m}$, zväčšenie 15 000 krát. Kontaminované (bunky guľovitého tvaru)

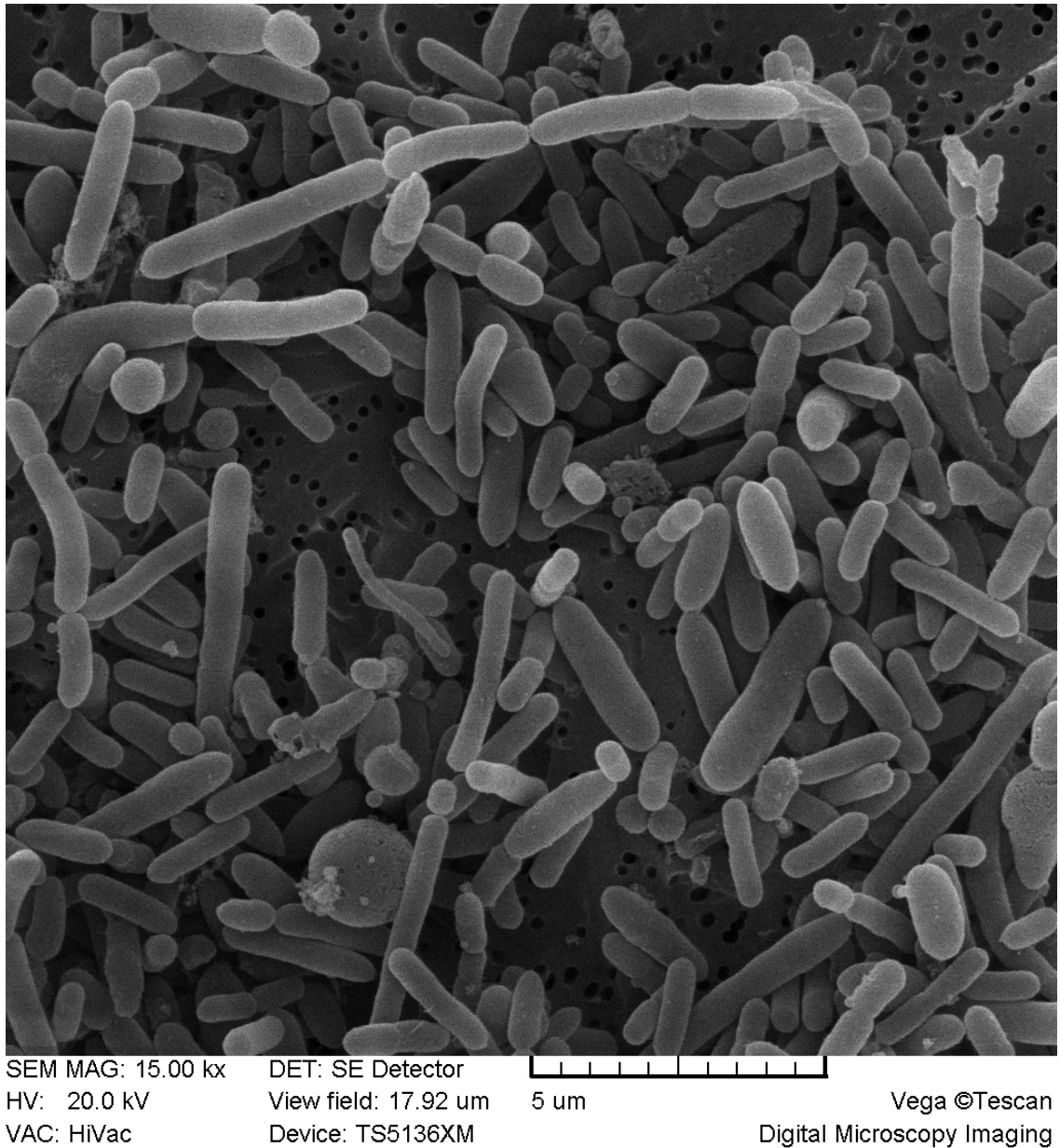
Na Obrázku 18 môžeme vidieť baktérie zbierkového kmeňa *A. hallii* DSM 3353 tyčinkovitého tvaru v čerstvej kultúre dorastajúce do rozmerov 4-7 μm . V publikácii z Holandska, v ktorej reklasifikovali *A. hallii* z *Eubacterium hallii* kultivovali baktérie po dobu 12 hodín

a následne ich mikroskopovali skenovacím elektrónovým mikroskopom, kde namerali baktérie o dĺžke 0,7-4 μm . Rovnaký kmeň *A. hallii* bol v našom prevedení kultivovaný dlhšiu dobu a v WCH bujóne na rozdiel od Reinforced Clostridial Média s 1% agarom [44].



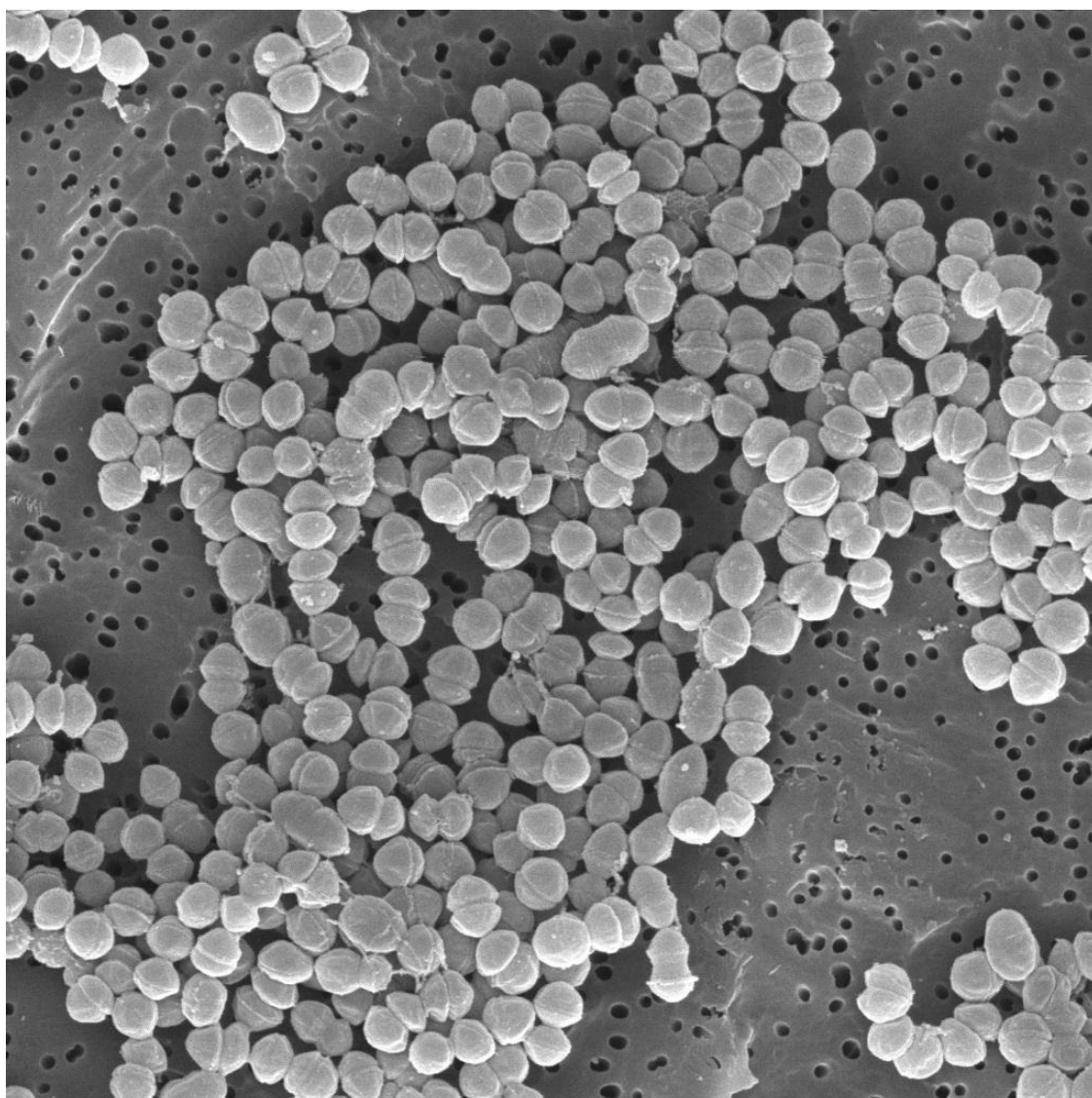
Obrázok 19: *Blautia obeum*, elipsovité pleomorfné bunky dĺžky 1x1-3 μm , zväčšenie 20 000 krát.

Obrázok 19 ukazuje snímok 24 hodinovej kultúry zbierkového kmeňa *B. obeum* DSM 25238 donedávna klasifikovaný ako *Ruminococcus obeum*, čo naznačuje aj tvar buniek. Bunky majú elipsovité tvar, dĺžku 1-3 μm , ostávajú spojené po delení v pároch a ďalej sa reťazia.



Obrázok 20: *Faecalibacterium prausnitzii*, tyčinky o dĺžke 1x3-6 μm , zväčšené 15 000 krát.

Obrázok 20 zobrazuje snímok 24 hodín kultivovanú kultúru zbierkového kmeňa *F. prausnitzii* DSM 25238. Baktérie na snímku sú tyčinkovitého tvaru dĺžky od 3-6 μm .



SEM MAG: 15.00 kx DET: SE Detector 5 µm
HV: 20.0 kV View field: 17.92 µm
VAC: HiVac Device: TS5136XM Vega ©Tescan
Digital Microscopy Imaging

Obrázok 21: *Blautia producta* An81, pleomorfne bunky guľovitého tvaru s rozmermi 0,75x0,75-1 µm, zväčšené 15 000 krát.

Blautia produkta An81 z laboratórnej zbierky Ústavu infekčných chorôb a mikrobiologie VFU Brno (Obrázok 21) má už viditeľnú morfológickú zhodu vzhľadu buniek s *B. obeum*. Bunky majú nepravidelný guľovitý tvar v rozmeroch 0,75-1 µm.

5.4. Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Úvodný experiment

V priebehu riešenia pokusu boli overené techniky kultivácie striktných anaeróbov a prípravy rôznych matric s bakteriálnymi kultúrami, ktoré by bolo možné použiť k plneniu enterosolventných kapsúl a tie uchovávať v mrazenom stave. Okrem matric uvedených v metodike boli predbežne overované ďalšie možné plnidla zo skupiny polysacharidov akými sú škrob a agar, tie sa však neosvedčili, pre sťažujúcu prípravu roztokov a ich komplikované riedenie pri overovaní viability bakteriálnych buniek. Doteraz dosiahnuté výsledky s použitím štyroch matric a dvoch kultúr sú dokumentované v *Tabuľke 12*. Z výsledkov je viditeľný pokles životaschopnosti bakteriálnych kultúr v porovnaní s čerstvou kultúrou suspendovanou v matrici A pred zamrazením. Najvyššia kryoprotektivita bola zistená u matric obsahujúcich inulín (Matrica B) a inulín s L-cysteíom (Matrica C), kde došlo k najnižšiemu poklesu viability, len o jeden, maximálne dva rady, a to u oboch testovaných kultúr. Rozdiel vo viabilite je viditeľne nižší aj pri uchovávaní zamrazených kultúr pri aeróbnych podmienkach v mikroskúmavkách typu Eppendorf v porovnaní s uchovávaním vo vzduchotesných ampulách, ktoré udržiavali anaeróbnú atmosféru. Matrica navyše obohatená o 5% roztok želatíny (D) dosiahla o rad nižší výsledok pri kmeni *B. producta* An81 a o 2 rady nižší pri kmeni *A. hallii* An3 v porovnaní s matricami B a C.

Predpokus ukázal negatíva zamýšľaného postupu:

Technika počítania životaschopných baktérií formou MPN bola náchylná ku kontamináciám. Možnosť falošne pozitívneho výsledku vyžadovala následnú verifikáciu výsledkov získaných touto metódou.

Materiálová a časová náročnosť metódou MPN bola vyššia.

Z vyššie uvedených dôvodov sme zvolili pre ďalší postup matrice obsahujúce inulín a želatínu. Pektín nakoľko podľa Solomina vykazuje kryoprotektívne účinky sa na kultiváciu baktérií vôbec nehodí [45].

Tabuľka 12: Výsledky predpokusu životaschopnosti striktno anaeróbných baktérií uchovaných v rôznych kryoprotektívnych matriciach pri -20°C po dobu jedného týždňa v porovnaní s počtami pred zamrazením.

Kultúra	Typ matrice ³	Podmienky uchovávaní	MPN/ml
<i>Anaerobutyricum hallii</i> An3	Matrica A (PRAS)	(kontrola v čase t ₀)	2,7.10 ⁹
	Matrica B	aeróbné	4,45.10 ⁸
		anaeróbné	5,5.10 ⁸
	Matrica C	aeróbné	8,2.10 ⁷
		anaeróbné	2,45.10 ⁸
	Matrica D	aeróbné	5,0.10 ⁶
		anaeróbné	5,0.10 ⁶
	Matrica E	aeróbné	3,0.10 ⁵
		anaeróbné	2,5.10 ⁵
	<i>Blautia producta</i> An81	Matrica A (PRAS)	(kontrola v čase t ₀)
Matrica B		aeróbné	8,5.10 ⁸
		anaeróbné	2.5.10 ⁹
Matrica C		aeróbné	2,7.10 ⁸
		anaeróbné	6,2.10 ⁸
Matrica D		aeróbné	4,7.10 ⁷
		anaeróbné	1,0.10 ⁸
Matrica E		aeróbné	8,5.10 ⁶
		anaeróbné	7,0.10 ⁷

³ Matrica A – PRAS, Matrica B – PRAS s 5% inulínu, Matrica C – PRAS s 5% inulínu a 0,1% L-cysteínu, Matrica D – PRAS s 5% inulínu, 0,1% L-cysteínu a 5% želatíny, Matrica E – PRAS s 5% inulínu a 3% pektínu.

5.5. Viabilita striktných anaeróbov čreva v kryoprotektívnych médiách – Hlavný experiment

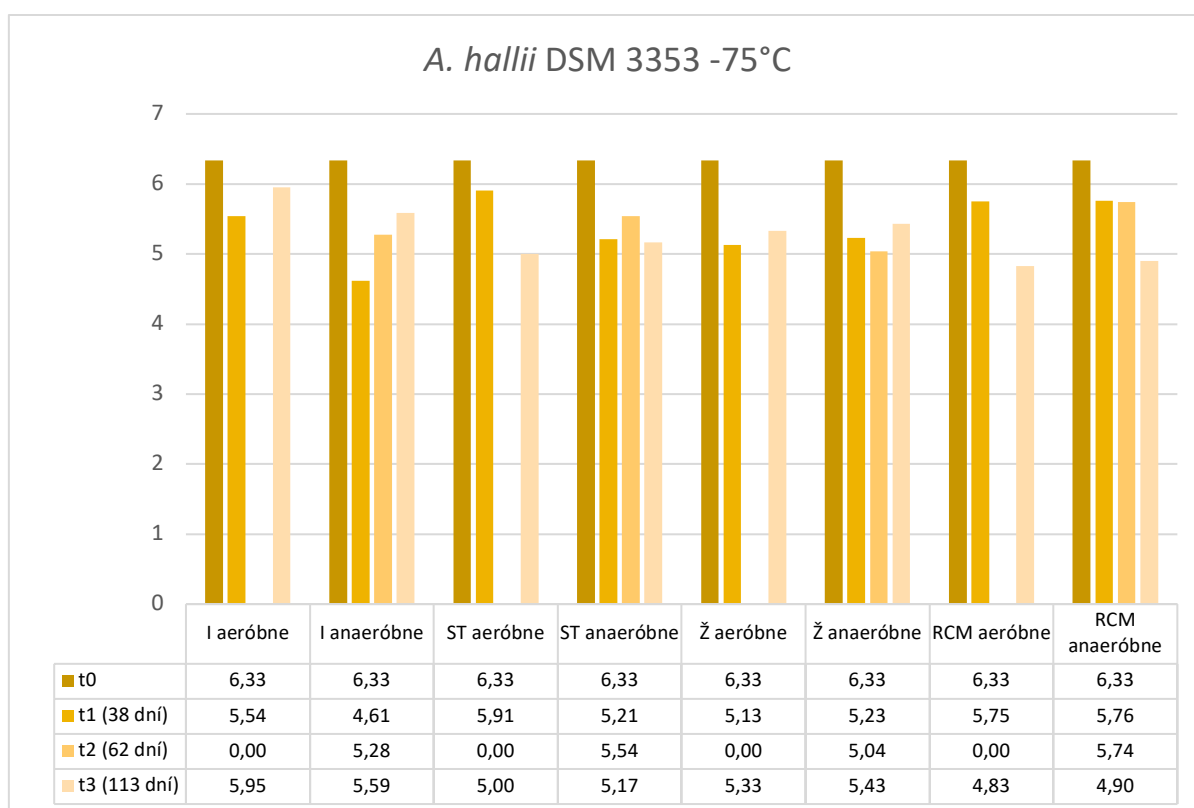
Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (**Inulín**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**Sacharóza+trehalóza**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Želatína**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**) boli v pomere 1:1 zmiešané s WCHB a bachorovou tekutinou obsahujúci jeden bakteriálny kmeň na vrchole exponenciálnej fázy rastu, sme po uskladnení v čase t_n a teplotných podmienkach -20°C a -75°C postupne rozmrazovali a merali metódou Total Plate Count (TPC) s výsledkom v kolónie formujúcich jednotkách (CFU) pri rôznych desaťnásobných riedeniach prispôbených predpokladanému počtu baktérií v rozmrazenej matrici. Nariedené vzorky boli kultivované na WCHA s bachorovou tekutinou na Petriho miskách 24-72 hodín a následne spočítané kolónie podľa vyššie zmienených pravidiel TPC (Total Plate Count). Po prvom rozmrazení (t_1) boli všetky vzorky vyriedené podľa množstva v kontrolnej vzorke (t_0), tj. zväčša 5 krát a kultivované. Pre ďalšie cykly kultivácie sme použili údaje o predchádzajúcej vzorke z dôvodu šetrenia časom aj materiálom a obmedzili kultiváciu na miskách na 2-3 Petriho misky na vzorku.

5.5.1. Kultivácia *A. hallii* DSM 3353 pri -75°C

Výsledky kultivácie po rozmrazení z -75°C môžeme vidieť v *Tabuľke 13* a *Grafe 1*. Početnosť baktérií sa zmenila o menej ako 2 rady nezávisle na prístupe kyslíka počas zmrazenia. Po prvom rozmrazení t_1 vykazovali najvyššiu viabilitu matrice 2 (5% sacharóza a 5% trehalóza v PRAS-e) a 4 (Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolu). V ďalšom cykle rozmrazovania t_2 sa podarilo zmerať viabilitu len vo vzorkách bez prístupu atmosférického kyslíka, z ktorých oproti predošlému rozmrazeniu boli odchýlky minimálne. Rozmrazením v čase t_3 sme potvrdili, že najvyššia viabilita bola detegovaná u matric 1, 2, 3 a u matrice 4 došlo k miernemu poklesu rastu. K odchýlkam v meraní mohlo dôjsť vďaka dlhšiemu času v médiu pred rozriedením do riediacich PRAS roztokov a následnému náteru na Petriho misky. Najprv sa riedila kultúra anaeróbných podmienok a vyriedovala na misky. K nedokončenému meraniu v čase t_2 došlo z dôvodu vyhlásenia vlády ČR o obmedzení prevádzky školských pracovísk.

Tabuľka 13: Počty zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkování na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

<i>A. hallii</i> -75°C					
Matrica	podmienky	t_0	t_1 (38 dní)	t_2 (62 dní)	t_3 (113 dní)
Inulín	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$3,47 \cdot 10^5$	-	$9,00 \cdot 10^5$
Inulín	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^5$
Sacharóza+trehalóza	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$8,06 \cdot 10^5$	-	$1,01 \cdot 10^5$
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$1,64 \cdot 10^5$	$3,50 \cdot 10^5$	$1,47 \cdot 10^5$
Želatína	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$1,36 \cdot 10^5$	-	$2,14 \cdot 10^5$
Želatína	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$1,68 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^5$	$2,70 \cdot 10^5$
RCM	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$5,68 \cdot 10^5$	-	$6,75 \cdot 10^4$
RCM	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$5,77 \cdot 10^5$	$5,50 \cdot 10^5$	$8,00 \cdot 10^4$



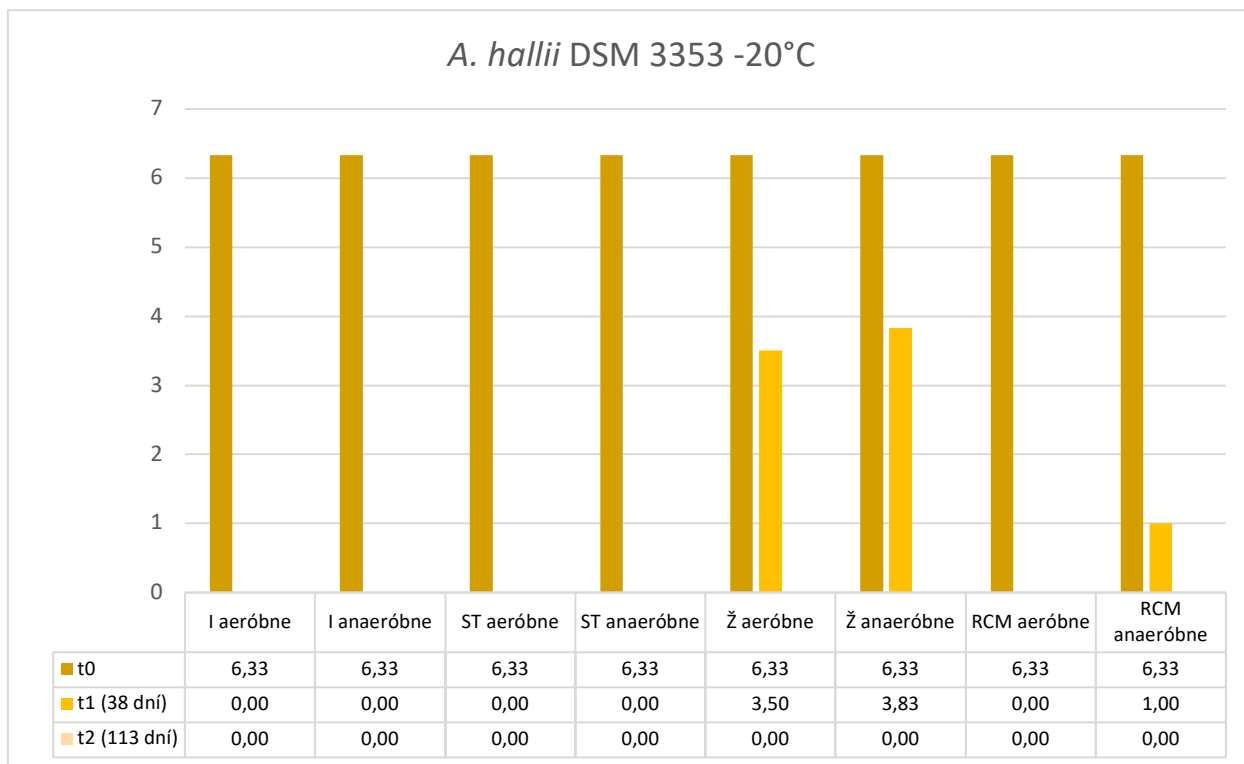
Graf 1: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkování na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

5.5.2. Kultivácia *A. hallii* DSM 3353 pri -20°C

Výsledky kultivácie *A. hallii* po rozmrazení z -20°C v čase *t* môžeme vidieť v *Tabuľke 14* a *Grafe 2*. Po prvom rozmrazení bol zreteľný pokles viability u matrice 3 (30% želatína v destilovanej vode) o 3 rady ako pri aeróbných podmienkach, tak aj pri podmienkach bez prístupu atmosférického kyslíka. Matrice 1 (PRAS s 5% inulínu), 2 (PRAS s 5% trehalózy a 5% sacharózy) a 4 (Clostridia Reinforced Medium s 20% glycerolom) nepreukázali dostatočné kryoprotektívne vlastnosti u *A. hallii*. V druhom cykle rozmrazenia neboli detegované ani žiadne životaschopné baktérie. Meranie po 62 dňoch nebolo uskutočnené z dôvodu vyhlásenia vlády ČR o obmedzení výskumných pracovísk. Teplota -20°C nebola dost' nízka, aby zachovala vyššie počty baktérií a ani kryoprotekčné médiá. Smirnova pri kryoprezervácii fekálnych vzoriek uvažovala o probléme s nedostatočnou viabilitou baktérií pri teplotách uchovávania vyšších ako -80°C a rekryštalizácií vody v materiáli [24]. Práve rekryštalizácia vody mohla spôsobovať tento vysoký úbytok v kultúre.

Tabuľka 14: Počty zbierkového kmeňa Anaerobutyricum hallii DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovani na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

<i>A. hallii</i> -20°C				
Matrica	podmienky	t_0	t_1 (38 dní)	t_2 (113 dní)
Inulín	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	0	0
Inulín	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	0	0
Sacharóza+trehalóza	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	0	0
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	0	0
Želatína	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$3,17 \cdot 10^3$	0
Želatína	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	$6,70 \cdot 10^3$	0
RCM	aerobne	$2,15 \cdot 10^6$	0	0
RCM	anaerobne	$2,15 \cdot 10^6$	10	0



Graf 2: Grafické znázornenie početnosti buniek zberkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkování na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v log(CFU). **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

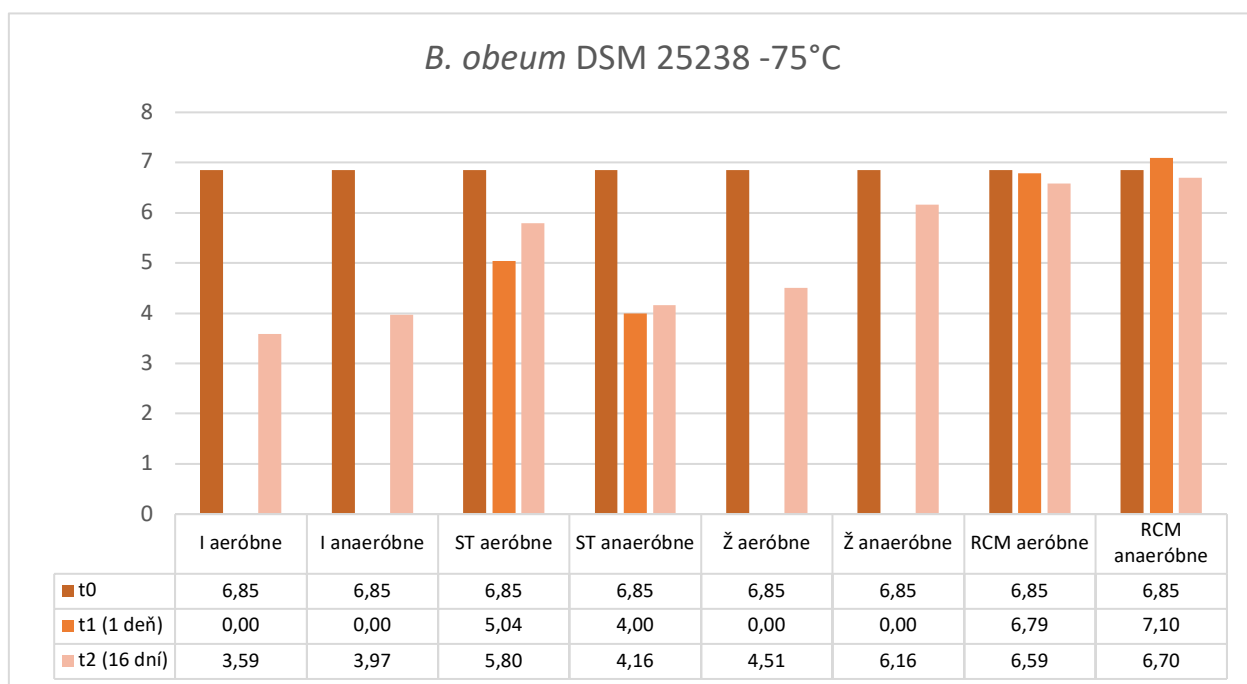
5.5.3. Kultivácia *B. obeum* DSM 25238 pri -75°C

Výsledky koncentrácií zberkového kmeňa *Blautia obeum* boli po prvom rozmrazení aj napriek nízkej teplote uchovávaní podstatne nižšie (Tabuľka 15 a Graf 3). V matriciach 1 (PRAS s 5% inulínu), 2 (PRAS s 5% trehalózy a 5% sacharózy) a 4 (30% želatína v destilovanej vode) bol pokles počtov o 1 a viac radov. Matrica 4 (Clostridia Reinforced Medium s 20% glycerolom) vykazovala najlepšie kryoprotekčné vlastnosti. Pri matrici 1 a 3 v oboch prípadoch sme nevedeli určiť koncentráciu kultúry, keďže kultúra bola vyriedená len od koncentrácie vyššej ako 10^4 vrátane. Pri druhom cykle rozmrazenia sme sa prispôbili úbytku a dokázali zníženú koncentráciu baktérií u matric 1, 2 a 3. Počty v rámci rovnakých matric sa líšili spôsobom uskladnenia a viditeľný bol rozdiel vo viabilite až na matricu 2. U matrice 3 boli namerané vyššie hodnoty ako sa očakávali po prvom rozmrazení, čo môže byť zapríčinené chybnou pri zamrazovaní/rozmrazovaní alebo následnej kultivácii v čase t_1 . Najlepšie výsledky obhájila matrica 4 s minimálne ovplyvnenou životaschopnosťou baktérií, ako u *A. hallii*. Merania boli

v kratšej časovej dobe vzhľadom na chúlостivejšie podmienky kultivácie *B. obeum* a vyhlásenie vlády ČR.

Tabuľka 15: Počty zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase *t* z teploty -75°C a vyočkovani na WCH agar s bachorovou tekutinou v CFU.

<i>B. obeum</i> -75°C				
Matrica	podmienky	t ₀	t ₁ (1 deň)	t ₂ (16 dní)
Inulín	aerobne	7,15.10 ⁶	0 (<10 ⁴)	3,86.10 ³
Inulín	anaerobne	7,15.10 ⁶	0 (<10 ⁴)	9,26.10 ³
Sacharóza+trehalóza	aerobne	7,15.10 ⁶	1,10.10 ⁵	6,28.10 ⁵
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	7,15.10 ⁶	1,00.10 ⁴	1,44.10 ⁴
Želatína	aerobne	7,15.10 ⁶	0 (<10 ⁴)	3,22.10 ⁴
Želatína	anaerobne	7,15.10 ⁶	0 (<10 ⁴)	1,45.10 ⁶
RCM	aerobne	7,15.10 ⁶	6,16.10 ⁶	3,86.10 ⁶
RCM	anaerobne	7,15.10 ⁶	2,03.10 ⁶	4,97.10 ⁶



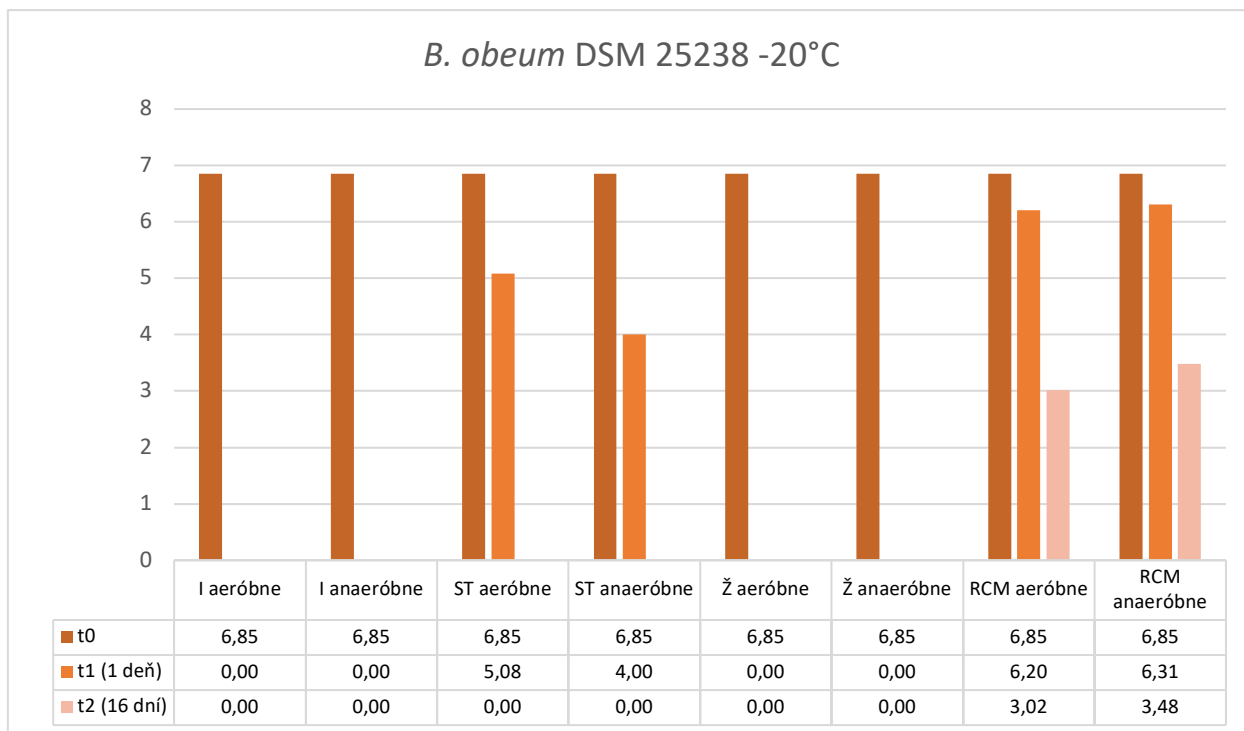
Graf 3: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase *t* z teploty -75°C a vyočkovani na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v log(CFU). **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

5.5.4. Kultivácia *B. obeum* DSM 25238 pri -20°C

Výsledky kultivácie *B. obeum* po rozmrazení z -20°C môžeme vidieť v *Tabuľke 16* a *Grafe 4*. V čase rozmrazenia t_1 neboli namerané hodnoty u matric 1 (PRAS s 5% inulínu) a 4 (30% želatína v destilovanej vode). Rovnako ako pri pokuse v -75°C sa predpokladala koncentrácia životaschopných baktérií 10^4 a vyššia a z tohto dôvodu sa nevyočkovávali prvé 3 riedenia. Každopádne môžeme konštatovať, že pri -20°C a rýchlejším úhynom baktérií v čase by menšie počty neodpovedali požiadavkám. Počty baktérií sa minimálne zmenili u matrice 4 (Clostridia Reinforced Medium s 20% glycerolom) a hodnoty u matrice 2 (PRAS s 5% trehalózy a 5% sacharózy) sa znížili o 1 a 2 rady od kontroly v čase t_0 . V druhom čase rozmrazovania vzoriek t_2 po 16 dňoch od zamrazenia neboli zistené žiadne životaschopné baktérie u matric 1, 2, 3 (30% želatína v destilovanej vode) a o zníženie CFU o 3 rady pri matrici 4.

Tabuľka 16: Počty zbierkového kmeňa Blautia obeum DSM 25238 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovani na WCH agar s bachorovou tekutinou v CFU.

<i>B. obeum</i> -20°C				
Matrica	podmienky	t_0	t_1 (1 deň)	t_2 (16 dní)
Inulín	aerobne	$7,15 \cdot 10^6$	0 ($<10^4$)	0
Inulín	anaerobne	$7,15 \cdot 10^6$	0 ($<10^4$)	0
Sacharóza+trehalóza	aerobne	$7,15 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^5$	0
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	$7,15 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^4$	0
Želatína	aerobne	$7,15 \cdot 10^6$	0 ($<10^4$)	0
Želatína	anaerobne	$7,15 \cdot 10^6$	0 ($<10^4$)	0
RCM	aerobne	$7,15 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^6$	$1,05 \cdot 10^3$
RCM	anaerobne	$7,15 \cdot 10^6$	$2,03 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^3$



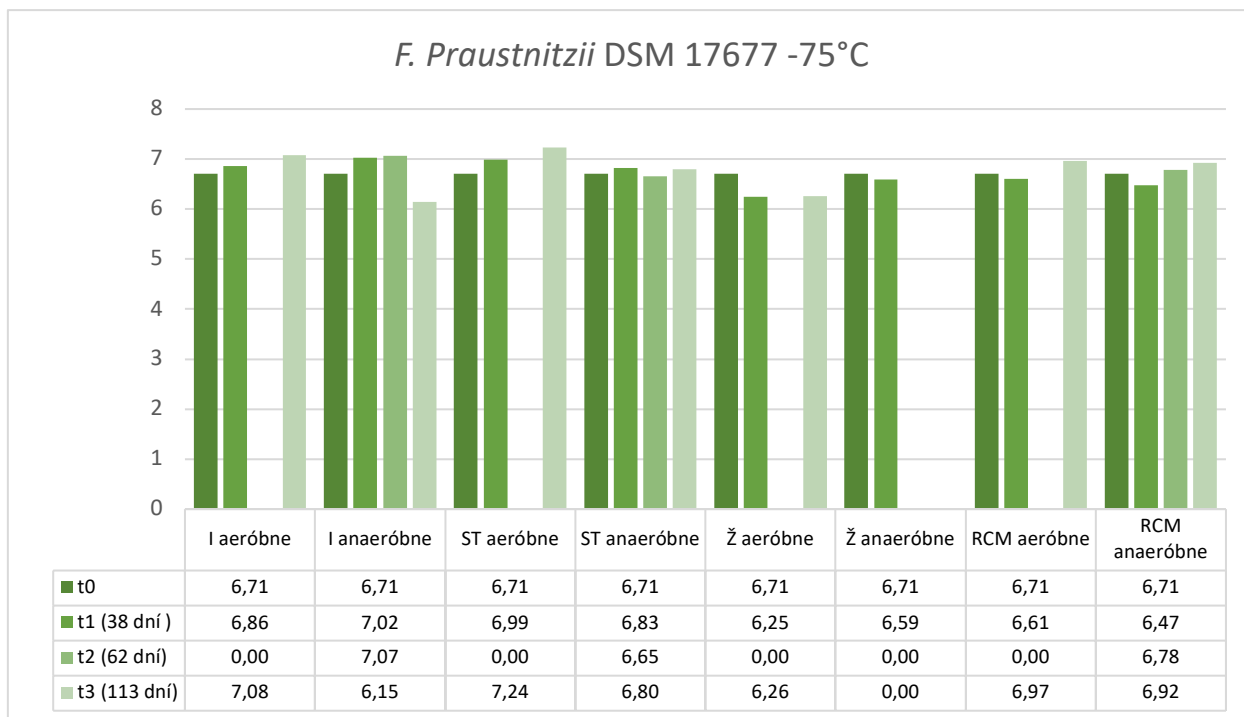
Graf 4: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase *t* z teploty -20°C a vyočkovani na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v log(CFU). **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

5.5.5. Kultivácia *F. praustnitzii* DSM 17677 pri -75°C

Po prvom rozmrazení (t_1) zbierkového kmeňa *F. praustnitzii* z teploty -75°C (Tabuľka 17 a Graf 5) môžeme vidieť, že sa počty po uchovávaní 38 dní nezmenili ani v jednom prípade skúšaných matric 1-4. V druhom cykle rozmrazenia (t_2) sme pozorovali podobné výsledky u anaeróbne uchovaných matric 1, 2 a 4. Matrica 3 nevykazovala žiadnu viabilitu. Pri kontrole životaschopnosti baktérie po 113 dňoch od zamrazenia (t_3), sme namerali rozdiel viability posunutý maximálne o jed rad nižšie u vzorky inulínu a potvrdili sme, že anaeróbna matrica 3 obsahujúca želatínu neobsahuje, žiadne životaschopné baktérie. Keďže vzorka s rovnakou matricou a v anaeróbnom prostredí potvrdila kryoprotekčný účinok a preživšie baktérie neboli nijako významne ovplyvnené, môžeme konštatovať, že matrice 2 uchovávané anaeróbne mohli byť chybné pripravené alebo mikroskúmavky, v ktorých bol roztok zamrazovaný neboli dostatočne vyredukované v anaeróbnom prostredí. Matrice s najlepším výsledkom boli 1 a 4 aj v ich anaeróbnom aj aeróbnom prevedení.

Tabuľka 17: Počty zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkování na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

<i>F. praustnitzii</i> -75°C					
Matrica	podmienky	t_0	t_1 (38 dní)	t_2 (62 dní)	t_3 (113 dní)
Inulín	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$7,18 \cdot 10^6$	-	$1,21 \cdot 10^6$
Inulín	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$1,05 \cdot 10^7$	$1,17 \cdot 10^7$	$1,41 \cdot 10^6$
Sacharóza+trehalóza	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$9,70 \cdot 10^6$	-	$1,72 \cdot 10^7$
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$6,70 \cdot 10^6$	$4,50 \cdot 10^6$	$6,25 \cdot 10^6$
Želatína	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$1,76 \cdot 10^6$	-	$1,8 \cdot 10^6$
Želatína	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$3,87 \cdot 10^6$	0	0
RCM	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$4,05 \cdot 10^6$	-	$9,25 \cdot 10^6$
RCM	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$2,98 \cdot 10^6$	$6,00 \cdot 10^6$	$8,40 \cdot 10^6$



Graf 5: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkování na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

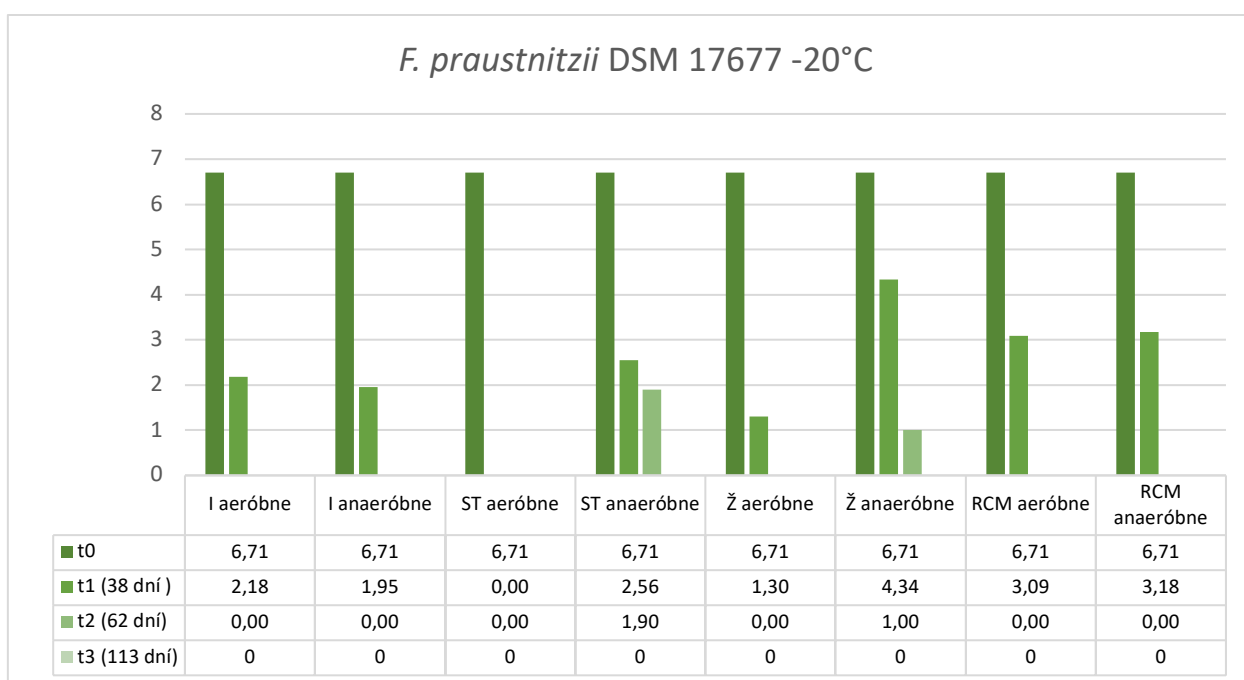
5.5.6. Kultivácia *F. praustnitzii* DSM 17677 pri -20°C

Pri zbierkovom kmeni DSM 17677 uchovávanom pri teplote -20°C bol nameraný (Tabuľka 18 a Graf 6) pokles už v prvom cykle rozmrazenia matric (t_1), kde viabilitu nepreukádzala iba **Matrica 2** (PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy). Ostatné matrice síce čiastočne uchovali kultúru, ale počty životaschopných baktérií boli znížené z $5,10 \cdot 10^6$ (t_0) na $1,23 \cdot 10^3$ CFU pri uchovaní za prístupu atmosferického kyslíka a $1,52 \cdot 10^3$ so zachovanou anaeróbnou atmosférou pri **Matrici 4** (Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolu), čo bol najvyšší nameraný výsledok. **Matrica 2** (PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy) so zachovaným anaeróbnym prostredím počas zamrazenia potvrdila viabilitu $8,00 \cdot 10^1$ CFU v 2 cykle (t_2) rozmrazovania spolu s **Matricou 3** (30% roztok želatíny v destilovanej vode) $1,00 \cdot 10^1$ CFU, taktiež len v anaeróbnom prevedení. U oboch týchto matric bol výsledok nízky. V treťom cykle nevykazovala známky životaschopnosti žiadna z testovaných matric.

Z výsledkov vyplýva, že najvyššiu protekciu vykazovali matrice 2 a 3 avšak v anaeróbnom prostredí. V druhom cykle neboli rozmrazené a vyriedené všetky matrice nakoľko prevádzka laboratória bola obmedzená vyhlásením vlády ČR.

Tabuľka 18: Počty zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkování na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

<i>F. praustnitzii</i> -20°C					
Matrica	podmienky	t_0	$t_1(31 \text{ dní})$	$t_2(62 \text{ dní})$	$t_3(113 \text{ dní})$
Inulín	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^2$	-	0
Inulín	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$9,00 \cdot 10^1$	0	0
Sacharóza+trehalóza	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	0	-	0
Sacharóza+trehalóza	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$3,60 \cdot 10^2$	$8,00 \cdot 10^1$	0
Želatína	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^1$	-	0
Želatína	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^1$	0
RCM	aerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$1,23 \cdot 10^3$	-	0
RCM	anaerobne	$5,10 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^3$	0	0



Graf 6: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkování na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. **Matrica 1** – PRAS s 5% inulínu (**I**), **Matrica 2** – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (**ST**), **Matrica 3** – 30% želatína v destilovanej vode (**Ž**), **Matrica 4** – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (**RCM**).

5.5.7. Zhrnutie výsledkov hlavného experimentu

Naše výsledky ukázali, že medzi jednotlivými druhmi striktne anaeróbných baktérií čreva človeka sú odlišnosti v nárokoch na pevné agarové aj tekuté kultivačné média. Z pevných sme testovali WCHA s a bez bachorovej tekutiny, LYHBHI a Brucela agar pre anaeróby, z ktorých sa nám najlepšie osvedčil WCHA s bachorovou tekutinou. Tekuté média v zastúpení WCHB s a bez bachorovej tekutiny, BHI s vit. K₁ a hemínom, z ktorých je taktiež najlepšia voľba WCHB s bachorovou tekutinou. Bachorová tekutina poskytuje týmto kultivačne náročným baktériám potrebné rastové látky. Môžu to byť produkty metabolizmu iných baktérií a nálevníkov, vyvážený pomer SFCA a iných zložiek približujúcich kultivačné médium výživovým podmienkam čreva. Práve produkty metabolizmu iných baktérií môžu byť pre život iných druhov kľúčové, z nich treba menovať chinóny, hlavne menachinóny [46]. O priaznivých podmienkach navodených pridaním bachorovej tekutiny do média hovorí aj staršia publikácia J.A. Leedle z roku 1980. K črevným baktériám chýlostivým na prostredie pridávali uhl'ovodíky identifikované v bachorovej tekutine. Výsledkom bolo viditeľné zväčšenie kolónií na Petriho miskách [47]. Miyazaki vyzdvihuje bachorovú tekutinu a jej mikroorganizmy, ktoré enzymatickým rozkladom polysacharidov pridávajú na viabilite ostatným baktériám [48].

Anaerobutyricum hallii a *Faecalibacterium praustnitzii* pri teplote -75°C nevykazovali výraznú zmenu početnosti zmrazovaných baktérií pre všetky štyri matrice v oboch typoch podmienok. Baktérie kmeňa *Blautia obeum* boli najpočetnejšie pri využití matrice 4 nezávisle od prítomnosti kyslíka. Pri matrici 3 boli namerané uspokojivé počty baktérií, ale iba v podmienkach bez prístupu kyslíka. *Blautia obeum* sa javí ako najfragilnejší kmeň z 3 vyššie testovaných, determinujúci podmienky pre pokračovanie a prípadné zmiešanie všetkých troch kultúr.

Pri teplote -20°C boli najlepšie výsledky sledované u matric 3 a 4. Roztok želatíny v matrici 3 a glycerol v matrici 4 chránili a *Faecalibacterium praustnitzii* dobu 38 dní s úbytkom životaschopných baktérií o polovicu. *Anaerobutyricum hallii* potvrdilo kryoprotekčné účinky matric 3 a 4. Po intervale 38 dní sa pri použití želatíny znížil počet životaschopných baktérií o polovicu a pri glycerole o viac ako 5/6. Kmeň *Blautia obeum* po 16 dňoch znížil svoju početnosť o polovicu pri použití matrice 4. Zvyšné tri matrice neobsahovali žiadne životaschopné bunky.

V práci zo švajčiarskeho Zürichu porovnávali viability piatich bakteriálnych kmeňov po zmrazení na -80°C po dobu 3 mesiacov s čerstvými vzorkami a vzorkami ošetrenými kryoprotekčnou látkou, buď zmesou sukrózy (SI) a inulínu alebo sukrózy, inulínu a glycerolu (SIG) [49].

Blautia obeum DSM 25238 bola rovnako, ako u nás vyhodnotená ako najfragilnejšia so znížením početnosti po rozmrazení po 3 mesiacoch o 1-2 rady. Porovnať ich výsledky kultivácie *B. obeum* môžeme len so švajčiarskou vzorkou hneď po zmrazení opäť rozmrazenou a našim rozmrazením v čase t_1 (1 deň) s najúspešnejšou matricou 4 (Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolu). Pri matrici 4 sme nenamerali pokles v počte baktérií prevyšujúci jeden rad, čo ani oni pri SI aj SIG. Baktérie v počte o rad neklesli ani pri rozmrazení po 16 dňoch. Pri anaeróbne uchovanej matrici 2 (5% sacharóza a 5% trehalóza v PRASe) sme namerali viditeľný pokles o 2 až necelé 3 rady už po prvom dni. V oboch experimentoch, našom aj švajčiarskom, sa namerali vyššie straty na počte pri použití sacharózy oproti glycerolu [49].

Pre *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 bolo priaznivejšie kryoprotekčné médium s SIG, kde kultúra stratila počet životaschopných baktérií po 3 mesiacoch len o necelú polovicu radu oproti našej anaeróbne uchovanej matrici 4, kde bola strata vyššia než 1 rad. Na druhú stranu, až prekvapivo dobrý výsledok bol zaznamenaný u aeróbne uchovanej matrice 1 (5% inulínu v PRASe), kde bol pokles v počte pri oboch meraniach nižší než o 0,5 radu. Švajčiarska kryoprotektívna matrica SI mala po 3 mesiacoch úbytok približne zrovnateľný s našim. Dôvodom nižšieho počtu v našej kultivácii po rozmrazení v čase t_3 bolo možno uchovávanie o 23 dní dlhšie alebo odchýlka v meraní [49].

Bakteriálny kmeň *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 nám v polovici výsledkov matric zmrazenia na -75°C vyšiel v pozitívnych odchýlkach, rádovo do 0,5 radu, čo môže byť zapríčinené nepresnosťou merania našej metódy. Pokles v počte od rozmrazenej kultúry zo švajčiarskej matrice SI bol o viac ako pol radu nižší [49].

Za zmienku stojí fakt, že Švajčiari používali inú, presnejšiu metódu MPN (most probable number), ktorá sa nám nepodarila uskutočniť, hlavne kvôli väčšiemu riziku kontaminácie. Použili sme metódu TPC (total plate count), ktorá síce nie je tak praktická po stránke opakovania merania, a teda presnosti výsledku, ale vhodná, čo sa týka identifikácie bakteriálnej kolónie a minimalizovania prehliadnutia kontaminácie [49].

5.5.8. Zameranie ďalšieho výskumu na podklade získaných výsledkov

Prevedené experimenty nám umožnili poznať kultivačné nároky študovaných baktérií, a tým vytypovať optimálne kultivačné média pre ich množenie a získavanie bakteriálnej masy, ktorá môže byť využitá v ďalších experimentoch. Získané vedomosti je možné orientovať do nasledujúcich oblastí výskumu:

1. Získanie kultúr v lyofilizovanom stave je jedna z ciest s veľkým potenciálom k otvoreniu priemyselnej prípravy probiotických anaeróbných kultúr a následného testovania ich rôznych liekových foriem (poťahovaných tabliet, enterosolventných kapsúl).
2. Hľadať a doplniť zmes baktérií o prírodné prípadne syntetické zlúčeniny, ktoré by našli uplatnenie ako symbiotiká.
3. Porovnávať vzájomné ovplyvňovanie bakteriálnych kmeňov inými kmeňmi anaeróbných alebo bežne používaných probiotických baktérií.
4. Využiť tieto kultúry k testovaniu zmiernenia vedľajších účinkov liečiv aktívnym dopĺňaním bakteriálnej kultúry, prípadne vedľajších účinkov samotného kmeňa pri dlhodobom podávaní probiotickej liečby človeku a zvieratám.

6. Záver

Rovnováha črevných baktérií je úzko spojená so intestinálnym zdravím človeka. Butyrát produkujúce baktérie črevnej mikroflóry pôsobia profylakticky pred vznikom a taktiež účinne inhibujú progres zápalových aj nezápalových ochorení tráviaceho traktu. Cieľom nášho skúmania bolo zvládnuť kultivačné vlastnosti bakteriálnych kmeňov *Anaerobutyricum hallii*, *Blautia obeum* a *Faecalibacterium praustnitzii*. Zistili sme, že WCHA a WCHB suplementované bachorovou tekutinou poskytujú optimálne podmienky pre množenie a rast týchto baktérií. Bakteriálne kmene *A. hallii* a *F. praustnitzii* rozmrazené z teploty -75°C vykazovali maximálne o 1 rad znížené počty životaschopných baktérií vo všetkých skúmaných typoch kryoprotekčných matríc aj po 113 dňoch uchovávaní. Aj napriek tomu, že matrice s obsahom želatíny pri tomto experimente vykazovali najnižšiu kryoprotekčnú funkciu pri teplote -20°C chránili baktérie najlepšie avšak ich počty pri uskladnení v týchto teplotách boli nízke a nestále v čase. Pri zbierkovom kmeni *B. obeum* boli namerané nízke zmeny viability v čase použitím kryoprotekčných matríc na báze glycerolu a sacharózy s trehalózou. Nízka viabilita bola pozorovaná u bakteriálnych buniek *B. obeum* uskladnených v teplote -20°C a aj v najúspešnejšom výsledku zameranom pri použití glycerolu, po 16 dňoch od uskladnenia sa znížil počet životaschopných buniek na polovicu. Nadobudnuté znalosti môžeme v budúcnosti použiť na ďalšie spracovanie týchto bakteriálnych kmeňov napr. ich enkapsulovanie, lyofilizáciu alebo obohacovanie o vhodné symbiotikum.

7. Referencie

1. FLINT H.J., DUNCAN S.H., LOUIS P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. *Current Opinion in Microbiology*. 2017, vol. 38, p. 59-65
2. FAN Y., CHEN S., YU Y., SI J., LIU B. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2006, vol. 7, no. 12, p. 987-991
3. MIQUEL S., MARTÍN R., ROSSI O., et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*. 2013, vol. 16, no. 3, p. 255-261
4. UDAYAPPAN S., MANNERAS-HOLM L., CHAPLIN-SCOTT A., et al. Oral treatment with *Eubacterium hallii* improves insulin sensitivity in db/db mice. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2016, vol. 2, no. 16009
5. HATZIOANOOU D., GHERGHISAN-FILIP C., SAALBACH G., et al. Discovery of a novel lantibiotic nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal tract. *Microbiology*. 2017, vol. 163, no. 9, p. 1292-1305
6. TURNBAUGH P.J., LEY R.E., HAMADY M. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007, vol. 449, no. 7164, p. 804-810
7. ECKBURG P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005, vol. 308, no. 5728, p. 1635-1638
8. JEFFERY I.B., LYNCH D.B., O'TOOLE P.W. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME Journal*. 2016, vol. 10, no. 1, p. 170-182
9. AZIMI T., NASIRI M.J., CHIRANI A.S., et al. The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review. *APMIS*. 2018, vol. 126, no. 4, p. 275-283
10. SEBAIHIA M., WREN B.W., MULLANY P., et al. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*. 2006, vol. 38, no. 7, p. 779-786
11. RIEGLER M., SEDIVY R., POTHOUKAKIS C., et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 1995, vol. 95, no. 5, p. 2004-2011
12. WALSH C. J., GUINANE C.M., O'TOOLE P.W., et al. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters*. 2014, vol. 588, no. 22, p. 4120-4130
13. RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M., BIAGI E., HEILIG H.G.H.J., et al. Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2011, vol. 141, no. 5, p. 1792-1801

14. SIMRÉN M. IBS with intestinal microbial dysbiosis: a new and clinically relevant subgroup? *Gut*. 2014, vol. 63, no. 11, p. 1685-1686
15. ŠVIHOVEC J., BULTAS J., ANZENBACHER P., et al. *Farmakologie*, 2018
16. TILG H., DANESE S. *Roseburia hominis*: a novel guilty player in ulcerative colitis pathogenesis? *Gut*. 2014, vol. 63, no. 8, p. 1204-1205
17. WALFISH A.E., CHING R.A., Crohn disease, Icahn School of Medicine, Elmhurst Hospital Center [online]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/professional/gastrointestinal-disorders/inflammatory-bowel-disease-ibd/crohn-disease>
18. HANSEN R., RUSSELL R.K., REIFF C., et al. Microbiota of De-Novo Pediatric IBD: Increased *Faecalibacterium Prausnitzii* and Reduced Bacterial Diversity in Crohn's But Not in Ulcerative Colitis. *American Journal of Gastroenterology*. 2012, vol. 107, no. 12, p. 1913-1922
19. BORODY T. J., KHORUTS A. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012, vol. 9, no. 2, p. 88-96
20. DE GROOT P.F., FRISSEN M.N., DE CLERCQ N.C. et al. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*. 2017, vol. 8, no. 3, p. 253-267
21. COSTELLO S. P., SOO W., BRYANT R.V. et al. Systematic review with meta-analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2017, vol. 46, no. 3, p. 213-224
22. YOUNGSTER I., SAUK J., PINDAR C., et al. Fecal Microbiota Transplant for Relapsing *Clostridium difficile* Infection Using a Frozen Inoculum From Unrelated Donors: A Randomized, Open-Label, Controlled Pilot Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, vol. 58, no. 11, p. 1515-1522
23. BAXTER M., COLVILLE A. Adverse events in faecal microbiota transplant: a review of the literature. *Journal of Hospital Infection*. 2016, vol. 92, no. 2, p. 117-127
24. SMIRNOVA D.V., ZALOMOVA L.V., ZAGAINOVA A.V., et al. Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019, vol. 309, no. 5, p. 259-269
25. REIMER L.C., VETCININOVA A., CARBASSE J.S., et al. Bac Dive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research*. 2019, vol. 47, no. 1, p. 631-636

26. LAWSON P.A., FINEGOLD S.M. Reclassification of *Ruminococcus obeum* as *Blautia obeum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015, vol. 65, no. 3, p. 789-793
27. COPPA G., GABRIELLI V.O., ZAMPINI L., et al. Oligosaccharides in 4 Different Milk Groups, *Bifidobacteria*, and *Ruminococcus obeum*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2011, vol. 53, no. 1, p. 80-87
28. TALARICO T.L., CASAS I.A., CHUNG T.C., et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988, vol. 32 no. 12, p. 1854-1858
29. ENGELS C., RUSCHEWEYH H.J., BEERENWINKEL N., et al. The Common Gut Microbe *Eubacterium hallii* also Contributes to Intestinal Propionate Formation. *Frontiers in Microbiology*. 2016, vol. 7, p. 713
30. KERCKHOFFS A.P.M., SAMSOM M., van der REST M.E., et al. Lower *Bifidobacteria* counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2009, vol. 15, no. 23
31. BUNESOVA V., LACROIX C., SCHWAB C. Mucin Cross-Feeding of Infant *Bifidobacteria* and *Eubacterium hallii*. *Microbial Ecology*. 2018, vol. 75, no. 1, p. 228-238
32. SCHWAB C., RUSCHEWEYH H.J., BUNESOVA V. Trophic Interactions of Infant *Bifidobacteria* and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8
33. VAN DEN ABBEELE P., DUYSBURGH C., JIANG T.A., et al. A combination of xylooligosaccharides and a polyphenol blend affect microbial composition and activity in the distal colon exerting immunomodulating properties on human cells. *Journal of Functional Foods*. 2018, vol. 47, p. 163-171
34. BALAMURUGAN R., GEORGE G., KABEERDOSS J., et al. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *British Journal of Nutrition*. 2010, vol. 103, no. 3, p. 335-338
35. QUÉVRAIN E., MAUBERT M.A., MICHON C., et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*. 2016, vol. 65, no. 3, p. 415-425
36. SOKOL, H., SEKSIK P., FURET J.P., et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009, vol. 15, no. 8, p. 1183-1189

37. MACHIELS K., JOOSSENS M., SABINO J., et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014, vol. 63, no. 8, p. 1275-1283
38. BENUS R.F.J., van der WERF T.S., WELLING G.W., et al. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* and dietary fibre in colonic fermentation in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2010, vol. 104, no. 5, p. 693-700
39. DOUBEK J., ŘEHÁKOVÁ K., UHRÍKOVÁ I., et al., Základy laboratorní diagnostiky neinfekčních nemocí, Ústav fyziologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2014, p. 234
40. GILLESPIE S.H. Anaerobes. *Medical Microbiology Illustrated*, Elsevier, 1994, p. 92-107
41. MEDVECKY, Matej, Darina CEJKOVA, Ondrej POLANSKY, Daniela KARASOVA, Tereza KUBASOVA, Alois CIZEK a Ivan RYCHLIK. Whole genome sequencing and function prediction of 133 gut anaerobes isolated from chicken caecum in pure cultures. *BMC Genomics*. 2018, vol. 19, no.1
42. TILLET H. E. Most probable numbers of organisms: revised tables for the multiple tube method. *Epidemiology and Infection*. 1987, vol. 99, no. 2, p. 471-476
43. RAISE A., DUPONT S., IACONELLI C., et al. Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* from the digestive tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020, vol. 56
44. SHETTY S.A., ZUFFA S., BUI T.P.N., et al. Reclassification of *Eubacterium hallii* as *Anaerobutyricum hallii* gen. nov., comb. nov., and description of *Anaerobutyricum soehngeni* sp. nov., a butyrate and propionate-producing bacterium from infant faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018, vol. 68, no. 12, p. 3741-3746
45. SOLOMINA O.N., SVEDENTSOV E.P., ZAITSEVA O.O., et al. Cryoprotective properties of some pectins. *Biological Sciences*. 2010, vol. 430, no. 1, p. 20-22
46. FENN K., STRANDWITZ P., STEWART E.J., et al. Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*. 2017, vol. 5, no. 1
47. LEEDLE J.A., HESPELL R.B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Appl Environ Microbiol*. 1980, vol. 39 no. 4, p. 709–719

48. MIYAZAKI K., MARTIN J.C., MARINSEK-LOGAR R., FLINT H.J. Degradation and Utilization of Xylans by the Rumen Anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B14. *Anaerobe*. 1997, vol. 3, no. 6, p. 373-381
49. BIRCHER L., GEIRNAERT A., HAMMES F., et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial Biotechnology*. 2018, vol. 11, no.4, p. 721-733

8. Zoznam použitých skratiek

3-HPA	3-hydroxypropionataldehyd
BHI	Brain heart infusion
CD	Crohn's disease
CDI	Clostridium difficile infection
CFU	Colony forming unit
DNBS	Dinitrobenzene sulfonic acid
DSM	Nemecká kolekcia mikroorganizmov a bunkových kolónií
FMT	Fekálna mikrobiálna transplantácia
GIT	Gastro-intestinálny trakt
IBD	Irritable bowel disease
IBS	Irritable bowel syndrome
IL	Interleukín
MAM	Microbial anti-inflammatory molecule
OTU	Operative taxonomic unit
PRAS	Pre-reduced anaerobically sterillized
RCM	Reinforced clostridial medium
SCFA	Short chain fatty acids
TNF	Tumor necrotizing factor
UC	Ulcerative colitis
WCHA	Wilkins-Chalgrene agar
WCHB	Wilkins-Chalgrene broth

9. Zoznam grafov

Graf 1: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

Graf 2: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

Graf 3: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

Graf 4: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

Graf 5: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

Graf 6: Grafické znázornenie početnosti buniek zbierkového kmeňa *Faecalibacterium praustnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCHA agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v $\log(\text{CFU})$. Matrica 1 – PRAS s 5% inulínu (I), Matrica 2 – PRAS s 5% sacharózy a 5% trehalózy (ST), Matrica 3 – 30% želatína v destilovanej vode (Ž), Matrica 4 – Reinforced Clostridial Medium s 20% glycerolom (RCM).

10. Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Zastúpenie mikrobiot osídľujúcich ľudské črevo [8].

Obrázok 2: Schéma vzniku IBD zapríčinennej dybiózou v GIT a porovnanie klasickej terapie antibiotikami (e) a aplikácie FMT (f) [19].

Obrázok 3: Chemická štruktúra diméru 3-hydroxypropionaldehydu formujúceho reuterín.

Obrázok 4: Schéma supresie imunitnej reakcie v čreve pôsobením *F. praustnitzii* [33].

Obrázok 5: Box s udržovanou atmosférou 10% CO₂; 5% H₂ a 85% N₂, teplotou 37°C a regulovanou vlhkosťou.

Obrázok 6: WCHA agar s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.

Obrázok 7: WCHA agar kolóniami *Blautia obeum*.

Obrázok 8: WCHA agar s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

Obrázok 9: WCHA agar suplementovaný bachorovou tekutinou s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.

Obrázok 10: WCHA agar suplementovaný bachorovou tekutinou s kolóniami *Blautia obeum*.

Obrázok 11: WCHA agar suplementovaný bachorovou tekutinou s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

Obrázok 12: Brucella agar s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.

Obrázok 13: Brucella agar s hemolýzujúcimi kolóniami *Blautia obeum*.

Obrázok 14: Brucella agar s hemolýzujúcimi kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

Obrázok 15: LYHBHI médium s kolóniami *Faecalibacterium praustnitzii*.

Obrázok 16: LYHBHI médium s kolóniami *Blautia obeum*.

Obrázok 17: LYHBHI médium s kolóniami *Anaerobutyricum hallii*.

Obrázok 18: *Anaerobutyricum hallii*, pleomorfné tyčinky 0,7x4-7 µm, zväčšenie 15 000 krát.
Kontaminované (bunky guľovitého tvaru)

Obrázok 19: *Blautia obeum*, elipsovité pleomorfné bunky dĺžky 1x1-3 µm, zväčšenie 20 000 krát.

Obrázok 20: *Faecalibacterium praustnitzii*, tyčinky o dĺžke 1x3-6 µm, zväčšené 15 000 krát.

Obrázok 21: *Blautia producta* An81, pleomorfné bunky guľovitého tvaru s rozmermi 0,75x0,75-1 µm, zväčšené 15 000 krát.

11. Zoznam schém

Schéma 1: Príprava kryoprotektčnej matrice.

Schéma 2: Riedenie rozmrazenej matrice na mikrotitračnej jamke do BHI média s vit. K₁ a hemínom k následnému vyhodnoteniu počtu životaschopných baktérií pomocou MPN.

Schéma 3: Príprava kryoprotekčnej matrice.

Schéma 4: Riedenie obsahu matrice pre následné určenie koncentrácie baktérií metódou TPC.

12. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Zloženie sušeného základu WCHA agaru v g/l roztoku.

Tabuľka 2: Zloženie sušeného základu WCHA bujónu (WCHB) v g/l roztoku.

Tabuľka 3: Fyziologické hodnoty bachorovej tekutiny [39].

Tabuľka 4: Zloženie sušeného základu BHI agaru v g/l roztoku.

Tabuľka 5: Zloženie sušeného základu BHI bujónu v g/l roztoku.

Tabuľka 6: Zloženie sušeného základu LYHBHI média v g/l roztoku.

Tabuľka 7: Zloženie sušeného základu Brucella agaru v g/l roztoku.

Tabuľka 8: Zloženie riediaceho roztoku PRAS

Tabuľka 9: Zloženie sušeného základu v g/l roztoku.

Tabuľka 10: Hodnotenie rastu a kultivačných vlastností v priebehu inkubácie.

Tabuľka 11: Porovnanie intenzity zákalu a tvorby sedimentu v závislosti na type tekutého média a doby inkubácie.

Tabuľka 12: Výsledky predpokusu životaschopnosti striktne anaeróbných baktérií uchovaných v rôznych kryoprotektívnych matriciach pri -20°C po dobu jedného týždňa v porovnaní s počtami pred zamrazením.

Tabuľka 13: Počty zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

Tabuľka 14: Počty zbierkového kmeňa *Anaerobutyricum hallii* DSM 3353 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

Tabuľka 15: Počty zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou v CFU.

Tabuľka 16: Počty zbierkového kmeňa *Blautia obeum* DSM 25238 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou v CFU.

Tabuľka 17: Počty zbierkového kmeňa *Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -75°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

Tabuľka 18: Počty zbierkového kmeňa *Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677 po rozmrazení v čase t z teploty -20°C a vyočkovaní na WCH agar s bachorovou tekutinou vyjadrené v CFU.

13. Prílohy

Revised tables for multiple tube method

473

Table 1. *Probable numbers of organisms**

<i>i, j, k</i>	Revised MPN	Previous MPN	Most probable range (MPR†)
0 0 1	2	2	2
0 1 0	2	2	2
1 0 0	2	2	2
1 0 1	4	4	4
1 1 0	4	4	4
1 2 0	5	6	5
2 0 0	4	5	4
2 0 1	5	7	5
2 1 0	5	7	5
2 1 1	7	9	7
2 2 0	7	9	7-9
2 3 0	11	12	11
3 0 0	7	8	7
3 0 1	9	11	9
3 1 0	9	11	9
3 1 1	13	14	13
3 2 0	13	14	13
3 2 1	16	17	14-16
3 3 0	16	17	14-16
4 0 0	11	13	11-13
4 0 1	14	17	14-16
4 1 0	16	17	14-16
4 1 1	20	21	18-20
4 2 0	20	22	18-22
4 2 1	25	26	23-27
4 3 0	25	27	23-27
4 3 1	31	33	29-34
4 4 0	32	34	29-34
4 4 1	38	40	34-41
5 0 0	22	23	20-23
5 0 1	29	31	25-34
5 0 2	41	43	36-50
5 1 0	31	33	27-36
5 1 1	43	46	36-50
5 1 2	60	63	50-70
5 1 3	85	84	70-95
5 2 0	50	49	40-55
5 2 1	70	70	60-80
5 2 2	95	94	80-110
5 2 3	120	120	105-135
5 3 0	75	79	65-90
5 3 1	110	110	90-125
5 3 2	140	140	120-160
5 3 3	175	180	155-200
5 3 4	210	210	185-240
5 4 0	130	130	110-150
5 4 1	170	170	150-200
5 4 2	220	220	190-250
5 4 3	280	280	240-320
5 4 4	345	350	300-390

Príloha 1: Tabuľka pre vyjadrenie najpravdepodobnejšieho počtu baktérií vo vzorke (MPN) [42].