

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Jaká je úloha mikrobiomu při vzniku, vývoji a léčbě nádorových
onemocnění

Magdaléna Štochlová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Magdaléna Štochlová**
Osobní číslo: **C16287**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Jaká je úloha mikrobiomu při vzniku, vývoji a léčbě nádorových onemocnění**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu pojednávající o mikrobiomu, jeho úloze v lidském těle. Zaměřte se na spojitost s patofyziologickými procesy v těle, zejména na nádorová onemocnění. Popište molekulární procesy probíhající během vzniku a vývoje nádoru.
2. V hlavní části bakalářské práce se zaměřte na vliv složení lidského mikrobiomu na nádorová onemocnění, ale i na vztah k imunitnímu systému člověka. Popište jednotlivé procesy detailněji na molekulární úrovni. Dále charakterizujte interakce mikrobiomu s dnes používanou terapií, zda může docházet k potlačení, či naopak podpoření léčby. V neposlední řadě pojednejte o konkrétních nádorových chorobách, kde byl prokázán vliv různého složení mikrobiomu na vývoj, progresi či léčbu nádoru.
3. Ke studiu tématiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Eliška Kročová**

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 7. 2019.

.....
Štochlová Magdaléna

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych zejména poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Elišce Zelinkové, za její odborné vedení, připomínky, ochotu, trpělivost a čas.

Velké díky patří mé rodině a příteli, kteří mi dodávali odhodlání k úspěšnému dokončení této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce popisuje úlohu lidského mikrobiomu při vývoji a léčbě nádorových onemocnění. Mikrobiom je soubor všech mikroorganismů. Střevní mikrobiom je nejdůležitější, protože zabezpečuje správné fungování celého lidského organismu. Pomáhá nám trávit a chrání lidský organismus před patogeny. Pokud dochází ke změnám v mikrobiomu, je zvýšená produkce patogenních látek a naruší to imunitní systém, což souvisí s rozvojem onemocnění. Práce popisuje druhy mikrobiomu, roli imunitního systému na mikrobiom a vliv na vznik nádorových onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrobiom, bakterie, imunitní systém, rakovina

TITLE

What is the role of microbiom in the development and therapy of cancer

ANNOTATION

This bachelor thesis describes the role of human microbiome in the development and treatment of cancer. The microbiome is a set of all microorganisms. The intestinal microbiome is the most important because it ensures the proper functioning of the whole human organism. It helps us digest and protect the human body from pathogens. If there are changes in the microbiome, the production of pathogens is increased and the immune system is disrupted, which is related to the development of the disease. This work describes the types of microbiome, the role of immune system on the microbiome and the effect on the development of cancer.

KEY WORDS

Microbiome, bacteria, immune system, cancer

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD	12
1. Charakteristika mikrobiomu	13
1.1. Mezinárodní projekt: Analýza lidského mikrobiomu.....	13
1.2. Viry.....	14
1.3. Bakterie.....	15
1.4. Houby a kvasinky	19
1.5. Prvoci.....	19
1.6. Metody pro vyšetření mikrobiomu	21
2. Funkce mikrobiomu	23
3. Druhy mikrobiomu	23
3.1. Střevní mikrobiom	23
3.1.1. Onemocnění střevního mikrobiomu	24
3.2. Kožní mikrobiom.....	24
3.2.1. Onemocnění kožního mikrobiomu	25
3.2.2. Péče o kožní mikrobiom	26
3.3. Ústní mikrobiom	26
3.3.1. Ústní prostředí.....	26
3.3.2. Onemocnění ústního mikrobiomu	27
3.3.3. Orální mikrobiologické studie	27
3.4. Placentární mikrobiom.....	27
3.4.1. Onemocnění placentárního mikrobiomu	28
3.5. Vaginální mikrobiom.....	29
3.5.1. Onemocnění vaginálního mikrobiomu	30

4.Imunitní systém.....	30
4.1. Imunitní systém a mikrobiom.....	32
4.1.1.Cytokiny.....	32
Interleukin 21	32
Interleukin 22.....	32
Interleukin 23.....	33
Interleukin 17.....	33
4.2. Imunitní systém střevního mikrobiomu.....	34
5. Nádorová onemocnění	36
5.1. Kolorektální karcinom	38
5.1.1.Terapie kolorektálního karcinomu.....	39
5.1.2. Vliv mikrobiomu na kolorektální karcinom	39
5.2. Rakovina prsu	43
5.3. Mikrobiom a imunoterapie nádoru	44
ZÁVĚR	46
SEZNAM LITERATURY	47

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba virové částice

Obrázek 2: Struktura bakteriofága

Obrázek 3: Struktura bakteriální buňky

Obrázek 4: Základní tvary bakterií

Obrázek 5: Stavba buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií

Obrázek 6: Schématická stavba trepky

Obrázek 7: MALDI-TOF hmotnostní spektrometr

Obrázek 8: Stavba lidské kůže

Obrázek 9: Faktory měnící placentární mikrobiom

Obrázek 10: Co všechno může ovlivnit vaginální mikrobiom

Obrázek 11: Orgány imunitního systému

Obrázek 12: Střevní mikrobiom a imunitní systém

Obrázek 13: Incidence a mortalita nádorových onemocnění v ČR 2012

Obrázek 14: Stádia rakoviny tlustého střeva

Obrázek 15: Změny zastoupení bakteriálních druhů v mikroflóře u napadané a zdravé tkáně šesti pacientů

Obrázek 16: Identifikované druhy bakterií u CRC

Obrázek 17: Přehled příznivých a nepříznivých bakterií ve střevním mikrobiomu

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Programy pro screening nádorových onemocnění

SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňky
ATB	antibiotika
CD ⁺	povrchové znaky
CLR	C-lektinový receptor
CRC	kolorektální karcinom
CTLA-4	cytotoxický T-lymfocytový antigen 4
DC	dendritická buňka
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
EBV	virus Epstein-Barrové
GDM	gestační diabetes mellitus
HBV	hepatitida B
HGP	projekt o lidském genomu
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMP	projekt o lidském mikrobiomu
ICI	inhibitory imunitního kontrolního bodu
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
INF- γ	interferon gama
IS	imunitní systém
mAb	monoklonální protilátky
MS	hmotnostní spektrometrie
NK	nukleová kyselina
OMICS	soubor technik analyzující proteom, transkriptom
PAMP	molekulární struktury na povrchu mikroorganismů
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1/PD-L1	receptor programované buněčné smrti
PRR	receptory rozpoznávající molekuly typické pro patogeny
RISA	ribosomální intergenová spacerová analýza
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
Tc	cytotoxický T-lymfocyt
TGF- β	transformující růstový faktor
Th	pomocný T-lymfocyt
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
Treg	regulační T-lymfocyt
UV	ultrafialové záření

ÚVOD

Mnoho mikroorganismů, které obývají lidské tělo, vytvářejí prospěšné vztahy s hostitelem. Tento systém není stabilní a mění se v průběhu života v závislosti na celé řadě faktorů. Všechny tyto mikroorganismy mají velký vliv na lidské zdraví. Ten může být buď pozitivní, kdy mikroorganismy napomáhají metabolismu živin, stimulují imunitní systém a jsou ochranou proti patogenům. Nebo negativní, kdy přítomné mikroorganismy přispívají k rozvoji onemocnění. Mezi nejvýznamnější civilizační onemocnění patří kolorektální karcinom a Crohnova choroba.

90 % bakterií v mikrobiomu pochází z 30-40 nejběžnějších druhů. Nejčastěji jsou to zástupci kmenů *Firmicutes* a *Bacteroides*. Mikrobiom se vyvíjí v průběhu celého života a dá se říci, že nikdy nedojde ke zcela ustálenému stavu. Za určitých podmínek může vzniknout tzv. dysbióza. Ta bývá často spojována se vznikem mnoha nemocí. Patří sem například obezita, alergie a atopický ekzém.

Díky technologii v sekvenování jsme schopni lépe popsat bakteriální diverzitu. Objasnění mechanismů působení faktorů na lidský mikrobiom je zásadní pro prevenci onemocnění. Podstatnou roli hrají také hygienické návyky a prostředí, ve kterém se jedinec nachází. Značné rozdíly v mikrobiomu byly pozorovány v jiných zemích a kontinentech. Stále častější užívání antibiotik vede k zásadním a někdy trvalým změnám mikrobiomu. Hlavním problémem používání antibiotik je dlouhodobá změna střevního mikrobiomu a přenos genů pro antibiotickou rezistenci.

Cílem této práce je shrnutí poznatků o lidském mikrobiomu a jeho dopad na celkové zdraví. Jsou zde zahrnuty druhy mikrobiomů, vliv imunitního systému na mikrobiom a vliv na vznik nádorových onemocnění. Práce je také zaměřena na nejčastější nádorová onemocnění, která se objevují v populaci.

1. Charakteristika mikrobiomu

Naše těla jsou ekosystémy, ve kterých se nachází mikrobiální vesmír. Každý z nás má přibližně 10 bilionů lidských buněk, 100 bilionů bakterií, kvasinek a jednobuněčných prvoků a 1 000 bilionů virů v našem těle a na našem těle (1). Lidské tělo je sídlem pro velké množství komenzálních (nepatogenních) a patogenních mikrobiálních druhů. Tento komplex není stabilní a mění se v průběhu celého našeho života. Změna mikrobiomu je ovlivněna řadou různých faktorů, mezi které patří věk, stravování a léky (antibiotika, probiotika, prebiotika). Může mít pozitivní vliv na celkový metabolismus živin, stimulaci imunitního systému (IS) a ochranu proti patogenům, nebo naopak vliv negativní a způsobit rozvoj onemocnění. Směs těchto bakterií, kvasinek a parazitů je úzce spojena s hmotností daného člověka, jeho duševním zdravím, imunitou, krevním tlakem, diabetem, srdečními chorobami, a dokonce i rakovinou (2).

Vědci nyní považují mikrobiom za důležitou součást našeho těla, která nám pomáhá udržovat zdravý metabolismus. Je-li náš mikrobiom správně udržován, může nás udržet v dobré fyzické a psychické kondici. Ale pokud naše metabolické pochody selhávají, vzniká příliš mnoho volných radikálů a v našem těle vzrůstá zánět, což vede ke špatnému zdraví (1).

1.1. Mezinárodní projekt: Analýza lidského mikrobiomu

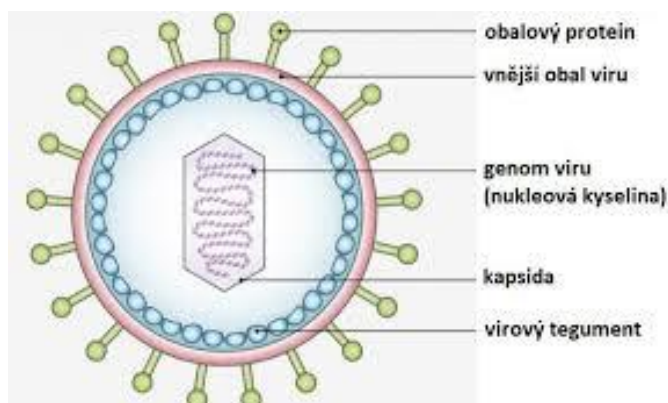
Hlavním cílem projektu „Human Microbiome Project“ (HMP) je pochopit lidské genetické a fyziologické vlastnosti. Důležitý je pojem mikrobiom, jehož faktory ovlivňují vývoj mikroorganismů v našem těle. Projekt poskytl informace, že existuje přes 5000 bakterií na 18 místech lidského těla. HMP je rozšířený po celém světě (USA, Evropa, Asie) a skládá se z několika projektů. Cílem je vyvinout nové technologie a tím předcházet vzniku nemocí lidské populace. Člověk je složen z mikrobiálních a lidských buněk, které tvoří společný genom (3).

V projektu o lidském genomu (HGP) vědci našli cca 100 000 genů, z toho 20 000 genů kódují bílkoviny. Dále zjistili, kolik dalších mikroorganismů vlastně žije uvnitř našeho těla. Mikrobiální komunity žijí například na kůži a na střevní sliznici. Ve výzkumu bylo na skupinách lidí odhaleno sekvence genu s ribozomálními RNA malými podjednotkami 16S bakteriálních komunit, které najdeme na lidském těle uvnitř nebo vně (4).

1.2. Viry

Viry jsou nebuněčné formy organismů a jedná se o struktury mnohem menší a jednodušší než buňky. Jsou to nebuněčné částice o velikosti cca 15-390 nm, které jsou pozorovatelné pouze elektronovým mikroskopem. Virům chybí vlastní metabolismus a rozmnožují se pouze v hostitelské buňce, jsou to tzv. nitrobuněční parazité.

Jednotlivé virové částice (obr. 1) nazýváme viriony. Každý virion je složen z molekuly nukleové kyseliny (DNA, RNA) nesoucí genetickou informaci (genomová nukleová kyselina), která je uložena v bílkovinném plášti tzv. kapsida, která nukleovou kyselinu (NK) chrání a případně zprostředkovává vazbu viru na buněčnou stěnu hostitelské buňky. Komplex NK a kapsidy se nazývá nukleokapsid. Virový tegument neboli slupka (virová matrice) je shluk proteinů, které tvoří prostor mezi obalem a nukleokapsidou. Tyto proteiny napomáhají replikaci virové DNA a aktivují interferony (5).

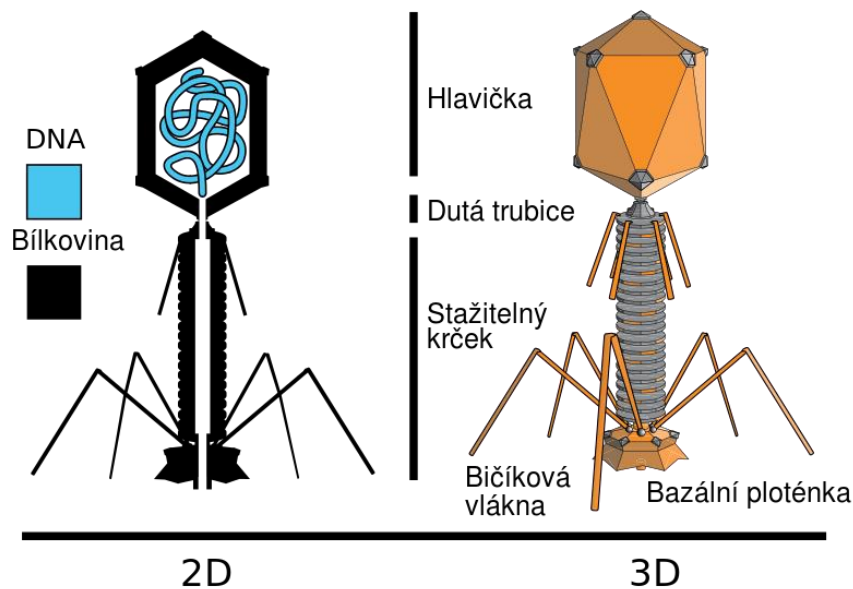


Obr. 1: Stavba virové částice, převzato z (6).

Podle typu genomové NK rozlišujeme RNA a DNA viry. RNA viry obsahují jednovláknovou +RNA, jednovláknovou -RNA nebo dvoušroubovicovou RNA. DNA viry obsahují řetězcovou DNA (ssDNA) nebo dvoušroubovicovou DNA (dsDNA).

Podle hostitele rozlišujeme následující viry:

- Bakteriofágy (obr. 2) – napadají bakterie
- Cyanofágy – napadají sinice
- Fytopatogenní viry – napadají rostliny
- Zoopatogenní viry – napadají živočichy
- Mykoviry – napadají houby

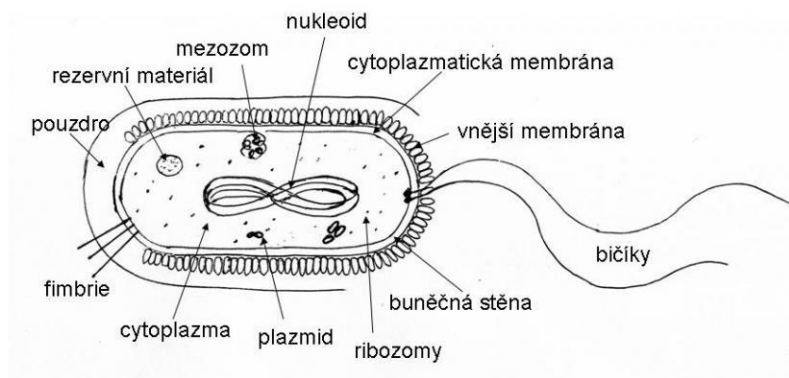


Obr. 2: Struktura bakteriofága, převzato z (7).

Zvláštním typem virů jsou retroviry. Jsou to obalené RNA viry s jednovláknovou NK, které pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepisují svoji genomovou RNA do DNA. Poté následuje syntéza zcela nových virových částic, nebo se DNA viru začlení (inzerce) do chromozomální DNA hostitelské buňky a vzniká provirus. Virus je v této formě neaktivní a jeho genom se při dělení buňky přenáší do dceřiných buněk a je tak dokonale chráněn před imunitním systémem svého hostitele (5).

1.3. Bakterie

Bakterie (obr. 3) jsou jednobuněčné prokaryotické organismy o velikosti 0,3-2 μm . Mají cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu a slizové pouzdro. Dále mají bičíky, které jim umožňují pohyb a fimbrie (pili) lepší přilnutí k různým povrchům. Nukleoid je dvoušroubovicová kruhová molekula DNA, která obsahuje genetickou informaci. Přítomný plazmid je do kruhu stočená malá molekula DNA, která umožňuje pronikat z jedné buňky do druhé. Některé bakterie vytvářejí spory – endospory, tedy klidové stádium, ve kterém bakterie přežívají i při působení negativních vlivů z vnějšího prostředí. V ribozomech probíhá tvorba bílkovin, na kterých probíhá translace, při níž je z řetězce RNA syntetizován polypeptid (5).

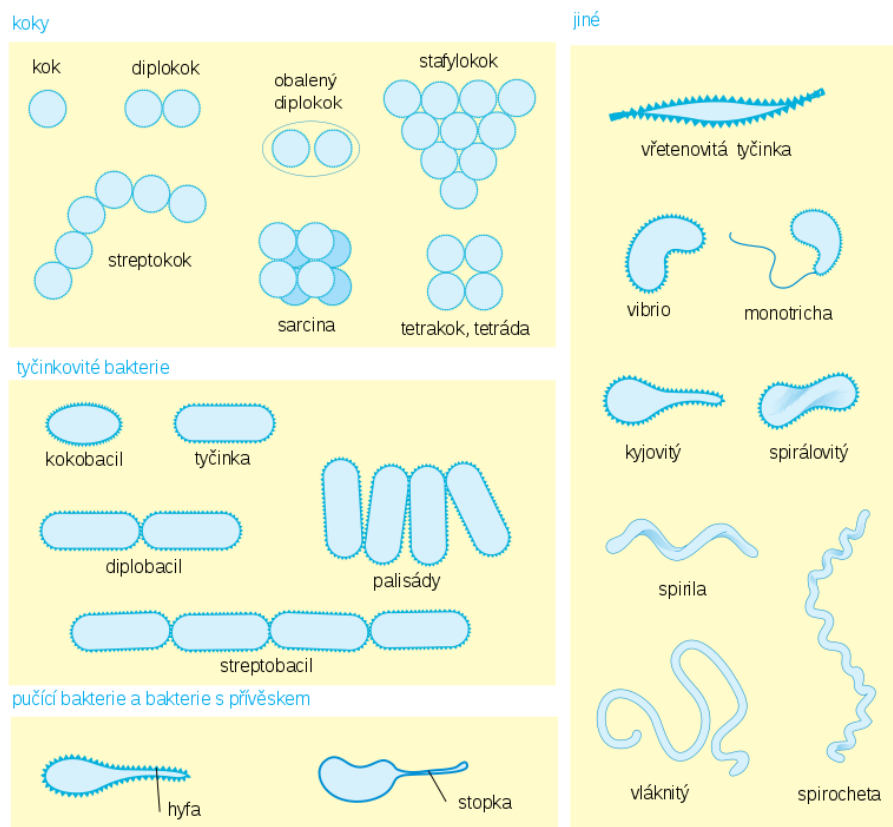


Obr. 3: Struktura bakteriální buňky, převzato z (8).

Bakterie jsou obrovská skupina živých organismů, které jsou klasifikovány pomocí testů založených na sledování DNA, tvaru buněk, požadavku na kyslík a na energetickou potřebu.

Existují různé tvary bakterií (obr. 4) :

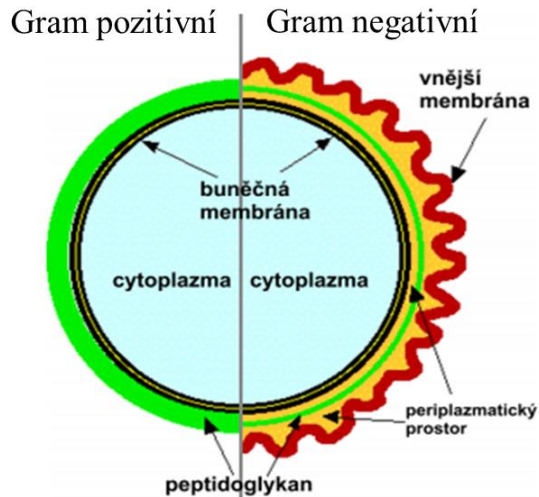
- Kulovité – koky, které mohou tvořit např. dvojice (diplokoky), čtveřice (tetrakoky), řetízky (streptokoky) nebo hroznovité tvary (stafylokoky)
- Tyčinkovité – bacily
- Zakřivené – např. vibria (lehce zakřivené), spirily (zvlněné) nebo spirochety (šroubovicové)



Obr. 4: Základní tvary bakterií, převzato z (9).

Podle stavby buněčné stěny (obr. 5), která ovlivňuje jejich barvitelnost, rozlišujeme grampozitivní a gramnegativní bakterie podle dánského vědce Hanse Christiana Grama – Gramovo barvení. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu (mureinu), po barvení dle Grama zůstávají zbarvené modře a neodbarvují se organickými rozpouštědly.

Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu složenou z tenké vrstvy peptidoglykanu a nad ní je další vrstva složená z fosfolipidů, lipoproteinů a lipopolysacharidů. Díky vysokému podílu lipidů v buněčné stěně je barvivo z buňky vyplavováno organickými rozpouštědly (10).



Obr. 5: Stavba buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií, převzato z (10).

Podle základního mechanismu metabolismu dělíme bakterie na:

- Autotrofní – zdrojem uhlíku je CO_2
- Heterotrofní – získávají uhlík a energii z organických látek

Podle potřeby kyslíku rozlišujeme bakterie:

- Aerobní – k životu nutně potřebují kyslík
- Anaerobní – kyslík nepotřebují
- Fakultativně anaerobní – mohou žít za aerobních i anaerobních podmínek

Podle vztahu k dusíku a jeho sloučeninám rozeznáváme bakterie:

- Nitrogení bakterie – vážou molekulární dusík z půdy a přeměňují ho na organické látky
- Nitrifikační bakterie – aerobní bakterie přeměňují amoniak na dusičnany
- Denitrifikační bakterie – anaerobní bakterie redukují dusičnany na plynný dusík nebo amoniak

Bakterie se rozmnožují nepohlavně většinou příčným dělením. Dochází ke zdvojení chromozomu, buňky se celá protáhne a obě molekuly DNA putují k opačným pólům buňky. Uprostřed buňky se vytvoří přehrádka a dochází k úplnému rozdělení na dvě nové bakteriální buňky.

1.4. Houby a kvasinky

Houby vřeckovýtrusé (Ascomycota) jsou nejpočetnější skupinou hub, která zahrnuje houby mikroskopické i makroskopické. Jsou to převážně saprofyty, ale jsou známy i parazitické druhy. Tvoří kyjovité výtrusnice neboli vřečka. Kromě kvasinek tvoří mycelium a mají velmi dobře vyvinuté článkované podhoubí (hyfy). V přehrádkách jsou jednoduché póry, které umožňují přechod plazmy a jader. Někteří zástupci hub tvoří plodnice, ale někteří sterilní pletivné útvary, které slouží k přežívání (námel).

Buněčná stěna hub je především z chitinu, u kvasinek z glukanu a mannanu. U kvasinek probíhá pučení. Dceřiné buňky se od mateřské oddělí nebo zůstávají pohromadě a tvoří řetízky – nepravá podhoubí tzv. pseudomycelia. Kvasinky jsou součástí půdní mikroflóry. Žijí často na povrchu i uvnitř těl rostlin a živočichů. Kvasinky rodu *Candida* žijí přirozeně na sliznicích, v trávicím traktu nebo na kůži člověka. Při svém přemnožení (při oslabení imunity) mohou způsobit místní onemocnění zvané kandidóza projevující se tvorbou bílých povlaků (např. v ústech). V důsledku poškození vaginální mikroflóry může dojít k přemnožení *Candida* a rozvoji tzv. mykotické vulvovaginitidy. Účastní se kvasných (fermentačních) procesů, při kterých jsou rozloženy cukry za vzniku alkoholu a oxidu uhličitého (např. kvasinka pивní *Saccharomyces cerevisiae*). Tzv. kulturní kvasinka je využívána k výrobě lihu, v pivovarnictví, v lékařství (obsahuje enzymy a vitamíny skupiny B). Kvasinka vinná (*Saccharomyces elipsoideus*) způsobuje kvašení ovocných šťáv. Kulturní kmeny jsou využívány při zkvašování moštu (šťávy z vinných hroznů) na víno.

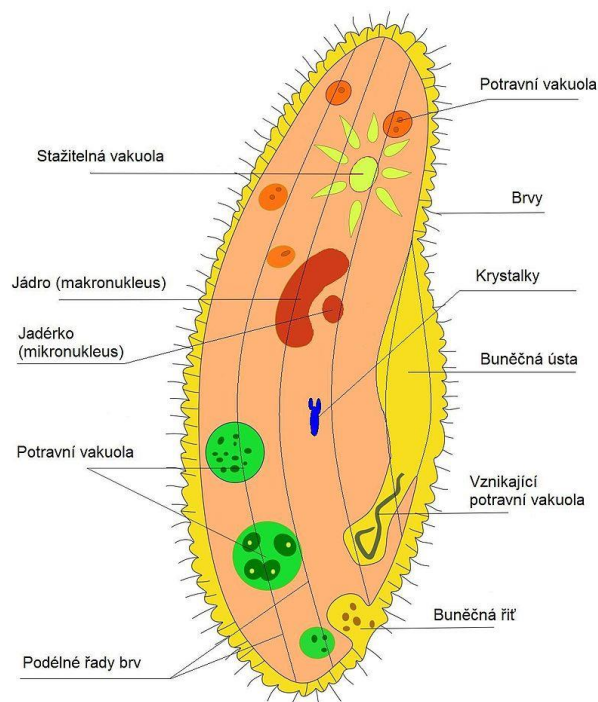
1.5. Prvoci

Prvoci tvoří různorodou skupinu eukaryotních organismů, které nelze zařadit mezi rostliny, houby ani živočichy. Nejčastěji dosahují rozměrů od 0,005 do 0,05 mm, ale jsou běžné i formy do velikosti 0,5 mm. Prvoci jsou většinou jednobuněčné organismy, ale patří sem i koloniální a mnohobuněčné organismy. Prvoci mají schopnost přežít v nejrůznějším prostředí a získávat živiny různým způsobem. Mohou se žít autotrofně (fotosyntetizující krásnoočka) i heterotrofně. Mezi prvoky najdeme konzumenty I. řádu (živící se např. řasami), konzumenty II. řádu (dravé prvoky), dekompozitory (živící se odumřelou organickou hmotou), organismy žijící v symbióze

nebo paraziticky. Žijí ve slaných a sladkých vodách, v půdě nebo cizopasí v těle mnohobuněčných organismů.

U jednobuněčných prvoků tvoří tělo jedna eukaryotická buňka obsahující všechny pro ni typické struktury (obr. 6):

Na povrchu je cytoplazmatická membrána, která může mít různou tloušťku (tenká, dvojitá, trojitá). Pokud je tvořena mikrotubuly nazývá se kortex (pelikula) a u mnohých skupin prvoků produkuje také schránku. Cytoplazma je tekuté prostředí buňky zahrnující všechny buněčné organely. Jádro (nukleus) je nejdůležitější organelou, která obsahuje DNA a dochází v něm také k syntéze RNA. Jádro může být jedno (většina prvoků) nebo i dvě (makronukleus a mikronukleus). Mitochondrie jsou dvojvrstvé organely, které poskytují energii pro životní pochody v buňce. Golgiho aparát je tubulózni organela, která zabezpečuje sekreční činnost buňky. Fagozom je potravní vakuola, která vzniká vlečením buněčné membrány do cytoplazmy a splývá s lyzozomem, který je naplněný trávicími enzymy. Pulzující vakuoly vylučují nadbytečnou vodu a regulují osmotický tlak v buňce. Mikrotubuly mají oporně-pohybovou funkci; jsou základem bičíků a brv a podílejí se i na stavbě pelikuly a mitotického vřeténka (11).



Obr. 6: Schématická stavba trepky, převzato z (12).

Někteří zástupci mají specializované orgány, např.:

- Pelikulu, pancíře, schránky a cysty sloužící pro oporu a ochranu
- Bičíky, panožky, brvy k pohybu
- Trávicí vakuoly, buněčná ústa - cytostom, buněčný hltan - cytopharynx, buněčná řiť – cytopyge sloužící k trávení
- Stigma (červeně zbarvené tělísko reagující na světelné podráždění), brvy a bičíky s hmatovou funkcí jako smyslové orgány

1.6. Metody pro vyšetření mikrobiomu

Nejdůležitější je mít reprodukovatelný a reprezentativní vzorek buněk mikrobiomu pro sekvenování. Pro identifikaci mikrobiální komunity je nutno znát obsah genu, genovou expresi a metabolismus. Je zapotřebí používat citlivé analyzátory, aby dokázaly rozluštit i složení lidského mikrobiomu. Jedním z nich je například hmotnostní spektrometr. Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda analytické chemie, která pracuje na principu dělení poměru hmotnosti m a náboje z . Používá se pro určení hmotnosti částic, či stanovení elementárního složení vzorku nebo molekuly, a pro objasnění chemické struktury molekul, jakou jsou například peptidy aj. Princip MS je založen na ionizaci chemických sloučenin, tvorbě nabitých molekul nebo fragmentů. Metoda má kvalitativní i kvantitativní využití. Určí nám kvantitu směsi ve vzorku a přítomné ionty. Velmi rychlá je identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (obr. 7) (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem). Metoda je velice přesná a aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů. MALDI-TOF MS dokáže rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a kmenové úrovni. Jejich přesné stanovení může sloužit pro monitoring životního prostředí, zpracování potravin a klinickou diagnostiku, kde je důležité zjištění přítomnosti patogenních organismů (13).



Obr. 7: MALDI-TOF hmotnostní spektrometr, převzato z (14).

Dále se v mikrobiologii používá přístroj na počítání buněk a plně automatický mikroskopický systém optimalizovaný pro zobrazování živých buněk. Velmi se využívá i fluorescenční mikroskop. Mezi další techniky patří denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a polymerázová řetězová reakce (PCR).

DGGE je velmi citlivá technika pro vyhledávání mutací. Důležitá je rychlost denaturace DNA a počet vodíkových můstků. Řetězce se budou lépe oddělovat v místech, kde je hodně AT (adenin-thymin) párů než na místech s CG (cytosin-guanin), které jsou stabilnější. Používá se polyakrylamidový gel. Vyšetřovaná DNA putuje v elektrickém poli rychlostí, která odpovídá molekulové hmotnosti. Vznikají denaturovaná vlákna. Citlivost DGGE se blíží 100 %.

PCR je metoda rychlého a snadného zmnožení specifického úseku DNA. Reakce pracuje na principu replikace nukleových kyselin. Části DNA, které se mají namnožit (amplifikovat) musí být ohraničeny tzv. primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. PCR slouží k vytvoření mnoha milionů kopií, což umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého vzorku. K syntéze nového vlákna se používá termostabilní DNA polymeráza bakterie *Thermus aquaticus* – Taq polymeráza. Reakce probíhá v termocykleru, který umožňuje nastavení teploty. Výsledkem PCR je obrovské množství kopií původní sekvence DNA. Metoda je velmi citlivá a přesná.

Orální mikrobiologické studie se zaměřují na bakteriální infekce pomocí techniky OMICS, kam patří např. metagenomika, metaproteomika, spektrální

zobrazovací fluorescence a *in situ* hybridizace. OMICS umožňuje studium komplexních interakcí mezi bakteriemi a rozpozná potenciální patogeny (15).

2. Funkce mikrobiomu

Funkce a složení lidského mikrobiomu se liší u každého jednotlivce. Složení mikrobiomu je odlišné ve střevech, na kůži, v ústech a v dýchacích cestách. Každé místo v těle má svůj originální mikrobiom, proto je odlišná struktura a funkce.

Nejrozsáhlejší střevní mikrobiom tvoří mikrobiální bariéru proti patogenům a potenciálním patogenům, dále vytváří produkty mikroflóry, které mají vliv na prokrvení střevní mukózy a motilitu. Další funkcí je stimulace imunitního systému, redukce bakteriální translokace a produkce vitamínů.

3. Druhy mikrobiomu

3.1. Střevní mikrobiom

Gastrointestinální trakt lidí obsahuje mikrobiální komunity, které se od sebe liší např. funkcí, složením, pohlavím, věkem a stravou. Vyskytují se na různých místech gastrointestinálního traktu, kde mají specifické metabolické funkce (16). Nejvíce mikroorganismů v gastrointestinálním traktu žije v tlustém střevě. Střevní mikrobiom obsahuje přibližně 3×10^{13} bakterií (17). Mezi významné fylogenetické druhy patří *Firmicutes* (třídy *Clostridia*, *Bacilli* a *Mollicutes*) a *Bacteroides* (18). Střevní mikrobiom interaguje s epitelovými buňkami a stromálními buňkami, aby vykonávaly různé životně důležité regulační funkce. Například může regulovat bariérovou funkci, udržovat slizniční imunitní homeostázu, symbiózu hostitele, prevenci před infekcemi, kontrolovat nadměrný růst patologických organismů a regulovat organismus, včetně syntézy vitamínů a nestravitelné vlákniny (19).

Mnohočetné fyziologické funkce mohou být ovlivněny mikroorganismy, zejména metabolismus a imunita (20). Když je střevní mikro-ekologický systém změněný, některé komenzální bakterie mohou rychle proliferovat a získávat patogenní rysy jako pathobionty, včetně *Clostridium difficile* nebo vankomycin rezistentní *Enterococcus* (21). Důležitá je rovnováha, označovaná jako eubióza – normální střevní mikroflóra. Bohatý a různorodý mikrobiom může zlepšit adaptivní imunitní odpověď dítěte na různé vakcíny (22). Naopak porucha rovnováhy, zvaná dysbióza, může vést ke

zničení rovnováhy ve střevním mikrobiomu. Nerovnováhu způsobí například snížená diverzita, relativní nestabilita mikrobiomu a potenciální akumulace patogenů (23). Například u slizniční bariéry je narušena lokální i systémová imunitní reakce a zánětlivý stav nastane lokálně v celém těle (24).

Nadměrná čistota a množství užívaných antibiotik nebo jiných léků může poškodit střevní mikrobiom a může se zvýšit i riziko vzniku alergie a autoimunity. Mluvíme o „hypotéze hygieny“.

3.1.1. Onemocnění střevního mikrobiomu

Mezi nejvýznamnější civilizační onemocnění patří obezita, kolorektální karcinom (CRC), Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Crohnova choroba a ulcerózní kolitida se uvádějí pod společným názvem idiopatické střevní záněty a není znám přesný důvod jejich vzniku. Tato onemocnění mohou vznikat při změnách střevního mikrobiomu, např. když se zvýší množství určitých druhů mikroorganismů nebo naopak jejich nepřítomností. Následkem pak dochází k nadbytečné produkci škodlivých látek, toxinů nebo k mechanickému poškození sliznice a vzniku zánětů. Crohnova nemoc popisuje vrozenou i adaptivní imunitní odpověď (25).

Pacienti s chronickým zánětlivým onemocněním střev stále čekají na patogenetický význam a léčebné možnosti pro toto onemocnění. Probiotika by nám mohla zlepšit fungování mikrobiomu hlavně v oblasti gastrointestinálního traktu (25).

Velký vliv na mikrobiom mají i potraviny, kterými se bakterie živí. Někteří lidé nedostatečně přijímají potravu, tudíž u nich dochází k nevratné ztrátě některých druhů potřebných bakterií (26). Střevní mikrobiom nabývá významu i při vývoji karcinomů.

3.2. Kožní mikrobiom

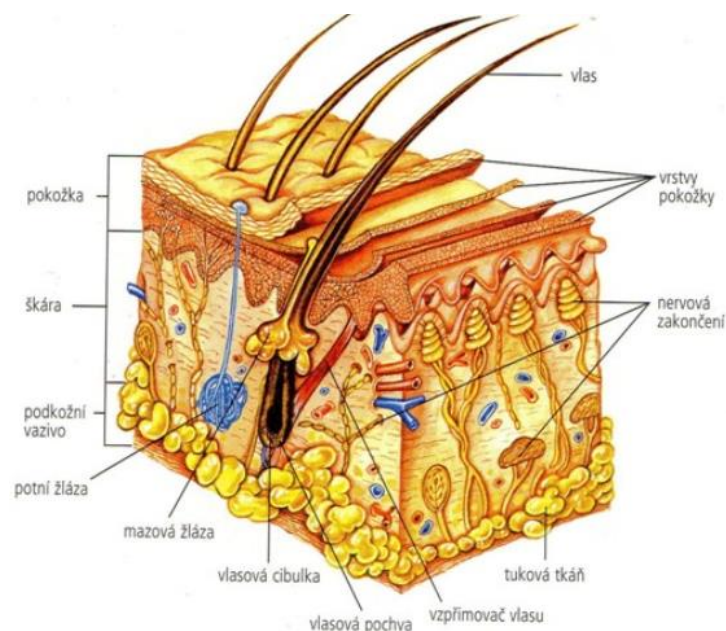
Naším největším orgánem je kůže (obr. 8), která má na svém povrchu neuvěřitelných 1000 různých druhů bakterií a až 80 druhů hub (27). Většina z nich je neškodná a pro člověka prospěšná. Kolonizace bakterií na kůži je ovlivněna povrchem kůže a jejími vrstvami. Rozmanitost bakterií záleží na barvě pleti, rase, pohlaví, věku a na zeměpisné poloze (28). Mikrobiom kůže se mění v závislosti na množství světla, zda je kůže vlhká, suchá, chlupatá nebo mastná. Nejhojnějším kmenem na kůži je kmen *Actinobacteria*. *Staphylococcus epidermidis* a *Propionibacterium acnes* nejvíce osidlují epitelie a mazové folikuly. Kolonie *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus* jsou zodpovědné za tvorbu akné a znečištění pórů. Mezi další obyvatele kůže patří *Streptococcus* a *Candida albicans*, kteří mohou sídlit i ve střevním mikrobiomu.

Kožní mikrobiom je pod kontrolou lokálního imunitního systému, který je modulován střevním mikrobiomem (29).

V roce 2013 byly identifikovány mikroby až v podkožní tukové vrstvě. Podkožní vazivo je vrstva kůže pod škárou, která obsahuje tukové buňky jako zásobárnu energie a jsou v nich rozpuštěny vitamíny. Hlavní funkcí je izolace a ochrana svalů. Podkožní tuková vrstva určuje tvar a hmotnost celého těla a u žen bývá silnější. Probíhá zde nejintimnější komunikace mezi mikrobiomem a imunitním systémem. To chrání kůži před infekcí a zánětem. Mikrobiom kůže preferuje kyselé prostředí (pH okolo 5). Imunitní systém chrání kožní mikrobiom antimikrobiálními peptidy – katelicidin (29).

Mikrobiom dětské kůže se podílí na toleranci a snižuje výskyt autoimunitních onemocnění v pozdějším věku. Některá antibiotika mohou ale tuto toleranci poškodit.

Mikrobiom také pomáhá při hojení ran, omezuje expozici alergenů a UV záření, minimalizuje oxidační poškození a udržuje pleť vlhkou a kyprou.



Obr. 8: Stavba lidské kůže, převzato z (30).

3.2.1. Onemocnění kožního mikrobiomu

Jedním z hlavních onemocnění kožního mikrobiomu je atopická dermatitida. Jde o chronický zánětlivý stav kůže, kterým trpí mnoho dětí a dospělých často spojený s odlupováním a svěděním pokožky hlavy (28).

3.2.2. Péče o kožní mikrobiom

Časté používání antimikrobiálních ručních dezinfekčních prostředků a mýdel přispívá ke kožní dysbióze a k rezistenci na antibiotika. Kožní dysbióza je spojována s mnoha chorobami – lupénka, alergie, ekzémy, kontaktní dermatitida, akné, špatné hojení ran, kožní vředy, lupy, kvasinky a plísňové infekce a urychlené stárnutí kůže.

Dokonce i mýdlo nám může poškodit mikrobiom kůže a přinést kožní problémy, protože je alkalizující (má pH okolo 10). Pomáhá nám odstranit nečistoty a bakterie. Kůže ale preferuje pH okolo 5.

Ruční dezinfekční prostředky, lokální steroidy a interní léky (antibiotika, perorální steroidy, blokátory kyselin a nesteroidní léky proti bolesti) mohou také přímo nebo nepřímo poškodit mikrobiom kůže. A když dojde k narušení střevního mikrobiomu nebo imunitního systému, bude pravděpodobně také ovlivněn mikrobiom kůže. Mezi další škodlivé látky patří například parabeny, ftaláty a sulfity (28).

3.3. Ústní mikrobiom

Ústní mikrobiom zahrnuje více než 700 druhů bakterií a celou řadu virů. Bakterie a viry žijí společně a interagují v biofilmech pro udržení homeostázy nebo pro vyvolání onemocnění (31). Bakterie se vyšetřují hlavně ze sliznice, mandlí, patra, jazyka a zubního plaku. Na vzniku zubního kazu se nejvíce podílejí gramnegativní anaerobní bakterie, například *Treponema denticola* a *Prevotella intermedia* (32). Zubní kaz a periodontitida úzce souvisí s dysbiózou mikrobiálních orálních biofilmů, což ovlivňuje neutrální pH v zubním kazu, prostředí bohaté na bílkoviny a alkalické pH při periodontálním onemocnění (33). Roli hrají také neznámé druhy bakterií, které nám způsobují různé infekce v dutině ústní.

3.3.1. Ústní prostředí

Ústní dutina je vlhká a teplá (35-37°C) a proto je vhodná pro růst široké škály mikroorganismů. Poskytuje hojný a trvalý přísun živin pro mikrobiální růst (slinné proteiny a glykoproteiny, sacharidy) (34).

Ústní dutina novorozence je typicky sterilní. Hned po narození se ústní dutina stává hlavním vstupem pro mikroorganismy do lidského těla. Tyto mikroorganismy jsou získávány z porodního kanálu, z mateřské kůže, ze vzduchu, z potravin, vody a jiných tekutin. Sliny jsou hlavní cestou mikrobiálního přenosu.

Hlavními druhy jsou orální bakterie - *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* a *Streptococcus oralis*. I gramnegativní anaeroby - *Prevotella melaninogenica*,

Fusobacterium nucleatum a *Veillonella sp.* *Streptococcus mutans* a *Str. sanguinis* se připojují k tvrdým zubním tkáním a zahajují vývoj a zrání biofilmu v dutině ústní (35).

3.3.2. Onemocnění ústního mikrobiomu

Nejčastějším onemocněním dutiny ústní je neošetřený zubní kaz a periodontitida – zánět ozubice (36). Ústní choroby jsou často spojeny s různými faktory - jako je dieta, kouření, konzumace alkoholu, špatná hygiena a stres.

3.3.3. Orální mikrobiologické studie

Nedávné molekulární studie odhalily rozmanité spektrum hub jako potenciálních ústních rezidentů (37). *Candida* je nejvíce běžně pěstovanou a studovanou houbou a zejména druh *Candida albicans*, byl jednoznačně spojen s orální kandidózou. Nicméně úloha *C. albicans* při onemocnění periodontitidy je nejasná. Mezi hojně studovanou houbu patří i *Saccharomyces cerevisiae*.

Genom mikroorganismu dosud není z perorálních vzorků kultivován v laboratoři. Kultivace může být náročná, protože kvasinky mají specifické požadavky na živiny, zatímco jiné mohou být inhibovány v kultivačním médiu (38). Samotné mikroorganismy lze kultivovat ihned v laboratoři.

3.4. Placentární mikrobiom

Placenta není sterilní orgán, ale má vlastní endogenní mikrobiom. Složení placentárního mikrobiomu je odlišné od vagíny a podobá se perorálnímu mikrobiomu. Složení ovlivňuje výsledky těhotenství, které mohou přinášet i těhotenské komplikace. Ve srovnání se střevním mikrobiomem vykazuje omezenou mikrobiální diverzitu. Pro zlepšení výsledků těhotenství se vyvíjejí nová léčiva (39).

Rovnováha mikrobů se mění po celý život a hlavně v těhotenství (40). V těhotenství ženy byla identifikována mikrobiální nika v placentě, která je složená z nepatogenních kmenů. Patří sem například *Firmicutes*, *Proteobacterie*, *Bacteroides* a *Fusobacteria* (41). Převládajícím druhem je však *Fusobacterium nucleatum* a byla zde nalezena i *Escherichia coli*. Mikroorganismy jsou přítomny v plodové vodě, pupečnickové krvi a v placentě, to vysvětluje, že se dostanou až k plodu (42).

Děti narozené vaginálně mají bohatší střevní mikrobiom, stejně jako vaginální mikrobiom jejich matky, zatímco děti narozené císařským řezem mají dostatek komensálních bakterií, včetně druhů produkujících kyselinu mléčnou (43). To vysvětluje, proč děti narozené císařským řezem jsou více náchylnější k nemocem, jako

je diabetes mellitus (DM) I. typu, celiakie, astma nebo obezita. Kojené děti jsou obohaceny druhem *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zatímco uměle krmené děti přijímají *Enterokoky*, *Bacteroides*, *Clostridia* a *Streptokoky* (44).

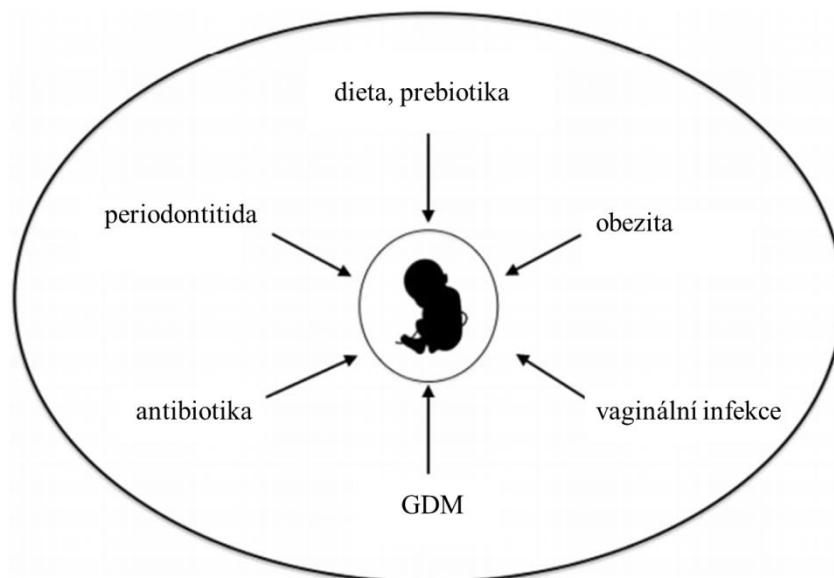
Vaginální mikrobiota demonstruje obohacení členů řádů *Lactobacilliales*, *Clostridiales*, *Bacteroidales* a *Actinomycetales*. To podporuje úlohu mikrobů v prevenci předčasného porodu. Těhotná i nesterilní děloha obsahuje množství DNA z rodů *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Gardnerella* a *Prevotella* (45).

Existují důkazy o přenosu bakterií od matky k plodu, který je částečně nezávislý na způsobu podání. Při předčasném porodu se z vyšetření placentárního mikrobiomu vykultivovaly *Burkholderia* sp., *Alphaproteobacteria*, *Actinomycetales* a smíšené nekultivovatelné anaeroby (46).

3.4.1. Onemocnění placentárního mikrobiomu

Chorioamnionitida je spojena s vyšším výskytem *Streptococcus agalactiae*, *Fusobacterium nucleatum* a *Ureaplasma parvum* (47). Častější je zvýšený zánět choriové plotny spojený se specifickými druhy, včetně *Prevotella bivia*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Peptostreptococcus magnus*, *Streptococcus* sp. a genitální mykoplazmy (48). Genitální mykoplazmy a *Streptococcus agalactiae* jsou často izolované bakterie v případě předčasného prasknutí membrán (49).

Mezi faktory měnící placentární mikrobiom (obr. 9) patří obezita matek, gestační diabetes mellitus (GDM) a antibiotika. Obezita matky způsobuje zánět placenty. Ženy s GDM vykazují snížený výskyt řádu *Pseudomonadales* a *Acinetobacter*, dále nižší expresi protizánětlivého interleukinu (IL) 10. Antibiotika (ATB) zhoršují vývoj mikrobiomu plodu (50).

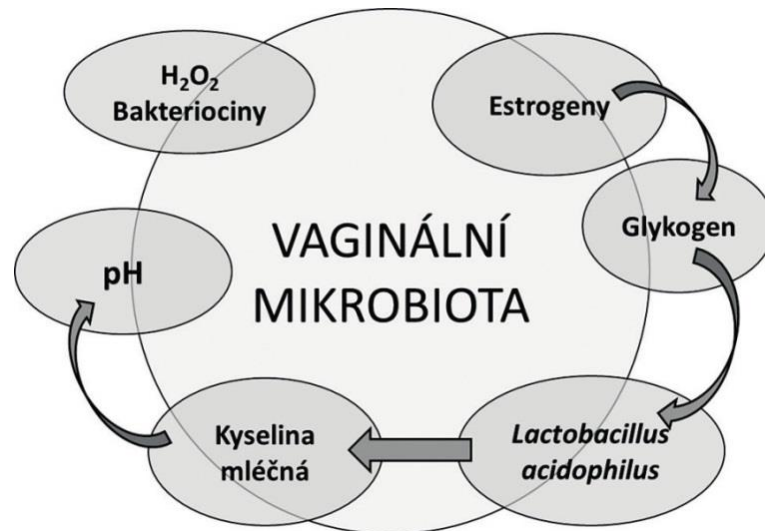


Obr. 9: Faktory měnící složení placentárního mikrobiomu, převzato z (51).

3.5. Vaginální mikrobiom

Vagina se skládá z bilionu mikroorganismů. Každý savec je jedinečný a tak není divu, že se liší i jejich vaginální mikrobiom. Jiný je u žen, nehumánních primátů a laboratorních zvířat (myši, krysy, králíci). Vaginální mikrobiom osidluje vaginu, děložní krček a poševní vchod (52). Vagina má nízké pH díky sekreci kyseliny mléčné. Studie odhalila, že vagina má víc než 200 fylogentypů, kde nejvíce převažují *Firmicutes* (*Lactobacillus*), *Bacteroides*, *Actinobacteria* a *Fusobacteria* (53). Primární kolonizační bakterie vaginy se nazývá *Lactobacillus* a napomáhá udržovat kyselé prostředí vaginy, odrazuje ostatní bakterie, kvasinky, viry a udržuje správnou produkci hlenu. Ovšem ale ne všechny typy *Lactobacillů* jsou dobré. Ženy, které dominantní *Lactobacillus* nemají, jsou také vystaveny riziku pohlavního onemocnění včetně kvasinkové vaginózy a onemocnění pánve (54).

Vaginální prostředí ovlivňují hormony (estrogeny), glykogen, *Lactobacillus acidophilus*, kyselina mléčná a pH (obr. 10). I sexuální aktivita, sperma, hormonální antikoncepce, menstruace nebo antibiotika mohou změnit složení vaginálního mikrobiomu. Antibiotika mohou eliminovat vliv *Lactobacillů* a tak dávají šanci jiným bakteriím, které nejsou vítány. Nerovnováha bakterií narušuje mikrobiom, což může vést ke kvasinkové vaginóze (přerůstání hub, *Candida*) (54).



Obr. 10: Co všechno může ovlivnit vaginální mikrobim, převzato z (55).

3.5.1. Onemocnění vaginálního mikrobiomu

Lactobacillus, *Gardnella vaginalis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella sp.*, *Ureaplasma* a *Mycoplasma* – všechny tyto bakterie mohou způsobit bakteriální vaginózu. Bakteriální vaginózou trpí miliony žen a může vyvolat předčasný porod či pomoci získat sexuálně přenosné infekce, kam patří například HIV, kapavka a syfilis. Ženy mohou být i neplodné nebo u nich dojde ke spontánnímu potratu. Ženy se zánětlivým onemocněním pánve, které se obvykle vyskytují, když se pohlavně přenosné bakterie šíří z pochvy do dělohy, vejcovodů nebo vaječníků jsou více ohroženy neplodností (54).

4. Imunitní systém

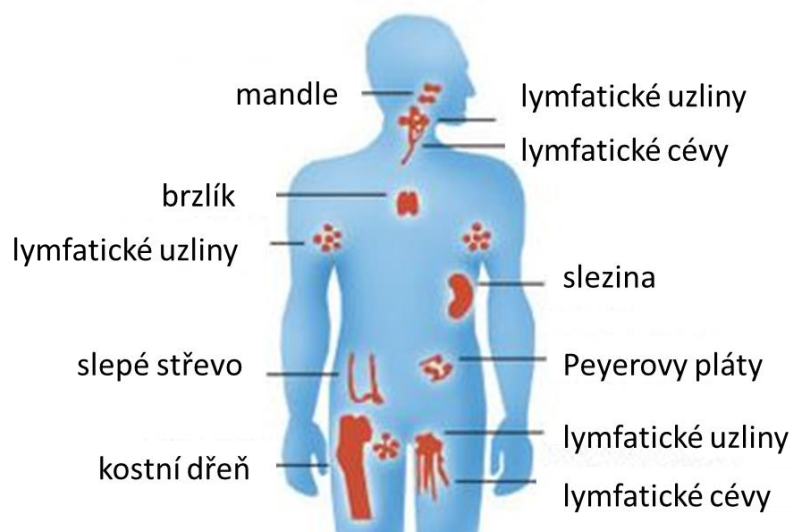
Imunita je schopnost organismu chránit své vnitřní prostředí a neporušenost svých buněk a tkání proti vnějším vlivům (např. mikroorganismy). Cizorodé látky schopné vyvolat v organismu imunitní odpověď nazýváme antigeny.

Rozlišujeme imunitu nespecifickou (přirozenou), která je vrozená a dochází zde k přirozeným reakcím organismu. Reakce nevyžadují předchozí kontakt s antigenem, je to např. schopnost monocytů fagocytovat choroboplodné mikroorganismy. Další je imunita specifická (získaná), kde se vyskytuje schopnost specificky reagovat na přítomnost antigenu, je vázána na funkci T- a B lymfocytům a výsledkem je tvorba specifických protilátek nebo buněk schopných reagovat s antigenem, který jejich tvorbu vyvolal. Vznikají buňky s imunologickou pamětí, tzn. se zvýšenou schopností reakce na stejný antigenní podnět.

Imunizace je proces umělého navození imunity. Existuje aktivní a pasivní imunizace. Při aktivní imunizaci se do organismu vpravuje antigen a organismus si sám vytváří proti němu protilátky, např. při prevenci infekčních chorob očkováním. Jinak je tomu u pasivní imunizace, kdy se do organismu vpravují izolované protilátky nebo sérum obsahující protilátky proti antigenu, vůči kterému je nutné navodit imunitu okamžitě.

B-lymfocyty zajišťují látkovou (humorální) imunitu – vyrábějí protilátky. Tvoří asi 15 % populace lymfocytů. Působením antigenu se transformují v imunoblasty, jejichž proliferací (dělením) vznikají plasmatické a paměťové buňky. Některé B-lymfocyty se při styku s antigenem přemění na paměťové buňky, které zajistí velmi rychlou odpověď při opakovaném styku organismu s daným antigenem. Toho se využívá při očkování.

T-lymfocyty dozrávají v brzlíku (obr. 11). Jsou to imunokompetentní buňky důležité pro rozběhnutí imunitní reakce. Zajišťují buněčnou imunitu, stimulují B-lymfocyty k práci a ničí buňky cizorodých tkání (transplantované) i pozměněné buňky vlastního těla (nádorové, napadené viry). T-lymfocyty se dělí do tří skupin. Cytotoxické T-lymfocyty (Tc) likvidují buňky s antigeny nebo buňky transplantovaných orgánů. Pomocné T-lymfocyty (Th), které vylučují cytokiny a stimulují leukocyty a dále se dělí na Th1 a Th2. Poslední jsou regulační T-lymfocyty (Treg), které mají schopnost imunosuprese – potlačují imunitu (56).



Obr. 11: Orgány imunitního systému, převzato z (57).

4.3. Imunitní systém a mikrobiom

4.3.1. Cytokiny

Cytokiny jsou kritickými mediátory imunitních odpovědí ve zdraví a nemoci. Pro i protizánětlivé cytokiny se objevily v nádorové tvorbě. Patří mezi ně TNF, TGF- β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23 a jejich rodiny. Tyto cytokiny formují složení střevní mikroflóry a jejich exprese či sekrece jsou regulovány působením komenzálních a patogenních bakterií. Na druhou stranu zánětlivé cytokiny působí (přímo nebo nepřímo) na transformované buňky epitelu, které slouží k regulaci přežití a jejich proliferaci (58).

Interleukin 21

IL-21 rozšiřuje Th2 funkci a podporuje vývoj B buněk (59). IL-21 je také produkován Th17 a působí autokrinním způsobem, aby se zvýšila jejich diferenciací (60). Exprese IL-21 je zvýšena u pacientů s CRC, což naznačuje potenciál pro tumorigenní úlohy. Studie pracující s myším modelem ukázala, že IL-21 podporuje rozvoj CRC související se zánětem. Myši bez IL-21 vykazovaly sníženou kolitidu a sníženou tvorbu nádorů tlustého střeva. Ablace IL-21 vedla ke zvýšené expresi IFN γ a snížení hladiny IL-6 a IL-17 v nádorech tlustého střeva, v souladu s protinádorovou úlohou IFN γ a rolí IL-6 a IL-17 podporující nádor střeva (61). IL-21 tedy slouží hlavně jako promotor zánětu asociovaného s nádorem, což vede k rozvoji sporadických a kolitidou spojených CRC.

Interleukin 22

IL-22 patří do skupiny cytokinů IL-10 a je důležitý v antimikrobiální obraně a při opravách střevního epitelu (62). IL-22 podporuje vývoj CRC aktivací proteinu STAT3 (signální transduktor a aktivátor transkripce 3) v nádorových buňkách (63). Exprese IL-22 je zvýšena u lidské ulcerózní kolitidy a CAC. Pacienti s chemorezistentním CRC mají vyšší hladiny IL-22 (64). IL-22 je produkován hlavně CD4⁺ Th17 / Th22 - buňkami, které migrují do mikroprostředí nádoru tlustého střeva. IL-22 je exprimován ve vysokých hladinách dendritickými buňkami ve zdravém tlustém střevě. IL-22 odvozený od vrozených lymfoidních buněk podporuje rozvoj zánětu tlustého střeva a rakoviny. IL-22 přímo signalizuje transformovaným enterocytům, aby podpořil rozvoj rakoviny (65).

Interleukin 23

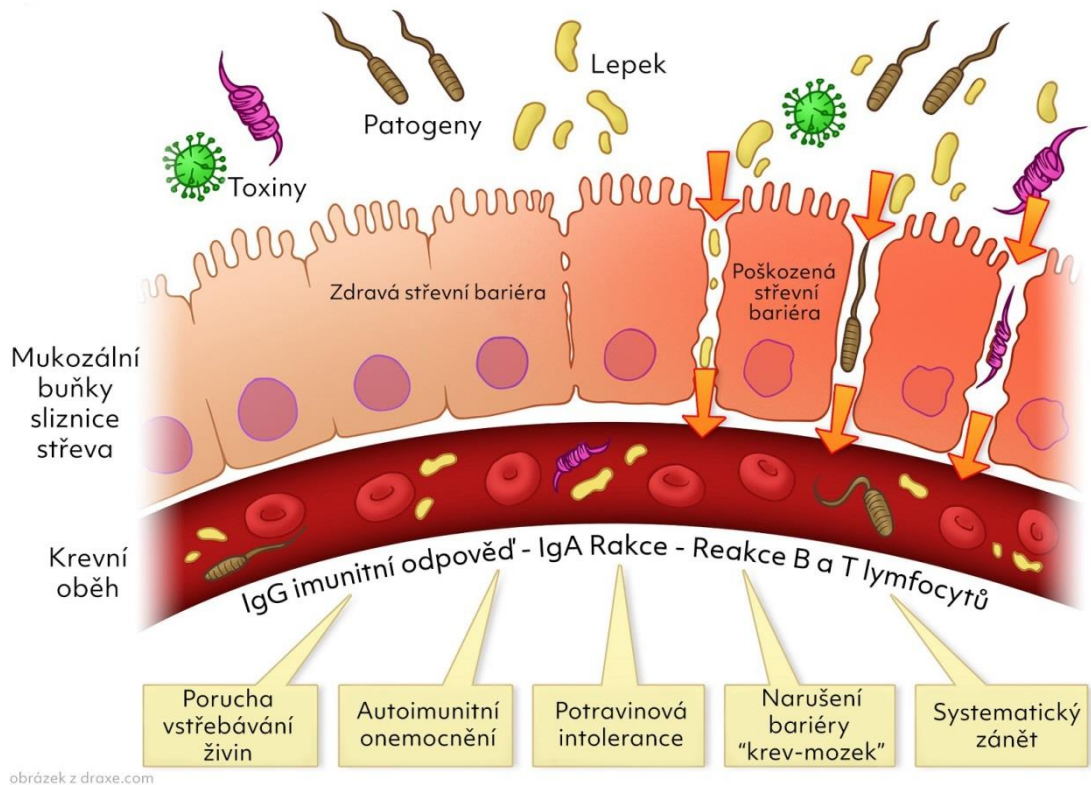
IL-23 je heterodimerní cytokin složený z p19 a p40 podjednotek (66). IL-23 se váže na komplex heterodimerních receptorů obsahující IL-23R a IL-12R β 1 a aktivuje STAT3 a další signální cesty (66). IL-23 je produkován aktivovanými makrofágy M1 v odezvě na zapojení receptorů podobných Toll (67). Prostřednictvím regulace IL-17 a jeho příbuzných cytokinů IL-23 silně podporuje zánětlivé reakce během patogenní infekce, poškozené tkáně, regenerace a vývoje rakoviny. U IL-23 se ukázalo, že podporuje rozvoj rakoviny kůže indukcí exprese IL-17 a snížení infiltrace CD8⁺ T buněk do nádorů (68). V tlustém střevě sporadický vývoj kolorektálních adenomů je spojen s dramaticky upregulovanými hladinami IL-23 v nádorových lézích. Hlavní místa exprese IL-23 v kolorektálních nádorech jsou na CD11⁺ a nádorových makrofázích. IL-23 receptor není exprimován na nádorových buňkách, proto IL-23 hlavně signalizuje imunitním buňkám infiltrujícím nádor, aby podpořil zánět vyvolaný rakovinou. Kontrola nádorové exprese IL-17 a ablace IL-17 členů nebo receptorů také inhibovaly vývoj nádoru (69).

Interleukin 17

V lidském CRC, zvýšené hladiny exprese IL-23, receptoru IL-23, a IL-17A byly spojeny s nepříznivými prognózami a rychlou progresí k metastatickému onemocnění (70). Signalizace IL-17 podporuje zánět, který je v průběhu rakoviny. V tlustém střevě IL-17 podporuje chronický zánět, který řídí rozvoj CRC. Infekce enterotoxigenní *Bacteroides fragilis* spouští kolitidu a urychluje vývoj nádoru, který je závislý na indukci IL-17A (71). Další studie ukázaly, že genetická ablace IL-17A nebo IL-17F vede ke zmírnění sporadického střevního tumoru. Cílená ablace IL-17A v buňkách epitelu tlustého střeva vedla k výraznému snížení tumorigeneze tlustého střeva, což ukazuje na přímý onkogenní mechanismus IL-17 v CRC (72). IL-17 také nepřímo přispívá k aktivaci STAT3 v nádorových buňkách, částečně zvýšením produkce IL-6. IL-17 je kritický pro raný vývoj CRC. Kromě IL-17A i IL-17C podporuje rozvoj CRC. IL-17 funguje i jako terapeutické činidlo pro pacienty s CRC. Signalizace IL-17 do nádorových buněk také zvyšuje úroveň PD-L1 v těchto buňkách, což podporuje jejich rezistenci ke zničení imunitního systému. IL-17 přitahuje infiltraci myeloidních buněk do nádorů a akumuluje supresorové buňky, které inhibují aktivitu protinádorové imunity (73).

4.2. Imunitní systém střevního mikrobiomu

Střeva lidí hostí různorodou komunitu bakterií, které hrají klíčovou úlohu v modulaci metabolismu hostitele a imunity (74). Střevní sliznice obsahuje jednu epitelovou buněčnou vrstvu, která je složená ze střevních epiteliálních buněk a intraepiteliálních lymfocytů (obr. 12). Tato jedinečná struktura podporuje interakci s imunitním systémem. Pohárkové buňky vylučují mucin, který se rozpouští ve vodě a tím vytváří hlen (mucus). Ve velkém množství se nachází na sliznicích a ve slinách, kde usnadňuje polykání a chrání ústa před poškozením. Lamina propria je pojivová tkáň, která je umístěna pod slizniční vrstvou. Peyerovy pláty (plaky) jsou organizovanou lymfoidní tkání tenkého střeva a tvořící slizniční imunitní systém. Mezi buňky imunitního systému patří buňky prezentující antigen (APC), vrozené lymfoidní buňky, T a B buňky. Lamina propria je největší složka imunitního systému *in vivo* a hraje kritickou roli v lokální a systémové imunitní reakci. Lokální imunita je usnadněna rozpoznáváním molekul asociovaných s patogenem (PAMP), rozpoznávaných receptorem (PRR), který zahrnuje receptorové kinázy, toll-like receptory (TLR) a C-lectinové receptory (CLR). Také lokální imunitní reakce mohou být ovlivněny metabolity generovanými bakteriemi, především produkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). V mnoha klíčových činnostech, bylo prokázáno, že SCFA by mohla zlepšit imunitu v důsledku produkce imunoglobulin A (IgA) plazmatickými buňkami (75).



Obr. 12: Střevní mikrobiom a imunitní systém, převzato z (76).

Systémové imunitní reakce mohou být navíc formovány mikrobiomem zprostředkovanou imunitní aktivací. Dendritické buňky (DC) patří mezi nejúčinnější antigen prezentující buňky a jsou spojovacím článkem mezi specifickou a nespecifickou imunitou. Mají antigeny z komensální bakterie v mezenterických lymfatických uzlinách střeva, B buněk a T buněk, včetně buněk Treg a Th17, mohou cestovat po celém těle a podporovat imunitní reakce proti vzdáleným identickým antigenům nebo proti jiným antigenům křížovou reakcí s podobnými epitopy (77).

5. Nádorová onemocnění

Nádor je soubor buněk rostoucí samostatně bez řízení organismu. Je nutné krevní zásobení a hormonální vlivy. Mezi morfologické znaky patří zvětšování orgánu, výrůstky, nehojící se vřed nebo zatvrdlina. Nádor se od okolí odlišuje barvou, konzistencí a povrchem. Epitelové nádory bývají šedobílé, mezenchymové růžové. Nádory dělíme dle postižené tkáně na mezenchymální, epitelové, neuroektodermové a embryonální nádory. Mezenchymální nádory vznikají z mezenchymu. Patří sem nádory vaziva, cév, krevních buněk, tukových a svalových buněk. Do epitelových patří nádory krycího, povrchového a žláзовého epitelu. Neuroektodermové nádory poškozují centrální nervovou soustavu, periferní nervy a melanocyty. Do embryonálních nádorů patří germinální a orgánově specifické. Nepravé tumory přezdíváme pseudotumory. Pravé tumory dělíme na benigní a maligní. Benigní (nezhoubné) nádory jsou schopné se diferencovat v buňky morfologicky i funkčně podobné buňkám, z kterých benigní nádor vzniká. Nemají tendenci metastázovat, ale růst je omezený a mohou omezovat okolní tkáň. Lidem s těmito nádory nezpůsobuje závažná onemocnění. Dají se dobře chirurgicky odstranit. Intermediární nádory jsou na pomezí mezi zhoubnými a nezhoubnými nádory, mohou tvořit metastázy. Maligní (zhoubné) nádory svým nekontrolovatelným růstem ničí okolní tkáň a tvoří metastázy. Velmi obtížně se určuje hranice nádoru. Mezenchymové nádory jsou nazývány sarkomy a epitelové nádory jsou označovány jako karcinomy. Problematikou nádorů a jejich diagnózou se zabývá onkologie (78).

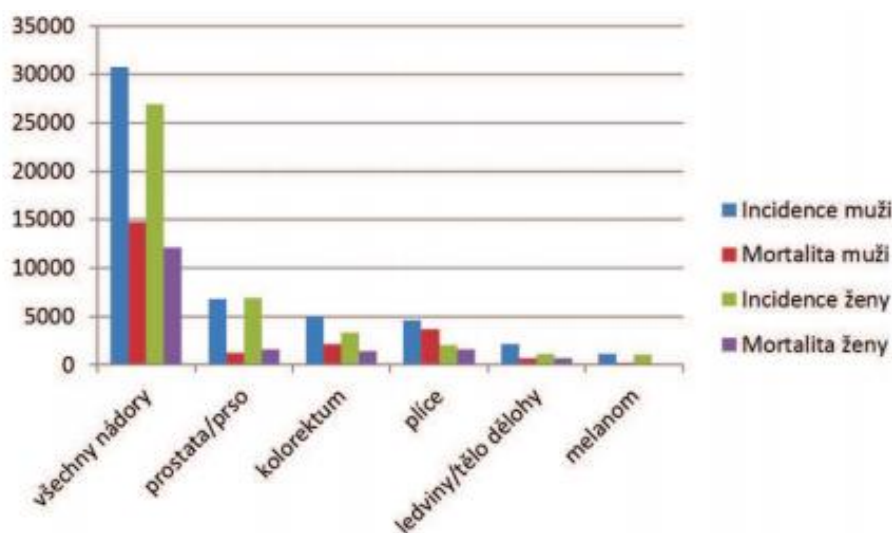
Mezi příčiny nádorového růstu patří fyzikální (ionizující záření), chemické (polycyklické uhlovodíky, azobarviva, aflatoxiny) a biologické faktory (HBV, EBV). Ze životního stylu ovlivňuje nádorový růst kouření, nezdravá výživa, nedostatečný pohyb a zvýšená konzumace alkoholu.

Molekulární podstatou vzniku nádorů je mutace DNA. Dochází k ní účinkem různých výše zmíněných faktorů. Onkogenní účinek má mutace, která zasáhne některý gen spadající do skupiny protoonkogenů (stimulují růst), tumor supresorových genů (potlačují nádorový růst) nebo do mutátorových genů (opravy DNA). Na vzniku nádorů se podílí i genetická predispozice. Pravděpodobnost nádorové transformace roste s věkem v důsledku genomových změn souvisejících s buněčným stárnutím (78).

Zhoubné nádory jsou na celém světě jednou z nejčastějších nemocí a také příčinou smrti. Polovina všech pacientů s nádorovým onemocněním na tuto nemoc zemře. Primární prevence má ovlivnit výskyt nemoci a sekundární znamená časný

záchyt onemocnění, čímž dojde ke snížení úmrtnosti a ke zlepšení prognózy pacientů (79). Cílem je zastavení tohoto neustálého vzestupného trendu, na kterém se pravděpodobně podílí nejen stárnutí populace, životní styl a expozice karcinogenních látek v životním prostředí, ale i stále se zlepšující diagnostika nádorových onemocnění, zahrnující screeningové vyšetřovací metody. Čím dříve se podaří onemocnění zachytit, tím efektivnější je léčba a její výsledky. Poslední tzv. čtvrtá stádia nádorových onemocnění již vyléčit nelze (80).

I v České republice jsou zhoubná nádorová onemocnění nepříznivým trendem (obr. 13). V roce 2010 bylo u nás hlášeno 82 606 nových nádorových onemocnění, což je oproti roku 2006 nárůst o 10 693 nově diagnostikovaných onkologických onemocnění. Mezi nově nahlášená nádorová onemocnění patřila zejména rakovina kůže, která tvořila 24 % ze všech nově nahlášených. Mezi nádorová onemocnění kůže patřil spinocelulární a bazocelulární karcinom (80).



Obr. 13: Incidence a mortalita nejčastějších nádorových onemocnění v České republice v roce 2012, převzato z (81).

V současné době máme v České republice tři screeningové programy: screening karcinomu prsu (mamografie), screening děložního čípku (vyšetření u gynekologa s cytologickým vyšetřením) a screening tlustého střeva (vyšetření na skrytá krvácení) (tab. 1) (82).

Tab. 1: Programy pro screening nádorových onemocnění dle Rady EU a jejich dostupnost v ČR, převzato z (83).

Preventivní program	Cílová populace	Screeningová metoda
program screeningu karcinomu prsu	ženy ve věku od 45 let	mamografické vyšetření 1x za 2 roky
program screeningu kolorektálního karcinomu	muži a ženy ve věku do 50 let	50-54 let věku – test na okultní krvácení 1x ročně od 55 let věku – test na okultní krvácení 1x za 2 roky nebo primární screeningová kolonoskopie 1x za 10 let
program screeningu karcinomu děložního čípku	ženy ve věku od 15 let	cytologické vyšetření stěru z hrdla děložního 1x ročně

Screening je metoda sekundární prevence k vyhledávání onemocnění v časném stádiu, kdy se onemocnění neprojevuje žádnými příznaky. Screening se provádí, pokud je v dané populaci přiměřeně vysoké riziko daného onemocnění, například v určité věkové skupině. Screeningová metoda musí být levná, nenáročná a citlivá, protože vyšetřením procházejí tisíce osob. Jsou známé další screeningové programy – např. kolorektální, mamografický a cervikální (84).

Ze statistiky za období 1985 až 2010 vyplývá, že nejčastější příčinou úmrtí u mužů je karcinom plic, prostaty a tlustého střeva, a u žen karcinom prsu, plic a tlustého střeva (85). Znalost rizikových faktorů, včasná diagnostika, aktivní prevence a zlepšování kvality života nás může eliminovat od nádorových onemocnění. Dále je nezbytná prevence onemocnění a efektivní léčba.

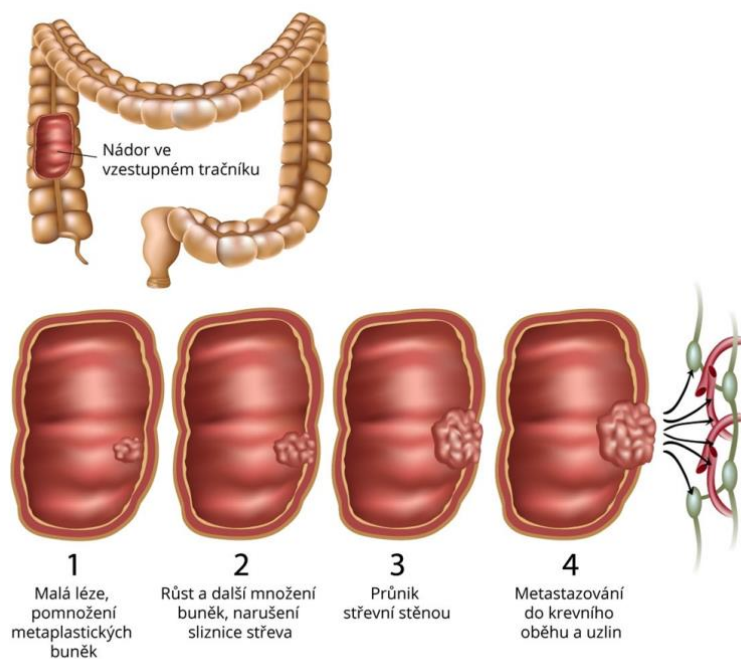
5.1. Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (obr. 14) neboli rakovina tlustého střeva je třetí nejčastěji diagnostikovanou rakovinou u žen a mužů. Postihuje distální část střeva, ale může napadat i proximální. Epidemiologické studie prokazují, že vznik kolorektálního karcinomu souvisí mj. se stravovacími zvyklostmi a špatným životním stylem (86). Převaha masa a živočišných tuků s nedostatkem vlákniny vede k relativnímu poklesu množství laktobacilů a bifidobakterií, ale především k růstu bakteriálních enzymů, jejichž produkty mohou fungovat jako mutageny a karcinogeny, resp. nádorové promotory. K těmto enzymům patří především beta-glukuronidáza, beta-glukosidáza, beta-galaktosidáza, nitroreduktáza a azoreduktáza (86). V patogenezi kolorektálního karcinomu sehrávají důležitou úlohu fekální steroidy, jak to prokázala studie Owena a

kol. (87). U nemocných s kolorektálním karcinomem byly zjištěny velké rozdíly v obsahu žlučových kyselin u zdravých kontrol a nemocných s kolorektálním karcinomem. Litocholová kyselina a ursodeoxycholová kyselina byly abnormální u 72 % nemocných s kolorektálním karcinomem oproti pouze 25 % zdravých kontrol.

5.3.1. Terapie kolorektálního karcinomu

Několik studií s podáním laktobacilové suplementace ukázalo následné drastické snížení beta-glukuronidázy. MacFarlane a Cummings (88) poukázali v experimentu na zvířeti, že bifidobakterie redukuje tračnickovou karcinogenezi indukovanou 1,2-dimethylhydralazinem. Stejní autoři upozorňují na schopnost laktobacilů degradovat nitrosaminy jako jeden z potravních kancerogenů. Nepochybně pozitivní je vliv laktulózy na hladinu fekálních steroidů a bifidobakteriální suplementace (89).



Obr. 14: Stádia rakoviny tlustého střeva, převzato z (90).

5.1.2. Vliv mikrobiomu na kolorektální karcinom

Lidský intestinální trakt obsahuje asi 10¹⁴ bakterií, obsahující 103 druhů, které jsou nezbytné pro trávení potravy a pro kontrolu intestinální epiteliální homeostázy střeva (91). CRC je spojen s bakteriálními infekcemi např. *Streptococcus bovis* (92) a *Clostridium septicum* (93). Nicméně incidence těchto infekcí s CRC je velmi nízká (cca 1%). Sérologická data ukázala zvýšenou expozici *Streptococcus bovis* s antigeny v raných stádiích CRC pacientů bez klinických příznaků bakteriální infekce (94). To

znamena, že specifické střevní bakterie mají v CRC konkurenční výhodu mikroprostředí, zatímco oportunní infekce přetrvávají aktivně v imunitním systému u pacientů. Potenciálně patogenní *Enterobacteria* byly nedostatečně zastoupeny v nádorové tkáni. Nedávné publikace poskytly mechanistický důkaz zapojení střevních bakterií do vývoje CRC, které zahrnují a) tvorbu superoxidových radikálů poškozujících DNA, b) produkci genotoxinů, c) indukci T-pomocných buněk závislou na T pomocných buňkách buněčné proliferace, d) indukci prokarcinogenních cest zprostředkovanou receptorem Toll (95).

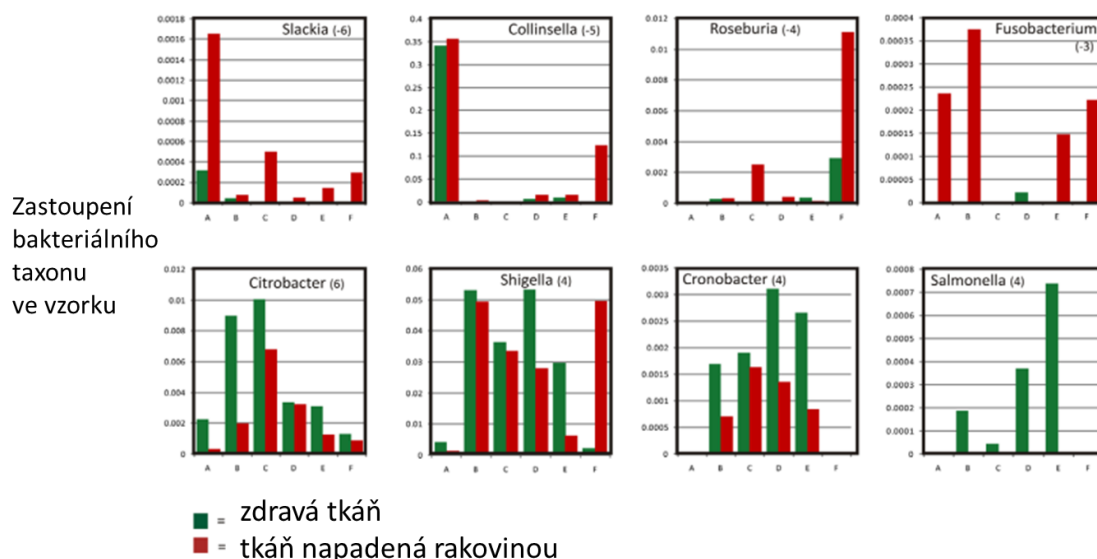
Šest pacientů z Nizozemska podstoupilo resekci tlustého střeva s adenokarcinomem. Po resekci byly vzorky tlustého střeva důkladně opláchnuty sterilní vodou, které vyšetřil onkologický patolog. Z každého vzorku tlustého střeva byl odebrán vzorek na biopsii z místa nádoru a ze sousední nezhoubné tkáně na lumenální straně stěny tlustého střeva. Vzorky tkáně byly narušeny mechanicky stříhem, po kterém byla extrahována celková DNA. Všechny vzorky byly skladovány při -80°C až do použití. K analýze bylo použito pyrosekvenování bakteriální rRNA k porovnání mikrobiomu CRC. Pacienti byli poučeni písemným informovaným souhlasem o sběru vzorků a jejich další analýze (95).

Vyšetření bylo provedeno denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DDGE) a ribozomální intergenovou spacerovou analýzou (RISA). Metoda RISA je založena na PCR amplifikaci oblastí rRNA operonu *rrl* mezi geny pro malou 16S a velkou 23S podjednotkou zvanou „intergenic spacer“ region. Použité primery využívají konservativních oblastí genů 16S a 23S.

Koloniální bakterie jsou totožné na všech přilehlých místech u zdravých pacientů. Data ukázala obecné tendence více *Bacteroides* a méně *Firmicutes* v nádorové tkáni ve srovnání se sliznicí mimo nádor. Nicméně, jak lze očekávat, pozorované změny mikrobiomu prokázaly vysokou míru variability mezi pacienty a v některých případech jsou i v rozporu s obecnou tendencí. Ačkoli infekce *S. bovis* nebo *C. septicum* mají známé klinické asociace s CRC, je jen velmi málo sekvencí mapováno rRNA těchto dvou druhů a není žádná spolehlivá kolonizace CRC na pozorované tkáni. To lze vysvětlit skutečností, že tyto oportunistické patogeny jsou převážně přítomny v přechodném období stádia adenomu CRC (95).

CRC tkáň byla konzistentně spojena s nadměrným zastoupením podtřídy *Roseburia*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium* a *Coriobacteridae*, zejména rodů *Slackia*

a *Collinsella*, které lze považovat za střevní komenzály (obr. 15). Na druhé straně, členové *Enterobacteriaceae*, jako je *Citrobacter*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Kluyvera*, *Serratia* a *Salmonella spp.* byly v CRC tkáni nedostatečně zastoupeny. Tyto bakterie jsou součástí zdravé tkáně u pacientů s rakovinou. Kromě toho několik kmenů *Enterobacteria* produkují genotoxiny poškozující DNA (96) a mohou tak aktivně přispívat k hromadění mutací, které charakterizují sekvenci adenokarcinomu CRC (97).

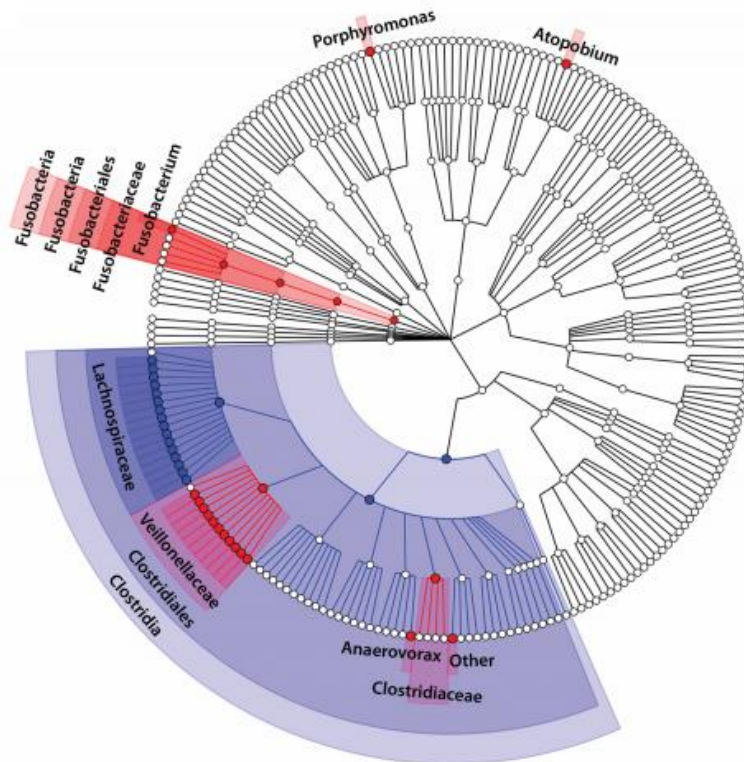


Obr. 15 : Změny zastoupení bakteriálních druhů v mikroflóře u napadené a zdravé tkáně u šesti pacientů (A-F), převzato z (98).

Nakonec ze studie vyplynuly dramaticky odlišné mikrobiomy ve tkáni CRC a sousedních maligních sliznic. Zjistilo se, že žádné konzistentní nadměrné zastoupení potenciálně patogenních bakterií ve tkáni CRC nehrozí. Variabilita v mikrobiomech u různých pacientů je pozorována a odráží mikroprostředí v CRC (99), což má za následek výskyt různých tříd střevních druhů.

Další studie testovala, zda fekální mutageny byly spojeny s CRC. Pacienti podepsali písemný informovaný souhlas, dodržovali dietu a poskytovali 2x denně vzorky stolice, které byly lyofilizovány. Lyofilizace je vynikající pro dlouhodobou ochranu DNA. Směs se skladovala při -40°C . Následně DNA izolovali z fekálních vzorků. Díky tomu jsou validovány vysoce rizikové a nízkorizikové bakteriální

populace. Mají nový poznatek o éře kolorektálního karcinomu a jeho vývoji v nádorové biologii a mikrobiologii. Pomáhá to k diagnostice a k terapeutickým účelům (100).



Obr. 16 : Identifikované druhy bakterií vyskytující se u CRC červeně, kontroly modře, převzato z (101).

Grampozitivní *Clostridie Coprococcus* (obr. 16) účinně fermentují vlákninu a jiné komplexní butyráty, hlavní metabolity tlustého střeva a mohou inhibovat zánět tlustého střeva a karcinogenezi (102). Také *Clostridie* může být méně hojná v nádorech než v sousední normální tkáni (103). Gram-negativní, anaerobní *Fusobacterium* přispívá ke kolitidě, periodontálnímu onemocnění (104) a k samotné rakovině tlustého střeva (105). *Atopobium*, grampozitivní anaerobní bakterie, je spojena s Crohnovou chorobou a inhibuje apoptózu rakovinu tlustého střeva in vitro (106). *Porphyromonas*, běžně se vyskytující v ústní a gastrointestinální dutině, je spojen s perorálním periodontálním onemocněním (107). Zvýšená rizika CRC byla potvrzena kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Zjistilo se, že riziko CRC je spojeno se sníženou diverzitou bakterií.

5.2. Rakovina prsu

Mammakarcinom neboli rakovina prsu je maligní nádorové onemocnění prsu, postihující ve většině případů ženy. Muži tvoří cca 1 % postižených. Mezi rizikové faktory patří alkohol, nevhodná strava, výskyt v rodině, genetické mutace, menstruace a přechod, ozáření prsu či obezita. Nejčastějšími příznaky nádorů prsu jsou okem či pohmatem patrné změny prsu a často oteklé lymfatické uzliny v podpaží. Velmi důležité je pravidelné samovyšetřování prsu, které umožní zachytit změny prsu a navštívit včas lékaře.

Rakovina prsu je možná nejvíce studovaná malignita v ČR a ve světě. Asi 1,7 milionu žen byla v roce 2012 diagnostikována rakovina prsu. Souhra mezi prostředím a geny pomáhá identifikovat, co je skutečně nebezpečné. Ženy se chrání pravidelnou návštěvou mamografu, kde pomáhá i následný screening. Každá pacientka by si sama měla rozhodnout, jakou léčbu chce podstoupit, zda pomalou nebo rychlou.

Rakovina prsu postihuje ženy a jejich incidence a úmrtnost v budoucnosti opět výrazně vzroste. V roce 2006 měly rakovinu prsu nejvíce ženy ve věku 45 let. Tato rakovina se jeví jako heterogenní a má potenciálně agresivní a biologické vlastnosti. V poslední době je zájem výzkumníků přitahován rakovinou prsu u mladých žen. Ženy se dělí na kategorie – 35 let, 40 let a 45 let. Ženám s premenopauzálním karcinomem prsu je okolo 40 let (108). Významný pokrok pro karcinom prsu má HER2 pozitivní, který je příčinou u 20 % všech pacientů. Proti tomu pomáhá rozvoj monoklonální protilátky antiHER2, kterou je transtuzumab emtasin, který likviduje metastázy (109).

Častěji se u mladých žen vyskytují karcinomy endometria I. typu. Vznikají z hyperplazie endometria – mutace v genu PTEN a K-ras (110). Bodové mutace byly pozorovány v genech TP53 a PIK3CA u 25 % případů. Studie prováděla analýzu 100 nádorů prsu a zjistila, že gravidita na tuto rakovinu nemá vliv a tudíž nenašli žádné rozdíly. Pouze 5 % pacientů mělo mutaci TP53. V této studii byly pozorovány mutace zárodečné linie mutace BRCA1/2. Tyto byly nejsilnější a představovali až 40 % familiárního karcinomu prsu (111). BRCA1 a BRCA2 jsou také zapojeny do rakoviny vaječníků, což zvyšuje riziko výskytu mutací.

V USA je každý rok cca 10 000 žen ve věku 40 let diagnostikována rakovina prsu (4-5 %). Na západě jsou 4 % žen s rakovinou prsu ve věku 35 let. Východ uvádí 13 % žen s diagnózou rakoviny prsu ve věku 40 let. U takhle mladých žen je nádor agresivnější. Navíc vědci se domnívají, že účinnost hormonální terapie je u mladých žen významně nižší (111).

3 340 žen se zúčastnilo další analýzy. Zjistilo se, že 7 % žen s karcinomem prsu mělo BRCA1 mutaci a postižené lymfatické uzliny. Průměrný věk u této mutace byl 41,9 let. Ženám se tvoří i metastázy v kostech (112).

Jsou k dispozici testy jako například Oncotype Dx, Mammaprint, Endopredict, Breast Cancer Index. Tyto testy jsou v klinické praxi využívány s velkým úspěchem. Rakovina prsu se léčí operací, chemoterapií a radioterapií. Lékaři se snaží minimalizovat vedlejší účinky a zlepšit celkovou míru přežití (112).

Zejména komplexnost a heterogenita genetických mutací mezi pacienty, nebo kódování a nekódování DNA a RNA jsou nezbytné pro pochopení, prevenci a léčení rakoviny. Hlavní výzvou pro vědecké účely je jak předpovědět terapeutickou rezistenci a jak vybrat ideální kombinaci terapeutických činidel pro každého pacienta, aby se zlepšilo přežití. Důležité je pochopit rozmanitost – heterogenitu, která ovlivňuje funkci genomu a regulaci genové exprese (113).

5.3. Mikrobiom a imunoterapie nádoru

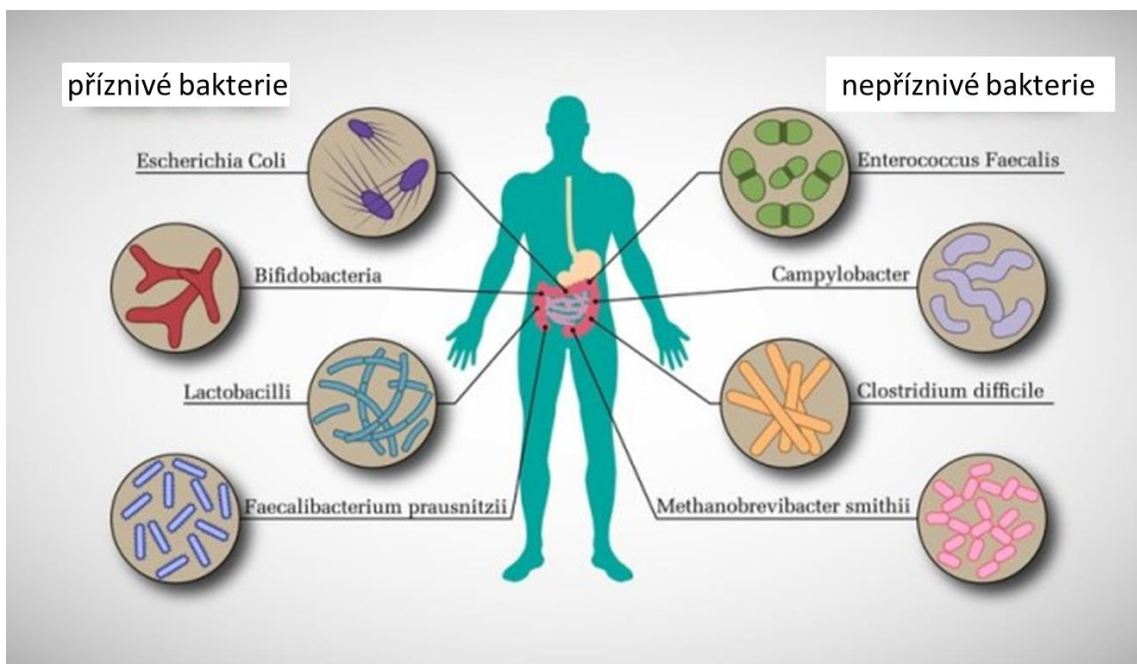
Hromadné důkazy potvrzují, že střevní mikrobiom hraje významnou roli v léčbě rakoviny. Má hluboký vliv na imunitní systém a imunoterapie se ukázala jako slibný způsob léčby pacientů s rakovinou (114).

Mikrobiom využívá imunitního systému, aby sám působil protinádorově. Inhibitory imunitního kontrolního bodu (ICI), jako nové imunoterapeutické látky, přinesly slibné klinické výsledky u pokročilých hematologických malignit, o čemž svědčí monoklonální protilátky (mAb) blokující cytotoxický T-lymfocytový antigen-4 (CTLA-4) a receptor na povrchu buněk, který se řadí mezi tzv. kontrolní body (checkpoints) imunitního systému (PD-1 / PD-L1). PD-1 je transmembránový glykoprotein typu I patřící do velké imunoglobulinové rodiny proteinů CD28/B7. Obecně tato dráha chrání organismus před vznikem autoimunitních onemocnění, ale může se podílet na navození nádorové tolerance. Zvýšená aktivita inhibiční PD-1/PD-L1 dráhy může vyvolat funkční postižení efektorových T-lymfocytů a tím jejich vyčerpání. K této T lymfocytární dysfunkci může docházet při nádorovém onemocnění nebo při dlouhodobé infekci. Typickým znakem je zvýšená exprese PD-1 (115).

Existence nepříznivých bakterií ve střevě (obr. 17) může negativně ovlivnit účinnost imunoterapie. V současné době antibiotika mohou být použita k odstranění škodlivých bakterií, ale mohou také představovat určitá rizika včetně dysbiózy způsobené nedostatkem specifity. Prebiotika by měla usnadnit kolonizaci a relativní

expansi konkrétních bakterií, což může být prospěšné na protinádorovou imunitu. Kombinace prebiotik a specifických bakterií tvoří synbiotika. *Bifidobacteria spp.*, *Akkermansia muciniphilia*, *E. hirae* a *Bacteroides spp* jsou považovány za příznivé bakterie, které mohou účinně zlepšit protinádorovou imunitu a lépe kontrolovat růst nádoru *in vivo* (116). Střevní mikrobiom pacientů s kolorektálním karcinomem může způsobit dysplazie, tvorby polypů a tumorigenezi (116).

Mikrobiom může na jedné straně poskytovat toxické metabolity nebo karcinogenní produkty přímo jako látky transformující rakovinu. Na druhé straně může nepřímo hrát roli při podpoře vyvolání zánětu nebo imunosuprese (117).



Obr. 17: Přehled příznivých a nepříznivých bakterií ve střevním mikrobiomu, převzato z (118).

ZÁVĚR

V dnešní době se hodně setkáváme s výzkumy zabývající se strukturou střevního mikrobiomu. Většina bakterií vyskytující se v lidském mikrobiomu je nekultivovatelných a musí se použít metody metagenomické, které využívají sekvenování DNA.

Střevní mikrobiom je důležitým pomocníkem pro metabolismus živin, ale je také nedílnou součástí modulace imunitního systému. První mikroorganismy se v dětském střevě vyskytují již v průběhu těhotenství, ale k největší bakteriální kolonizaci však dochází až při samotném porodu. Závisí tedy na způsobu porodu a také zda se dítě narodí v termínu či předčasně. Mezi zásadní faktory ovlivňující strukturu a vlastnosti mikrobiomu patří léky (antibiotika), probiotika, strava, vnější prostředí a hygienické návyky jedince. Ve většině případů vlivem velkého množství různých faktorů vzniká dysbióza, která je spojována se spoustou onemocnění, jako je syndrom dráždivého tračníku, průjemy, záněty, alergie a především cukrovka 2. typu a obezita. Tyto nemoci však nejsou způsobeny pouze mikrobiální dysbiózou, ale na jejich vzniku se podílí mnohem více faktorů. Patří mezi ně především genetické predispozice, hygienické podmínky, či prostředí, ve kterém dítě vyrůstá.

Kolorektální karcinom, je jeden z nejčastěji diagnostikovaných druhů rakoviny a nejvíce napadá distální část střeva. U pacientů s kolorektálním karcinomem byl zjištěn pokles bakterií z kmene *Bacteroides* a nárůst bakterií z kmene *Firmicutes* a rodu *Fusobacterium*. K rozvoji rakoviny také přispívají látky produkované samotnými bakteriemi.

Výzkumy se dnes zaměřují na pochopení mechanismů, jakými jednotlivé faktory přesně působí na mikrobiom a na způsoby prevence onemocnění. Data ze studií jsou zatím ve většině případů limitována na zvířecí modely a výsledky z takovýchto studií nelze vždy reprodukovat na lidský organismus.

Sledování střevního mikrobiomu je slibnou strategií pro léčbu rakoviny. Není však jasné, jaké konkrétní složení střevního mikrobiomu nejvíce přispívá k podpoře protinádorové léčby imunitní reakce, ale existuje celá řada léčeb, které mění mikrobiom, který vyžaduje pečlivé testování a sledování.

SEZNAM LITERATURY

1. BÄCKHED, F. et al.: *Defining a Healthy Human Gut Microbiome. Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications*. Cell Host & Microbe, 2012, 12 (5), 611-622.
2. BELIZÁRIO, J. E. et al.: *Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches*. Frontiers in Microbiology [online], 2015, 6, dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01050/abstract>.
3. VERSALOVIC, J.: *The Human Microbiome and Probiotics. Implications for Pediatrics*. Annals of Nutrition and Metabolism. 2013, 63 (2), 42-52.
4. LUDWIG, W. et al.: *A software environment for sequence data*. Nucleic Acids Res, 2004, Res. 32, 1363–1371.
5. BENEŠOVÁ, M.: *Odmaturuj! z biologie. 2.*, přeprac. vyd. Brno: Didaktis, 2013.
6. Viry, [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://publi.cz/books/294/04.html>.
7. Bakteriofág, [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bakteriof%C3%A1g#/media/Soubor:Bakteriof%C3%A1g.svg>.
8. Bakterie, [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/8/562.jpg.
9. Tvary bakterií, [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_morphology_diagram_cs_\(2\).svg#mediaviewer/File:Bacterial_morphology_diagram_cs_\(2\).svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_morphology_diagram_cs_(2).svg#mediaviewer/File:Bacterial_morphology_diagram_cs_(2).svg).
10. TERRY, T. M.: *Procaryote anatomy: cell envelope, motility, endospores*. [online]. [cit. 2013-12-20]. Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/bonline/library/micro229/terry/229sp00/lectures/cells2.html>.
11. HAUSMANN, K. et al.: *Protozoologie*. Praha: Academia, 2003.
12. Prvoci, [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Trepka_velk%C3%A1#/media/Soubor:Trapka_velka_Paramecium_caudatum.jpg.
13. CHALUPOVA, J. et al.: *Identification of fungal microorganisms by MALDI TOF mass spektrometry*. Biotechnology Advances, 2014, 32, 230.

14. MALDI-TOF Mass Spectrometry: *Principle and Applications in Microbiology*. Microbeonline [online]. © 2019 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/maldi-tof-ms-principle-applications-microbiology/>.
15. NASCIMENTO, M. M.: *The Oral Microbiome. Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Application*. Elsevier, 2019, 91-100.
16. HOLLISTER, E. B. et al.: *Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health*. *Gastroenterology*. 2014, 146 (6), 1449-1458.
17. IIDA, A. et al.: *Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment*. *Science*, 2013, 342, 967–970.
18. Wellcome Trust Case Control Consortium. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007, 447, 661-678.
19. SANTIS, S. D. et al.: *Nutritional keys for intestinal barrier modulation*. *Front. Immunol.*, 2015, 6, 612.
20. DZUTSEV, A. et al.: *The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy*. *Immunol.*, 2015, 45, 3-17.
21. CHOW, J. et al.: *Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease*. *Immunol.*, 2011, 23, 473-480.
22. HUDA, M. N. et al.: *Stool microbiota and vaccine responses of infants*. *Pediatrics*, 2014, 134, 362-372.
23. FROSALI, S. et al.: *How the intricate interaction among toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology*. *Immunol.*, 2015, 489.
24. LEVY, M. et al.: *Dysbiosis and the immune systém*. *Nature reviews*, 2017, 17, 219-232.
25. PFEIFFER, A. F. H.: *Mikrobiom. Der Diabetologe*. [online]. 2016, 12 (6), 384-385, [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11428-016-0134-1>.
26. KELLER, J. et al.: *Mikrobiom. Der Gastroenterologe*. [online]. 2015, 10 (2), 85-86, [cit. 2019-02-26]. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s11377-014-0925-0>.

27. ROSENTHAL, M. et al.: *Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease*. *Infect Genet Evol*, 2011, 11, 839-848.
28. GRICE, E. A. et al.: *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome*. *Nature*, 2009, 324, 1190–1192.
29. NAIK, S. et al.: *Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals*. *Science*, 2012, 337, 1115–1119.
30. Kožní soustava. SlidePlayer [online]. © 2019 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/5585827/>.
31. DEWHIRST, F. et al.: *The human oral microbiome*. *Bacteriol*, 2012, 192 (19), 17-50.
32. Human Microbiome Project: *A framework for human microbiome research*. *Nature*, 2012, 486 (7402), 215-221.
33. MASON, M. R. et al.: *Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome*. *Plos ONE* [online]. 2013, 8 (10), [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.007728>.
34. MARSH, PD.: *Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease*. *BMC Oral Health*, 2006, 6-14.
35. JAKUBOVICS, NS.: *Saliva as the sole nutritional source in the development of multispecies communities in dental plaque*. *Microbiol Spectr*, 2015, 3 (3).
36. WADE, W.: *Uncultured members of the oral microbiome*. *Calif Dent Assoc*, 2016, 44 (7), 56-447.
37. FRENCKEN, J., et al.: *Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review*. *Clin Periodontol*, 2017, 44 (18), 94-105.
38. DIAZ, P. et al.: *Mining the oral mycobiome: methods, components, and meaning*. *Virulence*, 2017, 8 (3), 23-313.
39. AAGAARD, K. et al.: *The placenta harbors a unique microbiome*. *Sci Transl Med*, 2014, 6, 237.
40. PELZER, E. et al.: *Review: Maternal health and the placental microbiome*. *Placenta* [online]. 2017, 54, 30-37, [cit. 2019-05- 13]. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014340041630649X?via%3Dihub>.
41. QIN, J. et al.: *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature*, 2010, 464, 59-65.

42. AAGAARD, K. et al.: *The placenta harbors a unique microbiome*. *Sci Transl Med*, 2014, 6, 237-265.
43. PETRICEVIC, L. et al.: *Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery*. *Sci Rep.*, 2014, 4, 513.
44. DIGIULIO, D. et al.: *Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation*. *Plos ONE* [online]. 2008, 3 (8), [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0003056>.
45. AAGAARD, K. et al.: *A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy*. *Plos ONE*, 2012, 7 (6), 364.
46. ANDREWS, W. W. et al.: *Endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis after spontaneous or indicated preterm versus term delivery*. *Gynecol.*, 2005, 193, 739-745.
47. MARTIN, R. et al.: *Earlylife events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota*. *Plos ONE*, 2016, 11 (6), 158-498.
48. KOREN, O. et al.: *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy*. *Cell*, 2012, 150 (3), 470-480.
49. PRINCE, A. L. et al.: *The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis*. *Obstet Gynecol*, 2016, 215 (5), 627.
50. HECHT, J. L. et al.: *Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues*. *Pediatr Dev Pathol*, 2008, 11 (1), 15-22.
51. PELZER, E. et al.: *Review: Maternal health and the placental microbiome*. *Placenta* [online]. 2017, 54, 30-37 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014340041630649X>.
52. CHALLIER, J.C. et al.: *Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta*. *Placenta*, 2008, 29 (3), 274-281.
53. WITKIN, S. et al.: *Complexities of the uniquely human vagina*. *Sci Transl Med*, 2014, 4, 132.
54. FETTWEIS, J. M. et al.: *Species-level classification of the vaginal microbiome*. *BMC Genomics*, 2012, 13 (8), 17.

55. LINHARES, I. M. et al.: *The Human Vaginal Microbiome. Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications* [online]. Elsevier, 2019, 109-114, [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128152492000117>.
56. HOŘEJŠÍ, V. et al.: *Základy imunologie*. 3. vydání, Triton, 2009, 280, ISBN 978-80-7387-280-9.
57. Imunitní systém, [online]. [cit.2019-06-28]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Imunologick%C3%BD_v%C3%BDvoj_d%C3%ADt%C4%9Bte#/media/File:Organs_of_the_Immune_System_by_AIDS.gov.jpg.
58. GRIVENNIKOV, S. I. et al.: *Immunity: inflammation, and cancer*. Nature, 2010, 140 (6), 883-899.
59. RAVEL, J. et al.: *Vaginal microbiome of reproductive-age women*. Sci U.S.A., 2011, 108 (1), 4680-4687.
60. LINHARES, I. M. et al.: *The Human Vaginal Microbiome. Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Application*. Elsevier, 2019, 109-114.
61. OZAKI, K. et al.: *A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production*. Science, 2002, 298 (5598), 1630-1634.
62. STOLFI, C. et al.: *Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer*, Exp Med, 2011, 208 (11), 2279-2290.
63. KORN, T. et al.: *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells*. Nature, 2007, 448 (7152), 484-487.
64. DUMOUTIER, L. et al.: *Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22*. Immunol, 2001, 166 (12), 7090-7095.
65. KRYCZEK, I. et al.: *IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase*. Immunity, 2014, 40 (5), 772-784.
66. WU, T. et al.: *Elevated serum IL-22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer*. Clin Immunol., 2013, 147 (1), 38-39.
67. KIRCHBERGER, S. et al.: *Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model*. Exp Med, 2013, 210 (5), 917-931.

68. OPPMANN, B. et al.: *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. 2000, *Immunity*, 13 (5), 715-725.
69. ROSES, R. E. et al.: *Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists*. *Immunol*, 2008, 181 (7), 5120-5127.
70. LANGOWSKI, J. L. et al.: *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. *Nature*, 2006, 442 (7101), 461-465.
71. GRIVENNIKOV, S. I. et al.: *Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth*. *Nature*, 2012, 491 (7423), 254-258.
72. TOSOLINI, M. et al.: *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2011, 71 (4), 1263-1271.
73. WU, S. et al.: *A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses*. *Nat Med*, 2009, 15 (9), 1016-1022.
74. WANG, K. et al.: *Interleukin-17 receptor signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis*. *Immunity*, 2014, 41 (6), 1052-1063.
75. WANG, X. et al.: *Inflammatory cytokines IL-17 and TNF-alpha up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells*. *Immunol.*, 2017, 184, 7-14.
76. Dr. Axe: *Health and Fitness News, Recipes, Natural Remedies* [online]. © 2019 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://draxe.com/>.
77. HUTTENHOWER, C. et al.: *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 2012, 486, 207-214.
78. STŘÍTESKÝ, J.: *Patologie*. 2001, 1. vydání.
79. PABST, O.: *New concepts in the generation and functions of IgA*. *Immunol*, 2012, 12, 821-832.
80. STARY, G. et al.: *A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells*. *Science*, 2015, 348, 820.
81. Kolorektální karcinom, *Global Cancer Observatory* [online]. © 2019. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/>.
82. Češka, R. et al.: *Interna*, 1. vydání, Triton, 2010, 855, ISBN 978-80-7387-423-0.

83. Časopis Klinická onkologie - Masarykův onkologický ústav, MOÚ. Onkologie, Prevence a léčba rakoviny - Nemocnice Brno [online]. © 2019 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/casopis-klinicka-onkologie/t2078>.
84. HOLUBOVÁ, V.: *Nový akademický slovník cizích slov A–Ž*, 2005, 880.
85. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky [online]. 2014, [cit. 2019-06-28]. Dostupné z <http://www.uzis.cz/registry/narodni-zdravotni-registry/narodni-onkologicky-registr>.
86. DUŠEK, L. et al.: *Objektivní potřeba a stav nádorové prevence v České republice a v Evropě*. Klinická onkologie, 2014, 27 (2), 257-258.
87. Příloha č. 5 Zdraví 2020. *Hlavní příčiny úmrtí a jejich determinanty* [online]. 2014, [2019-06-28]. Dostupné z http://www.mzcr.cz/Verejne/dokumenty/zdravi-2020-narodni-strategie-ochrany-a-podpory-zdravi-a-prevence-nemoci_8690_3016_5.html.
88. O'KEEFE, SJ. et al.: *Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota*. Curr Opin Gastroenterol., 2008, 24 (1), 51-58.
89. YANG, L. et al.: *Bacteria, inflammation, and colon cancer*. World Gastroenterol, 2006, 12 (42), 6741-6746.
90. Rakovina tlustého střeva - příznaky a léčba. Příznaky nemocí [online]. © 2009 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/nemoc/rakovina-tlusteho-streva>.
91. KINROSS, JM. et al.: *The human gut microbiome: implications for future health care*. Curr Gastroenterol Rep., 2008, 10 (4), 396-403.
92. KOROPATKIN, NM. Et al.: *How glycan metabolism shapes the human gut microbiota*. Nat Rev Microbiol, 2012, 10 (5), 323-335.
93. CASTELLARIN, M. et al.: *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*. Genom Res., 2012, 22 (2), 299-306.
94. HOOPER, LV. et al.: *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. Science, 2001, 292, 1115-1118.
95. WAISBERG, J. et al.: *Infectious endocarditis from Streptococcus bovis associated with colonic carcinoma: case report and literature review*. Gastroenterol, 2002, 39, 177-180.
96. TJALSMA, H. et al.: *Profiling the humoral immune response in colon cancer patients: diagnostic antigens from Streptococcus bovis*. Cancer, 2006, 119, 2127-2135.

97. TOPRAK, NU. Et al.: *A possible role of Bacteroides fragilis enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer*. Clin Microbiol Infect, 2006, 12, 782-786.
98. MARCHESI, JR. et al.: *Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome*. [online]. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020447>.
99. BOLEIJ, A. et al.: *Increased exposure to bacterial antigen RpL7/L12 in early stage colorectal cancer patients*. Cancer. 2010, 116, 22-4014.
100. NOUGAYREDE, JP. Et al.: *Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells*. Science, 2006, 313, 848-851.
101. AHN, J. et al.: *Human Gut Microbiome and Risk for Colorectal Cancer*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute [online]. 2013, 105 (24), 1907-1911, [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djt300>.
102. VOGELSTEIN, B. et al.: *The multistep nature of cancer*. Trends Genet, 1993, 9, 138-141.
103. RIGHI, V. et al.: *Discrimination of healthy and neoplastic human colon tissues by ex vivo HRMAS NMR spectroscopy and chemometric analyses*. Proteome Res, 2009, 8, 1859-1869.
104. SCHLOSS, PD. et al.: *Introducing mothur: Open Source, Platform-independent, Community-supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities*. Appl Environ Microbiol, 2009, 75, 7537-7541.
105. KOROPATKIN, NM. et al.: *How glycan metabolism shapes the human gut microbiota*. Nat Rev Microbiol, 2012, 10 (5), 323–335.
106. KOSTIC, AD. Et al.: *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma*. Genome Res, 2012, 22 (2), 292-298.
107. OHKUSA, T. et al.: *Induction of experimental ulcerative colitis by Fusobacterium varium isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis*. Gut, 2003, 52 (1), 79-83.
108. AHN, J. et al.: *Periodontal Disease, Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) serum antibody levels and orodigestive cancer mortality*. Carcinogenesis, 2012, 33 (5), 1055-1058.

109. ALTONSY, MO. et al.: *Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway*. Food Microbiol, 2010, 137(2-3), 190-203.
110. PIHLSTROM, BL. et al.: *Periodontal diseases*. Lancet, 2005, 366 (9499), 1809-1820.
111. REYNA, C. et al.: *Breast cancer in young women: special considerations in multidisciplinary care*. Multidiscip Health, 2014, 29 (7), 419-429.
112. KROMAN, N. et al.: *Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study*. BMJ, 2000, 320, 474-478.
113. LIANOS, GD. et al.: *Potential of antibodydrug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management*. Onco Targets Ther, 2014, 24 (7), 491-500.
114. GUARNER, F. et al.: *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003, 361 (9356), 512-519.
115. ZATLOUKALOVA, P. et al.: *The role of PD-1/PD-L signaling pathway in antitumor immune response*. 2016, 29 (4), 472-477.
116. BEAUGERIE, L. et al.: *Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea*. Best Practise & Research Clinical Gastroenterology, 2004, 18 (2), 337-352.
117. SHERIDAN, J. et al.: *Editorial: gut selective immunosuppression is it a double edged word?*. Allimentary Pharmacology & Therapeutics, 2017, 46 (3), 373.
118. *Střevní mikrobiom: NutriD poradna s.r.o.*[online]. © 2018 [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: <http://www.nutridporadna.cz/2017/05/28/strevni-mikrobiom-budoucnost-optimalizovane-vyzivy/>.