

Vliv přípravků s rostlinnými kanabinoidy na orální mikrobiom

Bc. Klauďie Mátéová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kludie Mátéová**
Osobní číslo: **T19002**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vliv přípravků s rostlinnými kanabinoidy na orální mikrobiom**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši o přírodních fytoKANABINOIDECH a jejich legálních možnostech použití v kosmetickém a potravinářském průmyslu.
2. Dále popište lidský orální mikrobiom a metody jeho studia.

II. Praktická část

1. Experimentálně ověřte kvantitativní a kvalitativní vliv fytoKANABINOIDŮ na mikroflóru ústní dutiny metodami mikrobiologickými a molekulárně-biologickými.
2. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] SMALL, E. W. Cannabis: A Complete Guide. Boca Raton: CRC Press. 2017. ISBN: 978-1498761635.
- [2] FARHA, Maya A., Omar M. EL-HALFAWY, Robert T. GALE, et al. Uncovering the Hidden Antibiotic Potential of Cannabis. ACS Infectious Diseases [online]. 2020, 6(3), 338-346 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00419. ISSN 2373-8227. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.9b00419>.
- [3] JAKUBOVICS, N.S. a W. SHI. A New Era for the Oral Microbiome. Journal of Dental Research [online]. 2020, 99(6), 595-596 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1177/0022034520918536. ISSN 0022-0345. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034520918536>.
- [4] WILLIS, Jesse R. a Toni GABALDÓN. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. Microorganisms [online]. 2020, 8(2) [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.3390/microorganisms8020308. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/308>.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehotský, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: **Klaudie Mátéová**

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vlivem preparátů s kanabinoidy (potravinový doplněk Cannasan IMUNO, zubní pasta Cannasan) na orální mikrobiom. Literární rešerše pojednává zejména o složení orálního mikrobiomu a faktorech, jež ho ovlivňují. Následuje přehled metod používaných k identifikaci orální mikroflóry a charakteristika kanabinoidů se zaměřením na jejich využití. V experimentální části byly zhodnoceny výsledky testovaných preparátů. Kultivační metodou byla po užívání preparátů Cannasan posuzována změna počtu aerobních a anaerobních mikroorganismů. Dále byla k hodnocení antibakteriálních účinků těchto preparátů využita disková difúzní metoda. Taxonomická analýza mikrobiálních společenstev před a po užívání preparátů Cannasan byla realizována metodou sekvenování nové generace (NGS) na platformě Illumina. U zubní pasty Cannasan byl sledován také vliv na změnu barvy zubů, který nebyl potvrzen. Z dosažených výsledků studie je patrné, že vliv na orální mikroflóru lze přisuzovat výhradně potravinovému doplňku Cannasan IMUNO.

Klíčová slova: ústní dutina, orální mikrobiom, konopí, kanabinoidy, NGS

ABSTRACT

This thesis investigates the effect of cannabinoid preparations (Cannasan IMUNO food supplement, Cannasan toothpaste) on the oral microbiome. Literature search focuses mainly on the oral microbiome composition and the factors influencing it. Consequently, the work outlines a review of methods used for identifying the oral microflora and a characterization of cannabinoids with a focus on their use. The experimental part presents an evaluation of results from the tested preparations. The change in the number of aerobic and anaerobic microorganisms after using Cannasan preparations was assessed using the culture method. Furthermore, the disc diffusion method was used to evaluate the antibacterial effects of these preparations. The taxonomic analysis of microbial communities before and after using Cannasan preparations was performed using the next generation sequencing (NGS) method on the Illumina platform. The effect of Cannasan toothpaste on tooth color change was also monitored, yet not confirmed. The study results demonstrate that the effect on the oral microflora can be attributed exclusively to the Cannasan IMUNO food supplement.

Keywords: oral cavity, oral microbiome, cannabis, cannabinoids, NGS

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce paní Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za její ochotu, vstřícnost, trpělivost a mnoho podnětných rad a především čas, který mi věnovala při psaní mé diplomové práce. Ráda bych poděkovala také laborantkám, Ing. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové, za pomoc při realizaci experimentů v laboratoři. Zároveň bych chtěla poděkovat panu prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za bioinformatické zpracování sekvenčních dat.

Děkuji za spolupráci řediteli Výzkumného ústavu Cannasan z.ú. panu Ing. Františku Bednaříkovi, který laskavě poskytl preparáty do studie a všem zúčastněným dobrovolníkům, bez nichž by diplomová práce nemohla být realizována.

Mé velké poděkování patří mé rodině a blízkým, především mamince Monice, za nesmírnou psychickou a finanční podporu po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 DUTINA ÚSTNÍ.....	11
1.1 ANATOMIE DUTINY ÚSTNÍ	11
1.2 SLINNÉ ŽLÁZY ÚST	13
2 ORÁLNÍ MIKROBIOM	14
2.1 BAKTERIÁLNÍ SLOŽENÍ ORÁLNÍHO MIKROBIOMU	14
2.2 NEBAKTERIÁLNÍ SLOŽENÍ ORÁLNÍHO MIKROBIOMU.....	15
2.3 KOLONIZACE DUTINY ÚSTNÍ.....	16
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ORÁLNÍ MIKROBIOM.....	18
3.1 ÚSTNÍ HYGIENA.....	18
3.2 STRAVA.....	19
3.3 KOUŘENÍ.....	21
3.4 KONZUMACE ALKOHOLU.....	21
4 METODY STUDIA ORÁLNÍHO MIKROBIOMU	22
4.1 METODY ZALOŽENÉ NA POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCI.....	23
4.1.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	23
4.1.2 Polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů	24
4.2 METODY HYBRIDIZACE DNA–DNA	24
4.2.1 Šachovnicová hybridizace.....	25
4.2.2 Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>	25
4.2.3 DNA mikročipy.....	26
4.3 METODY SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE.....	26
4.3.1 Pyrosekvenování 454 Roche	27
4.3.2 Genomový analyzátor Illumina	28
4.3.3 Sekvenování aplikovaných biosystémů ligací a detekcí oligonukleotidů	29
4.3.4 Jednomolekulové sekvenování v reálném čase.....	29
5 KANABINOIDY.....	30
6 BIOSYNTÉZA FYTOKANABINOIDŮ	33
7 MOŽNOSTI APLIKACE FYTOKANABINOIDŮ	35
7.1 POTRAVINÁŘSKÝ PRŮMYSL	35
7.2 KOSMETICKÝ PRŮMYSL.....	36
7.3 FYTOKANABINOIDY A ORÁLNÍ MIKROBIOM	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
8 CÍL PRÁCE	39

9	MATERIÁL A METODY	40
9.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	40
9.2	MATERIÁL	41
9.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH PŮD	41
9.3.1	Fyziologický roztok	41
9.3.2	Lyzační pufr	41
9.3.3	Plate Count Agar (PCA).....	42
9.3.4	Reinforced Clostridial Broth + Agar (RCA).....	42
9.4	TESTOVANÉ PŘÍPRAVKY	42
9.5	CHARAKTERIZACE SOUBORU ÚČASTNÍKŮ STUDIE.....	43
9.6	ODBĚR VZORKŮ.....	44
9.7	HODNOCENÍ BAREVNÉ ŠKÁLY ZUBŮ	44
9.8	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	45
9.8.1	Kultivační metoda	45
9.8.2	Disková difúzní metoda	46
9.9	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ ANALÝZA	47
9.9.1	Izolace DNA.....	47
9.9.2	Kontrolní stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	48
9.9.3	Příprava reakční směsi a vlastní průběh PCR	48
9.9.4	Elektroforetická separace produktů PCR	50
9.9.5	Purifikace produktů PCR po elektroforetické separaci.....	51
9.9.6	NGS a taxonomická analýza mikroorganismů	52
10	VYHODNOCENÍ A DISKUZE VÝSLEDKŮ	53
10.1	HODNOCENÍ BAREVNÉ ŠKÁLY ZUBŮ	53
10.2	KULTIVAČNÍ METODA	56
10.3	DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA	58
10.4	TAXONOMICKÁ ANALÝZA MIKROORGANISMŮ METODOU NGS	59
10.4.1	Prokaryota	59
10.4.2	Eukaryota	64
	ZÁVĚR	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
	SEZNAM TABULEK.....	79
	SEZNAM PŘÍLOH.....	80

ÚVOD

Povědomí o účincích *Cannabis sativa* neboli konopí setého sahá až do starověku, přičemž většina jedinců má tuto rostlinu spojenou převážně s drogovým charakterem. V dnešní době se však pozornost upírá k tzv. technickému konopí, které se vyznačuje vysokým obsahem kanabidiolu (CBD) a zároveň velmi nízkým obsahem psychoaktivní sloučeniny (THC). Tento trend je doprovázen narůstajícími studii účinků kanabinoidů z hlediska průmyslového, potravinářského či kosmetického využití. V budoucnu lze tedy očekávat několikanásobné zvýšení produktů z konopí na globálním trhu, což řadí tuto rostlinu mezi slibné suroviny s hlavním symbolem udržitelného zemědělství.

Orální mikrobiom je označení souboru všech mikroorganismů kolonizujících dutinu ústní. Jedná se převážně o bakterie, v menší míře jsou zde zastoupeny také viry, archea, houby a prvoci. Zubní plak se tvoří kombinací slin, tekutin a zbytků potravin usazených na povrchu zubů a linií dásní. Obsahuje tisíce bakterií, které přeměňují zbytky jídla na kyseliny, což nakonec vede k iniciaci zubních onemocnění, jako je zubní kaz, zánět dásní a paradentóza. Složení mikrobiomu má tedy zásadní vliv na patologické projevy v ústní dutině. Přičemž kompozici a množství přítomných mikroorganismů ovlivňuje celá řada faktorů. Studium orální mikroflóry je tedy nezbytné pro charakterizaci zdravé ústní dutiny a její odlišení od patogeneze.

Tato diplomová práce je zaměřena na zjištění možného pozitivního vlivu na složení orální mikroflóry užíváním preparátů s přírodními fytoKANABINOIDY.

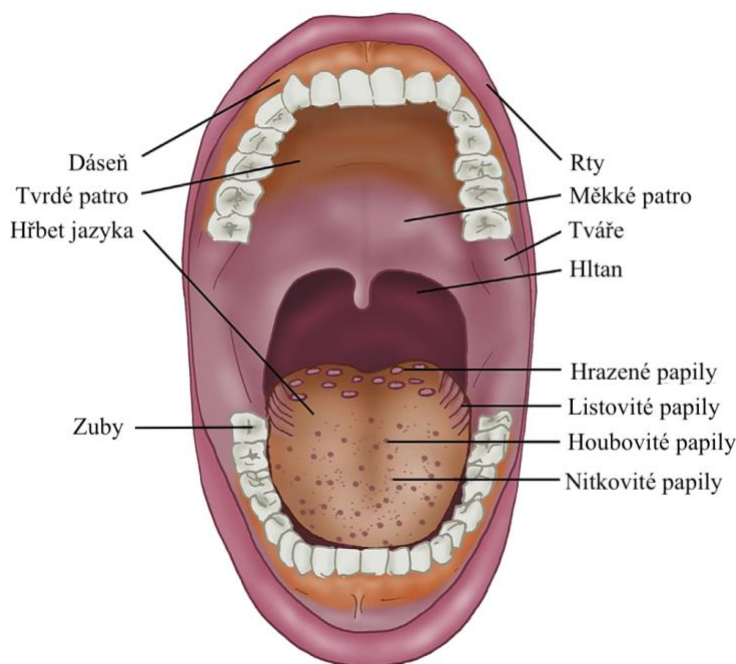
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DUTINA ÚSTNÍ

Ústní dutina (ústa) umožňuje vstup potravy a vzduchu do těla. Představuje tedy součást lebky s mnoha fyziologickými funkcemi jako jsou dýchání, kousání, žvýkání a polykání. Ústa také hrají hlavní roli při produkci řeči prostřednictvím pohybů jazyka, rtů a tváří. Mezi další struktury úst zapojené do produkce zvuků patří tvrdé a měkké patro [1]. Dutina ústní začíná jako štěrbinata ústní a sahá až k zúžení na přechodu do hltanu, které se nazývá úžina hltanová [2]. Zevní ohraničení dutiny ústní vytváří rty, vnitřní zubní oblouky a dásně, boční tváře, zadní nosohltan, dolní spodina dutiny ústní s jazykem a potenciální strop tvoří měkké a tvrdé patro [2–4]. Součástí jsou také zuby, dásně a svaly, které spolu s jejich šlachami, cévami a nervy udržují funkčnost dutiny ústní [3]. Dutina ústní je zubními oblouky rozdělena na předsíň a na vlastní dutinu ústní. Při sevřených zubech komunikuje předsíň s vlastní dutinou ústní jen malými štěrbinami mezi zuby a vpravo i vlevo mohutnější štěrbinou za posledními stoličkami [2].

1.1 Anatomie dutiny ústní

Anatomicky je ústní dutina orgánem trávicího systému a skládá se převážně z měkkých a tvrdých tkání. Rty, tváře, jazyk, dásně, patro a patrové madle řadíme mezi měkké tkáně, zatímco zuby patří do skupiny tvrdých tkání [3]. Na Obr. 1 je znázorněn čelní pohled na ústní dutinu s jejími jednotlivými částmi.



Obrázek 1 Čelní pohled na ústní dutinu – upraveno dle [4]

Rty formují přední hranici vnějšího otvoru ústní dutiny a tvoří je dvě silné řasy: horní a dolní ret. Oblasti horního a dolního rtu se setkávají v ústních koutcích a uzavírají svými volnými okraji horizontální štěrbinu ústní. Rty se skládají ze čtyř vrstev tkáně: kožní, svalové, žlázné a slizniční. Vnější část rtů je spojitá s kůží, zatímco vnitřní povrch je plynule spojen se sliznicí úst [2, 5]. Keratinizovaný stratifikovaný dlaždicový epitel vnější kůže přechází na tenkou, nekeratinizovanou sliznici, která poskytuje souvislou výstelku přes všechny struktury ústní dutiny kromě zubů [1]. Kostru rtů tvoří kruhový sval ústní, do kterého se upíná značné množství svalů, které se podílejí na tvaru štěrbinu ústní. Kontrakce tohoto svalu během procesu polykání zajišťuje dostatečné utěsnění, aby se zabránilo úniku potravy z dutiny ústní [1, 4].

Patro představuje strop ústní dutiny a tvoří horizontální přepážku mezi ústy a dutinou nosní [2]. Dělí se na dvě hlavní části, přičemž každá z nich má specifické vlastnosti související přímo s rolí, kterou hrají při různých orálních funkcích. Tvrdé patro je pokryto keratinizovanou sliznicí a podporováno tvrdou kostnatou strukturou spodní části horní čelisti a patrovou kostí, kdežto navazující měkké patro tvoří převážně svaly a slinné žlázy. Měkké patro odděluje ústní dutinu od nosohltanu a zároveň ho zakrývá během procesu polykání, aby zabránilo vstupu potravy do dutiny nosní [3]. Měkké patro lze charakterizovat jako pohyblivou ploténku, která se od tvrdého patra sklání šikmo dozadu a dolů, zatímco sliznice tvrdého patra pevně srůstá s periostem kostí, a proto je nepohyblivá [2].

Jazyk zaujímá hlavní část ústní dutiny a skládá se z epitelu, několika kosterních svalů, nervů a pojivových tkání. Na jazyku rozeznáváme kořen, který se nachází v zadní části jazyka, střední část neboli tělo a přední volně pohyblivou část, kterou nazýváme hrot jazyka [2]. Svalová struktura jazyka se skládá z vnitřních a vnějších svalů. Vnitřní svaly v jazyku začínají i končí a jsou uspořádány ve třech navzájem kolmých směrech: svisle, podélně a příčně. Vnější svaly vyčnívají, mění polohu jazyka a fungují převážně při jeho zatahování, stlačování či zvedání. Společně vnitřní a vnější svaly usnadňují pohyby jazyka během žvýkání, polykání a artikulací řeči [5]. Pohyby jazyka také pomáhají odstraňovat zbytky jídla z ústní dutiny [4]. Sliznice jazyka je kryta mnohvrstevným dlaždicovým epitelem a odlišuje se od zbytku ústní sliznice přítomností papil, které pokrývají její hřbetní povrch a dodávají jazyku charakteristickou drsnou strukturu. Jazykové papily lze rozlišit podle tvaru na čtyři hlavní typy: nitkovité, houbovitě, listovité a hrazené papily. Chuťové pohárky jsou přítomny v epitelu listovitých a hrazených papil [2, 5].

Fylogeneticky jsou zuby velmi staré útvary dutiny ústní, složené z tvrdých tkání. Vyčnívají z alveolárních výběžků horní a dolní čelisti ve dvou obloukovitých řadách a slouží k uchopování, dělení a rozměňování potravy. Korunka, krček a kořen tvoří tři hlavní části zubu. Tkáně zubu jsou velmi tvrdé a obsahují vysoké procento minerálních látek. Zubovina neboli dentin, vytváří hlavní hmotu zubu. Sklovina kryje povrch korunky a zubní cement pokrývá povrch kořene a krčku. Lidský chrup obsahuje zuby různě tvarované, a tím i funkčně specializované. Jedná se o řezáky, špičáky, třenové zuby a stoličky. Dásně jsou měkké sliznice kryjící alveolární výběžky čelistí, které chrání kořeny zubů před kazem a zároveň pomáhají držet zuby na svém místě [2].

1.2 Slinné žlázy úst

Slinné žlázy jsou četné exokrinní žlázy, jejichž kanálky ústí do dutiny ústní. Z hlediska velikosti rozlišujeme dva hlavní typy slinných žláz, a to malé a velké. Malé slinné žlázy produkují sliny nepřetržitě a lze je nalézt jak v předsíni, tak ve vlastní dutině ústní. Opakem jsou velké slinné žlázy, které secernují sliny pouze na základě nervového podnětu. K velkým slinným žlázám patří žláza příušní, žláza podjazyková a žláza podčelistní. Dle povahy sekretu se slinné žlázy dále klasifikují na: serosní (produkující řídký sekret), mucinózní (produkující hlenovitý sekret) a smíšené, tzv. seromucinózní žlázy [2, 6]. Serosní složka obsahuje enzymy štěpící polysacharidy, zatímco hlenovitá mucinózní složka tvaruje a připravuje sousto k polknutí a činí jeho povrch hladkým. Jejich distribuce na sliznici úst, a tím i kvalita produkovaných slin se místo od místa charakteristicky mění [2].

Sekrece slin je reflexní funkce závislá především na aferentní stimulaci. Sliny jsou tvořeny z více než 99 % vodou a velmi malým množstvím anorganických a organických látek, které umožňují slinám plnit mnoho důležitých funkcí. Mezi jednu z hlavních rolí slin patří produkce mucinu, který působí jako lubrikant při procesech žvýkání, polykání a mluvení. Slizniční film chrání sliznici úst a udržuje ji neustále vlhkou. Minerální látky obsažené ve slinách pomáhají udržovat integritu zubní skloviny a působí jako pufr [6].

2 ORÁLNÍ MIKROBIOM

Lidský mikrobiom je označení pro komunitu mikrobiálních obyvatel nacházejících se uvnitř a na povrchu lidského těla. Tento termín vytvořil Joshua Lederberg k charakteristice ekologické komunity symbiotických, komenzálních a patogenních mikroorganismů [7]. Pojmenování orální mikroflóra, orální mikrobiota či orální mikrobiom náleží mikroorganismům, které kolonizují lidskou ústní dutinu. Patří mezi ně především bakterie, dále pak v menší míře viry, archea, houby a prvoci [7, 8].

2.1 Bakteriální složení orálního mikrobiomu

Souhrnný počet bakteriálních druhů, které byly detekovány v orálních vzorcích analýzou mikrobiomu na bázi deoxyribonukleové kyseliny (DNA), přesahuje 700. Toto číslo zahrnuje jednak základní skupinu druhů, které jsou přítomny prakticky u každého jedince, tak i skupinu druhů přítomných variabilně v reakci na životní styl a genotypové determinanty jednice [7, 9]. Izolováno, kultivováno a pojmenováno bylo již více než 250 druhů, přičemž se nepochybně očekává další identifikace nových druhů [10].

Firmicutes, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria* tvoří šest hlavních bakteriálních kmenů, které definují základní orální mikrobiom určený běžnou povahou dutiny ústní mezi jednotlivci [8, 11]. V menší míře jsou zde přítomny bakteriální kmene *Tenericutes*, *Synergistetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi* a *Saccharibacteria* (známé také jako TM7) [8].

Orální bakterie z kmene *Firmicutes* se dále dělí na třídu *Bacilli*, která zahrnuje obligátně či fakultativně aerobní druhy, třídu *Clostridia*, jejichž druhy jsou anaerobní a třídu *Erysipelotrichia*. Z třídy *Bacilli* je v dutině ústní nejhojněji zastoupen rod *Streptococcus*, dále pak rody *Abiotrophia*, *Gemella* a *Granulicatella*. Převážná většina lidských orálních bakterií z třídy *Clostridia* spadá do čeledí *Veillonellaceae*, *Lachnospiraceae* a *Peptostreptococcaceae*. Přičemž čeleď *Veillonellaceae*, dříve známá po názvem *Acidaminococcaceae*, je největší a zahrnuje rody *Veillonella*, *Selenomonas*, *Anaeroglobus*, *Centipeda*, *Dialister* a *Megasphaera*. Z třídy *Erysipelotrichia* lze v orálním mikrobiomu nalézt následující mikroorganismy: *Buleidia extructa*, *Solobacterium moorei*, *Eggerthia catenaformis* a *Erysipelothrix tonsillarum*. Nedávno vytvořený kmen *Tenericutes* byl dříve třídou *Mollicutes* kmene *Firmicutes*. Z rodu *Mycoplasma* je možno identifikovat ve slinách člověka druhy *Mycoplasma hominis*, *M. salivarium* a *M. faucinum* [8].

Kmen *Fusobacteria* zahrnuje pouze dva rody detekované v ústní dutině. Jedná se o rod *Fusobacterium*, druh *F. nucleatum* a rod *Leptotrichia*, konkrétně druh *L. buccalis* [8, 12]. Veškeré orální taxony identifikované z kmene *Spirochaetes* jsou zástupci rodu *Treponema* [8]. Mezi převážně vyskytující se kultivovatelné druhy patří *T. medium*, *T. denticola* a *T. maltophilum* [12].

Z kmene *Bacteroides* je identifikováno přibližně 107 taxonů spadajících do rodů *Prevotella*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Bergeyella*, *Capnocytophaga* a dalšími osmi nepojmenovanými [8]. Na úrovni druhů pak byly detekovány zejména *Prevotella denticola*, *P. oris*, *P. tanneriae*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* a *P. endodontalis* [12].

Orální taxony z kmene *Actinobacteria* byly nalezeny pouze v řádech *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Coriobacteriales*. Z řádu *Actinomycetales* jde zejména o rody *Actinomyces*, *Rothia*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Arsenicococcus*, *Propionibacterium*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Turicella*, *Corynebacterium*. Řád *Bifidobacteriales* zahrnuje rody *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia*, *Parascardovia*. V ústní dutině byly detekovány rovněž rody *Atopobium*, *Olsenella*, *Eggerthella*, *Cryptobacterium* a *Slackia* z řádu *Coriobacteriales* [8].

Alphaproteobacteria, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* představuje pět tříd z kmene *Proteobacteria* přítomných v orálním mikrobiomu. Do třídy *Betaproteobacteria* patří rody *Neisseria*, *Kingella*, *Simonsiella*, *Delftia*, *Eikenella*, *Achromobacter*, *Ralstonia*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Lautropia*, *Variovorax* a *Leptothrix*. *Gammaproteobacteria* zahrnuje orální taxony v následujících šesti čeledích: *Xanthomonadaceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*. Z třídy *Deltaproteobacteria* jsou v ústní dutině detekovány rody *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Bdellovibrio*. Do poslední zmíněné třídy *Epsilonproteobacteria* lze zařadit rody *Campylobacter* a *Helicobacter* [8].

2.2 Nebakteriální složení orálního mikrobiomu

Viry byly v ústní dutině nalezeny v aktivní i latentní formě. Ze vzorků slin a zubního plaku bylo identifikováno několik bakteriofágů z čeledě *Siphoviridae*, *Myoviridae* a *Podoviridae*. Konkrétně se jedná o fága *Cornebacterium*, fága *Pseudomonas* a fága *Lactococcus*. Přítomnost bakteriofágů je spojená s deaktivací bakteriálních obranných mechanismů, které

vedou k jejich usazení v ústní dutině. *Herpes simplex* je běžně vyskytující se virový kmen, který má schopnost uniknout imunitní odpovědi hostitele a vstoupit do latentní fáze. Virus se snadno spustí v pozdější fázi v reakci na stres nebo vystavení ultrafialovému záření a je spojen s vývojem *Herpes labialis*, běžně známým oparem rtů [13].

Součástí orálního mikrobiomu je rovněž doména *Archaea*, nicméně její zastoupení je omezeno na malý počet druhů (fylotypů), z nichž všechny jsou methanogeny. Mohou být detekovány i u zdravých jedinců, ale jejich prevalence a počet se zvyšuje u subjektů s paradentózou. Mezi tyto přísné anaeroby produkující methan patří *Methanobrevibacter oralis*, *Methanobacterium curvum*, *M. congolense* a *Methanosarcina mazei* [14, 15].

Houby tvoří druhou nejhojněji zastoupenou složku orálního mikrobiomu a souhrnně nesou název orální fungální mikrobiom neboli mykobiom [10]. Mezi nejčastěji detekované orální houby patří rod *Candida*, následovaný rody *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus* [10, 15, 16]. Nejběžnějším druhem rodu *Candida* je *Candida albicans*, méně častými druhy jsou pak *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea* a *Candida dubliniensis*. Četnost a intenzita orálních druhů *Candida* se liší s věkem [10].

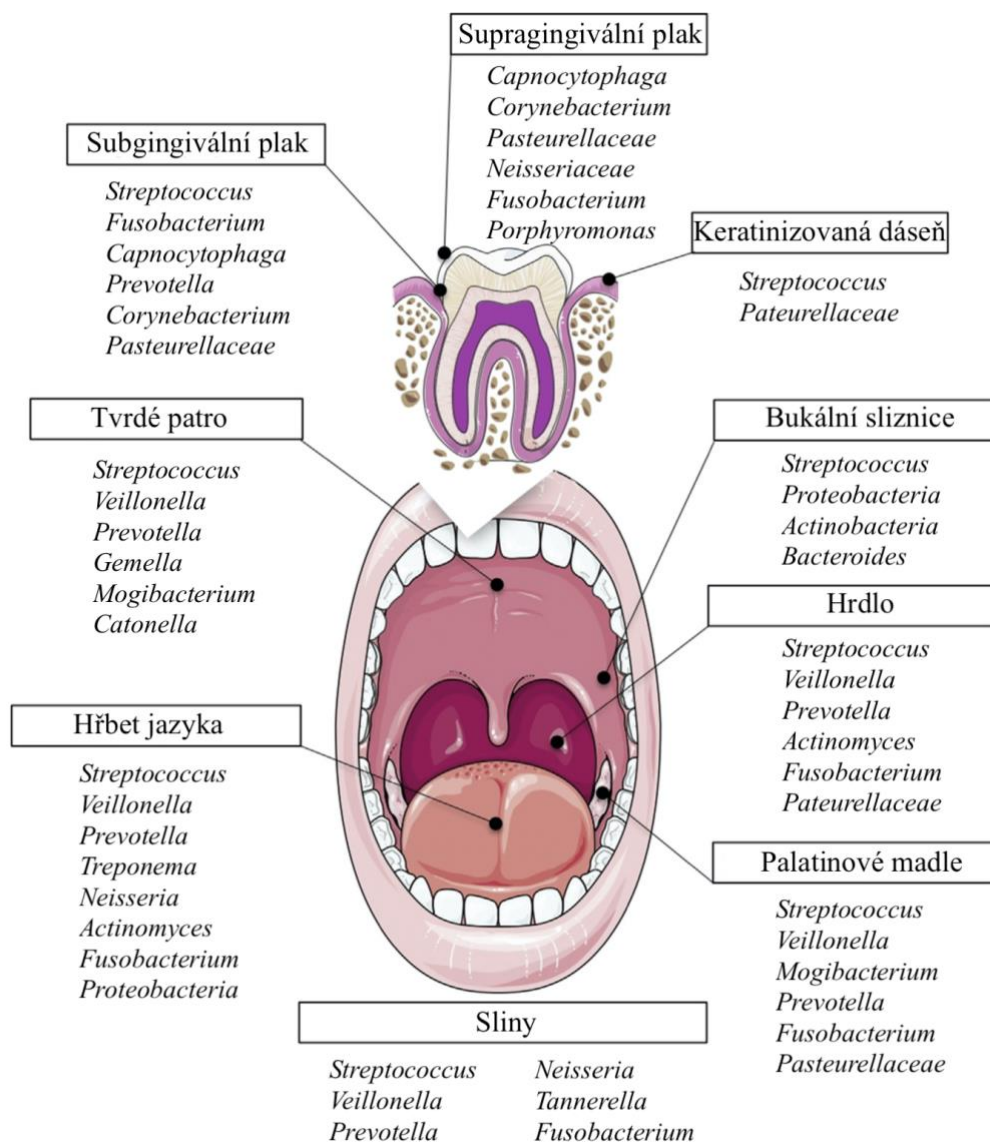
Ve srovnání s ostatními mikrobiálními skupinami kolonizujícími ústní dutinu představují prvoci velmi malou menšinu. Předpokládá se, že populace prvoků v dutině ústní je převážně saprofytická a nejčastěji uváděnými zástupci jsou *Entamoeba gingivalis* a strukturovanější *Trichomonas tenax* [13]. Tyto dva lidské orální prvoky lze zařadit mezi nepatogenní komenzály a jejich počet se zvyšuje u subjektů se špatnou ústní hygienou a onemocněním dásní, neboť zbytky potravy spolu s bakteriemi tvoří jejich zdroj výživy [14, 15].

2.3 Kolonizace dutiny ústní

Ústa nejsou homogenním prostředím, ale nabízejí několik odlišných stanovišť pro mikrobiální kolonizaci. Tvrdé povrchy zubů a měkké tkáně ústní sliznice tvoří dva hlavní povrchy dutiny ústní [17]. Různé povrchy přitahují odlišná mikrobiální společenství, neboť každý výklenek poskytuje jedinečný ekosystém s optimálními podmínkami a živinami pro jeho členy. Z tohoto důvodu je orální mikrobiom odebraný ze stejného místa různých jedinců podobnější než mikrobiomy z různých míst stejného jedince [16]. Nicméně prostředí ústní dutiny se s věkem neustále mění, a tím se mění i orální mikrobiom, který je navíc, vzhledem k častému spojení dutiny ústní s vnějším prostředím, pozoruhodně dynamický [18]. Mikrobiální kolonizace se na příslušných površích nejčastěji vyskytuje

ve formě biofilmu. K jeho tvorbě je zapotřebí počáteční připojení (adheze) bakterií k povrchu hostitele, obvykle ke slinným molekulám adsorbovaným na povrch. Jakmile jsou bakterie připojeny, dělí se a vylučují polymery, které poskytují matici nebo základní strukturu pro další vývoj mikrokolonií. Pro vývoj rozmanitého orálního biofilmu jsou rovněž nezbytné bakteriální interakce [19].

Bakterie představují nejstudovanější a nejhojnější taxonomickou skupinu orálního mikrobiomu. Na Obr. 2 jsou znázorněny základní bakteriální skupiny spojené s výskytem v dutině ústní. Mezi převážně dominantní rody patří *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella* a *Fusobacterium*, které lze označit za rezidentní mikroorganismy. Hojně se v dutině ústní také vyskytují bakterie z čeledi *Pasteurellaceae* kmene *Proteobacteria* [15].



Obrázek 2 Kolonizace základních bakteriálních skupin – upraveno dle [15]

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ORÁLNÍ MIKROBIOM

Symbiotický vztah mezi mikroflórou a hostitelem existuje v dynamické rovnováze, nazývané jako mikrobiální homeostáza. Jakákoli podstatná změna místního prostředí může narušit interakce mikrobů s mikroby, což pak může ovlivnit rovnováhu mezi mikroby a hostitelem, a tím zvýšit riziko onemocnění. Rozpad této mikrobiální homeostázy se nazývá dysbióza a její dopady v ústech jsou vyobrazeny na Obr. 3 [20].



Obrázek 3 Projevy dysbiózy dutiny ústní – upraveno dle [21]

Orální mikrobiom je ovlivňován převážně faktory spojenými s moderním životem, jako jsou: prostředky pro péči o ústní dutinu, hormonální nerovnováha, obecné stravovací návyky, spotřeba cukru, kouření tabáku, konzumace alkoholu a jiných antimikrobiálních látek a vakcín [9].

3.1 Ústní hygiena

Mikroorganismy v ústní dutině vytváří na povrchu zubů dva typy biofilmu: supragingivální a subgingivální plak, které se významně liší svým složením bakteriální mikroflóry. V supragingiválním plaku dominují grampozitivní bakterie, včetně *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis* a *Lactobacillus*, zatímco v subgingiválním plaku převládají gramnegativní anaerobní bakterie, jako *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*

nucleatum a *Porphyromonas gingivalis*. Příčinou vzniku zubního kazu je obvykle supragingivální plak. Zubní biofilm je dynamická, neustále aktivní metabolická struktura. Dochází ke střídavým procesům snižování a zvyšování pH biofilmu, po nichž následují příslušné procesy demineralizace a remineralizace zubního povrchu. U zdravých jedinců za normálních podmínek jsou tyto procesy v rovnováze a nedochází k trvalému poškození povrchu zubní skloviny [18]. Cílem v péči o ústní dutinu je fyzicky odstranit mikrobiální plak a nečistoty z ústní dutiny pomocí vhodných mechanických nástrojů a přípravků. Zubní plak je výsledkem kolonizace a růstu různorodých mikroorganismů na površích zubů, měkkých tkání a zubních náhrad. Špatná ústní hygiena a akumulace zubního plaku vede ke vzniku zubního kazu. Nepravidelná ústní hygiena může mít také za následek zánět dásní, ke kterému dojde za méně než 10 dní, pokud nedochází k pravidelnému odstraňování zubního plaku. Zánět dásní je charakterizován zanícenými a krvácejícími dásněmi, které se postupně oddělují od zubů [22].

Ačkoli je čištění zubů považováno za předpoklad pro udržení dobrého zdraví ústní dutiny, má také potenciální vliv na opotřebení zubů, zejména s ohledem na zubní erozi. Abrazi zubů lze ovlivnit řadou faktorů, mezi něž řadíme nejen fyzikální vlastnosti použité zubní pasty a povahu štětin zubního kartáčku, ale také frekvenci a sílu čištění zubů. Zatímco abrazi způsobenou běžnou ústní hygienou lze v průběhu času považovat za fyziologické opotřebení, intenzivní čištění může poškodit erodované povrchy odstraněním demineralizované povrchové vrstvy zubní skloviny [23].

Fluorid hraje velmi důležitou a nezastupitelnou roli v prevenci vzniku zubního kazu. Zubní pasty a ústní vody s obsahem fluoridu patří k hlavním formulacím, se kterými se lze setkat v přípravcích péče o ústní dutinu. Existuje také systémové podávání fluoridu prostřednictvím vody, soli, mléka a tobolek. Fluorid posiluje zubní sklovinu a cement tvorbou fluoroapatitu a vyvolává antibakteriální účinek prostřednictvím inhibice bakteriálního růstu a adheze mikroorganismů. Fluorid tedy předchází a léčí zubní kaz tím, že podporuje příznivou remineralizaci zubní skloviny a současně zhoršuje bakteriální metabolismus [24].

3.2 Strava

Sacharidy neboli cukry mají zásadní vliv na mikrobiální kolonizaci, neboť poskytují snadno dostupné substráty pro orální mikroorganismy, které jsou závislé na sacharidech jako zdrojích energie. Proto je vliv obsahu cukru ve stravě studován extenzivněji než jakékoli jiné

nutriční faktory. Jedinci, kteří často přijímají vysoké hladiny sacharidů, mají v ústní dutině větší množství acidogenních a acidotolerantních druhů [25]. Jedná se zejména o bakterie z čeledi *Lactobacillaceae* rodu *Lactobacillus* a bakterie rodu *Streptococcus*, konkrétně druh *Streptococcus mutans* a *S. sobrinus*. Kyseliny produkované těmito bakteriemi jsou ve skutečnosti považovány za primární příčinu vzniku zubního kazu [25, 26]. Při nadměrném požití cukru dochází ke zvýšenému procesu fermentace sacharidů, sliny ztrácí svou pufovací schopnost a neustálé snižování pH vede k erozi skloviny, cementu a dentinu. Se vznikem zubního kazu jsou spojeny také bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* a *Scardovia* [26]. Naproti tomu jiné druhy rodu *Streptococcus*, jako jsou *Streptococcus mitis* a *S. salivarius*, zvyšují pH, a proto jsou spojeny s ochranným účinkem proti zubnímu kazu [27].

Xylitol, cukerný alkohol vyrobený hydrogenací xylóзовého cukru, je umělé sladidlo používané jako alternativa k běžným cukrům. Má potenciální antibakteriální účinek proti patogenům *Porphyromonas gingivalis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Vyskytuje se také v kombinaci s mannitolem v některých druzích žvýkacích gum. Žvýkání stimuluje sekreci slin, čímž napomáhá k preventivnímu opatření proti vzniku zubního kazu [24]. Tok slin umožňuje příjem živin nezbytných pro bakterie, ale na druhé straně podporuje mechanické odstranění bakterií z kolonizovaných povrchů. Zvýšená rychlost sekrece slin pomáhá snížit dobu expozice zubní skloviny kyselinám a urychluje normalizaci pH prostředí po jídle obsahující kariogenní výrobky. Usnadňuje tak udržování pH mikrobiálního plaku na úrovni, která zajišťuje integritu minerálního složení zubní skloviny [18].

Zdraví ústní dutiny rovněž významně ovlivňuje samotný příjem vitamínů. Vitamíny jsou definovány jako esenciální organické sloučeniny katalyzující metabolické reakce těla. Fungují také jako donory elektronů, antioxidanty a barviva. Mohou být přijímány z potravy a potravinových doplňků, v závislosti na kvalitě jídla a množství živin. V některých případech mohou být také syntetizovány prostřednictvím našeho těla nebo střevním mikrobiomem. Nižší příjem vitamínu A je spojen se sníženým vývojem orální epiteliální tkáň, zhoršenou tvorbou zubů, hypoplazií skloviny a přítomností paradentózy. Vitamín K má systémový účinek a jeho nedostatek zvyšuje riziko krvácení, což může mít vliv na jedince, kteří podstoupili orální chirurgický zákrok nebo utrpěli úraz. Příznaky deficitu riboflavinu, vitamínu B2, lze pozorovat na rtech, koutku úst (úhlová stomatitida), jazyku a sliznici, kde se opakovaně tvoří aftózní vředy [28].

3.3 Kouření

Ústní dutina je obvykle první část těla vystavená složkám tabákových výrobků nebo jejich emisím. V důsledku toho se z ústní dutiny stává časté místo pro karcinogenní, mikrobiální, imunologické a klinické účinky užívání tabáku. Přestože používání konvenčních tabákových výrobků neustále klesá, používání elektronických systémů pro dodávání nikotinu v posledních letech exponenciálně vzrostlo, zejména mezi mladými lidmi [29]. Toxické látky a bakterie obsažené v cigaretách přímo či nepřímo ovlivňují některé bakteriální druhy kolonizující ústní dutinu prostřednictvím imunosuprese, nedostatku kyslíku, tvorby biofilmu nebo jiných potenciálních mechanismů, což vede ke kolonizaci patogenních organismů a v konečné fázi k onemocnění [30]. Další možný mechanismus vedoucí ke změně mikrobiální rozmanitosti úst je zprostředkován ještě před samotným zapálením cigarety, neboť bakterie přítomné na cigaretě mohou být potencionálně přeneseny do dutiny ústní pomocí rtů [31]. Na úrovni rodů dominují u kuřáků *Streptococcus*, *Prevotella* a *Veillonella*, zatímco rod *Neisseria*, který je součástí zdravé orální mikroflóry, byl ve srovnání s nekuřáky výrazně nižší [32]. U kuřáků byl navíc přítomen fakultativně anaerobní druh *Streptococcus australis*, který má toleranci vůči kyselému prostředí, což podporuje hypotézu, že kouření cigaret zvyšuje kyselost slin. Významné zvýšení zastoupení druhů bakterií produkující sulfan *Veillonella atypica*, *Prevotella melaninogenica* a *Prevotella salivae* může být jedním z důvodů zápachu z úst u kuřáků [31]. Ve vzorcích subgingiválního plaku kuřáků lze nalézt bakteriální rody často spojené se vznikem paradentózy, a to zejména *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Campylobacter* a *Bacteroides* [13].

3.4 Konzumace alkoholu

Nadměrná konzumace alkoholu může ovlivnit složení orálního mikrobiomu, včetně potencionálního vyčerpání prospěšných komenzálních bakterií a zvýšené kolonizace potenciálně patogenních bakterií. U jedinců, kteří častěji konzumují alkohol byl shledán snížený výskyt komenzálních *Lactobacillales* neboli bakterií mléčného kvašení z třídy *Bacilli* kmene *Firmicutes*. Zatímco rody *Aggregatibacter*, *Actinomyces*, *Kingella*, *Leptotrichia*, *Cardiobacterium* a *Prevotella*, zodpovědné za možný výskyt orální dysbiózy, svou přítomností dominují. Zvýšený výskyt byl zaznamenán u nepatogenního rodu *Neisseria* s extrémně vysokou aktivitou enzymu alkoholdehydrogenáza. Díky tomuto enzymu dokáže z ethanolu produkovat významné množství acetaldehydu, který má toxické, mutagenní a karcinogenní účinky [33].

4 METODY STUDIA ORÁLNÍHO MIKROBIOMU

Mezi tradiční metody identifikace mikrobů patří kultivační metody studující buď čisté kultury nebo komplexní multidruhová společenství [7]. Identifikace pomocí konvenčních metod je založena na fenotypových a biochemických kritériích, včetně mikroskopie, biochemických vlastnostech, růstových podmínkách, imunofluorescenčním barvení, analýze konečných produktů bakterií, složení buněčné membrány a citlivosti na antibiotika [34]. Přestože identifikace kultivovatelných mikroorganismů je dobře charakterizována, přístup k celé mikrobiální komunitě, včetně nekultivovatelných mikrobů, je stále mimo dosah kvůli značným omezením při simulaci jejich původních stanovišť [35].

Nedávné studie do značné míry překonaly tato omezení využitím sofistikovanějších molekulárních přístupů a technik založených na nukleových kyselinách k charakterizaci kultivovatelných i nekultivovatelných členů orálního mikrobiomu [19]. Jedná se zejména o techniky založené na molekule DNA, které obcházejí potřebu kultivace *in vitro* [34]. Hlavní přístupy k nákladově efektivní a vysoce výkonné identifikaci lidského orálního mikrobiomu využívají značnou variabilitu v genové sekvenci mikrobiální 16S ribozomální ribonukleové kyseliny (rRNA), která je součástí 30S podjednotky prokaryotického ribozomu a považuje se za čárový kód, který lze využít k identifikaci konkrétních mikrobů [36]. Geny 16S rRNA lze extrahovat z heterogenních vzorků, amplifikovat, sekvenovat a poté porovnat s databázemi, jako je Human Oral Microbiome Database (HOMD), což je veřejně dostupný online zdroj, který spojuje sekvenční data s fenotypovými, fylogenetickými, klinickými a bibliografickými informacemi o mikroorganismech nalezených v dutině ústní. Jestliže se v databázi najde shoda sekvence, lze daný mikroorganismus identifikovat. V případě, že databáze neobsahuje žádnou odpovídající položku, je možné sekvenci přidat jako záznam pro dříve neznámý fylotyp [17].

Existují tři hlavní kategorie molekulárních mikrobiálních analýz, přičemž jako první lze zmínit metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), včetně denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a polymorfismu délky terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP). Druhou kategorií tvoří metody hybridizace DNA–DNA, kde je možno zařadit šachovnicovou hybridizaci, fluorescenční hybridizaci *in situ* (FISH) a DNA mikročipy na bázi genu 16S rRNA [34]. Nové možnosti ve studiích orálního mikrobiomu se otevřely s příchodem poslední třetí kategorie, a to sekvenování genomu s vysokou propustností, známého také jako sekvenování nové generace (NGS) [37]. Chronologie

dostupnosti a schopnosti těchto metod charakterizovat mikroby a mikrobiální komunity je vyobrazena na Obr. 4 [38].



Obrázek 4 Metody studia orálního mikrobiomu – upraveno dle [38]

4.1 Metody založené na polymerázové řetězové reakci

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je primární metodikou používanou pro většinu testů založených na amplifikaci specifických fragmentů z jakékoli molekuly DNA. Lze ji využít jednak jako samostatnou metodu nebo jako první krok při generování výchozího materiálu pro následující molekulárně-biologické techniky. Tato základní amplifikační technika je založena na množení specifického úseku DNA ohraničeného horním a dolním oligonukleotidovým primerem (obvykle 20–30 nukleotidů) enzymem DNA polymerázou. Cyklicky měnící se teplota způsobuje denaturaci, annealing primerů a následnou extenzi nově vznikajících řetězců DNA [39]. PCR, kterou vyvinul Kary Mullis a spolupracovníci v roce 1983, je nyní k dispozici po tři desetiletí a spolu s různými iteracemi se stala testem „zlatého standardu“ v mikrobiologii. Za objev této metody mu byla v roce 1993 udělena Nobelova cena [40].

4.1.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Principem metody DGGE je elektroforetická separace fragmentů markerových genů, včetně 16S rRNA, amplifikovaných pomocí PCR přes polyakrylamidový gel obsahující rostoucí gradient denaturantů, obvykle močoviny a formamidu. Produkty PCR, které mají

podobnou nebo identickou molekulovou hmotnost jsou separovány na základě odlišných denaturačních charakteristik určených jedinečnou nukleotidovou sekvencí. Na základě těchto profilů vymezených sekvenčním složením každé amplifikované DNA se vyvíjí pruhovaný vzor. Zřetelné pruhy, respektive pásy, vytvořené na gelu představují různé sekvence DNA z různých bakterií přítomných ve vzorku. Jednotlivé pásy lze následně vyříznout, sekvenovat a určit tak druhovou identitu. Omezením DGGE je, že rozdíly v sekvenci větší než 1 pár bází se nemusí na denaturačním gelu oddělit z důvodu podobnosti v nukleotidových poměrech, které vedou ke stejným denaturačním charakteristikám 2 různých sekvencí. Excise a sekvenování je tedy nezbytným krokem k potvrzení identifikace druhů přítomných v jednotlivých pásech [41].

4.1.2 Polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů

T-RFLP je molekulární přístup, který umožňuje hodnocení komplexních bakteriálních komunit profilováním založeným na poloze restrikčního místa blízko značeného konce amplifikovaného genu. Metoda je založena na štěpení směsi variant amplifikovaných PCR jediného genu pomocí jednoho či více restrikčních enzymů a detekci velikosti každého z jednotlivých výsledných koncových fragmentů [38]. Směs fragmentů se oddělí buď kapilární nebo polyakrylamidovou elektroforézou a velikosti různých koncových fragmentů se stanoví fluorescenční detekcí. Tato metoda je surový způsob, jak porovnat molekulární profily bakteriálních komunit, nicméně není však vhodná pro identifikaci konkrétních bakterií. Dalším omezením metody T-RFLP je, že jakékoli dvě odlišné sekvence, které sdílejí terminální restrikční místo, povedou k jednomu píku a budou tedy nerozeznatelné [42].

4.2 Metody hybridizace DNA–DNA

Objev hybridizační reakce, což je spontánní párování dvou komplementárních řetězců dvoušroubovice nukleové kyseliny, vedl k vývoji technik hybridizace DNA–DNA aplikované pro studium mikroorganismů [39]. Tato technika umožnila hybridizaci 45 vzorků DNA proti 30 značeným DNA sondám na jedné nosné membráně. Dostáváme se tedy až k počtu 1350 simultánních hybridizací [34]. Tyto techniky využívají jednořetězcové sondy DNA značené buď radioaktivním izotopem, nebo fluorescenční či chemiluminiscenční značkou, které se vážou na komplementární báze cílového řetězce DNA za vzniku duplexu, tedy výsledné formace dvouřetězcové molekuly [39]. Hybridizační signály jsou obvykle detekovány pomocí chemifluorescenčních postupů [34]. Využívají se buď sondy DNA

celého genomu, nebo krátké oligonukleotidové sondy se sekvencemi DNA obsahující 15–30 bází, které doplňují jejich cílovou sekvenci. Oligonukleotidové sondy jsou specifitější, neboť se váží na oblasti genu 16S rRNA, který umožňuje přesné taxonomické umístění. Nutno podotknout, že k zajištění genomové DNA pro konstrukci sond jsou zapotřebí kultivovatelné bakterie [39].

4.2.1 Šachovnicová hybridizace

V této technice jsou standardy DNA představující cílové druhy imobilizovány na nylonové membráně a poté současně křížově hybridizovány s obvykle radioaktivně značenými DNA sondami představující celé genomy známých mikroorganismů [38, 39]. Název šachovnicová hybridizace vyplývá z provedení, neboť sondy jsou hybridizovány kolmo k DNA několika vzorků a zpracované obrazy hybridizací vypadají jako šachovnice [38]. Jedná se o rychlou, přímou, citlivou a relativně levnou analýzu velkého počtu vzorků pro vysokou hladinu různých bakterií [39]. Technika šachovnicové hybridizace byla široce využívána ke komplexnímu zkoumání typů a počtů bakterií v supragingiválním a subgingiválním plaku a slinách u zdravých subjektů a u pacientů s paradentózou. Tento přístup byl také použit ke studiu vlivu kouření cigaret na složení orální mikrobioty [38].

Hybridizace oligonukleotidů se zpětným zachycením je modifikací šachovnicové metody zahrnující PCR amplifikaci 16S rRNA vzorku a druhově specifické 16S rRNA oligonukleotidové sondy. Tyto sondy lze zároveň konstruovat tak, aby identifikovaly kultivovatelné i nekultivovatelné druhy. Jedná se o hybridizaci výběru segmentů genu 16S rRNA značených PCR ze sad vzorků na druhově specifické oligonukleotidové sondy fixované na membráně. Výhodou je především vysoká selektivita za přísných podmínek, přesná hybridizace komplementárních cílových sekvencí a přesná taxonomie. Za nevýhodu je považována nízká citlivost při nízkých hladinách cílových bakterií ve složitých vzorcích s bakteriální a lidskou DNA, kdy dochází ke ztrátě kvantitativního hodnocení [39].

4.2.2 Fluorescenční hybridizace *in situ*

Fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy určené k cílení genu 16S rRNA jsou hybridizovány s částečně fixovanými celými buňkami na podložních sklíčkách. Sondy lze poté přímo vizualizovat pomocí standardní fluorescenční nebo konfokální fluorescenční mikroskopie. Techniku fluorescenční hybridizace *in situ*, nebo konkrétněji hybridizaci celých buněk, lze aplikovat v orálním mikrobiologickém výzkumu ke kvantifikaci, určení prostorové konfigurace, demonstraci morfologie a taxonomické identifikaci jednotlivých

bakteriálních buněk. Kromě toho lze pro analýzu biologicky rozmanitých mikrobiálních populací kombinovat techniku FISH v roztoku s průtokovou cytometrií. Výhodou je tedy identifikace a kvantifikace několika mikrobiálních druhů ve stejném vzorku [34, 39].

4.2.3 DNA mikročipy

DNA mikročipy jsou metodikou založenou ke zkoumání profilů genové exprese, tedy mikrobiální interakce a k identifikaci mikrobiálních komunit v ústní dutině. Mikročipy obsahují oligonukleotidové sondy, které cílí na geny RNA a DNA v biologických vzorcích. Veškeré platformy mikročipů sdílejí společný atribut, že senzor detekuje signál z cílových sekvencí, které paralelně hybridizují s imobilizovanými oligonukleotidovými sondami na nylonové membráně nebo skleněném podložním skle. Intenzita tohoto signálu poskytuje míru množství vázané nukleové kyseliny ve vzorku. Platformy mikročipů se liší zejména v počtu oligonukleotidových sond a ve způsobu, jakým jsou sondy k mikročipu připojeny. K identifikaci mikrobů v ústní dutině jsou využívány jednak nízkohustotní mikročipy, tak i mikročipy s vysokou hustotou. Nízkohustotní mikročipy nesou desítky až stovky specifických sond, zatímco vysokohustotní mikročipy obsahují tisíce až miliony sond, které jsou přímo syntetizovány na povrchu mikročipu [38].

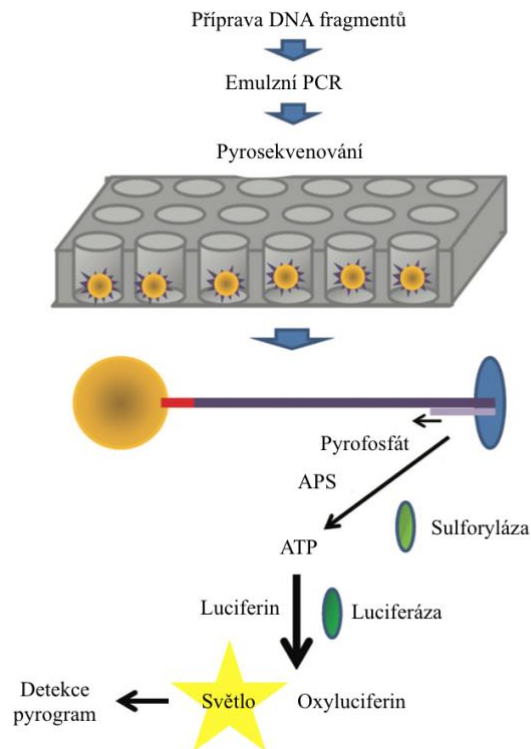
4.3 Metody sekvenování nové generace

V posledním desetiletí vedly pokroky v miniaturizaci a důmyslné metodiky molekulární detekce k bezprecedentní řadě technologií NGS, které jsou založeny na principu syntézy v kombinaci s PCR anebo na detekci změn vlastností DNA během sekvenční reakce [39]. Pro masivně paralelní produkci sekvenování DNA se využívají čtyři platformy. Jedná se o pyrosekvenování 454 Roche, genomový analyzátor Illumina, dále pak sekvenování aplikovaných biosystémů ligací a detekcí oligonukleotidů (SOLiD). Poslední platforma je založena na sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (SMRT) [43, 44]. Každá platforma ztělesňuje komplexní souhrn enzymologie, chemie, optiky s vysokým rozlišením, hardware a softwarového inženýrství. Tyto přístroje umožňují vysoce efektivní kroky přípravy vzorků před sekvenováním DNA, což poskytuje významnou úsporu času a minimální požadavek na přidružené vybavení. Různými přístupy popsány níže se každá technologie snaží amplifikovat jednotlivá vlákna knihovny fragmentů a provádět na nich sekvenční reakce. Knihovny fragmentů se získají hybridizací specifických linkerů k tupým koncům fragmentů generovaných přímo z požadovaného genomu nebo zdroje DNA [44].

4.3.1 Pyrosequencing 454 Roche

Technologie pyrosequencing 454 Roche je pravděpodobně nejpoužívanější platformou NGS ke studiu lidského mikrobiomu a její princip je vyobrazen na Obr. 5. Tato technika je metodou sekvenování syntézou, která zahrnuje kombinaci emulzní PCR a pyrosequencing, jenž závisí na generování světla po začlenění nukleotidů do rostoucího řetězce DNA. V pyrosequenčním přístupu je DNA izolována, fragmentována, ligována do speciálních adaptérů a poté rozdělena na jednotlivé řetězce. Emulzní PCR se provádí pro klonální amplifikaci a zahrnuje tvorbu emulze olej-voda, kde vodná fáze obsahuje reakční činidla PCR a fragment DNA, který má být sekvenován [43]. Zahrnuty jsou zde také zachycovací agarózové kuličky, jejichž povrchy nesou oligonukleotidy komplementární ke specifickým adaptorovým sekvencím v knihovně [44]. Po kontrolovaném a intenzivním míchání systému olej-voda dochází k emulgaci a tvorbě milionů vodných kapiček, ve kterých probíhá amplifikace PCR. Optimalizace koncentrace fragmentu DNA, agarózových kuliček a vodných kapiček zaručuje, že se v každé kapičce vyskytne pouze jeden templát a jedna kulička. Následně se na každé agarózové kuličce v klonální amplifikaci vygeneruje milion kopií jedinečného fragmentu DNA. V konečné fázi dochází k rozbití emulze, denaturaci DNA a kuličky nesoucí jednořetězcovou DNA se přenesou na pikotitrační destičku tak, aby se jedna kulička vyskytovala v každé z několika stovek tisíc jamek. Jelikož má každá kulička své pevné místo v destičce, lze na něm snadno sledovat každou sekvenční reakci. V dalším kroku jsou do každé jamky umístěny kuličky obsahující enzymy katalyzující následné pyrosequenční reakční kroky a celá směs se centrifuguje, aby obklopila kuličky agarózy. Pyrosequenční reakce probíhá za použití směsi jednovláknového fragmentu DNA, sekvenčního primeru a 4 enzymů: DNA polymerázy, adenosin trifosfát (ATP) sulfurylázy, luciferázy a apyrázy. Reakční směs dále obsahuje 2 enzymatické substráty: adenosin fosfosulfát (APS) a luciferin. První ze čtyř nukleotidů se přidá do sekvenční reakce a enzym DNA polymeráza katalyzuje jeho zabudování do řetězce DNA v případě, že by došlo ke komplementaritě. Během každého začlenění dochází k tvorbě fosfodiesterové vazby, čím se uvolní pyrofosfát v množství ekvivalentním k množství inkorporovaného nukleotidu. Enzym ATP sulfuryláza postupně přeměňuje fosfát na ATP v přítomnosti APS. ATP se poté využívá při přeměně luciferinu na oxyluciferin zprostředkovanou enzymem luciferáza, což generuje viditelné světlo, jehož intenzita je úměrná použitému množství ATP. Světlo je zachyceno kamerou a detekováno jako pík v pyrogramu. Výška každého píku je úměrná počtu zabudovaných nukleotidů. Systém je regenerován pomocí enzymu apyrázy, který

degraduje ATP a neregistrované nukleotidy. Následně dochází k přidání dalšího jednoho nukleotidu. Generování signálu indukuje, který nukleotid je další v sekvenci. Jak proces pokračuje, komplementární vlákno DNA roste a výsledná nukleotidová sekvence je stanovena na základě signálních píků v pyrogramu [43].



Obrázek 5 Princip pyrosekvenování – upraveno dle [43]

4.3.2 Genomový analyzátor Illumina

Sekvenování zahrnuje ligaci specifických adaptérů na oba konce krátkých fragmentů DNA a imobilizaci jednoho z adaptérů vazbou na pevný povrch. Adaptéry hybridizují se specifickými oligonukleotidy navázanými na proprietární substrát v průtokové cele [45]. Pro amplifikaci se využívá přemostění PCR a sekvenování je zahájeno přidáním sekvenčního primeru, enzymu DNA polymerázy a čtyř reverzibilních terminátorů barviv [43]. Nukleotidy nesoucí fluorofory se poté zavádějí jeden po druhém a inkorporují se do rostoucího komplementárního řetězce DNA prostřednictvím DNA polymerázy a jejich fluorescence po zabudování se zaznamenává čtyřkanálovým fluorescenčním skenerem [43, 45]. Sekvenční obrazy jsou zachyceny a analyzovány za účelem identifikace nukleotidu, který je začleněn do rostoucího řetězce a cyklus se dále opakuje s různými druhy nukleotidů [45]. Až donedávna byly délky sekvenování Illumina příliš krátké na to, aby mohly být použity pro fylogenetické studie na úrovni druhů. Nicméně délka sekvencí čtení

roste rychlým tempem, které nyní umožňuje získat spolehlivé výsledky, přinejmenším na úrovni rodů [26].

4.3.3 Sekvenování aplikovaných biosystémů ligací a detekcí oligonukleotidů

Platforma SOLiD je založena na technologii sekvenování podle ligace, přičemž se sekvenování získává měřením sériové ligace oligonukleotidu na sekvenční primer pomocí enzymu DNA ligázy. Obdobně jako při pyrosekvenování jsou fragmenty DNA ligovány na oligonukleotidové adaptéry, připojeny k magnetickým kuličkám a poté amplifikovány pomocí emulzní PCR, aby byl zajištěn dostatečný signál pro sekvenční reakce. Výsledné kuličky obsahující produkt PCR se poté kovalentně naváží na sleněné sklíčko na povrchu průtokové cely. Sekvenování je zprostředkované ligací dibázových sond, které jsou fluorescenčně značeny. Sekvenování začíná nasedáním sekvenčního primeru na sdílené adaptační sekvence přítomné v každém amplifikovaném fragmentu. Každý ligační krok je doprovázen detekcí fluorescence, po které regenerační krok připraví prodloužený primer pro další kolo ligace [43, 44].

4.3.4 Jednomolekulové sekvenování v reálném čase

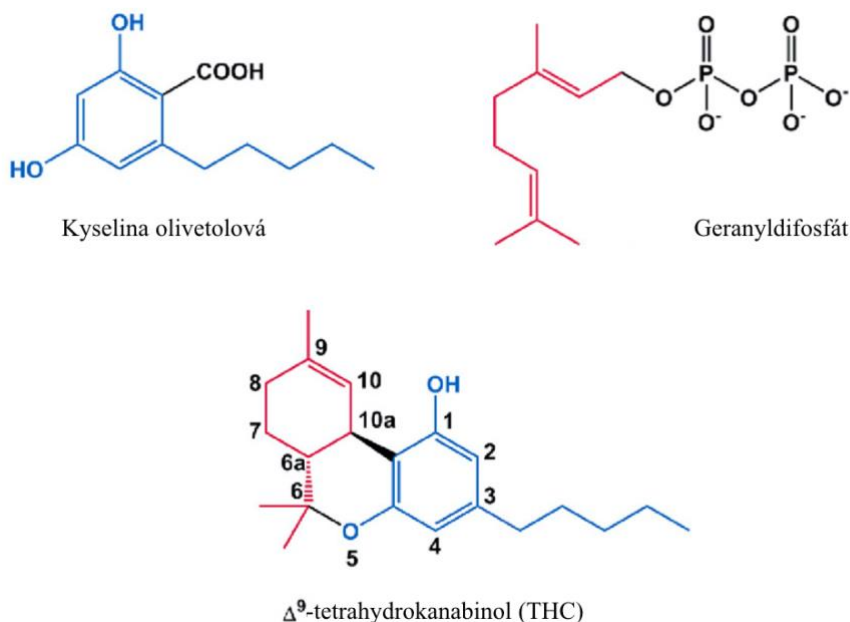
Sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase nezahrnuje amplifikaci DNA a eliminuje tak chybovost související s předpoklady PCR. Platforma SMRT používá nukleotidy modifikované fluorescenčním barvivem a vlnovod s nulovým režimem. Detekce jednotlivých molekul je zprostředkována pomocí fosfo-vázaných nukleotidů pro inkorporaci s každým nukleotidem majícím jinou fluorescenční značku. Výhodou těchto deoxyribonukleotid trifosfátů je to, že fosfolinkované fluorofory jsou uvolňovány z báze, pokud je inkorporována do sekvence DNA polymerázou. SMRT využívá modifikovanou phi29 DNA polymerázu, která má vysoké kinetické vlastnosti a dokáže účinně zvládnout fosforem vázané fluorofory, přičemž je na rozdíl od dříve zmíněných technologií imobilizována na dně kovové jamky, která je osvětlena přes skleněnou podložku. Protože DNA polymeráza obsahuje komplementární nukleotid, štěpí enzym fluorescenčně značený fosfát z báze, což generuje světelný záblesk. Pomocí nanofototonické vizualizační komory a technologie vlnovodu v nulovém čase se záblesk světla zaznamenává v reálném čase. Klíčovou vlastností je, že vlnovod v nulovém režimu zaznamenává světlo pouze v těsné blízkosti povrchu, a proto ignoruje další fluorescenční události, jako jsou fluorofory difundující do roztoku. Silnou stránkou SMRT je, že umožňuje velmi dlouhá čtení, zatímco její slabinu tvoří nejvyšší chybovost ze všech výše zmíněných platforem NGS [38].

5 KANABINOIDY

Cannabis sativa neboli konopí seté, patří do malé čeledi *Cannabaceae*. Konopí je jednoletá, obvykle dvoudomá, větrem opylovaná bylina, jejíž samčí i samičí květy rostou na samostatných rostlinách [46]. Již od starověku se používá jako psychoaktivní droga, složka lidové medicíny a zdroj textilních vláken. Taxonomická klasifikace této rostliny byla vždy obtížná kvůli její genetické variabilitě. Rod *Cannabis* podléhá dělení na tři hlavní druhy. Prvním z nich je vláknový typ *C. sativa*, který se vyznačuje bohatým obsahem kanabidiolu (CBD). Tento druh je rovněž známý pod názvem technické konopí a je využíván pro průmyslové, textilní, potravinářské či kosmetické účely. Druhý tzv. drogový typ *C. indica* je charakterizován vysokými hladinami psychoaktivní sloučeniny Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (THC). Zároveň se jedná o formu konopí, která se využívá pro lékařské a rekreační účely. Posledním druhem z rodu *Cannabis* je *C. ruderalis*. Vzhledem ke snadnému křížení těchto druhů je upřednostňována monotypická klasifikace, ve které je rozpoznán jeden druh (*C. sativa*), který je na základě kanabinoidního profilu rozdělen na různé chemotypy. Chemotyp I zahrnuje rostliny zejména drogového typu s převahou THC a zanedbatelným obsahem CBD. Do chemotypu II jsou zařazeny rostliny s přechodnými vlastnostmi mezi drogovým a vláknovým typem, tedy se středním množstvím THC i CBD. Chemotypy III a IV zahrnují rostliny vláknového typu obsahující vysoké hladiny nepsychoaktivních kanabinoidů a velmi malé množství psychoaktivních. Existuje také chemotyp V, který je navržen pro rostliny neobsahující téměř žádné kanabinoidy [47].

C. sativa se vyznačuje složitým chemickým složením, které zahrnuje terpeny, sacharidy, mastné kyseliny a jejich estery, amidy, aminy, fytosteroly, fenolové sloučeniny a specifické biologicky aktivní složky této rostliny, jmenovitě kanabinoidy [47]. Do 80. let 20. století představoval pojem kanabinoidy svou definicí skupinu typických terpenofenolických sloučenin přítomných v *Cannabis sativa*, jejich karboxylových kyselinách, analogách a produktech transformace. Z této poměrně omezené farmakognostické definice je však vyžadována značná expanze, neboť se v dnešní době klade stále větší důraz na syntetickou chemii, farmakologii a na příbuzné struktury nebo sloučeniny, ovlivňující kanabinoidní receptory. Termín kanabinoidy dnes představuje celou řadu endogenních, přírodních a syntetických ligandů kanabinoidních receptorů, které patří do široké škály chemických skupin [48]. Kanabinoidy jsou meroterpenoidy, konkrétně terpenofenolové sloučeniny, získané alkyací alkylrezorcinolu monoterpenovou jednotkou [47]. Obecná struktura

kanabinoidů je tedy tvořena ze dvou částí: difenolu (resorcinol) nesoucí alkylový řetězec (kyselina olivetolová) a cyklické monoterpenové jednotky (geranyldifosfát). Obecná struktura kanabinoidů a jejich prekurzorů, kyseliny olivetolové (OA) a geranyldifosfátu (GPP) je znázorněna na Obr. 6 [46].



Obrázek 6 Obecná struktura kanabinoidů a jejich prekurzorů – upraveno dle [46]

Konopí má dlouhou historii pro lékařské použití a je psychoaktivní látkou pro rekreační použití. Izolace jeho hlavních aktivních složek a syntéza silných kanabimimetik vedly k objevům dvou receptorů spřažených s G-proteinem, které specificky reagují na kanabinoidy a jsou označovány jako kanabinoidní receptor 1 (CB1) a kanabinoidní receptor 2 (CB2) [49]. Endokanabinoidní systém se skládá z kanabinoidních receptorů, endogenních ligandů kanabinoidních receptorů (endokanabinoidů) a enzymů, které regulují biosyntézu a inaktivaci endokanabinoidů. Endokanabinoidy jsou endogenně produkované bioaktivní lipidy, které aktivují kanabinoidní receptory. N-arachidonylethanolamin, známý také pod názvem anandamin, a 2-arachidonoylglycerol se řadí mezi dva hlavní endokanabinoidy [50]. Kanabinoidní receptory se spolu s endokanabinoidy podílejí na modulaci mnoha fyziologických funkcí, a to nejen v centrálním a periferním nervovém systému, ale také v řadě periferních míst v lidském těle, jako je endokrinní, imunitní, kardiovaskulární a reprodukční systém. Výše zmíněné CB1 a CB2 receptory jsou kódovány různými geny a vykazují 44% homologii v jejich primárních strukturách. Funkčně patří

do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem a transdukují signály vazby ligandu do různých biologických odpovědí, a to jako cestou zprostředkovanou G-proteinem, tak cestou nezávislou na tomto proteinu. Hlavní úlohou receptoru CB1 je obecně modulovat uvolňování neurotransmiterů, zatímco hlavní funkcí receptoru CB2 je mimo jiné zprostředkovat imunomodulační účinky kanabinoidů. Funkce kanabinoidních receptorů mohou být modulovány jednak různými ligandy (agonisty, částečnými agonisty, neutrálními agonisty a inverzními agonisty), které cílí na ortosterická vazebná místa v receptorech, tak alosterickými modulátory, které se vážou na alosterická vazebná místa receptorů [49].

Psychotropní účinky jsou zprostředkovány hlavně CB1, který je široce distribuován v mozku, ale hlavně ve mozkové kůře, bazálních gangliích a mozečku. CB1 je také přítomen v několika tkáních a orgánech, včetně tukové tkáně, gastrointestinálního traktu míchy, nadledvin a štítné žlázy, jater, reprodukčních orgánů a imunitních buněk. CB2 je v zásadě exprimován v imunitních buňkách, nicméně nachází se také v jiných typech buněk, včetně chondrocytů, osteocytů a fibroblastů. Je také přítomen v některých nervových tkáních, jako jsou ganglia dorzálních kořenů a mikroglialní buňky. CB2 lze tedy považovat za periferní kanabinoidní receptor. THC je primární psychoaktivní složkou konopí a funguje jako částečný agonista CB1 a má dobře známé účinky na bolest, zvýšení chuti k jídlu, trávení, emoce a procesy, které jsou zprostředkovány endokanabinoidním systémem. Naopak CBD, jenž představuje hlavní nepsychoaktivní fytokanabinoidní složku, vykazuje velmi malou afinitu k oběma receptorům. CBD působí jako částečný antagonist CB1 a zároveň jako slabý inverzní agonista CB2 [50].

6 BIOSYNTÉZA FYTOKANABINOIDŮ

Přírodní rostlinné kanabinoidy nesou souhrnný název fytokanabinoidy a lze je obecně nalézt ve všech rostlinných částech, kromě semen. Stopy fytokanabinooidů obsažené v semenech jsou s největší pravděpodobností výsledkem kontaminace konopnou pryskyřicí. V zásadě neexistují žádné kvalitativní rozdíly ve spektru fytokanabinooidů mezi jednotlivými částmi rostlin, jedná se pouze o rozdíly kvantitativní. Nejvyšší koncentrace fytokanabinooidů se vyskytují ve specializovaných sekrečních strukturách, žláznatých trichomech samičích květů. V listech je jejich obsah nižší a k postupnému snižování dochází dále přes stonek až ke kořenům, kde je obsah fytokanabinooidů velmi nízký [48].

Fytokanabinoidy jsou produkovány metabolismem rostliny v kyselé formě, což znamená, že obsahují karboxylovou kyselinu připojenou k aromatickému kruhu. Neutrální a psychoaktivní formy fytokanabinooidů jsou výsledkem neenzymatické dekarboxylace vlivem tepla, slunečního záření či dlouhodobého skladování ztrátou relativně nestabilní karboxylové skupiny ve formě oxidu uhličitého (CO_2) [46, 48]. Biosyntetické dráhy hlavních fytokanabinooidů s pentylovými postranními řetězci, jako jsou THC, CBD, kanabinol (CBN), kanabichromen (CBC) a kanabigerol (CBG) začínají syntézou kyseliny kanabigerolové (CBGA), která je ústředním meziproduktem pro biosyntézu fytokanabinooidů. Prekurzory biosyntézy pocházejí ze dvou odlišných drah. Jedná se o plastidovou dráhu, která vede k biosyntéze prvního prekurzoru GPP a o OA, jenž je druhým prekurzorem a produktem polyketidové dráhy. Prvním specifickým biosyntetickým krokem je kondenzace GPP s OA za vzniku CBGA. Za pomoci specifických enzymů dochází k stereoselektivní oxidační cyklizaci monoterpenové části CBGA na kyselinu kanabidiolovou (CBDA), kyselinu Δ^9 -tetrahydrokanabinolovou (THCA) a kyselinu kanabichromenovou (CBCA). THCA může následně dále oxidovat za tvorby kyseliny kanabinolové (CBNA) [48, 51]. K neenzymatické dekarboxylaci kanabinooidních kyselin za vzniku neutrálních forem dochází přirozeně v průběhu času, neboť jejich přítomnost je z velké části výsledkem proměnlivých a nepředvídatelných podmínek během všech fází pěstování, sklizně, zpracování, skladování a používání. Je tedy třeba brát v úvahu pravděpodobnost, že se dobře definovaný přípravek z konopí může velmi rychle změnit na produkt s výrazně odlišnými biologickými účinky [48]. Existují také různé izomery fytokanabinooidů, které jsou výsledkem variací nebo izomerace polohy dvojně vazby v alicyklickém uhlíkovém kruhu, jako například Δ^8 -tetrahydrokanabinol (Δ^8 -THC). Dalším neobvyklým fytokanabinooidem je CBN, který se

7 MOŽNOSTI APLIKACE FYTOKANABINOIDŮ

Průmyslové konopí je hojně využíváno k výrobě různorodých průmyslových a spotřebních produktů, včetně potravin a nápojů, doplňků stravy, kosmetiky a přípravků pro osobní péči, ale také textilií, papíru, stavebních a izolačních materiálů, nátěrů a biopaliv. Průmyslová odvětví považují konopí za slibné řešení, a tedy alternativu k syntetickým výrobkům. V budoucnu lze očekávat několikanásobné zvýšení výrobků z konopí na globálním trhu, což řadí konopí mezi slibné suroviny s hlavním symbolem udržitelného zemědělství [53].

7.1 Potravinářský průmysl

Využití konopí jako potravin se datuje zhruba před 3000 lety, kdy jej Číňané a Nepálci používali jako hlavní potravinářskou komoditu. Konopí však nakonec ztratilo svůj význam jako jídlo, zatímco jeho psychoaktivní vlastnosti získávaly čím dál tím větší pozornost a jeho pěstování se stalo nezákonné. S přibývajícím časem a množstvím odborníků na výživu, bylo konopí oživeno a představeno jako velmi zdravý zdroj potravy [53].

Jedinečná nutriční kvalita je dána přítomností proteinu z konopných semen nazývaného edestin. Tento unikátní protein je velmi snadno stravitelný a zároveň podobný globulárním proteinům lidského těla, které se nacházejí v krevní plazmě, což značí jeho dobrou kompatibilitu s lidským zažívacím systémem. V celé rostlinné říši má konopí nejvyšší množství tohoto proteinu v semeni. Edestin je nejbohatší zdroj kyseliny α -linolové a představuje tak vhodný zdroj tuků zejména pro ty, kteří nekonzumují ryby či vejce. Konopné semínko také obsahuje fytosteroly, které pomáhají snižovat množství cholesterolu v těle tím, že odstraňují tuky přítomné v tepnách. V závislosti na výživových vlastnostech konopí bylo na trh uvedeno mnoho nových výrobků, včetně konopného másla, konopného oleje, konopného mléka anebo konopné mouky [53].

Protože se konopné produkty vyrábí pro použití v potravinách, existuje obava, že by olej mohl být kontaminován významným množstvím psychoaktivní složky THC. Přestože samotné konopné semeno metabolicky neprodukuje žádné kanabinoidy, lze je v konopném oleji detekovat, neboť kanabinoidy a další složky přítomné v pryskyřici mohou být přeneseny z květů a listů na semena a následně do oleje během lisování. Mezi způsoby prevence takové kontaminace patří důkladné čištění semen, včetně odstranění pláště semen, tedy loupání a použití odrůd konopí s certifikovaným nízkým obsahem THC, tedy technického konopí s maximálním obsahem THC do 0,2 % na evropském trhu. V dnešní

době je množství THC pozorované v konopném oleji obvykle tak malé, že neexistuje možnost intoxikace, a tudíž žádné potenciální negativní účinky na lidské zdraví [48].

7.2 Kosmetický průmysl

Úspěch v konopném průmyslu, pokud jde o objevující se trendy v přírodní kosmetice, pochází ze základních vlastností rostliny, které pomáhají udržet zdravou pokožku spotřebitele. Konopná kosmetika přichází se silnou základnou pro růst jako alternativa pro spotřebitele, kteří upřednostňují přírodní ingredience s malým nebo žádným dopadem na životní prostředí. Jelikož je konopí bohaté na esenciální mastné kyseliny, pomáhá léčit záněty pokožky, vyrovnávat akné, regulovat množství kožního mazu a zklidňovat pokožku. CBD je hlavní složkou konopí, která bojuje proti stárnutí pokožky spolu s prokazatelnými antioxidačními účinky. CBD také spolupracuje s lidským endokanabinoidním systémem, čímž podporuje obnovu a omlazení pokožky [53]. CBD silně reguluje proliferaci, migraci a neurogenezi mezenchymálních kmenových buněk, které mají prokazatelné protizánětlivé, imunitní, metabolické a samoobnovovací vlastnosti. Většina kosmetických produktů na bázi CBD oleje je legálně k dispozici s koncentrací THC nižší než 0,3 mg [54]. Kromě konopných pleťových a tělových produktů jsou konopné sloučeniny také míchány jako přísady do šampónů, balzámů a laků na vlasy, mýdel, balzámů na rty, rtěnek, krémů na ruce či deodorantů [53].

7.3 Fytokanabinoidy a orální mikrobiom

Zubní plak označuje složitý biofilm, který funguje jako rezervoár několika mikrobů. Lze jej definovat jako měkký povlak ulpívající na povrchu zubu či na jiných tvrdých površích v dutině ústní, včetně odnímatelných a pevných náhrad. Zubní plak se tvoří kombinací slin, tekutin a zbytků potravin usazených na povrchu zubů a linií dásní. Obsahuje tisíce bakterií, které přeměňují zbytky jídla na kyseliny, což nakonec vede k iniciaci zubních onemocnění, jako je zubní kaz, zánět dásní a periodontální onemocnění [55].

Paradentóza neboli onemocnění dásní je celosvětový problém veřejného zdraví, který každoročně postihuje miliony lidí a je nejčastější příčinou ztráty zubů u dospělých jedinců. Jedná se o infekci dásní, která postihuje měkké a tvrdé tkáně v oblasti zubů. Protože zubní povlak je primární příčinou několika zubních onemocnění, měl by se pravidelně odstraňovat pomocí různých druhů pomůcek pro péči o ústní dutinu, včetně mechanických pomůcek, jako jsou zubní a mezizubní kartáčky či mezizubní nitě a chemických pomůcek, jako jsou

ústní vody a zubní pasty. Spolu s komerčně dostupnými látkami ke snížení bakteriálního obsahu zubního plaku je k dispozici řada přírodních přípravků, zahrnující extrakty z granátového jablka, skořice, aloe vera nebo mořských řas. Podobně mají také fytokanabinoidy extrahované z konopí potenciální antimikrobiální vlastnosti proti grampozitivním i gramnegativním druhům. Byla porovnána účinnost komerčních přípravků pro péči o ústní dutinu a kanabinoidů na snižování bakteriálního obsahu zubních plaků. Kanabinoidy vykazovaly proti komerčním přípravkům Colgate a Oral B vyšší účinnost při snižování počtu kolonií bakteriálních kmenů zubního plaku. Extrakty *C. sativa* vykazují antimikrobiální aktivitu na grampozitivní bakterie, jako jsou *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* a gramnegativní bakterie, jako *Proteus vulgaris*, *Bordetella bronchioseptica*, *Pectobacterium carotovum*, *Pseudomonas savastanoi*. Antimikrobiální účinek byl rovněž zaznamenán i u *Aspergillus niger* a *Candida albicans* [55]. Vysoké dávky CBD, CBN a THC potlačují růst orálních patogenů *Porphyromonas gingivalis* a *Filifactor alocis*, zatímco *Treponema denticola* zůstala vůči těmto fytokanabinoidům rezistentní ve všech testovaných dávkách [56]. Endokanabinoid anandamid vykazuje antibakteriální vlastnosti proti kmenům *S. aureus* rezistentním vůči antibiotiku methicilinu (MRSA) tak, že inhibuje jejich schopnost tvořit biofilm, snižuje metabolickou aktivitu zralého biofilmu a modifikuje vlastnosti povrchu bakteriálních buněk bez usmrcení bakterií. Endokanabinoidy a sloučeniny jim podobné mohou sloužit jako přirozená obranná linie proti MRSA nebo jiným bakteriím rezistentním na antibiotika. Takové kanabinoidy by vzhledem ke svému působení proti biofilmu mohly být slibnou alternativou k antibiotikům proti infekcím MRSA souvisejícím s biofilmem. Podobné účinky jako na MRSA byly zaznamenány rovněž u fytokanabinoidů CBD a CBG [55].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části diplomové práce je zjistit možný kvantitativní a kvalitativní vliv přírodních fytoKANABINOIDŮ na mikroflóru ústní dutiny metodami mikrobiologickými a pokrokově molekulárně-biologickými.

9 MATERIÁL A METODY

9.1 Přístroje a pomůcky

- Laboratorní předvážky (KERN, Německo)
- Laboratorní vertikální autokláv Systemec 2540 EL (Systemec, Německo)
- Laminární box (Telstar, Španělsko)
- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR, Itálie)
- Laboratorní třepačka Vortex-Genie 2 (MO BIO Laboratories Inc., USA)
- Laboratorní minitřepačka MS 3 basic (IKA, Německo)
- Lineární třepačka SK-O180-E (DLAB, Čína)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- Dry Block Heating Thermostat Bio TBD-100 (Biosan, Lotyšsko)
- Spiral plater Eddy Jet 2 (IUL, Španělsko)
- Automatic Colony Counter SphereFlash® (IUL, Španělsko)
- Spektrofotometr Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Biologický termostat (Mettler, Německo)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Elektroforetická vana + příslušenství MultiSUB Mini (Consort, Belgie)
- Elektroforetická vana + příslušenství HU10 Mini-Plus Horizontal (SCIE-PLAST, UK)
- Zdroj napětí elektroforetické vany EV243 (Consort, Belgie)
- UV-transluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, UK)
- Vortex V-1 Plus (Biosan, USA)
- Anaerostat (Merck, Německo)
- Automatické mikropipety

- Dávkořač na láhev
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky z plastu

9.2 Materiál

- Jednorázové mezizubní kartáčky (Dontodent, Německo)
- Papírová stupnice barevné škály zubů (Opalescence, USA)
- Eddy Jet kalíšky na vzorek (IUL, Španělsko)
- Eddy Jet mikroinjekční stříkačky (IUL, Španělsko)
- Anaerobní vyvíječ Anaerocult® A (Merck, Německo)
- Anaerobní vyvíječ Anaerocult® A mini (Merck, Německo)
- DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, USA)
- EliZyme™ HS Robust MIX (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- Marker 100 bp DNA Ladder (Biolabs, UK)
- PCR clean-up, NucleoMag® 96 PCR (MACHEREY-NAGEL, Německo)

9.3 Příprava roztoků a živných půd

9.3.1 Fyziologický roztok

K přípravě fyziologického roztoku bylo zapotřebí navážít 4,3 g NaCl (s přesností na 0,1 g), rozpustit jej v destilované vodě a převést do skleněné reagenční láhve. Následně byla reagenční láhev doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem 500 ml. Za pomoci dávkovače upevněného na reagenční láhvi byl roztok dávkován v objemu 3 a 4,5 ml do sterilních skleněných zkumavek. Takto připravené zkumavky s fyziologickým roztokem byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

9.3.2 Lyzační pufr

Na přípravu lyzačního pufru bylo do reagenční láhve převedeno 10 ml ze zásobního roztoku 1M TRIS (pH 8,0) a 20 ml ze zásobního roztoku 0,5M EDTA (pH 8,0). Následně bylo ke směsi přidáno 5 ml 20% roztoku SDS a reagenční láhev byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem 100 ml. Výsledný lyzační pufr tedy obsahoval 100mM TRIS, 100mM EDTA, 1% SDS a destilovanou vodu.

9.3.3 Plate Count Agar (PCA)

Ke stanovení celkového počtu aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů byla využita PCA živná půda, která byla připravena navážením 7 g PCA (s přesností na 0,1 g) do skleněné reagenční láhve a doplněním destilovanou vodou na požadovaný objem 400 ml. Takto připravená a řádně rozmíchaná živná půda byla v reagenčních lahvích sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Následně byla vysterilizovaná půda rozlita do sterilních plastových Petriho misek.

9.3.4 Reinforced Clostridial Broth + Agar (RCA)

Živná půda RCA byla použita pro stanovení celkového počtu anaerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů. Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo 15,2 g zesíleného klostridiálního bujónu, ke kterému bylo přidáno 6 g agaru (s přesností na 0,1 g) pro zvýšení pevnosti živné půdy. Směs byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem 400 ml, řádně rozmíchána a ponechána ke sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Následně byla vysterilizovaná půda rozlita do sterilních plastových Petriho misek.

9.4 Testované přípravky

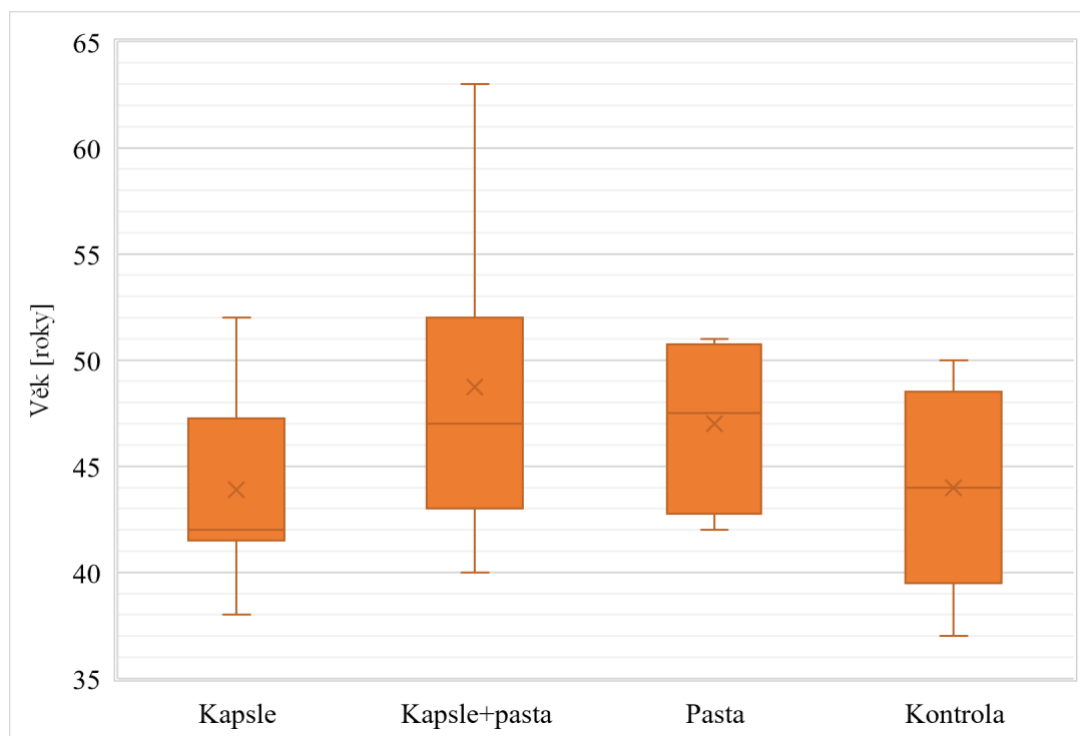
Diplomová práce byla vytvořena ve spolupráci s Výzkumným ústavem Cannasan z.ú. a testované přípravky byly do studie laskavě poskytnuty panem Ing. Františkem Bednaříkem, který preparáty Cannasan vyrábí. Preparáty Cannasan obsahují širokou škálu kanabinoidů, přičemž obsah THC je nižší než 0,2 %, tudíž nevykazují žádné psychotropní účinky.

V této experimentální studii byl testován patentovaný doplněk stravy Cannasan IMUNO, který byl dobrovolníkům poskytnut ve formě perorálních kapslí. Druhým testovaným přípravkem byla zubní pasta Cannasan. Účastníci studie byli instruováni o způsobu dávkování kapslí (1–0–1) a doporučené aplikaci zubní pasty. Oba testované přípravky byly dobrovolníkům věnovány k pravidelnému každodennímu používání v domácím prostředí po dobu 3 měsíců. Rámcové složení preparátů Cannasan dle Mezinárodní nomenklatury kosmetických přísad (INCI):

- Cannasan IMUNO: *Cannabis sativa*, *Vitis vinifera*, *Brassica napus*, *Ribes nigrum*, *Taraxacum officinale*, *Salvia officinalis*, *Fagus sylvatica*, *Helianthus tuberosus*;
- Cannasan zubní pasta: *Coconut oil*, *Vitis vinifera*, *Cannabis sativa*, *Vitis vinifera*, *Chamomilla officinalis*.

9.5 Charakterizace souboru účastníků studie

Experimentální studie se dobrovolně zúčastnilo celkem 30 žen ve věkovém rozhraní 37–63 let. Před začátkem experimentu bylo dobrovolníkům předloženo k podpisu prohlášení účastníka studie (Příloha P I) a informovaný souhlas s účastí ve studii (Příloha P II). Následně bylo každému dobrovolníkovi přiděleno evidenční číslo, pod kterým byl veden po celou dobu studie. Dobrovolníci byli rozděleni na základě testovaných preparátů do 4 skupin, přičemž 4. skupina sloužila jako kontrola a skládala se celkem z 5 dobrovolníků, kteří nepoužívali žádný z testovaných preparátů. Věkový průměr této kontrolní skupiny byl 44 let (prostý aritmetický průměr). Dobrovolníkům, kteří užívali pouze potravinový doplněk byla přiřazena 1. skupina (kapsle). Dohromady tuto skupinu tvořilo 10 dobrovolníků s věkovým průměrem 44 let. Do 2. skupiny bylo zařazeno 11 dobrovolníků, jimž byly přiřazeny oba testované preparáty, tedy potravinový doplněk i zubní pasta. Věkový průměr této skupiny činil 49 let. Poslední zmíněná 3. skupina byla zrealizována pro dobrovolníky, kteří používali pouze zubní pastu. Celkem se jednalo o skupinu 4 dobrovolníků s věkovým průměrem 47 let. Krabicový graf vyobrazený na Obr. 8 znázorňuje věkové rozhraní účastníků studie včetně průměru a mediánu pro každou skupinu. Součástí experimentální studie byl také dotazník, který přibližoval zejména zdravotní stav ústní dutiny a stravovací zvyklosti dobrovolníků (Příloha P III).



Obrázek 8 Charakteristika věkového rozhraní účastníků studie

9.6 Odběr vzorků

Vzorky byly u skupin dobrovolníků postupně odebírány před zahájením experimentu, dále pak po 1 a následně po 3 měsících používání testovaných preparátů Cannasan. Každý dobrovolník byl rovněž informován, aby přibližně 1,5 – 2 hodiny před odběrem nejedl, nekouřil, neprováděl ústní hygienu a aby po tuto dobu pil pouze čistou vodu. Odběr vzorku byl realizován samotným dobrovolníkem pomocí dvou jednorázových mezizubních kartáčků, přičemž každý sloužil pro jednu stranu ústní dutiny, a to včetně vrchních i spodních mezizubních prostor. Po provedení odběru vzorku z mezizubních prostor daného dobrovolníka byl konec prvního mezizubního kartáčku z pravé strany ihned odstřižen a vložen do 3 ml fyziologického roztoku ve zkumavce pro mikrobiologickou analýzu, zatímco konec druhého mezizubního kartáčku se vzorkem z levé strany byl vnesen do 200 µl lyzačního pufru v eppendorfci a ihned zmražen. Takto připravený vzorek dále sloužil pro molekulárně-biologickou analýzu. Každá zkumavka i eppendorfka se vzorkem byla vždy řádně označena jak evidenčním číslem, tak číslem měření.

9.7 Hodnocení barevné škály zubů

Součástí procesu odběru vzorků bylo také hodnocení barevné škály zubů dobrovolníků. Hodnocení bylo prováděno pomocí barevné papírové stupnice (Obr. 9), která se přikládala k horním řezákům dobrovolníků (I1, I2).



Obrázek 9 Barevná stupnice Opalescence

Barevná papírová stupnice byla dále rozdělena na 2 podstupnice, a to na stupnici Yellow/Brown (Y/B), která signalizovala podtón zubů do žluta, a na stupnici Grey/Brown (G/B) s podtónem zubů do šeda. Stupnice Y/B nabývala hodnot 1–12, zatímco stupnice G/B nabývala hodnot 1–7. Na základě vizuální podobnosti barvy zubů byla dobrovolníkům přiřazena hodnota na odpovídající stupnici. K eliminaci odlišnosti v individuálním vnímání barev byla hodnota dobrovolníkům přiřazena až po předešlé konzultaci s další osobou. Vyhodnocení bylo provedeno vždy za konstantních světelných podmínek uvnitř laboratoře. Hodnocení barevné škály zubů bylo vykonáno na začátku experimentu, dále pak po 1 a následně po 3 měsících používání testovaných preparátů Cannasan.

9.8 Mikrobiologická analýza

9.8.1 Kultivační metoda

Mikrobiologická analýza byla provedena nejpozději do 2 hodin od odběru každého vzorku následujícím způsobem. Pro maximální uvolnění mikroorganismů z mezizubního kartáčku do fyziologického roztoku byl stojan se zkumavkou upevněn na lineární třepačce, kde byl ponechán k třepání rychlostí 200 ot/min při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následující kroky byly provedeny v zařízení s proudem filtrovaného vzduchu, tedy laminárním boxu, který byl před samotnou prací vysvícen ultrafialovým (UV) světlem po dobu 15 minut. Veškeré úkony byly také vykonávány v chirurgických rukavicích. Vzhledem k vysokému počtu mikroorganismů v původním vzorku bylo nutné provést desítkové ředění. sterilním fyziologickým roztokem. Z původní zkumavky se vzorkem bylo automatickou mikropipetou odpipetováno 500 μ l tekutiny do nové zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem o objemu 4,5 ml. Tímto způsobem byla získána 10x zředěná suspenze, z které bylo po promíchání na vortexu odpipetováno 500 μ l do další nové zkumavky pro získání 100x zředěné suspenze. Z takto připravených zředěných suspenzí a z původní neředěné suspenze bylo automatickou mikropipetou odebráno 1000 μ l vzorku a tento objem byl pipetován do plastových kalíšků Eddy Jet. Kalíšky se vzorky byly následně postupně od nejvyšší koncentrace po nejnižší vloženy do přístroje Spiral Plater Eddy Jet 2, kde bylo provedeno automatické naočkování živných půd na Petriho miskách pomocí sterilní mikroinjekční stříkačky Eddy Jet. Princip spirálové metody spočívá v rozprostření definovaného klesajícího množství vzorku na Petriho misce pomocí Archimédovy spirály za účelem naočkování několika faktorů ředění na jednu Petriho misku. Na přístroji byl nastaven logaritmický typ spirály s objemem vzorku 50 μ l a opakováním celkem po 3 Petriho misky.

Následně byla z každého kalíšku provedena inokulace vzorku na 2 Petriho misky s PCA živnou půdou a na 1 Petriho misku s RCA živnou půdou. Každá Petriho miska byla označena evidenčním číslem, číslem měření i příslušným ředícím faktorem.

Celkový počet mikroorganismů byl stanovován jak při aerobní kultivaci, ke které byla využita PCA živná půda, tak při anaerobní kultivaci, ke které byla využita RCA živná půda. Anaerobní kultivace byla provedena vložením naočkovaných RCA Petriho misek v zavěšené poloze do plastového anaerostatu za použití vyvíječe anaerobní atmosféry Anaerocultu A. Poté byl anaerostat uzavřen a ponechán k inkubaci spolu s naočkovanými PCA Petriho miskami, které byly rovněž v zavěšené poloze umístěny do krabic. Inkubace probíhala v biologickém termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po inkubaci byly vzniklé kolonie na Petriho miskách automaticky počítány a přepočítány na počet mikroorganismů v původní vzorku pomocí přístroje SphereFlash, z kterého byla vyhodnocena hodnota CFU/ml (počet kolonie tvořících jednotek na 1 ml vzorku).

9.8.2 Disková difúzní metoda

Jednotlivé preparáty Cannasan byly také testovány diskovou difúzní metodou, kdy během kultivace dochází k difúzi látek z disku do okolního agaru. Potenciální antibakteriální účinky se u testované látky projeví tvorbou inhibiční zóny kolem disku.

Nejdříve byla vytvořena bakteriální suspenze z čisté kultury ve fyziologickém roztoku. Bakteriální kmeny byly obdrženy z České sbírky mikroorganismů (CCM) a pro testování antimikrobiálních účinků byly vybrány kmeny *Escherichia coli* ATCC 25922 (CCM 3954) a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CCM 3953). Jednotlivé kolonie vybraných bakteriálních kmenů byly pomocí sterilní kličky postupně vneseny do fyziologického roztoku tak, aby vytvořený zákal odpovídal stupnici 0,5 McFarlandova zákalového standardu. Výsledné bakteriální inokulum bylo ihned po zhotovení krouživým pohybem rozlito v množství 1 ml na povrch předem připravené Petriho misky s Mueller-Hintonovým agarem. Na takto inokulované Petriho misky byly položeny 2 sterilní papírové disky o průměru 6 mm, na které bylo předem aplikováno vždy 10 g testovaného preparátu Cannasan (Cannasan IMUNO, zubní pasta Cannasan). Bezprostředně po aplikaci disků byly Petriho misky inkubovány v biologickém termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin a celý experiment byl třikrát opakován.

9.9 Molekulárně-biologická analýza

9.9.1 Izolace DNA

Pro maximální výtěžek byla izolace DNA provedena pomocí DNeasy® Blood & Tissue Kit firmy QIAGEN. Názvy jednotlivých roztoků jsou uvedeny dle originálního návodu a celý systém je optimalizován tak, aby umožňoval přímou lyzi buněk s následnou selektivní vazbou DNA na membránu DNeasy, přičemž jednoduché zpracování centrifugací zcela odstraňuje kontaminující látky a inhibitory enzymů, zejména proteinů. Purifikovaná DNA se v konečné fázi eluuje v pufru s nízkým obsahem soli nebo ve vodě a je přichystána k použití v následných aplikacích.

Izolace DNA ze vzorku byla realizována dle návodu DNeasy® Blood & Tissue Kitu následovně. Nejprve byla eppendorfka se zmraženým lyzačním pufrém obsahující vzorek vyjmuta z mrazicího boxu a ponechána k rozmrazení při pokojové teplotě. Poté bylo k roztoku přidáno 20 μ l proteinázy K spolu s 200 μ l pufru AL. Eppendorfka se směsí byla řádně uzavřena a vložena v horizontální poloze do adaptéru laboratorní třepačky Vortex-Genie 2, kde byla vortexována zhruba 1 minutu. Následně byla eppendorfka přemístěna do vyhřátého termobloku na 56 °C a ponechána k inkubaci po dobu 10 minut. Po inkubaci byla eppendorfka vyjmuta z termobloku a ke směsí bylo přidáno 200 μ l 96% ethanolu. Takto připravená směs byla v uzavřené eppendorfce opětovně vložena do adaptéru laboratorní třepačky a vortexována 1 minutu. Po uplynutí této doby byl celý objem přepipetován na MiniSpin kolonku s membránou DNeasy, která byla vsunuta do 2 ml mikrozkušavky. Ucelená aparatura kolonky a mikrozkušavky byla centrifugována při 8 000 rpm po dobu 1 minuty. Profiltrovaný roztok byl spolu s mikrozkušavkou odstraněn a kolonka byla připevněna na novou 2 ml mikrozkušavku. Na kolonku bylo následně pipetováno 500 μ l pufru AW1, který obsahuje ve vysoké koncentraci chaotropní sůl, jenž podporuje specifickou adsorpci DNA na silikátový povrch DNeasy membrány spinové kolonky. Ucelená aparatura byla znovu podrobena centrifugaci při 8 000 rpm po dobu 1 minuty. Kolonka byla přemístěna na novou 2 ml mikrozkušavku, přičemž předešlá mikrozkušavka byla i s filtrátem opět odstraněna. Na kolonku byl pipetován pufr AW2 o objemu 500 μ l a ucelená aparatura byla podrobena centrifugaci při 14 000 rpm po dobu 3 minut. Po centrifugaci byla mikrozkušavka s profiltrovaným roztokem zlikvidována a kolonka byla připevněna na novou eppendorfku o objemu 1 ml. Adsorbovaná čistá DNA byla eluována přidáním 100 μ l pufru AE přesně do středu bílé DNeasy membrány

spinové kolonky a následnou inkubací při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po inkubaci, a tedy uvolnění DNA z membrány, byla upevněná kolonka spolu s eppendorfkou centrifugována při 8 000 rpm po dobu 1 minuty. Tento krok byl pro zvýšení výtěžku DNA znovu opakován. Po dokončení centrifugace byla kolonka zlikvidována a eppendorfka obsahující izolovanou čistou DNA byla uchována v mrazícím boxu pro následnou molekulární analýzu.

9.9.2 Kontrolní stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Pro kontrolní stanovení koncentrace a ověření čistoty izolované DNA byla využita spektrofotometrická metoda. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Tecan Infinite 200 PRO a příslušného ovládacího programu. Zpočátku byly jamky mikrodestičky pročištěny malým množstvím lihu a poté následovalo proměření absorbance elučního pufru BE, který sloužil jako „blank“. Do každé jamky destičky Nano Quant bylo pipetováno 2 μ l tohoto pufru a následně byla měřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm. Po skončení měření byl eluční pufr odstraněn a jamky mikrodestičky byly opět pročištěny. Do každé čisté jamky bylo pipetováno 2 μ l vzorku izolované DNA a absorbance byla proměřena při stejných vlnových délkách, jako u předchozího elučního pufru. Příslušné vlnové délky byly zvoleny dle charakteristik struktur obsažených ve vzorku. Koncentrace DNA byla vypočítána na základě změřené absorbance při 260 nm, neboť tato oblast vlnové délky odpovídá absorpčnímu maximu nukleových kyselin. Proteiny, jakožto možné kontaminanty izolované DNA, mají své absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Ověření čistoty DNA, respektive míra znečištění proteiny, byla stanovena z poměru A260/A280. Jestliže se hodnota poměru nacházela v rozmezí 1,8 – 2,0, vzorek izolované DNA nebyl znečištěn kontaminanty.

9.9.3 Příprava reakční směsi a vlastní průběh PCR

Z izolované DNA byla pro následnou taxonomickou analýzu bakteriálního a houbového profilu orálního mikrobiomu prostřednictvím NGS provedena amplifikace vybraných úseků DNA pomocí metody PCR, která byla uskutečněna ve dvou krocích.

Primární PCR

Vybraným úsekem amplifikace byla pro taxonomickou identifikaci bakterií variabilní oblast V4-V5 genu kódujícího 16S rRNA. Pro amplifikaci této variabilní oblasti byly aplikovány

primery 515f a 926r. Pro taxonomickou analýzu hub byl za cílové místo amplifikace zvolen interní transkribovaný spacer 2 (ITS2) a PCR byla provedena pomocí primerů ITS3f a ITS4r.

Příprava reakční směsi pro primární PCR probíhala ve speciálním PCR boxu, který byl před samotnou prací vysvícen UV zářením po dobu 15 minut. Všechny potřebné reagenty byly před aplikací šetrně rozmrazeny, krátce promíchány a stočeny na centrifuze. Pipetované objemy jednotlivých komponentů reakční směsi jsou uvedeny v Tab. 1, přičemž celkový objem směsi byl 25 μ l.

Tabulka 1 Složení reakční směsi pro primární PCR

Komponenty reakční směsi	Objem [μ l]	Koncentrace v reakční směsi
2x EliZyme™ HS Robust MIX	12,5	1x
Sterilní PCR voda	9,5	
Primer f (10 μ mol/l)	1,0	0,4 μ mol/l
Primer r (10 μ mol/l)	1,0	0,4 μ mol/l
Templát DNA	1,0	

Eppendorfký s takto připravenou PCR reakční směsí byly promíchány, centrifugovány a poté vloženy do stojanu termocykleru Aeris™, kde probíhala amplifikace. Časové a teplotní profily byly zvoleny dle programu uvedeného v Tab. 2. Po skončení reakce lze produkty udržovat v bloku termocykleru při teplotě 4 °C neomezeně dlouhou dobu, což je možno využít jako formu skladování produktů před jejich samotnou detekcí.

Tabulka 2 Podmínky průběhu PCR

Proces	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	35
Annealing	55	30 s	
Elongace	72	30 s	
Závěrečná elongace	72	5 min	1

Použitý EliZyme™ HS Robust MIX obsahuje DNA polymerázu, deoxynukleotidy (dNTP), MgCl₂ a optimalizovaný reakční pufr. Enzym je při teplotě pod 65 °C inaktivován, čímž se předchází tvorbě primer-dimer komplexů a nespecifických amplifikací.

Sekundární PCR

Při sekundární PCR jsou získané produkty primární PCR použity jako templát a označeny primery obsahující Illumina adaptéry s indexy i7 a i5, čímž dojde k vytvoření sekvenačních knihoven, které umožňují následnou identifikaci vzorků metodou NGS. Příprava reakční směsi pro sekundární PCR probíhala opět v předem vysvíceném PCR boxu a pipetované objemy jednotlivých komponentů jsou zaznamenány v Tab. 3, přičemž celkový objem směsi činil 50 μl .

Tabulka 3 Složení reakční směsi pro sekundární PCR

Komponenty reakční směsi	Objem [μl]	Koncentrace v reakční směsi
2x EliZyme™ HS Robust MIX	25	1x
Sterilní PCR voda	19	
Primer f – i7 (10 $\mu\text{mol/l}$)	2	0,4 $\mu\text{mol/l}$
Primer r – i5 (10 $\mu\text{mol/l}$)	2	0,4 $\mu\text{mol/l}$
Templát primární PCR	2	

Samotná PCR probíhala v termocykleru za totožných časových i teplotních podmínek uvedených v Tab. 2. Po dokončení sekundární PCR bylo provedeno kontrolní stanovení koncentrace a čistoty DNA na přístroji Tecan Infinite 200 PRO dle postupu uvedeného v kap. 9.9.2. Úspěšnost vykonané PCR byla následně ověřena elektroforeticky.

9.9.4 Elektroforetická separace produktů PCR

Elektroforéza na agarózovém gelu je nejúčinnějším způsobem separace fragmentů DNA různých velikostí. Princip této metody je založen na rozdílné mobilitě jednotlivých fragmentů v elektrickém poli skrz póry agarózového gelu. Fosfátová páteř molekuly DNA je záporně nabitá a po aplikaci elektrického pole se jednotlivé fragmenty pohybují od katody směrem k anodě, tedy kladně nabitě elektrodě. Tímto způsobem větší, neboli delší fragmenty migrují skrz póry gelu pomaleji, než fragmenty malé, čímž dojde k jejich separaci na základě rozdílné velikosti [57].

Elektroforetická kontrola kvality a délky produktů PCR byla provedena v 1,5% agarózovém gelu, který byl připraven rozpuštěním agarózy v 1x koncentrovaném Tris-Acetát-EDTA (TAE) elektroforetickém pufru v Erlenmayerově baňce. Následně byla směs přivedena k varu pomocí mikrovlnné trouby, kde došlo k jejímu úplnému rozpuštění a vzniku

homogenního roztoku. Po mírném ochlazení byl do tekutého agaru přidán ethidium bromid, což je toxické interkalační barvivo, jež tvoří s nukleovými kyselinami komplex, který po osvětlení UV zářením fluoreskuje. Takto připravený agar byl nalit do horizontální aparatury s hřebínkem, který sloužil pro tvorbu jednotlivých jamek. Po dostatečném zatuhnutí byl hřebínek odstraněn a agar vložen do elektroforetické vany, která byla na každém konci opatřena elektrodou (katodou a anodou). Vana byla následně celá zalita 1x koncentrovaným TAE pufrem, který sloužil jako elektrolyt, a umožnil tak tok elektronů mezi elektrodami. Do utvořených jamek v gelu bylo nanášeno 5 μ l namnožených fragmentů DNA a 3 μ l srovnávacího velikostního markeru (100 bp DNA Ladder). Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí, přičemž separace probíhala při 90 V po dobu 20 minut. Po skončení elektroforetické separace byl gel umístěn do UV-transluminátoru, kde po prosvícení gelu UV zářením probíhala vizualizace získaných separovaných produktů.

9.9.5 Purifikace produktů PCR po elektroforetické separaci

K purifikaci DNA v konečných produktech PCR byla využita PCR clean-up sada (kit), konkrétně NucleoMag® 96 PCR firmy MACHEREY-NAGEL. Názvy jednotlivých roztoků jsou uvedeny dle originálního návodu a celý systém je založen na reverzibilní adsorpci nukleových kyselin na paramagnetické kuličky NucleoMag® P-Beads za vhodných podmínek pufru. Vysoce purifikovaná DNA je v konečné fázi eluována elučním pufrem s nízkým obsahem solí nebo vodou a je připravena k použití v následných aplikacích.

Purifikace produktů PCR byla vykonána dle instrukcí uvedených v manuálu purifikačního kitu NucleoMag® 96 PCR následovně. Do každé jamky 96 jamkové destičky bylo přeneseno 50 μ l reakční směsi produktů PCR, ke které bylo následně přidáno 12 μ l NucleoMag® P-Beads a zároveň 138 μ l pufru MP1. Pro maximální navázání DNA na vysoce reaktivní paramagnetické kuličky byla destička připevněna k třepačce a protřepávána po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Rychlost třepačky byla nastavena tak, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi jednotlivými jamkami. Paramagnetické kuličky byly separovány pomocí magnetického separátoru a přibližně po 2 minutách od jejich usazení byl vzniklý supernatant mikropipetou odstraněn. Do každé jamky bylo přidáno 300 μ l pufru MP2, následně byly paramagnetické kuličky resuspendovány třepáním destičky na třepačce po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byly paramagnetické kuličky opět magnetickým separátorem separovány a po 2 minutách od jejich usazení byl

vzniklý supernatant znovu odstraněn. Dalším krokem bylo promytí paramagnetických kuliček s cílem odstranit případné nečistoty a sůl. Do jamek bylo pipetováno 300 μ l promývacího pufru MP3 a následovala opět resuspendace paramagnetických kuliček, kdy byla destička ponechána k třepání na třepačce po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po resuspendaci paramagnetických kuliček byla provedena jejich separace s opětovným odstraněním supernatantu tak, jak bylo uvedeno v předchozích krocích. Promytí bylo opakováno identickým způsobem přidáním 200 μ l promývacího pufru MP3 do každé jamky destičky s následnou resuspendací paramagnetických kuliček třepáním po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Pomocí magnetického separátoru byly paramagnetické kuličky opět separovány. Po odstranění supernatantu mikropipetou byly paramagnetické kuličky sušeny při 55 °C po dobu 10 minut. Sušení bylo provedeno z důvodu odstranění alkoholu z předchozích kroků promývání. Purifikovaná DNA byla z paramagnetických kuliček eluována přidáním 50 μ l elučního pufru MP4. Eluční pufr je nutné nanést tak, aby zcela pokrýval paramagnetické kuličky. Následně byla celá destička opět připevněna k třepačce a protřepávána po dobu 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k uvolnění DNA z paramagnetických kuliček. Po uplynutí této doby byly paramagnetické kuličky pomocí magnetického separátoru opět separovány a supernatant obsahující vyčištěné produkty PCR byl přenesen do Strip zkumavky. Po dokončení purifikace bylo provedeno kontrolní stanovení koncentrace a čistoty DNA na přístroji Tecan Infinite 200 PRO postupem uvedeným v kap. 9.9.2.

9.9.6 NGS a taxonomická analýza mikroorganismů

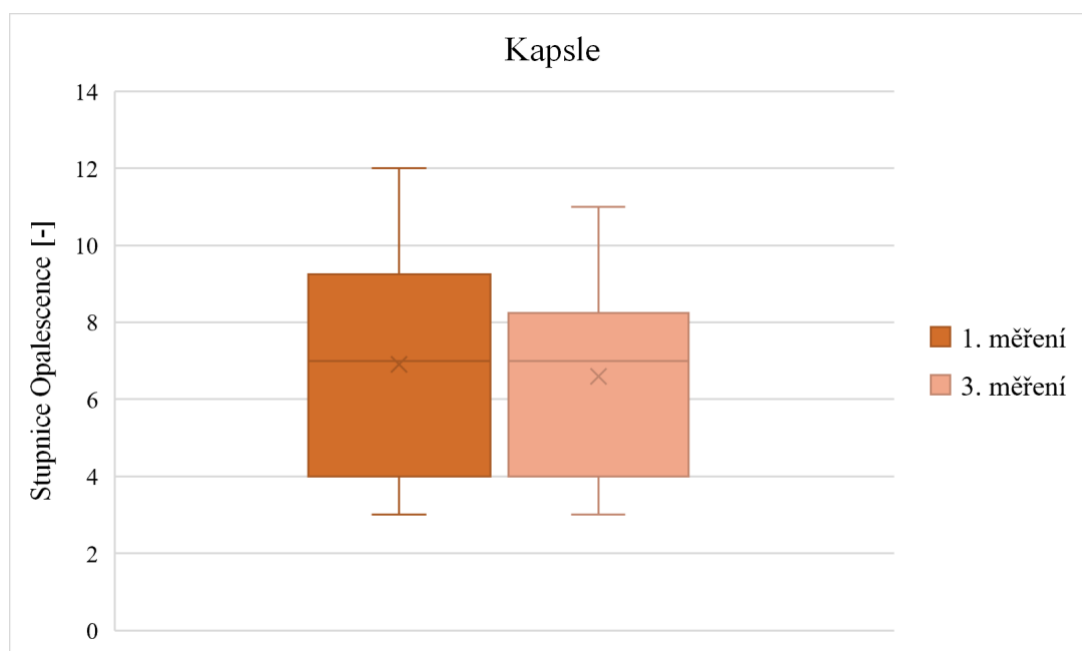
Takto připravené purifikované produkty PCR byly zaslány k dalšímu zpracování do firmy SEQme s.r.o., kde probíhala sekvenační analýza DNA knihovny na sekvenátoru NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Sekvenační data byla dále analyzována pomocí programu SEED verze 2.1.2 a balíčku Phyloseq R. Taxonomické řazení bylo přiřazeno na základě porovnání dat s referenční databází SILVA.

10 VYHODNOCENÍ A DISKUZE VÝSLEDKŮ

10.1 Hodnocení barevné škály zubů

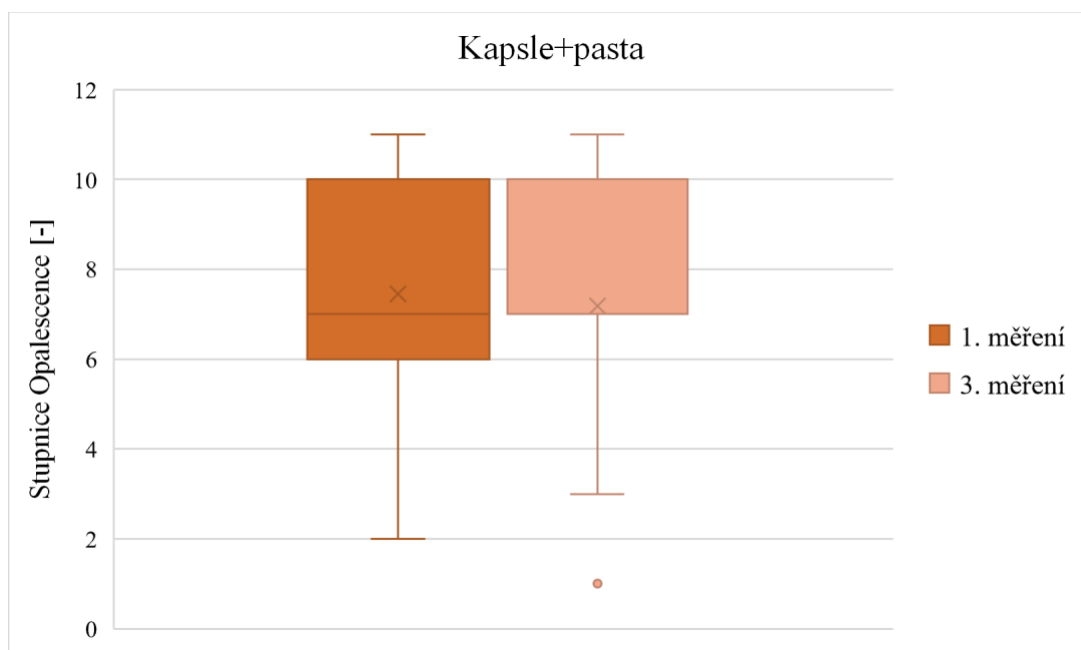
Na základě složení zubní pasty Cannasan, která primárně obsahovala kokosový olej a abrazivní částice z rozemletých zbytků rostlin konopí, byla experimentální studie doplněna o hodnocení barevné škály zubů. Z důvodu lepší přehlednosti byly v MS Excel při vyhodnocování barevné změny zubů sestrojeny krabicové grafy pro každou skupinu dobrovolníků zvlášť (Obr. 10, 11, 12, 13). Jednotlivé grafy jsou tvořeny z přiřazených hodnot barevné stupnice Opalescence odpovídající reálné barvě zubů dobrovolníků. Porovnávají jsou hodnoty před začátkem experimentu (1. měření) se získanými hodnotami na konci experimentu, tedy po ukončení užívání preparátů Cannasan (3. měření). Součástí jednotlivých grafů jsou také průměrné hodnoty a mediány, které přesněji charakterizují míru změny barevnosti zubů každé skupiny.

Celkem u 4 dobrovolníků z 1. skupiny užívající pouze potravinový doplněk Cannasan IMUNO (kapsle) došlo ke snížení hodnot o jeden stupeň. Zároveň bylo u jednoho z dobrovolníků zaznamenáno zvýšení hodnoty o jeden stupeň. U zbývajících 5 dobrovolníků nedošlo k žádné barevné změně. Navzdory nepatrnému náznaku změn hodnot u poloviny dobrovolníků je z grafu na Obr. 10 zřejmé, že se průměry jednotlivých měření spolu s mediány téměř neliší.



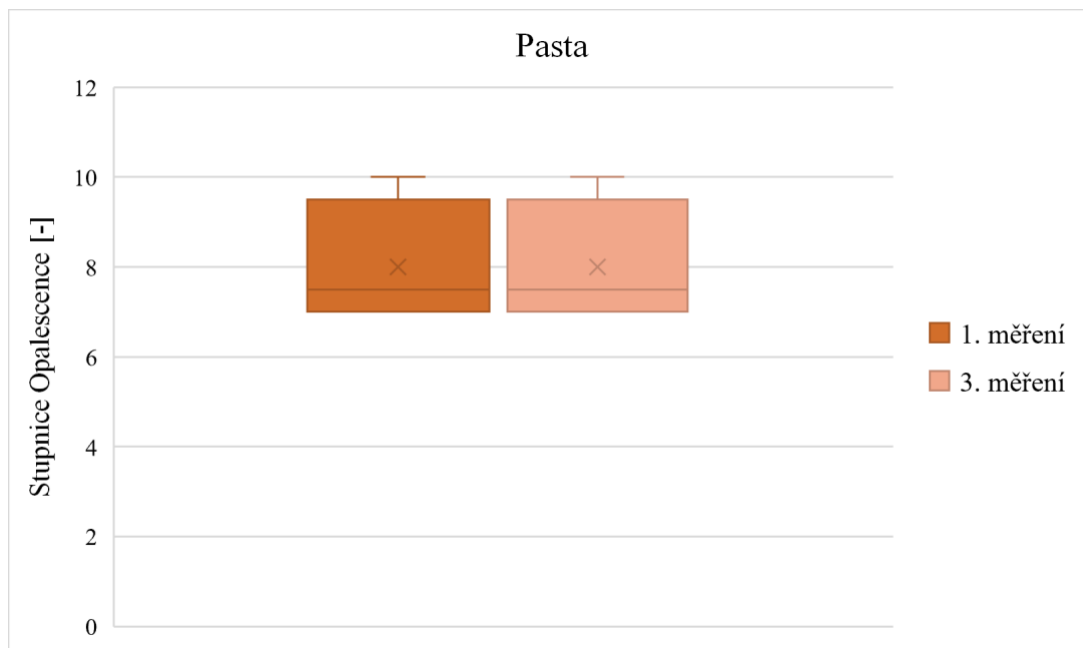
Obrázek 10 Hodnocení změny barvy zubů u 1. skupiny

Obdobně klesající trend byl sledován také u 2. skupiny dobrovolníků užívající potravinový doplněk Cannasan IMUNO spolu se zubní pastou, kde u 4 dobrovolníků došlo rovněž ke snížení hodnot o jeden stupeň. Zároveň bylo taktéž u jednoho z dobrovolníků zaznamenáno zvýšení hodnoty o jeden stupeň. K žádné vizuální barevné změně nedošlo celkem u zbylých 6 dobrovolníků. Průměry jednotlivých měření spolu s mediány, které jsou znázorněny na Obr. 11 charakterizují, že u této skupiny dobrovolníků nedošlo v celkovém souhrnu k prokazatelné změně hodnot odpovídajících změně barevnosti zubů.



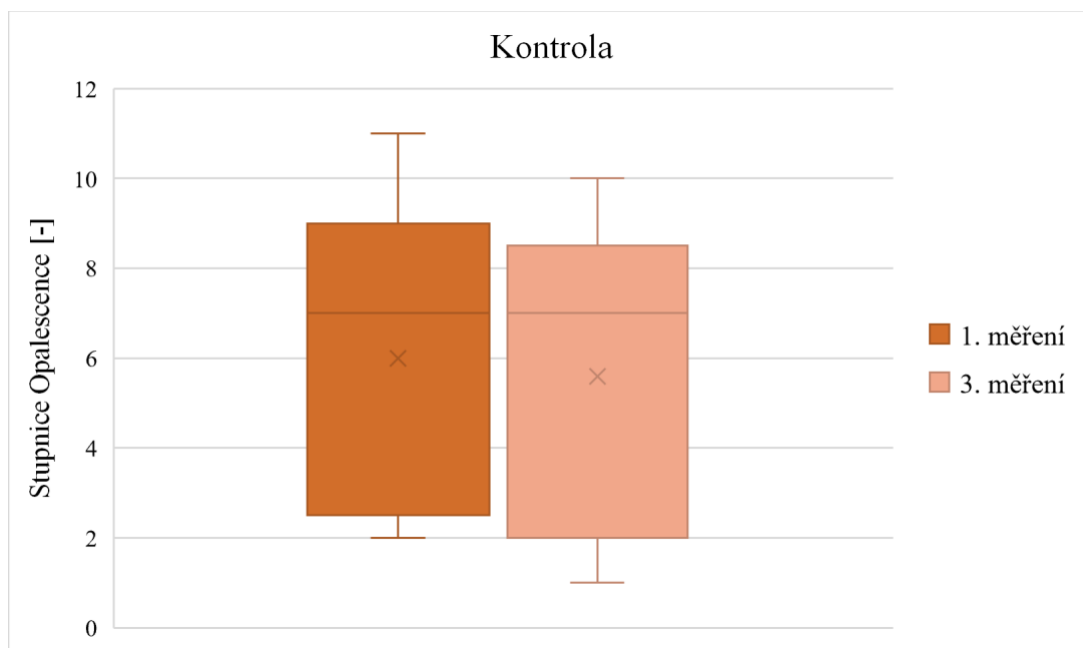
Obrázek 11 Hodnocení změny barvy zubů u 2. skupiny

Nejvýznamnější skupinou pro hodnocení barevné škály zubů byla 3. skupina, kterou tvořili celkem 4 dobrovolníci používající pouze zubní pastu Cannasan. Vzhledem ke svému složení by zubní pasta Cannasan mohla mít značný vliv na případnou prokazatelnou změnu v barevnosti zubů. Po skončení experimentu však tuto ideu nebylo možné potvrdit, neboť u žádného ze 4 dobrovolníků nedošlo ke změně hodnot, ať už o kladný či záporný stupeň. Neprojevenou změnu charakterizuje také graf na Obr. 12, ze kterého je zřejmé, že jsou průměry jednotlivých měření spolu s mediány zcela totožné.



Obrázek 12 Hodnocení změny barvy zubů u 3. skupiny

Z kontrolní 4. skupiny dobrovolníků, kteří neužívali ani jeden z testovaných preparátů Cannasan bylo celkem u 2 dobrovolníků zaznamenáno snížení hodnoty o jeden stupeň. Jako jeden z možných aspektů změny hodnot u této kontrolní skupiny může být použité laboratorní osvětlení, které mohlo na základě změny ročního období ovlivnit vnímání barevných odstínů. K žádné změně hodnot nedošlo u zbývajících 3 dobrovolníků. Graf na Obr. 13 znázorňuje mediány a průměry jednotlivých měření, které se od sebe značně neliší.



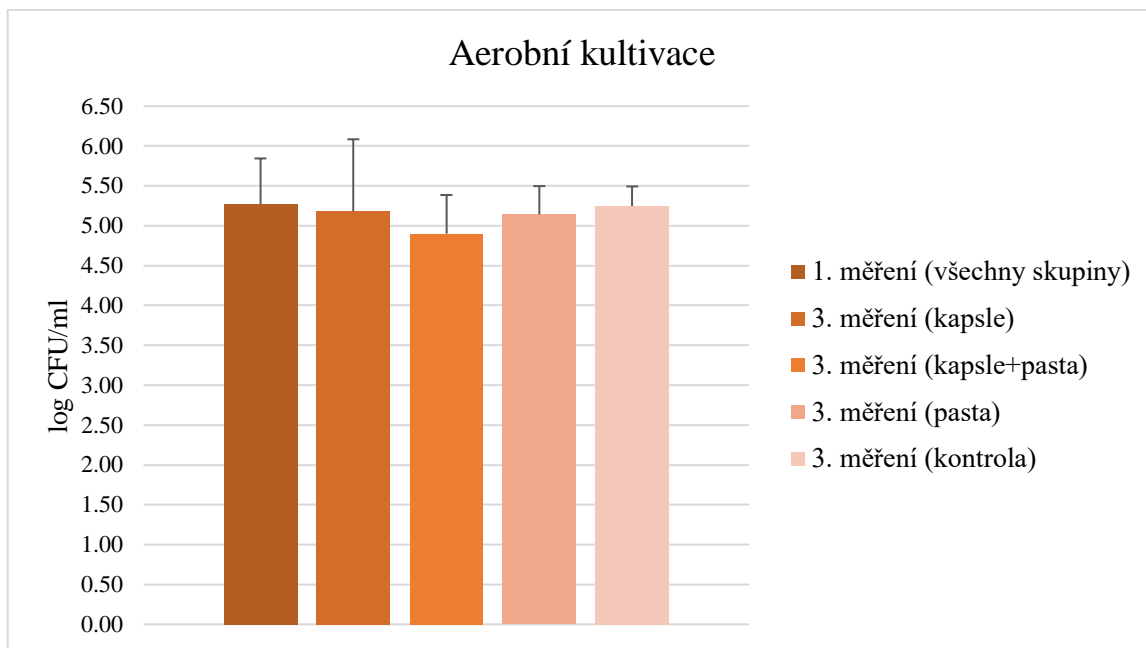
Obrázek 13 Hodnocení změny barvy zubů u 4. skupiny

Z výše uvedených výsledků, a to zejména z Obr. 12, je patrné, že používání zubní pasty Cannasan po dobu 3 měsíců nemělo výrazný vliv na změnu barvy zubů, ať už kladným či záporným směrem. Změna barvy nebyla zaznamenána ani v případě kombinace užívání potravinového doplňku Cannasan IMUNO spolu se zubní pastou (viz Obr. 11). Závěrečná tvrzení byla také statisticky podpořena Mann-Whitneyovým pořadovým testem, který na hladině významnosti 5 % potvrdil, že mezi soubory z 1. a 3. měření není žádný rozdíl. Výsledná statistická data podporují rozhodnutí o potvrzení nulové hypotézy, že mediány obou souborů jsou shodné.

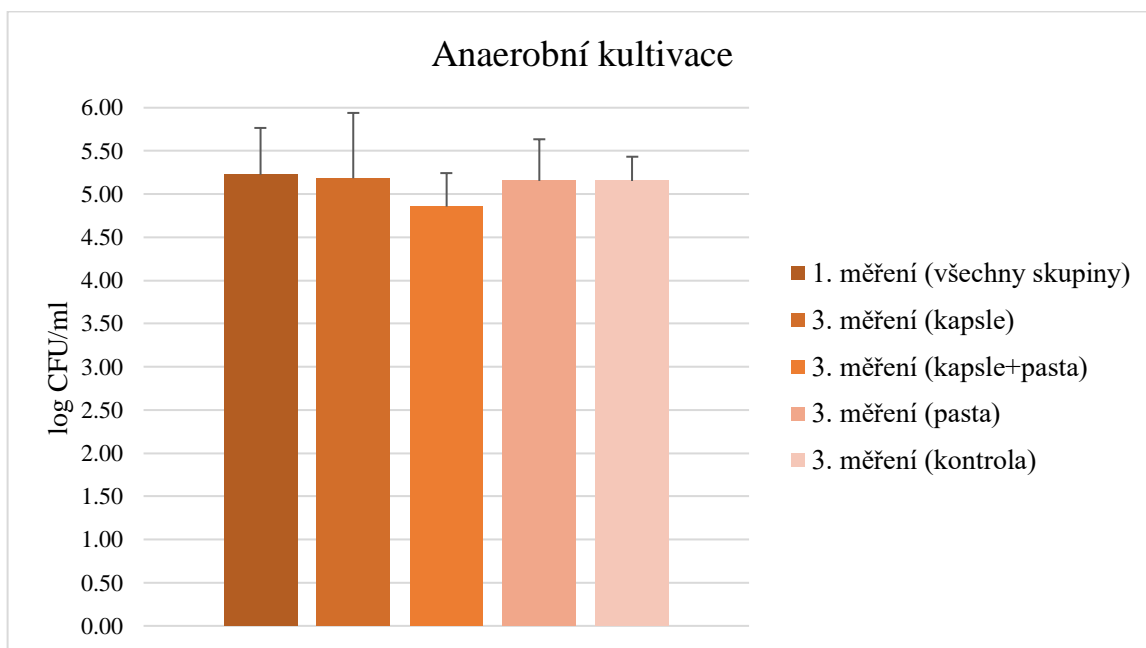
10.2 Kultivační metoda

Kultivační metodou byla hodnocena změna počtu aerobních a anaerobních mikroorganismů přítomných v ústní dutině dobrovolníků vlivem používání preparátů Cannasan. Ke kultivaci za aerobních podmínek byla využita PCA živná půda, zatímco pro anaerobní kultivaci byla použita RCA živná půda. Vyhodnocení bylo realizováno na základě vzniklých kolonií, které byly automaticky počítány a přepočítány pomocí přístroje SphereFlash na hodnoty CFU/ml. Výsledky jsou pro jednotlivé kultivace graficky znázorněny na Obr. 14 a 15, přičemž všechny získané hodnoty CFU/ml byly pro lepší vizualizaci grafů zlogaritmovány. Vytvořené sloupcové grafy rovněž obsahují chybové úsečky, které pomáhají posoudit přesnost a spolehlivost měření.

Z důvodu zvýšení exaktnosti vyhodnocených výsledků byl jako výchozí bod zvolen průměr hodnot log CFU/ml z 1. měření všech skupin dobrovolníků. Při aerobní kultivaci byla průměrná hodnota log CFU/ml 5,27 a při anaerobní kultivaci 5,22 log CFU/ml. Tyto hodnoty byly poté porovnávány se získanými průměry hodnot log CFU/ml z 3. měření pro každou skupinu dobrovolníků zvlášť. V případě kultivace za aerobních podmínek došlo u 1. skupiny (kapsle) ke snížení hodnoty log CFU/ml na 5,19. Zatímco za anaerobních podmínek kultivace u této skupiny hodnota klesla na 5,18 log CFU/ml. Mírný úbytek byl zaznamenán rovněž u 3. skupiny (pasta), kde došlo při aerobní kultivaci k poklesu hodnoty log CFU/ml na 5,14. Obdobný pokles na hodnotu 5,15 log CFU/ml byl sledován také při anaerobní kultivaci. Nejvyšší úbytek mikroorganismů byl v obou případech kultivace registrován u 2. skupiny (kapsle+pasta). U aerobů došlo k zřetelnému snížení hodnoty log CFU/ml na 4,90. U anaerobů byl zaznamenán pokles na hodnotu 4,86 log CFU/ml. U kontrolní 4. skupiny nedošlo k výraznému snížení počtu mikroorganismů, ať už za aerobních či anaerobních podmínek kultivace.



Obrázek 14 Celkový počet mikroorganismů u jednotlivých skupin za aerobních podmínek



Obrázek 15 Celkový počet mikroorganismů u jednotlivých skupin za anaerobních podmínek

Z výše uvedených výsledků (Obr. 14 a 15) je zřejmé, že používání samostatných preparátů, ať už potravinového doplňku Cannasan IMUNO či zubní pasty Cannasan, má velice nepatrný vliv na změnu počtu aerobních a anaerobních mikroorganismů v ústní dutině. V obou případech kultivací bylo zaznamenáno snížení počtu mikroorganismů, avšak statisticky byly tyto změny vyhodnoceny jako zanedbatelné. Za předpokladu, že jsou preparáty aplikovány samostatně, je jejich účinek na změnu počtu mikroorganismů velmi

malý. Avšak v případě kombinace užívání potravinového doplňku Cannasan IMUNO spolu se zubní pastou Cannasan dochází k násobení těchto účinků, a tedy výraznému snížení počtu mikroorganismů v ústní dutině. Za podmínek anaerobní kultivace bylo následující tvrzení podloženo také statistickou analýzou dat, kdy byla nejprve otestována homogenita rozptylů souborů pomocí F-testu. Následně byl proveden dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů, který na hladině významnosti 5 % potvrdil, že střední hodnoty souborů 1. a 3. měření nejsou shodné. Výsledná statistická data podporují rozhodnutí o zamítnutí nulové hypotézy, že se střední hodnoty těchto souborů neliší.

Podobných výsledků bylo dosaženo také ve studii, která porovnávala účinnost přípravků pro péči o ústní dutinu a kanabinoidů (CBD, CBC, CBN, CBG) na základě snížení počtu bakteriálních kolonií. Vyhodnocením bylo zjištěno, že kanabinoidy ve srovnání s dobře zavedenými produkty pro péči o ústní dutinu, jako jsou Oral B a Colgate, účinněji snižují počet bakterií v zubním plaku [55]. Nelze však opomenout fakt, že orální mikrobiom je komplexní záležitost, kterou je možno ovlivnit mnoha různými faktory, jež jsou velmi individuální pro každého jedince.

10.3 Difúzní disková metoda

K hodnocení antibakteriální aktivity preparátů Cannasan byla využita difúzní disková metoda. Studie [58] využívala tuto metodu ke stanovení antimikrobiální aktivity jednak extraktů z rostlin *C. sativa*, tak i oleje ze semen této rostliny. Produkty *C. sativa* vykazovaly ve všech formách výraznou antibakteriální aktivitu proti grampozitivnímu kmeni *Staphylococcus aureus* s průměrnou inhibiční zónou 21 mm. Mírná antibakteriální aktivita byla zaznamenána také u gramnegativního kmene *Escherichia coli* s průměrnou inhibiční zónou 15 mm [58]. Ve studii [59] zkoumali antibakteriální účinky antibiotik v kombinaci s CBD, přičemž dospěli k závěru, že inhibiční zóna při použití samotného CBD proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli* byla výrazně menší, než při kombinaci CBD s antibiotiky. Přídavek CBD tedy v tomto případě zvýšil baktericidní účinek antibiotik na gramnegativní bakterie. Naproti tomu po aplikaci samotného CBD proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* nebyla pozorována žádná inhibiční zóna. V kombinaci CBD spolu s antibiotiky došlo ve dvou případech ke snížení jejich účinku, přičemž zvýšení inhibiční zóny bylo zaznamenáno pouze u jednoho typu antibiotik [59].

Ačkoliv výše uvedená literatura uvádí, že kanabinoidy vykazují antimikrobiální účinek, pomocí diskové difúzní metody v této studii antibakteriální účinky prokázány nebyly, neboť

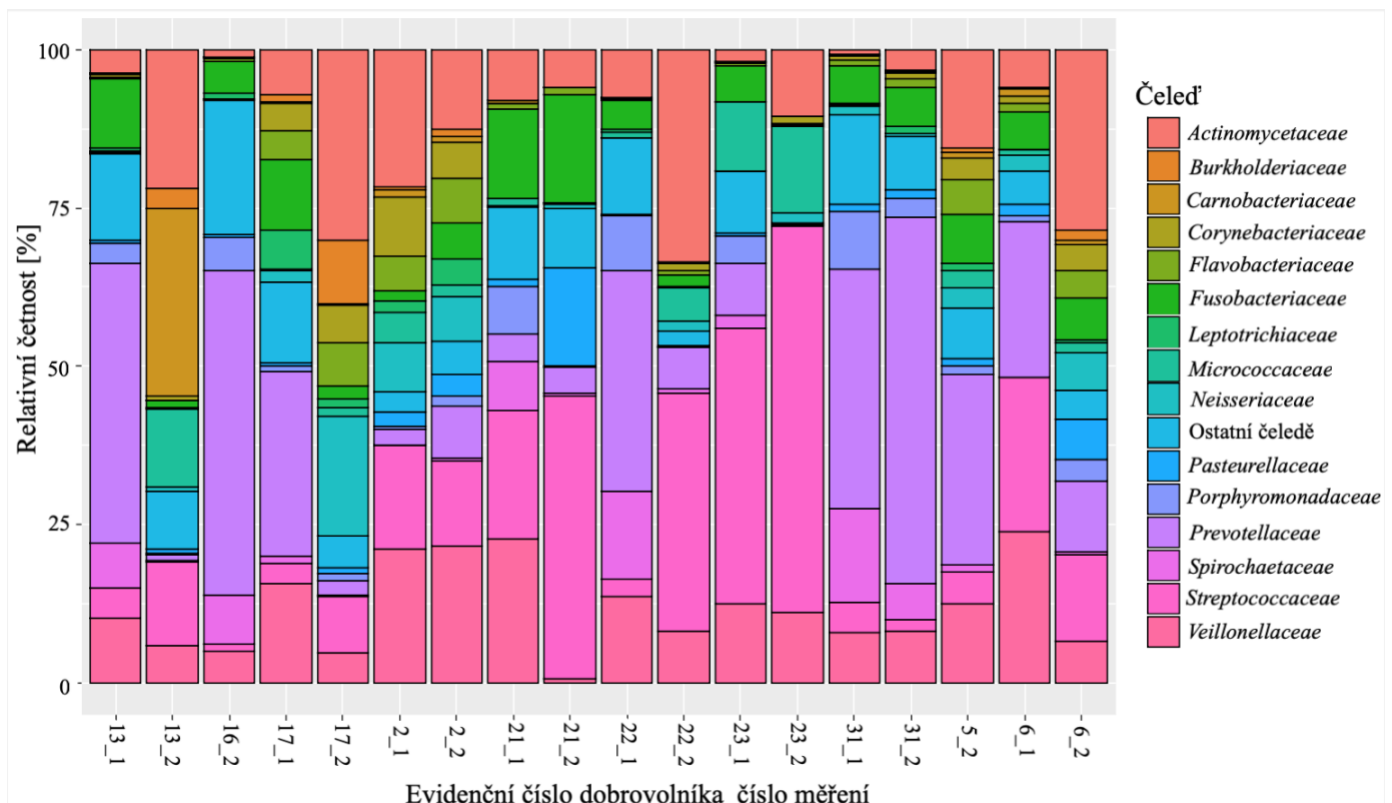
ani u jednoho z testovaných preparátů Cannasan nedošlo k tvorbě inhibičních zón. Na základě nepotvrzeného antibakteriálního účinku proti kmenům *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* lze usuzovat, že koncentrace obsažených kanabinoidů v preparátech Cannasan je pravděpodobně nižší, než jaká byla použita v předchozích studiích.

10.4 Taxonomická analýza mikroorganismů metodou NGS

Vzhledem k nepříznivé epidemiologické situaci kvůli pandemii Covid-19 a finanční náročnosti testování nebylo možné dosáhnout komplexních konečných výsledků taxonomických analýz orálního mikrobiomu všech 30 dobrovolníků po ukončení užívání preparátů Cannasan. Z těchto důvodů je k dispozici pouze část výsledků z 2. měření, tedy po jednom měsíci užívání preparátů Cannasan (Obr. 16 a 18).

10.4.1 Prokaryota

Na následujícím Obr. 16 je graficky znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých čeledí bakterií přítomných v orálním mikrobiomu 10 dobrovolníků. Sestrojeny byly také grafy obsahující procentuální zastoupení bakterií na úrovni tříd a rodů (Příloha P IV).



Obrázek 16 Taxonomická analýza prokaryot metodou NGS

Na základě výsledků získaných metodou NGS (Obr. 16), která byla realizována na platformě Illumina, byla zhotovena kategorizace nejčastěji se vyskytujících čeledí bakterií v rámci každé skupiny dobrovolníků (Tab. 4). Výsledné trendy čeledí jednotlivých skupin byly porovnávány s kontrolou, jejíž trend byl sestaven z nejčastěji se vyskytujících čeledí všech 10 dobrovolníků před samotným užíváním preparátů Cannasan (1. měření). Většina bakterií vyskytujících se v orálním mikrobiomu je anaerobních, popřípadě fakultativně anaerobních a pouze výjimečně se zde vyskytují bakterie aerobní. Pro snazší orientaci bylo pomocí online databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, [60]) vyrobeno resumé všech bakterií přítomných ve vzorcích orálního mikrobiomu dobrovolníků (Tab. 5).

Tabulka 4 Kategorizace čeledí bakterií jednotlivých skupin dobrovolníků

Pořadí	1. měření	2. měření			
	výchozí kontrola	kontrola (16, 23)	kapsle (17, 2, 22, 6)	kapsle+pasta (13, 21, 31)	pasta (5)
1	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i> <i>Prevotellaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	ostatní čeledě	<i>Prevotellaceae</i>
2	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i> ostatní čeledě	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i> <i>Streptococcaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
3	ostatní čeledě	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i>
4	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotellaceae</i>	ostatní čeledě
5	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i> <i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>
6	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>
7	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Leptotrichiaceae</i>	ostatní čeledě	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>

Z Tab. 4 je zřejmé, že před užíváním preparátů Cannasan byla v orálním mikrobiomu dobrovolníků nejhojněji zastoupena čeleď *Veillonellaceae*. Nicméně již po 1 měsíci došlo u skupiny dobrovolníků užívající samotný potravinový doplněk Cannasan IMUNO ke značnému poklesu bakterií této čeledě. Obdobný trend byl sledován také u skupiny dobrovolníků používající pouze zubní pastu Cannasan. Avšak v případě kombinace užívání obou preparátů Cannasan bylo zaznamenáno násobení těchto účinků, a tedy rapidní úbytek bakterií čeledi *Veillonellaceae*. Mezi nejobvyklejší rod, jenž se přirozeně vyskytuje ve slinách a zubním plaku, patří *Veillonella*. Prevalence a hojnost těchto druhů v ústní dutině je odrazem jejich významné role v mikrobiální ekologii orálních biofilmů. A to zejména díky jejich schopnosti stimulovat růst mnoha mikroorganismů prostřednictvím metabolické komplementace, a zároveň jejich rozmanité škály možných koagregačních a koadhezivních interakcí [61]. Ve studii [35] uvádějí, že špatná ústní hygiena zvyšuje počet bakterií *Veillonella* v ústní dutině, což podporuje adherenci patogenních kandidátů, a tedy potenciální vznik zubního kazu.

Druhou nejhojněji zastoupenou čeledí byla *Prevotellaceae*, která je často spojována s onemocněním ústní dutiny. Pojem oranžový komplex představuje skupinu bakterií sestávající z *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micro*, *Fusobacterium nucleatum* a bývá jednou z příčin vzniku paradentózy [15]. Snížení bakterií čeledi *Prevotellaceae* bylo zaznamenáno jednak u skupiny dobrovolníků užívající samotný potravinový doplněk Cannasan IMUNO, tak u skupiny užívající potravinový doplněk spolu se zubní pastou Cannasan. Lze předpokládat, že za tuto změnu orální mikroflóry dobrovolníků je zodpovědný právě potravinový doplněk Cannasan IMUNO, neboť při používání pouze zubní pasty Cannasan byl shledán opačný účinek, a tedy nárůst bakterií této čeledě. Tato predikce byla potvrzena také nárůstem bakterií z čeledi *Neisseriaceae*, která se řadí mezi indikátory zdravé ústní dutiny.

Součástí oranžového komplexu je rovněž oportunní patogen *Fusobacterium nucleatum* z čeledi *Fusobacteriaceae*. V biofilmu zubního plaku má *F. nucleatum* strukturálně podpůrnou roli, která přispívá jak ke zdraví ústní dutiny, tak k nemocem [62]. Při užívání samotného potravinového doplňku Cannasan IMUNO se zastoupení anaerobních bakterií čeledi *Fusobacteriaceae* snížilo, zatímco při používání samotné zubní pasty Cannasan nebyla pozorována žádná změna. Naopak nárůst bakterií této čeledi byl zaznamenán u skupiny dobrovolníků užívající potravinový doplněk Cannasan IMUNO v kombinaci se zubní pastou Cannasan. Vzhledem k tomu, že celkem 2 ze 3 dobrovolníků této skupiny jsou kuřáci, zatímco ve skupině užívající samotný potravinový doplněk Cannasan IMUNO byl shledán pouze 1 kuřák ze 4, lze tedy nárůst bakterií čeledi *Fusobacteriaceae* pravděpodobně přisuzovat účinku kouření, což je v souladu s dostupnou literaturou [13], která uvádí zvýšenou přítomnost rodu *Fusobacterium* v subgingiválním zubním plaku kuřáků.

Užíváním potravinového doplňku Cannasan IMUNO byl sledován nárůst bakterií čeledi *Streptococcaceae*, a to i v případě kombinace se zubní pastou Cannasan. Opačný trend byl zaznamenán při používání pouze zubní pasty Cannasan, kdy došlo ke snížení bakterií čeledi *Streptococcaceae*, jenž je velmi často spojována se vznikem zubního kazu. Nejvyšší kariogenní potenciál má druh *S. mutans*, zatímco druhy *S. mitis* a *S. salivarius* vykazují ochranný účinek proti zubnímu kazu [27]. Novější studie uvádějí, že vztah mezi *S. mutans* a zubním kazem není absolutní, neboť značné množství těchto druhů může přetrvávat na zubním povrchu, aniž by způsobovalo zubní kaz, který se může vyvinout i v nepřítomnosti těchto bakteriálních druhů [15, 18]. Značná část mikroorganismů spojených se zubním kazem patří také k normální orální mikroflóře. Z tohoto důvodu byl

zubní kaz popsán jako endogenní infekce, ke které dochází v momentě, kdy někteří členové komenzální mikrobioty získají selektivní výhodu oproti jiným druhům [15]. Zvýšení počtu bakterií čeledi *Streptococcaceae* tedy nemusí indikovat zvýšenou tvorbu zubního kazu.

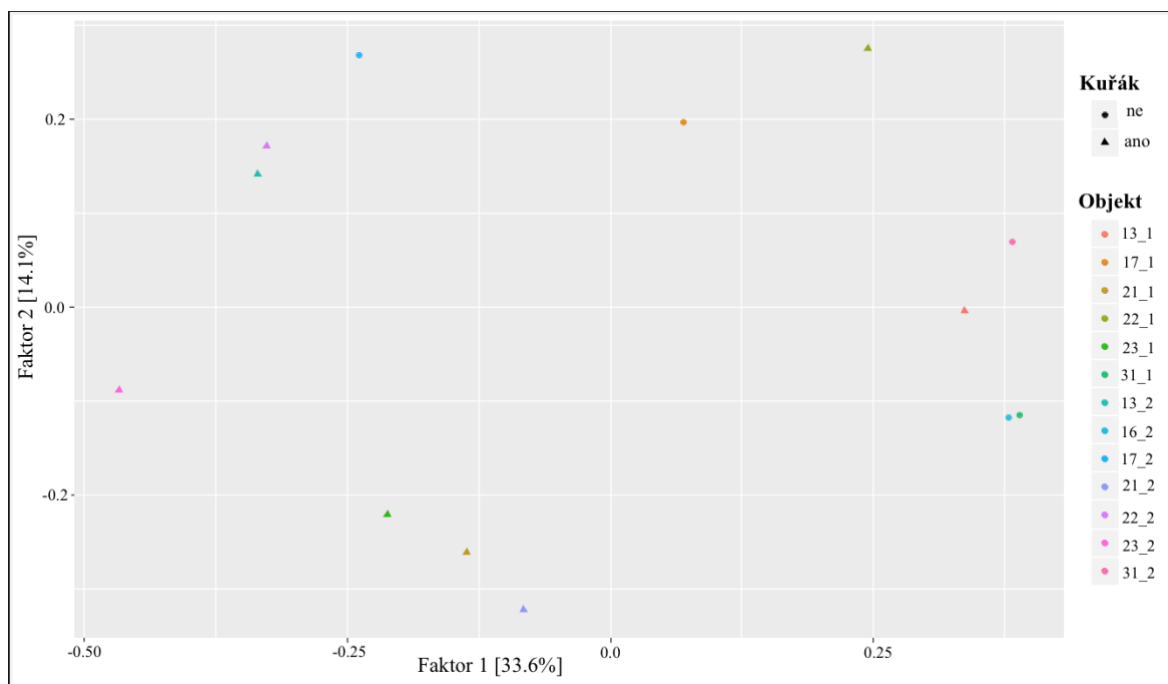
Značný nárůst bakterií čeledi *Actinomycetaceae* byl v orálním mikrobiomu dobrovolníků registrován po užívání obou preparátů Cannasan, přičemž dominantní zvýšení bylo sledováno u skupiny dobrovolníků užívající pouze potravinový doplněk Cannasan IMUNO. Anaerobní bakterie čeledi *Actinomycetaceae* patří mezi jedny z mnoha běžných kolonizátorů zdravé ústní dutiny. Avšak studie genomické analýzy [15] prokázaly možnou spojitost druhů *Actinomyces gerencseriae*, *A. naeslundii* a *A. israelii* se vznikem bílých lézí skloviny.

Tabulka 5 Taxonomie bakterií vyskytujících se v orálním mikrobiomu – vytvořeno dle [60]

Kmen	Třída	Čeď	Rod	Vztah ke kyslíku	Gramovo barvení
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetia</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	anaerobní	G+
			<i>oral taxon 848 str. F0332</i>	anaerobní	G+
		<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	aerobní fak. anaerobní	G+
		<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i>	aerobní	G+
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Alloprevotella</i>	anaerobní	G-
			<i>Prevotella</i>	anaerobní	G-
		<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas</i>	anaerobní	G-
	<i>Tannerellaceae</i>	<i>Tannerella</i>	anaerobní	G-	
<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Capnocytophaga</i>	aerobní	G-	
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i>	anaerobní	G-
			<i>Veillonella</i>	anaerobní	G-
		<i>Selenomonadaceae</i>	<i>Selenomonas</i>	anaerobní	G-
	<i>Bacilli</i>	–	<i>Gemella</i>	anaerobní	G+
		<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Granulicatella</i>	anaerobní	G+
			<i>Marinilactibacillus</i>	anaerobní	G+
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	fak. anaerobní	G+		
<i>Tissierella</i>	<i>Peptoniphilaceae</i>	<i>Parvimonas</i>	anaerobní	G+	
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>	anaerobní	G-
		<i>Leptotrichiaceae</i>	<i>Leptotrichia</i>	anaerobní	G-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Aggregatibacter</i>	aerobní fak. anaerobní	G-
			<i>Haemophilus</i>	aerobní fak. anaerobní	G-
		<i>Cardiobacteriaceae</i>	<i>Cardiobacterium</i>	anaerobní	G-
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Kingella</i>	fak. anaerobní	G-
			<i>Neisseria</i>	aerobní	G-
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Lautropia</i>	fak. anaerobní	G-		
<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Fretibacterium</i>	anaerobní	G-
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>	anaerobní	G-

Na základě dosažených výsledků (Tab. 4) lze přisuzovat vliv změny složení orálního mikrobiomu převážně potravinovému doplňku Cannasan IMUNO, neboť používání samotné zubní pasty Cannasan po dobu 1 měsíce nemělo na tuto změnu významný vliv. Nicméně nelze znovu opomenout variabilitu orální mikrobioty, která je pro každého jedince velmi individuální a závislá na mnoha faktorech. Návazné studie by byly jistě zajímavé z hlediska určení jednotlivých bakterií až na úroveň druhů, neboť v současnosti technologie NGS stále vykazuje omezení pro popis taxonů nižším než kmen, třída a rod. Avšak sekvenční technologie se neustále vyvíjí a zdokonalují. Informace týkající se nižších taxonomických úrovní by v návazných studiích mohly být důležité zejména pro přiblížení rozdílů mezi orální mikroflórou před a po užívání studovaných preparátů. Neboť vliv na zdraví ústní dutiny lze na základě rodů v kombinaci s nízkým počtem dobrovolníků jen stěží identifikovat.

Pro srovnání bakteriální mikroflóry kuřáků a nekuřáků před a po 1 měsíci užívání preparátů Cannasan byla aplikována metoda hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA). Vztah mezi mikroflórou kuřáků a nekuřáků je znázorněn pomocí rozptylového diagramu komponentního skóre (Scatter plot) na Obr. 17. Objekty, mezi nimiž je pozorována krátká vzdálenost, jsou si vzájemně velmi podobné. Zatímco mezi objekty nacházejícími se daleko od sebe je pozorována vysoká odlišnost.

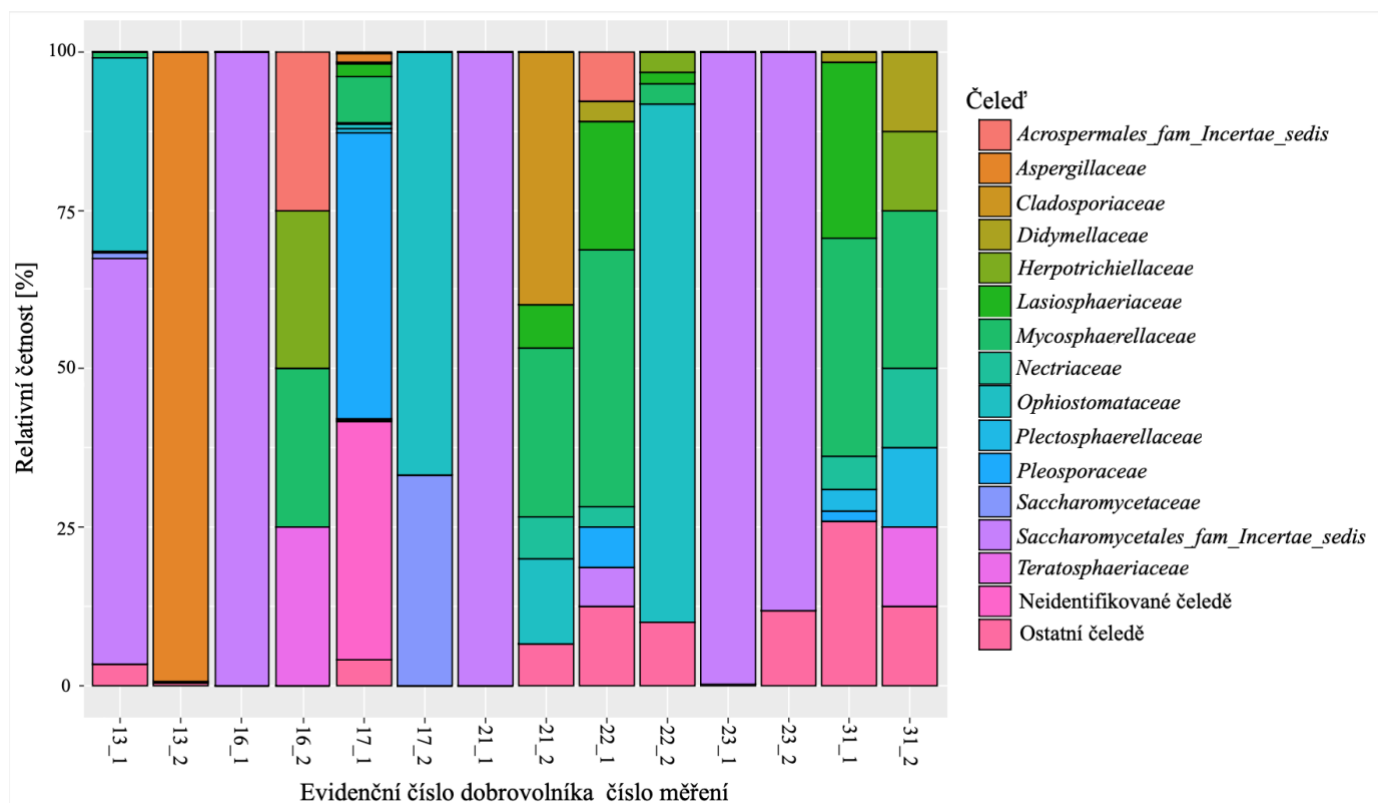


Obrázek 17 PCA bakteriální mikroflóry kuřáků a nekuřáků

Při analýze grafu (Obr. 17) si lze povšimnout, že se kuřáci nachází převážně v levé části grafu, zatímco nekuřáci jsou posunuti mírně doprava. Můžeme tedy konstatovat, že byla pozorována zvýšená podobnost mezi bakteriální mikroflórou kuřáků navzájem a zároveň odlišnost od mikroflóry nekuřáků. Dále byla zjištěna změna polohy u dvou kuřáků (objekt 13 a 22), kdy po 1 měsíci užívání preparátů Cannasan došlo k jejich posunu z pravé části grafu do levé. U nekuřáků podobný trend nebyl pozorován. Na základě těchto poznatků lze usoudit, že užívání preparátů nemá zásadní vliv na ozdravení bakteriální mikroflóry kuřáků, neboť mezi kuřáky a nekuřáky je stále velký rozptyl.

10.4.2 Eukaryota

Graf na Obr. 18 znázorňuje procentuální zastoupení jednotlivých čeledí eukaryot přítomných v orálním mikrobiomu celkem 7 dobrovolníků. Sestrojeny byly také grafy obsahující procentuální zastoupení hub na úrovni tříd a rodů (Příloha P V).



Obrázek 18 Taxonomická analýza eukaryot metodou NGS

Na základě výsledků zprostředkovaných metodou NGS (Obr. 18), která byla realizována na platformě Illumina, byla zhotovena kategorizace nejčastěji se vyskytujících čeledí eukaryot před a po 1 měsíci užívání preparátů Cannasan (Tab. 6). Vzhledem k nízkému počtu dobrovolníků byla utvořena pouze jedna skupina, která zahrnovala 5 dobrovolníků,

kteří užívali potravinový doplněk Cannasan IMUNO, a to buď samotný, nebo v kombinaci se zubní pastou Cannasan. Výsledný trend této skupiny byl porovnáván s kontrolou, jejíž trend byl sestaven z nejčastěji se vyskytujících čeledí všech 7 dobrovolníků před samotným užíváním preparátů Cannasan. Pomocí online databáze NCBI [60] bylo vyrobeno resumé všech eukaryot přítomných ve vzorcích orální mikroflóry dobrovolníků (Tab. 7).

Tabulka 6 Kategorizace čeledí eukaryot

Pořadí	Kontrola (před užíváním)	Preparáty Cannasan (po užívání)
1	<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Mycosphaerellaceae</i>
2	Ostatní čeledě	<i>Ophiostomataceae</i>
3	<i>Lasiosphaeriaceae</i>	Ostatní čeledě
4	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Cladosporiaceae</i> <i>Teratosphaeriaceae</i>
5	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Plectosphaerellaceae</i>

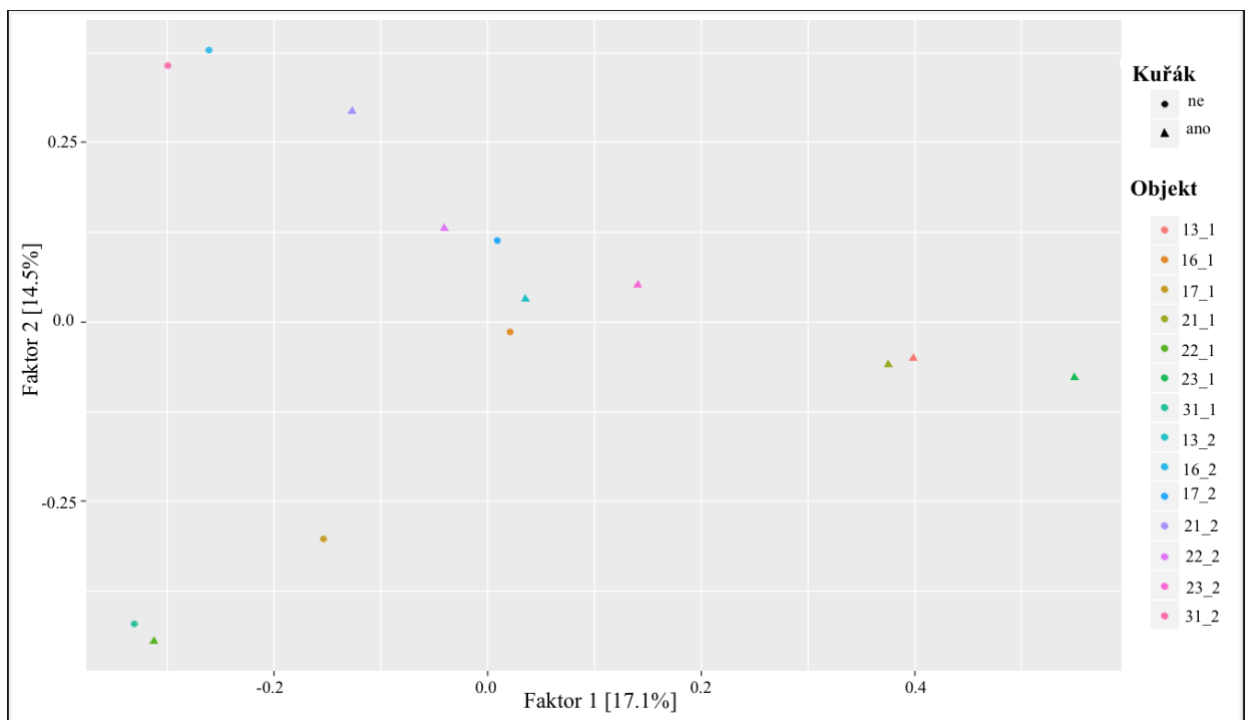
Tabulka 7 Taxonomie eukaryot vyskytujících se v orálním mikrobiomu – vytvořeno dle [60]

Kmen	Podkmen	Třída	Čeď	Rod
Ascomycota	Pezizomycotina	Dothideomycetes	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria</i>
			<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>
			<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Devriesia</i>
			<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Mycospharella</i>
			–	<i>Zasmidium</i>
		Eurotiomycetes	<i>Herpotrichiellaceae</i>	<i>Rhinochadiella</i>
			<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>
			Sordariomycetes	<i>Nectriaceae</i>
		<i>Plectosphaerellaceae</i>		<i>Gibellulopsis</i>
		<i>Lasiosphaeriaceae</i>		<i>Schizothecium</i>
	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Sporothrix</i>		
	Saccharomycotina	Saccharomycetes	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>
				<i>Candida</i>

Na první pohled lze z výsledků uvedených v Tab. 6 konstatovat, že vlivem užívání preparátů Cannasan po dobu 1 měsíce nedošlo u čeledi *Mycosphaerellaceae* k žádným změnám z hlediska zastoupení. Naproti tomu čeď *Lasiosphaeriaceae* spolu s čeledí *Pleosporaceae* a *Saccharomycetaceae* byla po užívání preparátů Cannasan výrazně snížena. Opačný trend byl zaznamenán u čeledí *Ophiostomataceae*, *Cladosporiaceae*, *Teratosphaeriaceae* a *Plectosphaerellaceae*. Z dostupných výsledků lze předpokládat, že užívání preparátů Cannasan po dobu 1 měsíce ovlivňuje složení minoritních čeledí eukaryot v orální

mikroflóre. Nicméně nelze přesně posoudit, zda se jedná o změnu kladným či záporným směrem, neboť eukaryota v orální mikroflóre nejsou ani zdaleka tak dobře popsána a prozkoumána, jako bakterie. Návazné studie by mohly být důležité při formování modelu zdravé a patogenní eukaryotické mikroflóry v dutině ústní.

Metoda PCA byla využita také pro srovnání eukaryot přítomných v orální mikroflóre kuřáků a nekuřáků po 1 měsíci užívání preparátů Cannasan. Vzájemný vztah mezi mikroflórou kuřáků a nekuřáků je znázorněn rozptylovým diagramem komponentního skóre (Scatter plot) ilustrovaném na Obr. 19.



Obrázek 19 PCA eukaryot v mikroflóre kuřáků a nekuřáků

Při analýze grafu (Obr. 19) si lze povšimnout, že se kuřáci vyskytují převážně od počátku směrem doprava, zatímco nekuřáky je možno pozorovat zejména v levé části grafu. Zároveň byl zaznamenán zřetelný shluk kuřáků i nekuřáků kolem počátku, což naznačuje velkou podobnost jejich mikroflóry. Objekty nejbližší počátku jsou nejtypičtější. Po 1 měsíci užívání preparátů Cannasan byla výhradně u kuřáků pozorována změna polohy objektů, přičemž u 13 a 21 došlo k posunu z pravé části grafu k počátku. Obdobný trend byl zaznamenán také u objektu 22, kde ale posun směrem k počátku vycházel z levé části grafu. Z dosažených výsledků lze předpokládat, že užívání preparátů Cannasan má z hlediska eukaryot značný vliv na zvýšení míry podobnosti orální mikroflóry kuřáků a nekuřáků. Lze tedy spekulovat o tom, že došlo k jakési její standardizaci, potažmo ozdravení.

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo pomocí mikrobiologických a nejpokrokovějších molekulárně-biologických metod ověřit kvantitativní a kvalitativní vliv kanabinoidů na orální mikrobiom. Experimentální studie byla realizována na dobrovolnících a k testování byly vybrány následující preparáty: potravinový doplněk Cannasan IMUNO a zubní pasta Cannasan.

Vlivem užívání výše zmíněných preparátů po dobu 3 měsíců byla kultivační metodou stanovena změna počtu aerobních a anaerobních mikroorganismů ústní dutiny. Za předpokladu, že jsou preparáty aplikovány samostatně, je jejich účinek na tuto změnu velmi malý. Nicméně v případě používání obou preparátů dochází k násobení těchto účinků, a tedy výrazné změně počtu mikroorganismů, která se pozitivně projevila jejich snížením. Pro doplnění byla také stanovena antibakteriální aktivita obou preparátů Cannasan diskovou difúzní metodou, která ovšem na rozdíl od literatury nebyla prokázána, zřejmě z důvodu nízké koncentrace fyto-kanabinoidů.

Na základě složení zubní pasty Cannasan, která primárně obsahovala kokosový olej a abrazivní částice z rozemletých zbytků rostlin konopí, byla experimentální studie doplněna o hodnocení barevné škály zubů. Z dosažených výsledků je patrné, že užívání této pasty po dobu 3 měsíců nemělo výrazný vliv na změnu barvy zubů, ať už kladným či záporným směrem.

Taxonomická analýza mikrobiálních společenstev metodou NGS poukázala na rozdíly orální mikroflóry již po 1 měsíci užívání potravinového doplňku Cannasan IMUNO. Obzvláště u řady bakteriálních čeledí byl pozorován posun ve prospěch zástupců kolonizujících zdravou ústní dutinu. Užívání preparátů Cannasan přispělo také ke zvýšení míry podobnosti orální mikroflóry kuřáků a nekuřáků z hlediska eukaryot. Lze tedy usuzovat, že v případě eukaryotické mikroflóry došlo u kuřáků k možnému ozdravení. Z dosažených výsledků je zřejmé, že užívání preparátu Cannasan IMUNO má značný vliv na ozdravení mikrobiálního společenstva dutiny ústní.

Dosažené výsledky studie dávají potenciál k dalšímu výzkumu účinků kanabinoidů na udržení zdravé orální mikroflóry.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VON ARX, Thomas a Scott LOZANOFF. *Clinical Oral Anatomy* [online]. Switzerland: Springer, 2017, 561, [cit. 2020-11-22]. ISBN 9783319419916. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41993-0
- [2] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 2*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2013, 512. ISBN 978-80-247-4788-0.
- [3] ANSARI, Ghassem, Mojtaba Vahid GOLPAYEGANI a Richard WELBURY. Oral and dental anatomy. In: *Atlas of Pediatric Oral and Dental Developmental Anomalies* [online]. First Edit. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd., 2019, s. 1–11, [cit. 2020-11-21]. ISBN 978-1-119-38085-6, eISBN 978-1-119-38086-3. Dostupné z: www.wiley.com/go/ansari/pediatric_oral_dental_anomalies
- [4] GOEL, Alexander N. a Jennifer L. LONG. The oral cavity. *Dysphagia Evaluation and Management in Otolaryngology* [online]. 2019, 5–12, [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-56930-9.00002-4
- [5] MADANI, Mansoor, Thomas BERARDI a Eric T. STOOPLER. Anatomic and Examination Considerations of the Oral Cavity. *Medical Clinics of North America* [online]. 2014, **98**(6), 1225–1238, [cit. 2020-11-22]. ISSN 15579859. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcna.2014.08.001
- [6] OHSHIMA, H. Dental and Oral Biology, Anatomy. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Third Edit. 2014, 1–18, [cit. 2020-11-23]. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.00034-9
- [7] DEO, Priya Nimish a Revati DESHMUKH. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of oral and Maxillofacial Pathology* [online]. 2019, **23**(1), 122–128, [cit. 2020-10-17]. Dostupné z: doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- [8] DEWHIRST, Floyd E., Tuste CHEN, Jacques IZARD, Bruce J. PASTER, Anne C.R. TANNER, Wen Han YU, Abirami LAKSHMANAN a William G. WADE. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology* [online]. 2010, **192**(19), 5002–5017, [cit. 2020-10-17]. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00542-10
- [9] KILIAN, Mogens. The oral microbiome – friend or foe? *European Journal of Oral Sciences* [online]. 2018, **126**(Suppl. 1), 5–12, [cit. 2020-10-17]. ISSN 16000722. Dostupné z: doi:10.1111/eos.12527

- [10] HE, Jinzhi, Yan LI, Yangpei CAO, Jin XUE a Xuedong ZHOU. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiologica* [online]. 2014, **60**(1), 69–80, [cit. 2020-10-17]. ISSN 18749356. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-014-0342-2
- [11] SHAW, Liam P., Andrew M. SMITH a Adam P. ROBERTS. The oral microbiome. *Emerging Topics in Life Sciences* [online]. 2017, **1**(4), 287–296, [cit. 2020-10-17]. ISSN 2397-8554. Dostupné z: doi:10.1042/etls20170040
- [12] PASTER, B. J., S. K. BOCHES, J. L. GALVIN, R. E. ERICSON, C. N. LAU, V. A. LEVANOS, A. SAHASRABUDHE a F. E. DEWHIRST. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* [online]. 2001, **183**(12), 3770–3783, [cit. 2020-11–06]. ISSN 00219193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001
- [13] NEETU, Sharma, Bhatia SONU, Singh Sodhi ABHINASHI a Batra NAVNEET. Oral Microbiome and Health. *AIMS Microbiology* [online]. 2018, **4**(1), 42–66, [cit. 2020-10-17]. ISSN 2077-4214. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2018.1.42
- [14] WADE, William G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* [online]. 2013, **69**(1), 137–143, [cit. 2020-10-19]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2012.11.006
- [15] SAMPAIO-MAIA, B., I. M. CALDAS, M. L. PEREIRA, D. PÉREZ-MONGIOVI a R. ARAUJO. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Advances in Applied Microbiology* [online]. 2016, **97**, 171–210, [cit. 2020-10-19]. ISSN 00652164. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aambs.2016.08.002
- [16] ZHANG, Yangheng, Xiang WANG, Houxuan LI, Can NI, Zhibin DU a Fuhua YAN. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine and Pharmacotherapy* [online]. 2018, **99**, 883–893, [cit. 2020-11–09]. ISSN 19506007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2018.01.146
- [17] KILIAN, M., I. L.C. CHAPPLE, M. HANNIG, P. D. MARSH, V. MEURIC, A. M.L. PEDERSEN, M. S. TONETTI, W. G. WADE a E. ZAURA. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal* [online]. 2016, **221**(10), 657–666, [cit. 2020-10-18]. ISSN 17417503. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bdj.2016.865

- [18] STRUZYCKA, Izabela. The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology* [online]. 2014, **63**(2), 127–135, [cit. 2020-11-14]. ISSN 25444646. Dostupné z: doi:10.33073/pjm-2014-018
- [19] SCANNAPIECO, Frank A. The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2013, **35**(20), 163–169, [cit. 2020-10-19]. ISSN 01964399. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinmicnews.2013.09.003
- [20] BELIBASAKIS, Georgios N., Nagihan BOSTANCI, Philip D. MARSH a Egija ZAURA. Applications of the oral microbiome in personalized dentistry. *Archives of Oral Biology* [online]. 2019, **104**, 7–12, [cit. 2020-10-14]. ISSN 18791506. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.023
- [21] GAO, Lu, Tiansong XU, Gang HUANG, Song JIANG, Yan GU a Feng CHEN. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein and Cell* [online]. 2018, **9**(5), 488–500, [cit. 2020-10-30]. ISSN 16748018. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-018-0548-1
- [22] JOHNSTONE, Lisa, Deb SPENCE a Jane KOZIOL-MCCLAIN. Oral hygiene care in the pediatric intensive care unit: Practice recommendations. *Pediatric nursing*. 2010, **36**(2), 85–96, [cit. 2020-11-14]. ISSN 00979805.
- [23] WIEGAND, Annette a Nadine SCHLUETER. The role of oral hygiene: Does toothbrushing harm? *Monographs in Oral Science* [online]. 2014, **25**, 215–219, [cit. 2020-11-14]. ISSN 16623843. Dostupné z: doi:10.1159/000360379
- [24] NAJEEB, Shariq, Muhammad Sohail ZAFAR, Zohaib KHURSHID, Sana ZOHAIB a Khalid ALMAS. The role of nutrition in periodontal health: An update. *Nutrients* [online]. 2016, **8**(9), 1–18, [cit. 2020-11-09]. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8090530
- [25] KATO, Ikuko, Adrian VASQUEZ, Gregory MOYERBRAILEAN, Susan LAND, Zora DJURIC, Jun SUN, Ho Sheng LIN a Jeffrey L. RAM. Nutritional Correlates of Human Oral Microbiome. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 2017, **36**(2), 88–98, [cit. 2020-10-27]. ISSN 0731-5724. Dostupné z: doi:10.1080/07315724.2016.1185386
- [26] DURAN-PINEDO, Ana E. a Jorge FRIAS-LOPEZ. Beyond microbial community

- composition: Functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes and Infection* [online]. 2015, **17**(7), 505–516, [cit. 2020-10-28]. ISSN 1769714X. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2015.03.014
- [27] GOMEZ, Andres a Karen E. NELSON. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microbial Ecology* [online]. 2017, **73**(2), 492–503, [cit. 2020-10-29]. ISSN 00953628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-016-0854-1
- [28] GUTIERREZ GOSSWEILER, Ana a E. Angeles MARTINEZ-MIER. Chapter 6: Vitamins and oral health. *Monographs in Oral Science* [online]. 2019, **28**, 59–67, [cit. 2020-10-27]. ISSN 16623843. Dostupné z: doi:10.1159/000455372
- [29] TOMAR, S. L. Oral Health Effects of Tobacco Products: Science and Regulatory Policy. *Advances in Dental Research* [online]. 2019, **30**(1), 2–3, [cit. 2020-10-14]. ISSN 15440737. Dostupné z: doi:10.1177/0022034519872481
- [30] HUANG, Chunrong a Guochao SHI. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2019, **17**(1), 1–15, [cit. 2020-10-30]. ISSN 14795876. Dostupné z: doi:10.1186/s12967-019-1971-7
- [31] KARABUDAK, Sema, Oguz ARI, Bengul DURMAZ, Tuba DAL, Tugcan BASYIGIT, Mahmut Tayyar KALCIOGLU a Riza DURMAZ. Analysis of the effect of smoking on the buccal microbiome using next-generation sequencing technology. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2019, **68**(8), 1148–1158, [cit. 2020-10-28]. ISSN 14735644. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.001003
- [32] AL-ZYOUD, Walid, Rima HAJJO, Ahmed ABU-SINIYEH a Sarah HAJJAJ. Salivary microbiome and cigarette smoking: A first of its kind investigation in Jordan. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2020, **17**(1), [cit. 2020-10-29]. ISSN 16604601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph17010256
- [33] FAN, Xiaozhou, Brandilyn A. PETERS, Eric J. JACOBS, Susan M. GAPSTUR, Mark P. PURDUE, Neal D. FREEDMAN, Alexander V. ALEKSEYENKO, Jing WU, Liying YANG, Zhiheng PEI, Richard B. HAYES a Jiyoung AHN. Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome* [online]. 2018, **6**(1), 59, [cit. 2020-10-30]. ISSN 20492618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-018-0448-x

- [34] PASTER, Bruce J. a Floyd E. DEWHIRST. Molecular microbial diagnosis. *Periodontology 2000* [online]. 2009, **51**(1), 38–44, [cit. 2021-01-12]. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x
- [35] VERMA, Digvijay, Pankaj Kumar GARG a Ashok Kumar DUBEY. Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology* [online]. 2018, **200**(4), 525–540, [cit. 2021-01-09]. ISSN 1432072X. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-018-1505-3
- [36] AHN, Jiyoung, Liying YANG, Bruce J. PASTER, Ian GANLY, Luc MORRIS, Zhiheng PEI a Richard B. HAYES. Oral microbiome profiles: 16s rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(7), 1–6, [cit. 2021-01-09]. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0022788
- [37] ZAURA, E. Next-generation sequencing approaches to understanding the oral microbiome. *Advances in dental research* [online]. 2012, **24**(2), 81–85, [cit. 2021-01-22]. ISSN 15440737. Dostupné z: doi:10.1177/0022034512449466
- [38] POZHITKOV, Alex E., Thomas BEIKLER, Thomas FLEMMIG a Peter A. NOBLE. High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontology 2000* [online]. 2011, **55**(1), 70–86, [cit. 2021-01-07]. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00380.x
- [39] BENN, A. M.L., N. C.K. HENG, J. M. BROADBENT a W. M. THOMSON. Studying the human oral microbiome: challenges and the evolution of solutions. *Australian Dental Journal* [online]. 2018, **63**(1), 14–24, [cit. 2021-01-12]. ISSN 18347819. Dostupné z: doi:10.1111/adj.12565
- [40] HOLLISTER, Emily B., John P. BROOKS a Terry J. GENTRY. *Nucleic Acid-Based Methods of Analysis* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2015. ISBN 9780123946263. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00013-2
- [41] HIYARI, Sarah a Katie M. BENNETT. Dental Diagnostics: Molecular Analysis of Oral Biofilms. *The Journal of Dental Hygiene*. 2011, **85**(4), 256–263, [cit. 2021-01-17]. ISSN 00039446.
- [42] AHN, Jiyoung, Calvin Y. CHEN a Richard B. HAYES. Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control* [online]. 2012, **23**(3), 399–404, [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: doi:10.1007/s10552-011-9892-7

- [43] SIQUEIRA, José F., Ashraf F. FOUAD a Isabela N. RÔÇAS. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* [online]. 2012, **4**, 1–15, [cit. 2021-01-23]. ISSN 20002297. Dostupné z: doi:10.3402/jom.v4i0.10743
- [44] MARDIS, Elaine R. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 2008, **9**, 387–402, [cit. 2021-01-23]. ISSN 15278204. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- [45] MALLA, Muneer Ahmad, Anamika DUBEY, Ashwani KUMAR, Shweta YADAV, Abeer HASHEM a Elsayed Fathi Abd ALLAH. Exploring the human microbiome: The potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **9**, 1–23, [cit. 2021-01-23]. ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.02868
- [46] DEGENHARDT, F., F. STEHLE a O. KAYSER. The Biosynthesis of Cannabinoids. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* [online]. 2017, 13–23, [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8
- [47] PELLATI, Federica, Vittoria BORGONETTI, Virginia BRIGHENTI, Marco BIAGI, Stefania BENVENUTI a Lorenzo CORSI. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International* [online]. 2018, **2018**, 1–15, [cit. 2021-01-28]. ISSN 23146141. Dostupné z: doi:10.1155/2018/1691428
- [48] HAZEKAMP, Arno, Justin T. FISCHEDICK, Mónica Díez LLANO, Andrea LUBBE a Renee L. RUHAAK. Chemistry of Cannabis. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* [online]. 2010, **3**, 1033–1084, [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: doi:10.1016/b978-008045382-8.00091-5
- [49] LU, D. a D. E. POTTER. Cannabinoids and the Cannabinoid Receptors: An Overview. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* [online]. 2017, 553–563, [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800756-3.00068-5
- [50] BRUNI, Natascia, Carlo Della PEPA, Simonetta OLIARO-BOSSO, Enrica PESSIONE, Daniela GASTALDI a Franco DOSIO. Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. *Molecules* [online]. 2018, **23**(10), 1–25, [cit.

- 2021-01-28]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102478
- [51] TAGHINASAB, Meysam a Suha JABAJI. Cannabis microbiome and the role of endophytes in modulating the production of secondary metabolites: An overview. *Microorganisms* [online]. 2020, **8**(3), 1–16, [cit. 2020-11-28]. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8030355
- [52] THOMAS, Brian F. a Mahmoud A. ELSOHLI. Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Constituents. *The Analytical Chemistry of Cannabis* [online]. 2016, 27–41, [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-804646-3.00002-3
- [53] KARCHE, Tahseen a Manager Rajdeo SINGH. The application of hemp Cannabis sativa L. for a green economy: A review. *Turkish Journal of Botany* [online]. 2019, **43**(6), 710–723, [cit. 2021-01-31]. ISSN 13036106. Dostupné z: doi:10.3906/bot-1907-15
- [54] BRAVE, Leslie. CBD the Skin, Mind and Body. *Alternative, Complementary & Integrative Medicine* [online]. 2019, **5**(1), 1–5, [cit. 2021-01-31]. Dostupné z: doi:10.24966/acim-7562/100060
- [55] STAHL, Veronica a Kumar VASUDEVAN. Comparison of Efficacy of Cannabinoids versus Commercial Oral Care Products in Reducing Bacterial Content from Dental Plaque: A Preliminary Observation. *Cureus* [online]. 2020, **12**(1), 1–12, [cit. 2021-02–01]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.6809
- [56] GU, Zhen, Shilpa SINGH, Rajarshi G. NIYOGI, Gwyneth J. LAMONT, Huizhi WANG, Richard J. LAMONT a David A. SCOTT. Marijuana-Derived Cannabinoids Trigger a CB2/PI3K Axis of Suppression of the Innate Response to Oral Pathogens. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**, 1–13, [cit. 2021-02–01]. ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02288
- [57] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62), 1–5, [cit. 2021-03-26]. ISSN 1940087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [58] ALI, Esra M M, Aisha Z I ALMAGBOUL, Salwa M E KHOGALI a Umelkheir M a GERGEIR. Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L. *Chinese Medicine* [online].

- 2012, **3**(March), 61–64, [cit. 2021-04-24]. Dostupné z: doi:10.4236/cm.2012.31010
- [59] KOSGODAGE, Uchini S., Paul MATEWELE, Brigitte AWAMARIA, Igor KRAEV, Purva WARDE, Giulia MASTROIANNI, Alistair V. NUNN, Geoffrey W. GUY, Jimmy D. BELL, Jameel M. INAL a Sigrun LANGE. Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2019, **9**(September), 1–13, [cit. 2021-04-24]. ISSN 22352988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00324
- [60] *Datábaze NCBI (National Center for Biotechnology Information)* [online]. [cit. 2021-05-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [61] KNAPP, Steven, Clint BRODAL, John PETERSON, Fengxia QI, Jens KRETH a Justin MERRITT. Natural competence is common among clinical isolates of *Veillonella parvula* and is useful for genetic manipulation of this key member of the oral microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, **7**(APR), 1–12, [cit. 2021-05-07]. ISSN 22352988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00139
- [62] BRENNAN, Caitlin A. a Wendy S. GARRETT. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2019, **17**(3), 156–166, [cit. 2021-05-08]. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0129-6

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Δ^8 -THC	Δ^8 -tetrahydrokanabidiol
ATP	Adenosin trifosfát
APS	Adenosin fosfosulfát
CB1	Kanabinoidní receptor 1
CB2	Kanabinoidní receptor 2
CBC	Kanabichromen
CBCA	Kyselina kanabichromenová
CBD	Kanabidiol
CBDA	Kyselina kanabidiolová
CBG	Kanabigerol
CBGA	Kyselina kanabigerolová
CBN	Kanabinol
CBNA	Kyselina kannabinolová
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CO ₂	Oxid uhličitý
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
FISH	Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>
G+	Grampozitivní
G-	Gramnegativní
GPP	Geranyldifosfát
HOMD	Lidská ústní mikrobiomová databáze
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Chlorid sodný

NCBI	National Center of Biotechnology Information
NGS	Sekvenování nové generace
OA	Kyselina olivetolová
PCA	Plate Count Agar
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RCA	Reinforced Clostridial Broth + Agar
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
SMRT	Jednomolekulové sekvenování v reálném čase
SOLiD	Sekvenování aplikovaných biosystémů ligací a detekcí oligonukleotidů
TAE	Tris-Acetát-EDTA
THC	Δ^9 -tetrahydrokanabinol
THCA	Kyselina Δ^9 -tetrahydrokanabinolová
T-RFLP	Polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů
UV	Ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Čelní pohled na ústní dutinu – upraveno dle [4]	11
Obrázek 2 Kolonizace základních bakteriálních skupin – upraveno dle [15]	17
Obrázek 3 Projevy dysbiózy dutiny ústní – upraveno dle [21].....	18
Obrázek 4 Metody studia orálního mikrobiomu – upraveno dle [38]	23
Obrázek 5 Princip pyrosekvenování – upraveno dle [43].....	28
Obrázek 6 Obecná struktura kanabinoidů a jejich prekurzorů – upraveno dle [46]	31
Obrázek 7 Chemické struktury hlavních fytoKANABINOIDŮ – upraveno dle [47].....	34
Obrázek 8 Charakteristika věkového rozhraní účastníků studie.....	43
Obrázek 9 Barevná stupnice Opalescence	44
Obrázek 10 Hodnocení změny barvy zubů u 1. skupiny	53
Obrázek 11 Hodnocení změny barvy zubů u 2. skupiny	54
Obrázek 12 Hodnocení změny barvy zubů u 3. skupiny	55
Obrázek 13 Hodnocení změny barvy zubů u 4. skupiny	55
Obrázek 14 Celkový počet mikroorganismů u jednotlivých skupin za aerobních podmínek	57
Obrázek 15 Celkový počet mikroorganismů u jednotlivých skupin za anaerobních podmínek	57
Obrázek 16 Taxonomická analýza prokaryot metodou NGS	59
Obrázek 17 PCA bakteriální mikroflóry kuřáků a nekuřáků	63
Obrázek 18 Taxonomická analýza eukaryot metodou NGS.....	64
Obrázek 19 PCA eukaryot v mikroflóře kuřáků a nekuřáků	66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení reakční směsi pro primární PCR.....	49
Tabulka 2 Podmínky průběhu PCR	49
Tabulka 3 Složení reakční směsi pro sekundární PCR.....	50
Tabulka 4 Kategorizace čeledí bakterií jednotlivých skupin dobrovolníků	60
Tabulka 5 Taxonomie bakterií vyskytujících se v orálním mikrobiomu – vytvořeno dle [60]	62
Tabulka 6 Kategorizace čeledí eukaryot.....	65
Tabulka 7 Taxonomie eukaryot vyskytujících se v orálním mikrobiomu – vytvořeno dle [60]	65

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Prohlášení účastníka studie

Příloha P II: Informovaný souhlas s účastí ve studii

Příloha P III: Dotazník

Příloha P IV: Procentuální zastoupení bakterií na úrovni tříd a rodů

Příloha V: Procentuální zastoupení hub na úrovni tříd a rodů

PŘÍLOHA P I: PROHLÁŠENÍ ÚČASTNÍKA STUDIE

Prohlášení účastníka studie

Souhlasím se svou účastí ve studii, kde bude sledován vliv na pokožku a orální mikrobiom schválených a komerčně dostupných přípravků na bázi konopí od výrobce Cannasan Pro s. r. o. tř. Svobody 737, Malenovice 763 02 Zlín:

- potravinového doplňku Cannasan IMUNO (notifikován jako doplněk stravy Ministerstvem zemědělství, číslo zprávy EPO: 2018123115331048795, doručeno dne 31. 12. 2018);
- konopné masti (Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku ref. č. 0305184 ze dne 13. 12. 2019)
- zubní pasty (Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku je v procesu schvalování)

Test bude veden pod záštitou doc. MUDr. M. Bučka, CSc. Beru na vědomí, že experiment může zahrnovat riziko nežádoucích účinků na kůži. Toto riziko mi bylo detailně objasněno a mohl(a) jsem se informovat o všech podrobnostech experimentu.

Vím, že mohu kdykoliv odvolat svůj souhlas s účastí v experimentu a mohu kdykoliv odstoupit od své účasti v testu bez udání důvodů.

O experimentu si mohu si vyžádat další informace a oznámit nežádoucí účinky u vedoucího studie, a to kdykoliv na určeném telefonním čísle.

Souhlasím, že data získaná během studie mohou být statisticky zpracována. Veškeré údaje o průběhu a výsledcích cvičení, které mne mohou identifikovat, zůstanou přísně důvěrné.

Prohlašuji, že toto poučení plně chápu a podepisuji ho při plném vědomí.

.....
plné jméno účastníka cvičení

.....
podpis účastníka cvičení

Ve Zlíně dne

PŘÍLOHA P II: INFORMOVANÝ SOUHLAS S ÚČASTÍ VE STUDII

Individuální informovaný souhlas

V rámci realizace experimentální části diplomové práce budou testovány různé výrobky s vlivem na pokožku a orální mikrobiom. U všech výrobků, kromě zubní pasty, byla posouzena dokumentace z hlediska jejich bezpečnosti. V případě zubní pasty je bezpečnostní zpráva stále v procesu schválení. Všechny známé informace o zkoumaných výrobcích dovolují testování na dobrovolnících.

Cíl studie

Cílem práce je zjistit odezvu Vaší pokožky na aplikované přípravky pomocí exaktně změřených veličin.

Podmínky účasti

Před zahájením vlastního experimentu je nutno vyplnit dotazník. Součástí dotazníku jsou údaje o Vašem zdravotním stavu, alergiích, kožních problémech, ústní hygieně, stravovacích zvyklostech, o užívaných lécích a o dřívější účasti v obdobných studiích. Na základě Vašich pravdivých odpovědí bude rozhodnuto o účasti v daném experimentu.

Metodika testu

Experiment bude prováděn diplomantkami pod dohledem kvalifikovaných pracovníků Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a dermatologa. Plánovaná práce zahrnuje monitorování změn vlastností pokožky po perorálním podávání potravinového doplňku Cannasan IMUNO a topické aplikaci krému; dále monitorování změn orálního mikrobiomu po perorálním podávání potravinového doplňku Cannasan IMUNO a ústní hygieny zubní pastou Cannasan.

Odstoupení z experimentu

Z experimentu je možno odstoupit při výskytu závažnějších potíží po dohodě s vedoucím diplomové práce.

Rizika a nepříjemnosti

Nejsou očekávána žádná rizika.

PŘÍLOHA P III: DOTAZNÍK

Dotazník pro účastníka měření

Kód pokusné osoby (evidenční číslo):

Současný zdravotní stav

Vyskytuje se u Vás nyní:	ano	ne	jaké
lupénka			
ekzém			
rakovina kůže			
jiné kožní problémy a onemocnění			
jizvy, mateřská znaménka, jiné vady kůže v místě testu			
zarudnutí kůže po slunění nebo z jiného důvodu v místě testu			
astma vyžadující denní příjem léků			
jiné chronické respirační onemocnění			
diabetes vyžadující léčbu inzulínem			
onemocnění imunitního systému			

Zdravotní stav v minulosti

Prodělal(a) jste:	ano	ne
transplantaci orgánů		
léčbu maligního nádoru v posledních 6 měsících		

+ Užívání léků

Berete či používáte pravidelně:	ano	ne	jaké
protizánětlivé léky (např. aspirin, ibuprofen, hydrokortizon nebo jiné steroidy)			
imunosupresivní léky (např. cyklosporin A)			
jiné léky			

Alergologická léčba

Probíhá u vás v současné době:	ano	ne	jaká
alergologická léčba (kapky, injekce apod.)			
dostali jste poslední dávku během minulého týdne			
očekáváte další dávky v průběhu studie			

Alergie

Projevila se u vás někdy alergie na:	specifikujte:
detergenty a čisticí prostředky	
kosmetické přípravky a vůně parfémů	
přípravky do koupele a na mytí (šampón, mýdlo)	
pleťové krémy a mléka, lotiony	
antiperspiranty a deodoranty	
léky	
jiné materiály	

Ústní hygiena a zdravotní stav ústní dutiny

Používáte při ústní hygieně:		ano	ne
zubní kartáček			
zubní nit			
mezizubní kartáček			
ústní voda			
čistič jazyka			
ústní sprej			
bělicí přípravky			
zubní pasta			
Zdravotní stav:	specifikujte:		
citlivost zubů			
zánět dásní			
paradentóza			
zubní kazy			
zubní náhrady			

Pouze pro ženy

Jste:	ano	ne
těhotná nebo kojící		

Doplňující údaje

Zdravotní stav:	ano	ne	specifikujte:
používáte pravidelně jakýkoliv přípravek pro léčbu kůže			
používáte pravidelně jakékoliv léčivo (na předpis, či volně prodejné)			
navštěvujete v současné době lékaře kvůli:			<ul style="list-style-type: none"> • alergiím • kožním problémům • z jiného důvodu
máte nějaké jiné zdravotní potíže			

Účast v dalších studiích

Studie:	Typ studie:	Datum poslední studie:
účastnil(a) jste se někdy kožního testu		
účastníte se v současné době jiné studie jakéhokoliv druhu		

Zkušenost s testovanou látkou

CBD:	ano	ne	specifikujte:
užíval(a) jste v minulosti přípravek s obsahem CBD			
vyskytla se u Vás nějaká negativní reakce během užívání			

Ústní mikrobiom – Dotazník stravovacích zvyklostí

Stravovací zvyklosti:	ano	ne
charakterizujte svůj způsob stravování <ul style="list-style-type: none"> • běžná pestrá strava • vegetariánství • veganství • raw strava • jiné než výše uvedené 		
Váš způsob stravování je dle Vašeho názoru <ul style="list-style-type: none"> • vyvážený • nadbytek cukru • nadbytek tuku • jiné než výše uvedené 		
dodržujete speciální dietu <ul style="list-style-type: none"> • žádná • redukční • nízkosacharidová • bezlepková • jiné než výše uvedené 		
máte nějaká dietní omezení <ul style="list-style-type: none"> • celiakie • laktózová intolerance • potravinová alergie (jaká) • jiné než výše uvedené 		

	zaškrtněte
typický nápoj, který konzumuji denně v největším množství je <ul style="list-style-type: none"> • voda • limonády • ovocné džusy/šťávy • čaje • jiné než výše uvedené 	
můj denní příjem tekutin odpovídá cca <ul style="list-style-type: none"> • méně než 1,5 l • 1,5 l • 2–3 l • více než 3 l 	
moje typická jídelní frekvence <ul style="list-style-type: none"> • 3 jídla denně • 5–6 jídel denně • jiné než výše uvedené 	

Doplňující údaje

Jste:	ano	ne
kuřák/kuřačka <ul style="list-style-type: none"> • nekuřák • příležitostný kuřák • do 5 cigaret denně • do 15 cigaret denně • jiné než výše uvedené 		

Jak často konzumujete:	nikdy	občas	1–2× týdně	denně
maso				
mléko a mléčné výrobky				
čerstvou zeleninu				
čerstvé ovoce				
cukr				
umělá sladidla				
cukrovinky (čokoláda, bonbóny atd.)				
žvýkačky				
sladké nápoje (limonády, džusy atd.)				
černý čaj				
zelený čaj				
bylinný čaj				
černou kávu				
kávu s mlékem				
tvrdý alkohol				
pivo				
červené víno				
bílé víno				

datum:

podpis účastníka měření:

Pouze pro účely organizátora měření

Na základě zjištěných údajů je účastník a) přijat
b) nepřijat

Zdůvodnění:

Datum:

Podpis organizátora:

PŘÍLOHA IV: PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ BAKTERIÍ NA ÚROVNI TŘÍD A RODŮ

