

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
**Ústav farmakologie**

**Mgr. Zuzana Matušková**

**CYTOCHROMY P450 – HLAVNÍ ENZYMY METABOLIZMU LÉČIV:  
STUDIUM VLASTNOSTÍ TĚCHTO ENZYMŮ V GASTROINTESTINÁLNÍM  
TRAKTU POTKANA A JEJICH OVLIVNĚNÍ PROBIOTIKY**

**Disertační práce**

**Školitel: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.**

**Olomouc 2015**

**PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC**  
**FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY**  
**Department of Pharmacology**

**Mgr. Zuzana Matušková**

**CYTOCHROMES P450 – MAIN ENZYMES OF DRUG METABOLISM:  
A STUDY OF PROPERTIES OF THESE ENZYMES IN RAT GASTROINTESTINAL  
TRACT AND THEIR INFLUENCING BY PROBIOTICS**

**Thesis**

**Supervisor: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.**

**Olomouc 2015**

Prohlašuji, že předkládaná práce je původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpala informace, jsou v práci řádně ocitovány a jejich seznam je uveden v sekci Literatura.

V Olomouci .....

.....

podpis

Beru na vědomí, že tato disertační práce je majetkem Univerzity Palackého (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci .....

.....

podpis

## Bibliografické identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Zuzana Matušková
Název disertační práce:	Cytochromy P450 – hlavní enzymy metabolismu léčiv: Studium vlastností těchto enzymů v gastrointestinálním traktu potkana a jejich ovlivnění probiotiky
Název disertační práce anglicky:	Cytochromes P450 – main enzymes of drug metabolism: A study of properties of these enzymes in rat gastrointestinal tract and their influencing by probiotics
Studijní program:	Lékařská farmakologie
Školitel:	prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.
Rok obhajoby:	2015
Klíčová slova v češtině:	cytochromy P450, farmakokinetika, probiotika, <i>E. coli</i> Nissle 1917, <i>Lactobacillus casei</i> , amiodaron, diklofenak
Klíčová slova v angličtině:	cytochromes P450, pharmacokinetics, probiotics, <i>E. coli</i> Nissle 1917, <i>Lactobacillus casei</i> , amiodarone, diclofenac

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (LF\_2011\_005; LF\_2012\_004; LF\_2013\_007), Grantovou agenturou České republiky (303/09/H048; 305/08/0535; P303/12/G163) a projekty CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a NPU I MSMT - 7778/2014.

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. P. Anzenbacherovi, DrSc. za odborné vedení mé práce, praktické rady, připomínky, trpělivost, za důvěru a podporu během celého mého doktorského studia. Současně děkuji doc. RNDr. E. Anzenbacherové, CSc. za praktické rady a zkušenosti z oblasti analytické chemie a biochemie. Ráda bych také poděkovala přednostovi Ústavu farmakologie MUDr. K. Urbánkovi, Ph.D. za odborné rady při sepisování této práce. Děkuji pracovníkům Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky a Bc. P. Procházkové, DiS z Ústavu mikrobiologie Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí bakterií a pomoc s jejich kultivací pro mé experimenty. Velké poděkování patří všem mým současným i bývalým kolegům z Ústavu farmakologie Univerzity Palackého v Olomouci za pomoc během vykonávání experimentů a získávání dat, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout, a samozřejmě také za jejich podporu a za vytváření příjemného pracovního prostředí.

Nakonec bych ráda poděkovala mému životnímu partnerovi za obrovskou trpělivost a podporu po celou dobu mého doktorského studia. Za obrovskou podporu děkuji i celé své rodině.

*Tato práce je věnována památce mého otce a mých prarodičů, kteří mě ve studiu vždy podporovali.*

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	1
1. ÚVOD .....	3
2. CÍL PRÁCE.....	4
3. TEORETICKÁ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE.....	5
3.1 Metabolizmus látek.....	5
3.2 Cytochromy P450 .....	6
3.3 Rozdělení enzymů CYP a porovnání jejich vlastností u člověka a potkana.....	14
3.3.1 Lidská rodina CYP1 .....	14
3.3.1.1 Podrodina CYP1A u člověka.....	14
3.3.1.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP1A s lidskou.....	18
3.3.1.3 Podrodina CYP1B u člověka .....	18
3.3.1.4 Porovnání potkaní podrodiny CYP1B s lidskou.....	19
3.3.2 Lidská rodina CYP2 .....	19
3.3.2.1 Podrodina CYP2A u člověka.....	19
3.3.2.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP2A s lidskou.....	20
3.3.2.3 Podrodina CYP2B u člověka .....	20
3.3.2.4 Porovnání potkaní podrodiny CYP2B s lidskou.....	21
3.3.2.5 Podrodina CYP2C u člověka .....	21
3.3.2.6 Porovnání potkaní podrodiny CYP2C s lidskou.....	23
3.3.2.7 Podrodina CYP2D u člověka.....	23
3.3.2.8 Porovnání potkaní podrodiny CYP2D s lidskou.....	24
3.3.2.9 Podrodina CYP2E u člověka .....	25
3.3.2.10 Porovnání potkaní podrodiny CYP2E s lidskou .....	26
3.3.3 Lidská rodina CYP3 .....	26
3.3.3.1 Podrodina CYP3A u člověka.....	26
3.3.3.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP3A s lidskou.....	28
3.4 Střevní mikroflóra lidského organismu .....	28
3.5 Probiotické mikroorganizmy .....	32

3.5.1	Rod <i>Lactobacillus</i> .....	35
3.5.1.1	<i>Lactobacillus casei</i> .....	37
3.5.2	Kmen <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 .....	38
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE .....	41
4.1	Seznam publikací, které jsou součástí této disertační práce .....	41
4.2	Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení .....	42
4.2.1	Chemikálie.....	42
4.2.2	Přístroje.....	43
4.2.3	Experimentální zvířata.....	43
4.2.4	Software.....	44
4.3	Metody .....	44
4.3.1	Odběr potkaních orgánů .....	44
4.3.2	Izolace potkaních mikrozomů z jaterní a střevní tkáně .....	45
4.3.3	Stanovení koncentrace proteinu a cytochromů P450 v potkaních mikrozomech... .....	45
4.3.4	Stanovení aktivity vybraných forem potkaních jaterních cytochromů P450 .....	46
4.3.5	Stanovení exprese jednotlivých forem CYP na úrovni proteinu .....	50
4.3.5.1	Elektroforéza SDS-PAGE.....	50
4.3.5.2	Western blot analýza (imunoblot).....	50
4.3.5.3	Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků .....	51
4.3.6	Stanovení exprese jednotlivých forem CYP na úrovni mRNA.....	51
4.3.7	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	52
4.3.7.1	Stanovení koncentrace diklofenaku v potkaní krevní plazmě .....	52
4.3.7.2	Stanovení koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu v potkaní krevní plazmě .....	53
5.	VÝSLEDKY .....	54
6.	DISKUZE.....	68
7.	ZÁVĚRY.....	73

8.	SOUHRN .....	75
9.	SUMMARY .....	76
10.	LITERATURA .....	78
11.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ .....	91
11.1	Práce související s disertační prací .....	91
11.1.1	Původní vědecké publikace <i>in extenso</i> v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF .....	91
11.1.2	Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech .....	92
11.1.3	Publikovaná abstrakta .....	92
11.1.4	Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech .....	93
11.2	Ostatní publikace .....	96
11.2.1	Původní vědecké publikace <i>in extenso</i> uveřejněné v časopisech s IF .....	96
11.2.2	Původní vědecké publikace <i>in extenso</i> uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech .....	97
11.2.3	Publikovaná abstrakta .....	97
11.2.4	Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech .....	98



## SEZNAM ZKRATEK

AMI	amiodaron
AUC <sub>0-30h</sub>	plocha pod křivkou v rozmezí 0 – 30 hodin
AUC <sub>0-∞h</sub>	plocha pod křivkou v rozmezí 0 – ∞ hodin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
c <sub>max</sub>	maximální plazmatická koncentrace léčiva
CYP	cytochrom P450
DEA	N-desethylamiodaron
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EDTA-Na <sub>2</sub>	disodná sůl kyseliny diethyltetraaminoctové
EFC	7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin
EM	fenotyp rychlého metabolizátoru
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FXR	farnesoidní receptor X
GIT	gastrointestinální trakt
hBD-2	antimikrobiální peptid β-defenzin 2
HNF	hepatocytární nukleární faktor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
IFN <sub>γ</sub>	prozánětlivý interferon gama
IL	interleukin, prozánětlivý cytokin
IM	fenotyp středního metabolizátoru
i. s.	vnitřní standard
K	kontrolní skupina
KTJ	kolonie tvořící jednotky, v těchto jednotkách se udává počet bakterií
Luciferin-ME EGE	methylether-ethylenglykolether luciferinu
LXR	jaterní receptor X
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotid fosfátu
OATP	transportní polypeptidy organických aniontů
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr s chloridem sodným, pH 7,4

PM	fenotyp pomalého metabolizátoru
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPAR $\alpha$	nukleární receptory, které jsou obecně aktivované proliferátory peroxizomů
PVDF membrána	polyvinylidendifluoridová membrána
PXR	pregnanový receptor X
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsírán sodný
sIgA	imunoglobulin A sekrečního typu
$t_{1/2}$	biologický poločas
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
TBS	tris pufr s chloridem sodným, pH 7,4
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy
$t_{max}$	čas při dosažení maximální plazmatické koncentrace
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	sorbitan-monolaurát polyethylenglykolu, viskózní kapalina
UDP	uridin-5'-difosfát
UGT	uridin-5'-difosfoglukoronosyltransferáza
UM	fenotyp ultrarychlého metabolizátoru
UV	ultrafialové záření
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZO1, ZO2	periferní membránové proteiny těsného spoje

## 1. ÚVOD

Cizorodé látky, tzv. xenobiotika, jsou látky, které se nachází všude kolem nás a do organismu se mohou dostat např. s potravou, vdechnutím či vstřebáním kůží. Tyto látky mohou být přeměněny v organismu na látky jiné za účasti biotransformačních enzymů. Nejdůležitějšími enzymy odpovídajícími za metabolismus většiny cizorodých látek včetně léčiv jsou cytochromy P450 (CYP). Díky enzymům CYP mohou látky ztratit schopnost účinku na organismus anebo naopak získat tento efekt, přičemž hlavním „mechanistickým“ úkolem enzymů CYP je přeměnit látku na polárnější, aby mohla být z organismu vyloučena. Samotná xenobiotika však mohou ovlivnit funkci enzymů CYP, a tím ovlivnit působení jiné, současně podané látky, která se metabolizuje stejným biotransformačním enzymem. Stejně tak mohou xenobiotika ovlivnit aktivitu transportních proteinů, které slouží k usnadnění nebo znesnadnění cesty látek přes tkáňové bariéry.

V posledních letech se řada studií zabývá složkami stravy, které mohou aktivně ovlivnit stav organismu, jako jsou se např. nutraceutika, probiotika či prebiotika. Podle definice Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2002 „jsou probiotika živé mikroorganismy, které jsou-li podány v adekvátním množství, vykazují příznivý vliv na zdraví hostitele“ [1]. Tyto mikroorganismy spolu s komenzálními bakteriemi osidlují střevní mikroflóru hostitele a k jejich hlavním účinkům patří schopnost kolonizace a adherence (tedy přilnavost ke střevní stěně), antagonistický vliv na patogenní bakterie, schopnost tvorby antimikrobiálních substancí a schopnost modulace imunitního systému. Podobně jako xenobiotika, o nichž bylo zmíněno výše, se mohou chovat i látky produkované právě probiotickými bakteriemi. Tyto látky mohou např. ovlivnit farmakokinetiku současně podané látky. Ačkoliv se často mluví o pozitivním působení probiotik na lidský organismus a případně na léčbu onemocnění, existuje rovněž možnost, že probiotické bakterie mohou ovlivnit léčbu v negativním smyslu, pokud by ovlivnily farmakokinetické parametry současně podaného léčiva. V takovém případě by mohla být léčba daným léčivem neúčinná anebo naopak by podané léčivo mohlo mít na organismus toxické účinky.

Ve střevním traktu lidského organismu je zastoupeno 400 – 500 různých druhů bakterií, které představují 1 – 3 % tělesné hmotnosti [2]. Každý druh bakterie může na organismus působit jiným způsobem a samotné složení mikroflóry se u jednotlivců může lišit. Proto je žádoucí studovat vliv různých druhů bakterií na aktivitu enzymů CYP, a tím se např.

vyvarovat nežádoucím efektům při léčbě pacienta a rovněž sledovat případné změny farmakokinetických parametrů léčiva. Předkládaná práce je jedním z prvních příspěvků na toto téma.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo zjistit, jak a které enzymy CYP jsou distribuované po celé délce střevního traktu u potkana a zda mohou na tyto enzymy mít vliv perorálně podané probiotické bakterie. Zároveň bylo cílem zjistit, zda probiotické bakterie mohou ovlivnit farmakokinetiku současně podaného modelového léčiva. Jako probiotické bakterie byly vybrány *Escherichia coli* Nissle 1917 a *Lactobacillus casei*, které byly získány ze spolupracujícího pracoviště Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky.

Studium bylo zaměřeno na následující témata:

- Stanovení distribuce biotransformačních enzymů v gastrointestinálním traktu potkana.
- Studium vlivu *E. coli* Nissle 1917 nebo *L. casei* na aktivitu jaterních enzymů CYP u potkana a na expresi jaterních a střevních potkaních CYP jak na úrovni proteinu, tak i na úrovni mRNA.
- Zjištění vlivu *E. coli* Nissle 1917 nebo *L. casei* na farmakokinetiku současně podaného modelového léčiva (diklofenaku nebo amiodaronu).

### 3. TEORETICKÁ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE

#### 3.1 Metabolizmus látek

Lidé, zvířata, rostliny, houby i bakterie žijí v prostředí, ve kterém se nachází nespočetné množství látek, a stejně tak je mnoho látek přítomno v samotném organismu. Tyto látky, ať už z vnějšího prostředí (tzv. xenobiotika) nebo látky endogenního původu (což mohou být např. nasycené i nenasycené mastné kyseliny, eikosanoidy, steroly, steroidy, žlučové kyseliny, deriváty vitamínu D<sub>3</sub> nebo retinoidy), se mohou přeměňovat na látky jiné (tzv. metabolity), které mohou hrát v organismu jistou úlohu. Xenobiotika (což mohou být látky z potravy, léčiva nebo cizorodé látky z okolního prostředí), se do lidského organismu dostanou tak, že se absorbují do krevního řečiště, cévami se pak v organismu distribuují do jater, kde mohou být metabolizovány (jedná se o tzv. biotransformaci) a nakonec proběhne exkrece látky z organismu. Tyto děje mají značný vliv na to, zda se látka dostane k cílovému orgánu, tedy na místo působení, a jaké bude její množství. To je především důležité v případě léčivé látky, která je podávána pacientovi. Již během absorpce a distribuce musí látka interagovat s dalšími látkami a překonat bariéry, jako je kyselé prostředí žaludku, propustnost membrány, transportní proteiny, plazmatické bílkoviny či jiné enzymy, které chrání organismus před škodlivými látkami. Vlastnosti dané látky, způsob podání a dávka rozhodují, zda látka bude mít v organismu žádoucí efekt [3].

Metabolizmus látek, ať už xenobiotik či endogenních látek, probíhá za účasti enzymů a lze jej rozdělit na dvě fáze, fázi I a fázi II. K první fázi metabolismu lze zahrnout zejména redoxní reakce, kterými se látky stávají polárnějšími. Druhá fáze metabolismu zahrnuje konjugační reakce substrátů s enzymy za dodání energie, kdy vznikne látka ještě více polární (s výjimkou methylace, jejíž produkty jsou obecně méně polární a reagují s dalším enzymem druhé fáze). Vzniklé metabolity se pak díky polárnější povaze mohou z organismu vyloučit močí, potem či žlučí. Reakce druhé fáze jsou rychlejší než reakce první fáze, proto je výsledná rychlost metabolismu spíše ovlivněna reakcemi fáze I. Ovšem metabolizmus látek neprobíhá výlučně fázemi I i II, může probíhat pouze fází I nebo jen fází II, v závislosti na vlastnostech dané látky [4,5]. Reakce obou fází metabolismu jsou shrnuty v Tab. 1.

Biotransformace látek usiluje především o to, aby byly látky hydrofilnější a mohly se dostat mimo organismus. Je to opět jeden z mechanismů, jak ochránit organismus před cizorodými látkami. Během tohoto děje může dojít k přeměně farmakologicky účinné látky na

neúčinnou, nebo naopak k přeměně látky neúčinné (tzv. proléčivo) na látku účinnou. V tomto smyslu se však nemusí jednat jen o léčiva, ale také látky z okolního prostředí, které se biotransformací mohou přeměnit na karcinogeny, tedy látky, jež mohou vyvolat rakovinné onemocnění [6,7].

### 3.2 Cytochromy P450

Mezi nejvýznamnější enzymy, které metabolizují endogenní látky i xenobiotika, patří cytochromy P450 (CYP). Jedná se o proteiny s hmotností kolem 45 000 Da, které obsahují prostetickou skupinu hem b, v němž je atom železa v oxidovaném stavu ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Tento hemový komplex je k proteinu vázán pomocí atomu síry z aminokyselinového zbytku cysteinu. Co se týče názvu „cytochrom P450“, zkráceně CYP, označení cytochrom je obecně používáno pro enzymy účastníci se transportu elektronů a označení P450 je podle pigmentu, který byl nejprve objeven v potkaních játrech a který v redukované formě (po vazbě s oxidem uhelnatým) absorbuje viditelné záření o vlnové délce 450 nm [5,8]. Ve skutečnosti se jedná o rozmezí 447-452 nm, v závislosti na daném enzymu [4,9]. Cytochromy P450 jsou klasifikovány podle primární struktury. V lidském těle je známo 57 aktivních enzymů, které jsou rozděleny do 18 rodin. Tyto hemové proteiny se označují číselně podle rodiny (ve které mají minimálně 40% podobnost v sekvenci aminokyselin), dále písmenem podle podrodiny (ve které jsou si enzymy podobné s více než 55 %) a konečné číslo pak označuje individuální formu enzymu, např. CYP3A4 [10,11,12].

Tyto proteiny jsou účinnými enzymy, které jsou schopné katalyzovat hydroxylaci alifatických i aromatických sloučenin, epoxidaci dvojných vazeb, oxidaci heteroatomů, odstranění esterové skupiny či katalyzovat dealkylační nebo dehydrogenační reakce [5,13]. Na Obr. 1 jsou znázorněny krystalové struktury CYP3A4 a CYP2C9 samotné nebo s navázaným substrátem, tedy látkou, která je schopná se na protein vázat. K výše zmiňovaným reakcím však nedochází jen za účasti substrátu a enzymů CYP, nýbrž za účasti dalších enzymů, jako jsou flavoprotein NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktáza (CYPOR), cytochrom  $b_5$  nebo mitochondriální ferredoxin a ferredoxin reduktáza [4,14,15]. Obecný mechanismus působení enzymů CYP spočívá v aktivaci molekulárního kyslíku, kdy je jeden atom kyslíku „vložen“ do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku je použit pro tvorbu molekuly vody. Během celého reakčního mechanismu se spotřebují dva elektrony, jejichž

<i>Reakce</i>	<i>Enzym</i>	<i>Příklady metabolizovaných látek</i>
<b>Fáze I</b>		
hydrolyzá	esteráza	famciklovir; oseltamivir; paraoxon; prokain; spironolakton; vinylacetát
	peptidáza	aminokyseliny; peptidy
	epoxidhydroláza	leukotrien A4; naftalen-1,2-oxid; styren-7,8-epoxid
redukce	azo- a nitro- reduktáza	chloramfenikol; prontosil
	karbonylreduktáza	daunorubicin; haloperidol; pentoxifyllin; prostaglandiny; warfarin
	disulfidreduktáza	disulfiram
	sulfoxidreduktáza	sulindac
	chinonreduktáza	doxorubicin; 6-hydroxydopamin
	reduktivní dehalogenáza	halotan; isofluran; methoxyfluran
	NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktáza	mitomycin C; tirapazamin
oxidace	alkoholdehydrogenáza	ethanol
	aldehyddehydrogenáza	acetaldehyd; glutamát; chloralhydrát
	aldehydoxidáza	famciklovir; methotrexát; nikotin; tamoxifen
	xanthinoxidáza	eskuletin; allopurinol
	monoaminoxidáza	haloperidol; katecholaminy; zolmitriptan
	diaminoxidáza	putrescin
	flavin-monooxidáza	chlorpromazin; imipramin; kokain; methamfetamin; nikotin; sulindac
	cytochrom P450	amiodaron; diklofenak; chlorzoxazon; ibuprofen; kumarin; testosteron
<b>Fáze II</b>		
glukuronidace	UDP-glukuronosyltransferáza	diklofenak; kodein; paracetamol; propranolol; testosteron
sulfonace (sulfatace)	sulfotransferáza	dopamin; ethanol; cholesterol; paracetamol; PAH; salicylamid
konjugace s glutathionem	glutathion-S-transferáza	diethylmaleát; dichlormethan; trinitroglycerin
konjugace s aminokyselinou	acylkoenzym A syntáza acylkoenzym A: aminokyselina N-acyltransferáza	kyselina benzoová
acetylace	N-acetyltransferáza	dapson; isoniazid; kyselina p-aminobenzoová a p-aminosalicylová
methylace	methyltransferáza	histamin; L-dopa; 6-merkaptopurin; nikotin

**Tabulka 1.** Reakce I. a II. fáze metabolismu látek, enzymy (které se účastní zmíněných reakcí) a příklady látek (které se těmito enzymy metabolizují) [4].  
PAH, polycyklické aromatické uhlovodíky.

zdrojem je redukovaná forma nikotinamidadeninukleotid fosfátu (NADPH) nebo nikotinamidadeninukleotidu (NADH) [4]. Jelikož pouze jeden ze dvou atomů kyslíku setrvává v molekule substrátu, jsou enzymy CYP také nazývány jako monooxygenázy [5]. Schematický mechanismus působení cytochromů P450 je uveden na Obr. 2.

**A**



**B**



**C**

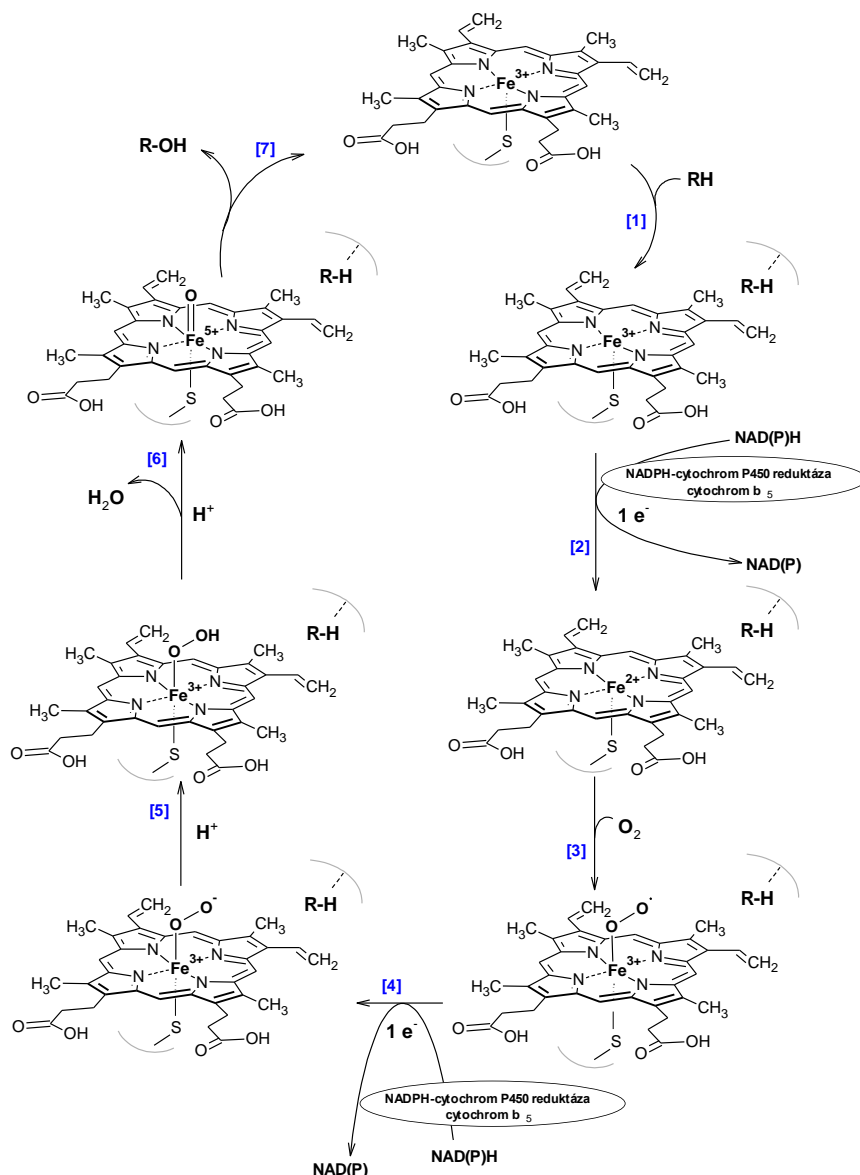


**D**



**Obrázek 1.** Krystalová struktura lidských cytochromů P450 (CYP). CYP3A4 (A); CYP3A4 v komplexu s erythromycinem (makrolidové antibiotikum; B); CYP2C9 (C); CYP2C9 v komplexu s flurbiprofenem (nesteroidní protizánětlivé léčivo; D) [16,17,18,19].





**Obrázek 2:** Schematické znázornění mechanismu působení cytochromů P450 (CYP):

Vazba substrátu (RH) na enzym CYP za vzniku komplexu enzym-RH [1]. Vazba RH bývá doprovázena změnou konformace a změnou spinového stavu železa z nízko-spinového na vysokospinový. Následně za účasti NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktázy, cytochromu  $b_5$  a donoru elektronů (NADPH nebo NADH) probíhá redukce oxidačního stavu hemového železa z  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  [2]. Redukované hemové železo může reagovat s tripletním molekulárním kyslíkem [3]. Jeden elektron z  $Fe^{2+}$  a jeden elektron z tripletního kyslíku vytváří meziprodukt s vazbou  $Fe^{3+}-O_2$ . Tento meziprodukt je relativně stabilní, ale může disociovat na  $Fe^{3+}$  a superoxidový anion. Uvolnění superoxidu je doprovázeno vznikem peroxidu vodíku, což je zdroj škodlivých kyslíkových radikálů. Meziprodukt po reakci [3] je superoxidový anion, který je vázaný k  $Fe^{3+}$  a obsahuje nepárový elektron na posledním kyslíku. Po této reakci následuje druhá redukce za účasti NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktázy, cytochromu  $b_5$  a donoru elektronů (NADPH nebo NAD) [4]. Při této redukci vzniká negativně nabitý železo-peroxidový komplex. Je třeba vzít na vědomí, že tento komplex je formálně dvojnásobně negativně nabitý, a tudíž se pravděpodobně rychle protonizuje za vzniku železo-hydroperoxidového komplexu [5]. Následuje druhá protonace za vzniku  $Fe^{5+}$  a rozštěpení vazby O-O, při které dochází k odštěpení molekuly vody a vzniku reaktivního meziproduktu komplexu železa s atomárním kyslíkem [6]. Komplex lze zapsat tak, jak je uveden ve schématu, ale je možné jej napsat i ve formě kation-radikálu, v němž oxidační stav atomu železa je  $Fe^{4+}$ . V konečné fázi dochází k přesunu atomu kyslíku z komplexu železa na RH a vznik R-OH, který je více polární než samotný substrát RH. Dochází k uvolnění oxidovaného substrátu a enzym se vrací do původního nízko-spinového stavu [7]. Enzym je opět připraven reagovat s další molekulou substrátu [5].

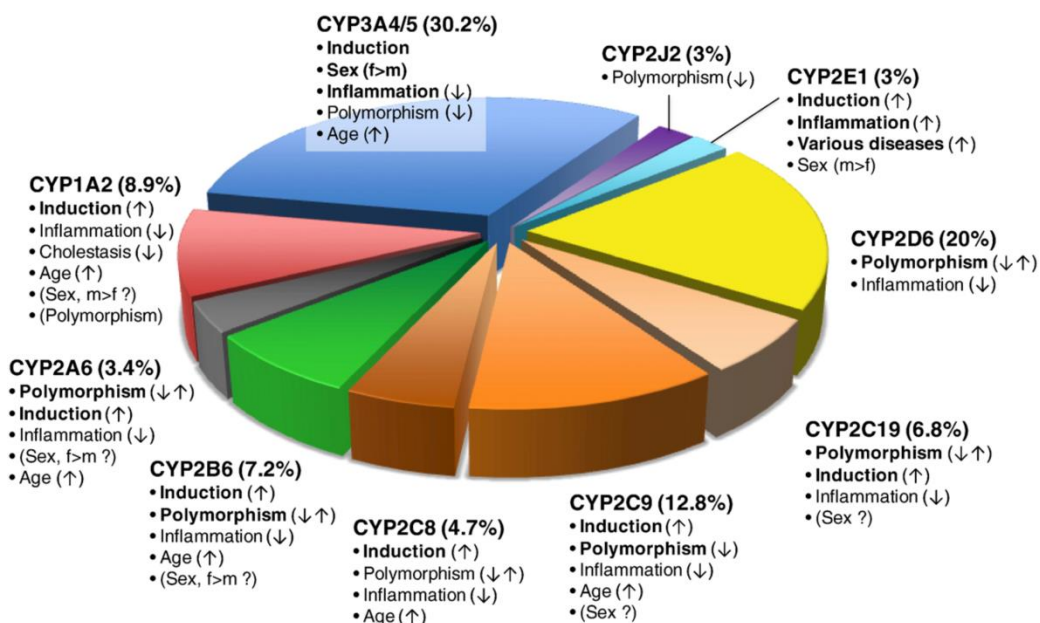
NADH, redukovaný nikotinamidadeninukleotid; NADPH, redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát.

Enzymy tří rodin CYP1-CYP3 se účastní především metabolismu xenobiotik (tedy látek živým organismům cizí), zatímco cytochromy P450 s vyšším číslem se spíše účastní metabolismu endogenních látek [20]. Podle substrátů lze enzymy CYP také rozdělit na dva typy. Enzymy detoxifikačního typu (CYP1-4) metabolizují např. léčiva, aromatické látky nebo mastné kyseliny, zatímco enzymy biosyntetického typu (CYP5 a s vyšším číslem) jsou zahrnuty do biosyntézy fyziologicky aktivních látek, např. steroidů, hydroxycholesterolů, vitamínu D<sub>3</sub> či žlučových kyselin [12]. Cytochromy P450 jsou odpovědné za 75 - 80 % reakcí I. fáze metabolismu a za 65 – 70 % clearance klinicky užívaných léčiv [21]. Na Obr. 3 je znázorněno procentuální rozdělení klinicky významných forem cytochromů P450 v lidských játrech.

Enzymy metabolizující xenobiotika jsou součástí nejen lidského organismu, ale jsou také nacházeny u bakterií, hub, rostlin a zvířat [5]. Lokalizace těchto enzymů je v buněčné membráně endoplazmatického retikula a mitochondrií a vyskytují se v celém organismu. Největší výskyt enzymů CYP je v játrech, kde je jejich obsah 300 pmol/mg proteinu. Dalšími orgány s výskytem CYP jsou např. gastrointestinální trakt, kůže, ledviny a nadledviny, mozek, plíce nebo srdce. Jelikož je obsah enzymů CYP v játrech největší, metabolismus látek probíhá především v tomto orgánu. Na druhou stranu, gastrointestinální trakt, kde je obsah enzymů CYP sice jen 20 pmol/mg proteinu, se nabízí jako první orgán, kde může být látka metabolizována po perorálním podání [22]. Pokud se jedná o látku účinnou, může již zde ztratit část své účinnosti.

Výkonnost cytochromů P450 ovlivňují faktory, jako jsou věk, pohlaví a zdravotní stav jedince. U ženského pohlaví je vyšší exprese CYP1A2, 3A4 a 7A1, zatímco enzymy CYP3A5, 27B1 a enzym druhé fáze UGT2B15 jsou více exprimovány u mužského pohlaví. Většina studií ukazuje, že ženy metabolizují léčiva rychleji než muži, a to zejména léčiva, která jsou metabolizována CYP3A4. Koncentrace tohoto proteinu v játrech může být totiž dvakrát vyšší u žen v porovnání s koncentrací jaterního proteinu CYP3A4 u mužů, značné rozdíly jsou i na hladině mRNA. Funkce enzymů je také ovlivněna stářím jedince. Cytochromy P450 se plně vyvíjí během 1. roku života. Během života pak dochází jen k mírnému zvýšení v expresi a aktivitě cytochromů P450, a to zejména u CYP2C9. U starších lidí je naopak funkce těchto enzymů snížena. Další z faktorů, ovlivňujících výkonnost enzymů CYP, je zdravotní stav jedince. Např. onemocnění jaterní cirhózou způsobuje strukturální změny jater, což vede ke snížení krevního průtoku játry, ke ztrátě funkce hepatocytů a ke snížené expresi enzymů CYP. Všechny tyto děje přispívají ke snížení kapacity pro metabolismus léčiv a výsledkem je pak nižší clearance a zvýšené hladiny léčiva

nenavázaného na plazmatické bílkoviny. Po dobu infekce, zánětu či jiného onemocnění kolují v těle prozánětlivé cytokiny (interleukiny IL-1 $\beta$  a IL-6, faktor nádorové nekrózy TNF- $\alpha$ ), které působí jako signální molekuly. Ty vyvolávají změny v jaterní genové expresi, která pak vede ke snížené expresi mnoha enzymů metabolizujících léčiva [21]. Všechny tyto faktory jsou taktéž schematicky znázorněny na Obr. 3.



**Obrázek 3.** Procentuální rozdělení klinicky významných forem cytochromů P450 v lidských játrech a faktory ovlivňující tyto enzymy [21].

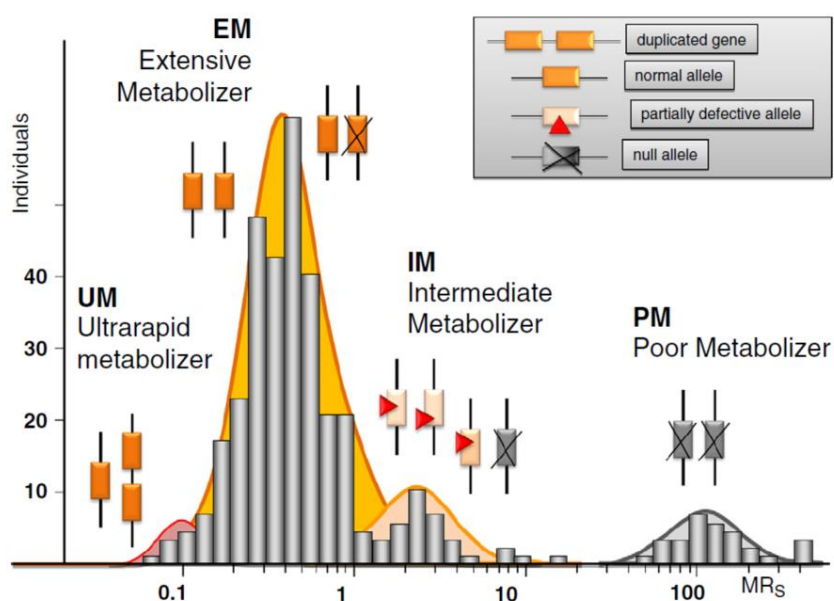
Induction, indukce; inflammation, zánět; cholestasis, cholestáza; age, věk; sex, pohlaví; polymorphism, polymorfismus; various diseases, různé nemoci.

Aktivitu enzymu CYP ovlivňuje i podaná látka, která je jeho substrátem. Pokud jsou podány současně dvě různé látky, které interagují se stejným enzymem CYP, může dojít k tzv. lékové interakci. Důsledkem toho může nastat buď indukce exprese, nebo inhibice aktivity či exprese metabolizujících enzymů. Inhibitorem může být látka, která je substrátem daného enzymu CYP, ale také látka, která se nemetabolizuje daným enzymem CYP a je pouze inhibitorem tohoto enzymu (např. chinidin – inhibitor CYP2D6, nikoliv jeho substrát) [23]. Mechanismus inhibice může být buď reverzibilní (nejběžnější forma) nebo ireverzibilní. Během reverzibilní inhibice dochází pouze k dočasné inhibici enzymu, zatímco ireverzibilní mechanismus inhibice spočívá v tvorbě reaktivních metabolitů pevně vázaných na příslušný enzym. Tyto reaktivní metabolity tak způsobují trvalou ztrátu enzymové aktivity do té doby, než se syntetizuje nový enzym.

V případě indukce exprese metabolizujících enzymů dochází ke zvýšení koncentrace mRNA (díky transkripční aktivaci), následně probíhá zvýšená syntéza proteinu, a v důsledku vyšší koncentrace enzymu dochází ke zrychlení metabolismu samotných indukujících látek (autoindukce; vlastnost např. karbamazepinu) nebo současně podaných látek. Zároveň se zvyšuje clearance a dochází ke změnám farmakokinetiky léčiv. K indukci metabolismu je zpravidla zapotřebí syntetizovat nový enzym, což trvá řádově hodiny až dny [23,24]. Výsledkem zvýšené aktivity enzymu pak může být nedostatečná léčba, protože podaná léčiva mohou být účinněji metabolizována a nemusí být dosaženy terapeutické hladiny těchto léčiv. Inhibice probíhá naproti tomu téměř okamžitě nebo během několika hodin a vede k nežádoucímu zvýšení plazmatické hladiny současně podávaných léčiv metabolizovaných stejným způsobem, a to až s toxickými následky. K enzymům schopným indukce patří CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 a 3A4, zatímco o CYP2D6 je známo, že indukovatelný není. Na druhou stranu, CYP2E1 je indukovatelný už jen stabilizací samotného proteinu [21,25]. Indukce exprese enzymu CYP může proběhnout transkripční aktivací prostřednictvím nukleárních receptorů (např. pregnanový receptor PXR, konstitutivní androstanový receptor CAR, receptor vitamín D<sub>3</sub> nebo nukleární faktor HNF4α) [26]. V případě CYP1A, 1B1, některých glukuronosyltransferáz (UGT) a glutathion S-transferáz (GST) hraje významnou transkripční roli cytosolický aryl-uhlovodíkový receptor (AhR) [21,27,28]. Obecně lze tedy říci, že indukce enzymové exprese vede ke zvýšení clearance podaných léčiv a může být považována jednak za prospěšnou, ale také za nežádoucí, vede-li např. k urychlenému vylučování léčiva, které tak neumožní dosažení terapeutické hladiny. Na druhou stranu enzymy podrodiny CYP1A mohou také aktivovat některé látky (např. benzo(a)pyren) na látky karcinogenní. Indukce těchto enzymů tak zvyšuje riziko vzniku rakoviny.

Aktivitu enzymů CYP může ovlivnit i genetický polymorfismus, což je prokázáno u některých lidských enzymů, např. u CYP1A1, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5. Genetický polymorfismus je obvykle definován jako geneticky podmíněný rozdíl ovlivňující  $\geq 2\%$  populace. Jedná se o dědičné změny DNA, které vedou k nedostatečné produkci enzymů CYP, nedostatečné indukovatelnosti CYP nebo k syntéze proteinu CYP se změněnou katalytickou aktivitou [22]. Jedinci pak na základě těchto změn metabolizují stejná xenobiotika různě rychle. Z tohoto důvodu se tito jedinci, tzv. metabolizátoři, klasifikují do fenotypových skupin: ultra rychlí (UM), rychlí (EM), střední (IM) a pomalí metabolizátoři (PM). UM nesou duplicitní nebo multiplicitní kopie genu určité alely. Naproti tomu IM nebo PM nesou v genotypu jednu nebo více nefunkčních alel. EM nesou 2 alely dávající normální aktivitu daného enzymu (značená \*1) a obvykle zahrnují větší část populace [21,29,30]. Na

Obr. 4 je znázorněna fenotypová a genotypová distribuce oxidace alkaloidu sparteinu. Této oxidace se účastní enzym CYP2D6. Stanovení bylo provedeno u německé populace a zahrnuto bylo 308 jedinců [21,31,32]. Databáze alelických variant genů lidských cytochromů P450 je užitečným zdrojem v oblasti farmakogenomiky a je k dispozici na webových stránkách <http://www.cypalleles.ki.se/>, které jsou postupně doplňovány odborníky z celého světa [29]. Tato databáze používá klasifikační systém, kde referenční alela (\*1) kóduje fenotyp aktivního metabolismu, zatímco variantní alely kódují fenotyp pomalého metabolismu (s nízkou či žádnou aktivitou enzymu k příslušné látce). Variantní alely jednotlivých enzymů CYP mohou být příčinou nedostačující léčby nebo mohou vyvolat toxické účinky [20], u enzymů CYP s endogenními funkcemi mohou být příčinou samotného onemocnění. Fenotypy metabolizátorů jsou používány především k popsání metabolismu léčiv [29] a mohou být stanoveny *in vivo* za použití selektivních modelových substrátů. Zjištění fenotypu pacienta může především usnadnit dávkování léčiva a zabránit tak předávkování s možností vzniku toxických účinků.



**Obrázek 4.** Fenotypová a genotypová distribuce oxidace alkaloidu sparteinu u německé populace (N = 308) [21,31,32].

Individuals, jedinci; MR<sub>s</sub>, metabolický poměr (poměr hladiny parentní látky k hladině metabolitu) pro spartein získaný z moče; ultrarapid metabolizer (UM), ultrarychlý metabolizátor; extensive metabolizer (EM), rychlý metabolizátor; intermediate metabolizer (IM), střední metabolizátor; poor metabolizer (PM), pomalý metabolizátor; duplicated gene, duplicitní gen; normal allele, normální alela; partially defective allele, částečně defektní alela; null allele, žádná alela.

### **3.3 Rozdělení enzymů CYP a porovnání jejich vlastností u člověka a potkana**

Jak již bylo řečeno výše, enzymy CYP jsou přítomny jak u člověka, tak i u zvířat, rostlin, hub a bakterií. Tato práce se zabývá cytochromy P450 u potkana, proto bude detailní rozbor enzymů CYP zúžen na člověka a potkana. V Tab. 2 jsou shrnuty lidské cytochromy P450 (CYP1-CYP3) s genem, lokalizací, s příklady substrátů, inhibitorů a induktorů. V Tab. 3 je pak porovnání vybraných lidských forem CYP s potkaními. Práce je navíc zúžena na rodiny CYP1-3, protože tyto rodiny se nejvíce týkají metabolismu xenobiotik.

#### **3.3.1 Lidská rodina CYP1**

Enzymy rodiny CYP1 se nachází v různých tkáních a jejich genová exprese bývá spojena s aryl-uhlovodíkovým receptorem (AhR), tedy transkripčním faktorem, který je aktivován vazbou polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). Tyto aromatické sloučeniny jsou obsaženy např. v cigaretovém kouři, vznikají průmyslovým spalováním nebo grilováním jídla na dřevěném uhlí. AhR může být také aktivován vazbou přírodních složek v potravě (např. v brokolici). Do rodiny CYP1 patří dvě podrodiny, CYP1A a CYP1B. Obě se účastní nejen metabolismu PAH, ale také endogenních látek, jež jsou ligandy receptoru AhR. CYP1A1 inaktivuje prostaglandin G<sub>2</sub>, CYP1A2 oxiduje uroporfyrinogen a melatonin, a enzymy CYP1A2 i CYP1B1 se účastní hydroxylace estrogenu [20,27,28].

##### **3.3.1.1 Podrodina CYP1A u člověka**

Do podrodiny CYP1A patří dva enzymy, CYP1A1 a CYP1A2. První z nich je v játrech detekovatelný jen v případě indukce tohoto enzymu [11]. K indukci CYP1A ovšem dochází velmi často, protože je indukovatelný i látkami ze znečištěného životního prostředí. Významnou roli v metabolismu léčiv hraje v této rodině spíše CYP1A2, který je významně exprimován v játrech a účastní se přeměny 10 % klinicky významných léčiv [20,21,33]. Mezi substráty CYP1A2 patří aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny (např. paracetamol, kofein, klozapin, fenacetin, takrin nebo teofylin) na rozdíl od CYP1A1, který preferuje

<b>Rodina lidských cytochromů P450</b>	<b>Gen</b>	<b>Lokalizace enzymu u člověka</b>	<b>Příklady substrátů enzymu u člověka</b>	<b>Příklady inhibitorů u člověka</b>	<b>Příklady induktorů enzymu u člověka</b>
<b>CYP1A</b>	<i>1A1</i>	plíce, játra, mozek, GIT, lymfocyty, srdce, kůže	PAH	některé flavonoidy	dioxiny, PAH, omeprazol
	<i>1A2</i>	játra, plíce	aromatické aminy, fenacetin, klozapin, kofein, PAH, paracetamol, takrin, teofylin, warfarin	amiodaron, cimetidin, disulfiram, fluvoxamin, furafyllin, látky z košťálové zeleniny	β-naftoflavon, fenobarbital, karbamazepin, PAH, omeprazol, rifampicin
<b>CYP1B</b>	<i>1B1</i>	kůže, mozek srdce, plíce, slezina, placenta, játra, ledviny, GIT	PAH	některé flavonoidy	dioxin
<b>CYP2A</b>	<i>2A6</i>	játra, nosní sliznice, plíce	bilirubin, butadien, kotinin, kumarin, nikotin	diethyldithiokarbamát, ketokonazol, 8-methoxypsoralen, pilokarpin, selegilin	barbituráty, dexametazon, estrogeny, karbamazepin, rifampicin
	<i>2A7</i>	-	-	-	-
	<i>2A13</i>	plíce	benzo[c]fenanthren; 3,4-dihydroxy-3,4-dihydro-7,12-dimethylbenz[a]anthracen	β-nikotylin, menthol	?
<b>CYP2B</b>	<i>2B6</i>	játra, mozek, ledviny, srdce, placenta, plíce, nosní sliznice	bupropion, cyklofosfamid, efavirenz, propofol, (S)-mefenytoin, testosteron, tramadol	klopidogrel, klotrimazol, sertralin	barbituráty, karbamazepin, metamizol, rifampicin, statiny

<b>CYP2C</b>	2C8	játra, ledviny	amiodaron, amodiaquin, imatinib, kyselina arachidonová, kyselina retinová, paklitaxel	gemfibrozil, kvercetin, montelukast, tamoxifen, trimethoprim	barbituráty, fibráty, imatinib, paklitaxel, rifampicin, statiny
	2C9/10	játra	celecoxib, diklofenak, ibuprofen, rosuvastatin, (S)-warfarin, tolbutamid	amiodaron, flukonazol, metronidazol, ritonavir, sulfafenazol	barbituráty, nifedipin, prednison, rifampicin, statiny
	2C18	kůže, játra	buprenorfin, diklofenak, fenytoin, warfarin	?	rifampicin
	2C19	játra, srdce	amitriptylin, diazepam, klopidogrel, propranolol, (R)-omeprazol, (S)-mefenytoin, vorikonazol	flukonazol, fluvoxamin, isoniazid, klopidogrel, omeprazol, ritonavir, voriconazol	barbituráty, karbamazepin, rifampicin, ritonavir
<b>CYP2D</b>	2D6	játra, mozek, duodenum, jejunum, srdce	amitriptylin, bufuralol, dextrometorfan, kodein, metoprolol, tamoxifen, tramadol	celecoxib, bupropion, haloperidol, chinidin, metadon	-
<b>CYP2E</b>	2E1	játra, nosní sliznice, mozek, srdce, kostní dřeň, ledviny, varlata, vaječníky, lymfocyty, GIT	ethanol, chlorzoxazon, nitrosaminy, kyselina salicylová, paracetamol, p-nitrofenol	diallylsulfid, diethyldithiokarbamát, disulfiram, 4-methylpyrazol	aceton, ethanol, hladovění, isoniazid
<b>CYP2F</b>	2F1	plíce, nosní sliznice, játra	benzen, kumariny, skatol	skatol	?
<b>CYP2J</b>	2J2	GIT, srdce, kosterní svaly, ledviny	amiodaron, astemizol, cyklosporin A, terfenadin	ketokonazol, kyselina arachidonová, troglitazon	?
<b>CYP2R</b>	2R1	keratinocyty, varlata	vitamín D	?	?
<b>CYP2S</b>	2S1	GIT, plíce, močové cesty, kůže	eikosanoidy	?	dioxin
<b>CYP2U</b>	2U1	brzlík, mozeček	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem	?	?



<b>CYP2W</b>	2W1	tlusté střevo plodu, nádorová tkáň tlustého střeva	?	?	?
<b>CYP3A</b>	3A4/5	játra, GIT, ledviny, plíce, mozek, endotel, placenta, lymfocyty	atorvastatin, cyklosporin A, diazepam, metyrapon, midazolam, paracetamol, takrolimus, testosteron	azamulin, erythromycin, grapefruitový džus, ketokonazol, klarithromycin, verapamil	barbituráty, fenytoin, gingko biloba, imatinib, karbamazepin, rifampicin, statiny
	3A7	játra plodu, endometrium dělohy	podobné jako u CYP3A4	podobné jako u CYP3A4	barbituráty, steroidy
	3A43	játra, prostata	zřejmě podobné jako u CYP3A4	zřejmě podobné jako u CYP3A4	zřejmě podobné jako u CYP3A4

**Tabulka 2.** Přehled lidských cytochromů P450 (CYP1-CYP3) s genem, lokalizací a s příklady substrátů, inhibitorů a induktorů [6,11,21,30,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44]. GIT, gastrointestinální trakt; PAH, polycyklické aromatické uhlovodíky; ?, není známo; -, nedetekováno.

Rodina	Podrodina	Lidská forma CYP	Potkaní forma CYP
<b>CYP1</b>	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1
<b>CYP2</b>	A	2A6, 2A7, 2A13	2A1*, 2A2*, 2A3
	B	2B6	2B1*, 2B2*, 2B3*, 2B12, 2B15
	C	2C8, 2C9/10, 2C18, 2C19	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23
	D	2D6	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2E1
<b>CYP3</b>	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62

**Tabulka 3.** Porovnání vybraných lidských forem cytochromů P450 (CYP) s potkaními formami [22,45,46].  
\*rozdíl mezi pohlavími.

substráty planární aromatické uhlovodíky. Mezi inhibitory CYP1A2 patří disulfiram, furafyllin nebo některé látky z košťálové zeleniny, a mezi induktory CYP1A2 patří např. PAH, látky z rostlin z čeledi miříkovitých, z léčiv pak omeprazol nebo rifampicin. Typické reakce katalyzované CYP1A2 jsou např. O-deethylace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu, O-deethylace fenacetinu a N3-demethylace kofeinu, které se běžně používají pro *in vitro* nebo *in vivo* stanovení fenotypu. Vysoká hladina CYP1A1 bývá u pacientů spojována s kouřením, ovšem na interindividuální variabilitu má vliv zejména strava [4,22,47,48], zvláště v dnešní době, kdy je letní grilování velmi populární.

Na interindividuální variabilitě se samozřejmě může podílet genetický polymorfismus. Např. genotyp *CYP1A2\*6* je spojený s nefunkčností enzymu, tato alela je však velmi vzácná. *CYP1A2\*1C* souvisí s nižší indukovatelností enzymu vyvolanou kouřením u japonské populace, naopak *CYP1A2\*1F* je spojena se zvýšenou enzymovou indukovatelností u švédských a německých kuřáků, a také u silných švédských a srbských konzumentů kávy [11,21].

### **3.3.1.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP1A s lidskou**

Potkaní podrodina CYP1A má stejně označené členy jako rodina lidská. Co se týče strukturní podobnosti k lidským enzymům CYP1A, pro CYP1A1 je to podobnost 83% a pro CYP1A2 80%. Protein CYP1A1 je u potkana exprimován především v tenkém střevě, v játrech je obsažen pouze v nízkých koncentracích, podobně jako u člověka. Naopak protein CYP1A2 je, podobně jako u lidí, exprimován zejména v játrech, zatímco v extrahepatálních tkáních je exprimován ve velmi nízkých koncentracích nebo vůbec [22]. Enzym CYP1A2 katalyzuje O-dealkylaci 7-ethoxyresorufinu [4] a tato reakce se využívá ke stanovení aktivity CYP1A2 u potkana *in vitro*.

### **3.3.1.3 Podrodina CYP1B u člověka**

Do podrodiny CYP1B patří jen jedna forma enzymu, CYP1B1, která je exprimována v játrech i v extrahepatálních tkáních, ovšem v nádorových buňkách je exprimována ve vyšších koncentracích v porovnání s normální tkání. Indukce enzymu CYP1B1 je tedy významným faktorem při stanovení rizika vzniku nádorů a to zejména v těch tkání, které jsou

citlivé na hormonální změny (např. prostata, prsní tkáň, vaječníky nebo děloha). Je známo, že lidský CYP1B1 se účastní 4-hydroxylace estrogenů. Vzniklé metabolity tedy mohou být příčinou např. rakoviny prsu [22,49,50]. Na myším modelu byla dokonce objevena souvislost mutace genu *CYP1B1* a vzniku primárního kongenitálního glaukomu [51].

#### **3.3.1.4 Porovnání potkaní podrodiny CYP1B s lidskou**

Potkaní CYP1B1 je exprimován v játrech a plicích. Podobně jako u lidí je CYP1B1 jediným enzymem podrodiny CYP1B. Tento enzym není ovšem detailně prozkoumán, a tudíž srovnání potkaního enzymu CYP1B1 s lidským enzymem je velice obtížné [22].

#### **3.3.2 Lidská rodina CYP2**

CYP2 je u savců nejrozsáhlejší rodinou cytochromů P450. Do této rodiny patří podrodiny CYP2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2J, 2R, 2S, 2U a 2W. Nejvýznamnější podrodinou je však CYP2C, protože se účastní metabolismu kyseliny arachidonové, některých steroidů a především nemalého množství často předepisovaných léčiv. Významnou roli v metabolismu léčiv má také enzym CYP2D6, menší pak enzymy CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1 a CYP2J2. Naopak jiné enzymy jsou sice známy, nicméně jejich funkce není stále prozkoumána. Z této rodiny se jedná o CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1 a CYP2W1 [20]. Vzhledem k tomu, jak je tato rodina rozsáhlá, v jednotlivých kapitolách bude zmíněno jen prvních pět podrodin, protože jsou zahrnuty především v metabolismu xenobiotik a jejich funkce je dobře známá.

##### **3.3.2.1 Podrodina CYP2A u člověka**

Do podrodiny CYP2A patří CYP2A6 a CYP2A13, a dále katalytický inaktivní CYP2A7. Významnější z nich je CYP2A6, který se vyskytuje v játrech, nosní sliznici a plicích [52]. Mezi substráty tohoto enzymu lze zařadit nízkomolekulární látky obsahující keto- nebo nitro- skupinu (např. kumarin, kotinin nebo nikotin). Jedná se o jediný enzym metabolizující léčiva, který katalyzuje 7-hydroxylaci kumarinu, a tato reakce slouží ke stanovení fenotypu *in vitro* a *in vivo*. Expresí proteinu CYP2A6 může být rovněž látkami

inhibována (např. ketokonazolem nebo 8-methoxypsoralenem) nebo indukována (barbituráty či rifampicinem). Alely *CYP2A6*\*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*12, \*17 patří mezi málo aktivní nebo neaktivní alely [4,21,53,54]. *CYP2A6*\*12 je hybridní alela *CYP2A7/CYP2A6*, která koreluje se sníženou aktivitou enzymu *CYP2A6* *in vivo*, konkrétně způsobuje 50% snížení koncentrace proteinu *CYP2A6* a 40% snížení aktivity 7-hydroxylace kumarinu. Distribuce této alely může vysvětlit některé interindividuální variability v aktivitě enzymu *CYP2A6*, které byly objeveny u jedinců s fenotypem EM [55].

### 3.3.2.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP2A s lidskou

Do této podrodiny patří enzymy *CYP2A1*, *2A2* a *2A3*. První dva se vyskytují v játrech a katalyzují 7 $\alpha$ - (*CYP2A1* i *CYP2A2*) a 15 $\alpha$ -hydroxylaci testosteronu (pouze *CYP2A2*). *CYP2A1* je dominantní u samic, naopak *CYP2A2* je dominantní u samců. *CYP2A3* není exprimován v játrech, ovšem je detekován v jícnu, plicích a nosní sliznici. Enzymy *CYP2A1* a *2A2* jsou z 60 % homologní k lidskému *CYP2A6*, ovšem na rozdíl od lidského *CYP2A6* tyto enzymy nekatalyzují (nebo jen velmi málo) 7-hydroxylaci kumarinu [4,22].

### 3.3.2.3 Podrodina CYP2B u člověka

K podrodině *CYP2B* patří geny *CYP2B6* a *2B7*. *CYP2B7* je nefunkční pseudogen, jehož mRNA se nachází v plicích. Významnější je funkční gen *CYP2B6*, který je obsažen v játrech, mozku, ledvinách, srdci, placentě, plicích a nosní sliznici, zatímco ve střevě, kůži a keratinocytech se vyskytuje v nízkých nebo žádných koncentracích. Jeho hladiny mohou být vyšší u kuřáků a alkoholiků [21,56]. *CYP2B6* je v tkáních obecně málo exprimován. Jeho variabilita v expresi je však zhruba třistanásobná. Většina studií tvrdí, že koncentrační rozdíly proteinu *CYP2B6* mezi pohlavími nejsou, nicméně některé studie ukazují vyšší koncentrace *CYP2B6* u žen ve srovnání s muži [22,57,58]. Mezi substráty tohoto enzymu patří látky neutrální nebo slabě bazické a většinou lipofilní, zahrnující anestetika a další léčiva (např. bupropion, efavirenz, tramadol), drogy, organofosfátové insekticidy (např. chlorpyrifos nebo široce používaný repelent s diethyltoluamidem (DEET) jako účinnou látkou) či herbicidy [58,59,60]. Hlavním regulátorem *CYP2B6* je receptor CAR a k indukci *CYP2B6* přispívá i PXR. Induktory exprese proteinu *CYP2B6* jsou tedy ligandy těchto receptorů (jako je např.

rifampicin, barbituráty). Co se týče inhibice exprese CYP2B6, svou roli zde hraje zánět v lidských hepatocytech, kdy dochází ke snížení transkripční regulace CYP2B6 jako reakce na interleukin 6 (IL-6) a interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). CYP2B6 katalyzuje O-dealkylaci 7-ethoxy-4-trifluoromethylkumarinu nebo 4-hydroxylaci bupropionu, specifitější reakcí pro CYP2B6 je pak N-demethylace (S)-mefenytoinu. Tyto reakce se běžně používají pro stanovení fenotypu *in vitro*. Potenciální *in vivo* marker by mohl být efavirenz [58,61,62].

Co se týče polymorfizmu, nejběžnější alelou je *CYP2B6\*6*, která se vyskytuje u 15 - 60 % populace (u Afričanů, Afrických Američanů, Asiatů, Kavkazanů) v závislosti na etnické skupině a přispívá k 50-75% snížení exprese proteinu. Další významnou alelou je *CYP2B6\*18*, která se vyskytuje především u africké populace, kde je její výskyt 4-12%. Tato alela přispívá k velmi malé až žádné expresi proteinu a protein je k různým substrátům velmi málo aktivní. Naopak alely *CYP2B6\*4* a *CYP2B6\*22* přispívají ke zvýšení exprese proteinu a jeho aktivitě [21,58].

#### **3.3.2.4 Porovnání potkaní podrodiny CYP2B s lidskou**

U potkana existují tři hlavní formy enzymů této podrodiny, CYP2B1, 2B2 a 2B3, a pak další dva, CYP2B12 a 2B15, které jsou málo prozkoumané. První dva jsou si strukturně velmi podobné (97% shodnost), mají i velmi podobnou substrátovou specifitu, nicméně CYP2B1 je mnohem více katalyticky aktivní než CYP2B2. Oba lze detekovat v játrech i extrahepatálních tkáních, jako jsou plíce a gastrointestinální trakt (více však v duodenu). U potkaní podrodiny CYP2B jsou rozdíly mezi pohlavími, v tomto případě jsou koncentrace CYP2B vyšší u samce než u samice. Tento dimorfismus je možné vysvětlit sekrecí růstového hormonu hypofýzy, který potlačuje expresi CYP2B více u samic v porovnání se samci [22]. Co se týče CYP2B12 a 2B15, oba se nachází v kůži potkana a substrátem CYP2B12 je kyselina arachidonová [63,64].

#### **3.3.2.5 Podrodina CYP2C u člověka**

Tato podrodina se skládá z těchto členů: CYP2C8, 2C9/10, 2C18 a 2C19. Nejvýznamnější z nich je CYP2C9, protože je z podrodiny CYP2C nejvíce exprimován v játrech a účastní se metabolismu klinicky významných léčiv. Aktivní místo CYP2C9 je

flexibilní, a to vysvětluje jeho širokou substrátovou specifitu [65]. Mezi jeho substráty lze obecně zařadit lipofilní a slabě kyselé látky, příkladem mohou být warfarin, phenytoin či nesteroidní protizánětlivá léčiva diklofenak nebo ibuprofen [11,21]. Markerem aktivity CYP2C9 je 4'-hydroxylace tolbutamidu, 7-hydroxylace (S)-warfarinu nebo 4'-hydroxylace diklofenaku. K metabolismu tolbutamidu přispívá i CYP2C19, proto jsou S-warfarin a diklofenak specifitějšími markery pro stanovení aktivity CYP2C9. Co se týče CYP2C10, jeho struktura i substrátová specifita je podobná jako u CYP2C9, proto CYP2C9 a CYP2C10 bývají často posuzovány společně [11]. CYP2C18 je detekován především v kůži. Tento enzym katalyzuje hydroxylaci fenytoinu, 5-hydroxylaci diklofenaku nebo 4'-hydroxylaci warfarinu [38,66]. Poslední dvě reakce katalyzuje i enzym CYP2C8, který se nachází zejména v játrech. Tento enzym také participuje např. na metabolismu retinolu, kyseliny retinové, kyseliny arachidonové, benzo(a)pyrenu, rosiglitazonu, pioglitazonu, amiodaronu, paklitaxelu nebo amodiaquinu. Exprese CYP2C8 může být indukována některými látkami, např. statiny. CYP2C19 je detekován v játrech i duodenu a je hlavním enzymem v metabolismu inhibitorů protonové pumpy (např. omeprazol), rovněž metabolizuje (S)-mefenytoin či antidepressiva (např. imipramin) [21]. Je také nutné zmínit nukleární receptory, které hrají významnou transkripční roli při indukci CYP2C. Jedná se o PXR, CAR, GR a HNF4 $\alpha$  [26].

Ukázalo se, že i členové podrodiny CYP2C vykazují polymorfismus, zejména CYP2C19 [22], který se u jedinců vyskytuje jako málo aktivní a způsobuje velkou interindividuální variabilitu. Nejvýznamnější alelou s nulovou aktivitou je *CYP2C19\*2*, která se vyskytuje výlučně u Kavkazanů. Další alelou je *CYP2C19\*3*, která se primárně vyskytuje u Asiatů, a další alely bez aktivity jsou *CYP2C19\*4* - \*8. Ukazuje se, že AUC omeprazolu, který je metabolizován CYP2C19, je u jedinců s fenotypem pomalých metabolizátorů 5 - 14 krát vyšší než u jedinců s fenotypem rychlých metabolizátorů, což komplikuje dávkování léčiva. Co se týče polymorfismu CYP2C8, mezi neaktivní alely patří *CYP2C8\*5* a *CYP2C8\*7*. Alela *CYP2C8\*8* má sníženou aktivitu, zatímco běžné a klinicky významné jsou alely *CYP2C8\*2*, *CYP2C8\*3* a *CYP2C8\*4*. *CYP2C8\*2* se prakticky vyskytuje jen u Afričanů a afrických Američanů. CYP2C9 má 35 odlišných alel, přičemž klinicky významné jsou *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*, které se běžně vyskytují u Kavkazanů [21]. Tyto alely mají sníženou aktivitu a mohou být u pacientů příčinou zhoršených zdravotních stavů, pokud jsou tito pacienti léčeni léčivem, která se metabolizují přes CYP2C9. Příkladem může být snížená clearance perorálních antidiabetik, která může vyvolat těžkou hypoglykémii, nebo v případě podání warfarinu může dojít v důsledku snížené biotransformace ke krvácení, což je známý vedlejší nežádoucí efekt tohoto léku [11].

### 3.3.2.6 Porovnání potkaní podrodiny CYP2C s lidskou

Potkaní CYP2C je rozsáhlá a velice složitá podrodina. K enzymům této podrodiny patří CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22 a 2C23. Na rozdíl od lidských jater, kde je nejvíce zastoupena podrodina CYP3A, nejrozšířenější v potkaních játrech je právě tato podrodina CYP2C. U těchto enzymů však existují pohlavní rozdíly. CYP2C12 je více exprimován v samičích játrech, stejně jako CYP2C7. CYP2C11 se u nevyspělých potkanů nevyskytuje a jeho exprese se rapidně zvyšuje až během puberty pouze u samců (4 - 5 týdnů po narození). CYP2C11 je převládající forma enzymů CYP v játrech dospělých samců potkanů (obsahující až 50 % celkového obsahu cytochromů P450). Tento enzym však není detekován jen v játrech, ale také v nižších koncentracích v ledvinách a tenkém střevě. CYP2C11 katalyzuje 2 $\alpha$ -hydroxylaci testosteronu a tuto reakci nekatalyzuje žádná lidská jaterní forma CYP [4]. Podobně jako CYP2C11, i CYP2C13 je exprimován více u samců než u samic. Naopak CYP2C6 se mezi pohlavími neliší a je obsažen v játrech a v nízkých koncentracích v tenkém střevě. Další z enzymů potkaní podrodiny CYP2C je CYP2C23, který je vysoce exprimován v ledvinách. Předpokládá se, že má důležitou úlohu při vazodilataci v ledvinách jako odpověď na jejich zatížení solemi [22].

### 3.3.2.7 Podrodina CYP2D u člověka

Do podrodiny CYP2D patří jen jeden funkční gen, a to *CYP2D6*, který je velice významný tím, že byl u něj již v 70. letech minulého století objeven polymorfismus [32]. Díky němu vzniklo rozdělení jedinců na základě fenotypů oxidativního metabolismu substrátů [4,11,32]. Do podrodiny CYP2D je také možné zařadit pseudogeny *CYP2D7* a *CYP2D8*. Tyto pseudogeny nejsou schopné produkovat funkční protein, a to díky přítomnému nukleotidu T138 v exonu 1 v případě *CYP2D7*, nebo obsahu mnoha nežádoucích mutací v případě *CYP2D8*. *CYP2D7* je navzdory své nefunkčnosti detekovatelný v játrech na úrovni mRNA [32].

Enzym CYP2D6 je regulován HNF4 $\alpha$  a jeho exprese probíhá jak v játrech, tak i v enterocytech, v různých oblastech lidského mozku, v pravé srdeční komoře, v duodenu, jejunu, avšak ne v ileu a tlustém střevě [32,67]. Exprese proteinu CYP2D6 je prakticky nedetekovatelná u ještě nenarozených dětí, nicméně, pouze pár hodin po narození se jeho exprese značně zvýší. CYP2D6 metabolizuje 15 – 25 % klinicky užívaných léčiv. Jedná se

o látky spíše hydrofilní, bazické a dusíkaté, příkladem může být antiarytmikum propafenon, antidepressivum amitriptylin,  $\beta$ -blokátory bufuralol a metoprolol, nebo slabá opioidní analgetika tramadol a kodein [32]. Mezi selektivní léčiva, která se používají ke stanovení fenotypu CYP2D6, patří debrisochin, dextrometorfan, metoprolol, spartein či tramadol, avšak debrisochin a spartein již nejsou v medicíně využívány. Mezi inhibitory patří chinidin nebo metadon, co se týče indukce, tuto vlastnost CYP2D6 nevykazuje. U polymorfizmu CYP2D6 bylo zjištěno, že fenotyp pomalého metabolizátoru může obsahovat 2 nulové alely, tedy alely, které kódují nefunkční protein. Na rozdíl od jiných enzymů CYP, u kterých se fenotyp pomalého metabolizátoru někdy projevuje jen sníženou aktivitou, u CYP2D6 není detekovatelná žádná zbytková aktivita. Nejběžnější nulová alela u Kavkazanů je *CYP2D6\*4*, kterou nese 20 – 25 % populace. Na druhou stranu se u CYP2D6 také objevují duplicitní alely. Jedna z prvních objevených byla funkční *CYP2D6\*2*. Duplicitní alely jsou také u *CYP2D6\*1*, *\*4*, *\*6*, *\*10*, *\*17*, *\*29*, *\*35*, *\*41*, *\*43* a *\*45*, ale bohužel ne všechny alely vytváří funkční geny, což znesnadňuje predikci fenotypu. Dnes je známo více než 80 alel enzymu CYP2D6 [21,22, <http://www.cypalleles.ki.se/>].

### 3.3.2.8 Porovnání potkaní podrodiny CYP2D s lidskou

Podrodina CYP2D obsahuje šest proteinů, CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5 a 2D18, které jsou exprimovány v různých tkáních v závislosti na dané formě. Tyto potkaní proteiny jsou si mezi sebou i s lidským CYP2D6 sekvenčně velmi blízké (více než 70% podobnost). Mezi potkaními enzymy, v případě CYP2D5 a 2D18 se jedná o více než 95% podobnost v sekvenci aminokyselin k CYP2D1 a CYP2D4 (ve stejném pořadí). Potkaní CYP2D1 je orthologní k lidskému CYP2D6 (82% podobnost). Navzdory podobnostem těchto enzymů je zřejmý rozdíl v inhibici. Příkladem je látka chinidin, která má inhibiční účinek na CYP2D u lidí, ovšem ne u potkanů. Zatímco chinin inhibuje potkaní podrodinu CYP2D, u lidí tento efekt nemá. Co se týče indukce, podrodina CYP2D, podobně jako u lidí, tuto vlastnost nevykazuje [22,32]. U potkaních enzymů CYP2D lze stanovit aktivitu pomocí 1'-hydroxylace bufuralolu (reakce je katalyzována všemi enzymy potkaní podrodiny CYP2D) a 1',2'-ethenylace bufuralolu (reakce je katalyzována pouze CYP2D4) [68]. Další reakce 7-hydroxylace propranolu a 4-hydroxylace debrisochinu jsou specifické pro CYP2D2, zatímco p-hydroxylace diazepamu je specifická reakce pro CYP2D3 [32].



### 3.3.2.9 Podrodina CYP2E u člověka

V podrodině CYP2E je u savců znám pouze jediný enzym, a to CYP2E1. Hladiny tohoto enzymu jsou nacházeny především v játrech. U nenarozeného dítěte je exprese proteinu CYP2E1 sice nedetekovatelná, ale po narození (již po pár hodinách po porodu) se exprese proteinu zvyšuje. Enzym CYP2E1 je také v nízkých koncentracích přítomen v mozku, nosní sliznici, kůře ledvin, varlatech, vaječnicích a v gastrointestinálním traktu. Významné hladiny jsou nacházeny rovněž v tkáních kardiovaskulárního systému. Tento enzym je známý především proto, že se podílí na metabolismu ethanolu a acetonu. Obě tyto látky, ale i patologické stavy (jako je diabetes mellitus nebo hladovění), indukují expresi cytochromu P450 2E1. Enzym CYP2E1 se mimo jiné účastní metabolismu řady látek, z nichž nejvýznamnější je paracetamol. Jedná se o analgetikum a antipyretikum, které se metabolizuje přes CYP2E1 na hepatotoxický metabolit N-acetylbenzochinonimin. Při překročení dávek paracetamolu anebo současného podání paracetamolu a induktoru CYP2E1 (např. ethanolu) může dojít k závažnému poškození jater. K projevům hepatotoxicity může dojít i v případě, kdy se enzym CYP2E1 vyrovnává s vysokými dávkami ketonů a mastných kyselin u diabetických nebo obézních pacientů. Enzym CYP2E1 je také účinný generátor reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxidový anion-radikál či peroxid vodíku, a tyto formy mají také podíl na poškození buněk. To jsou důvody, proč bývá chronická indukce CYP2E1 spojována s rizikem vzniku onemocnění (jako je např. rakovina) [69].

Substráty CYP2E1 jsou relativně malé, neutrální a relativně hydrofilní molekuly. Mezi reakce, kterých se účastní CYP2E1, lze zařadit N1- a N7-demethylaci kofeinu na teobromin a teofylin. Kromě ethanolu, acetonu, paracetamolu a kofeinu jsou tímto enzymem metabolizovány např. halogenované uhlovodíky, fenacetin anebo chlorzoxazon, který se také používá jako selektivní marker aktivity *in vitro* a *in vivo*. Je však třeba mít na paměti, že 6-hydroxylace chlorzoxazonu může být katalyzována i CYP1A1. Ke stanovení fenotypu *in vitro* lze také použít hydroxylaci 4-nitrofenolu. Expresi CYP2E1 ovlivňují HNF1 $\alpha$  a  $\beta$ -catenin, ovšem regulace exprese proteinu CYP2E1 je velmi složitá, zahrnuje transkripční, post-transkripční, translační a post-translační mechanismy [22]. Aktivitu enzymu CYP2E1 může však ovlivnit i strava, např. diallylsulfid, který je obsažen v česneku a cibuli. Tato látka snižuje aktivitu tohoto enzymu a podobný účinek mají i některé látky obsažené v košťálové zelenině [11]. Co se týče genového polymorfizmu, bylo publikováno pouze několik variant s malým nebo žádným dopadem na funkci enzymu CYP2E1 [4,21].

### **3.3.2.10 Porovnání potkaní podrodiny CYP2E s lidskou**

V potkaní podrodině CYP2E je, podobně jako u lidí, pouze jeden člen, CYP2E1. Podobnost primární struktury potkaního proteinu CYP2E1 s lidským je 80% a substrátová specifita je rovněž podobná. V tomto ohledu je potkan vhodným modelem pro studium enzymu CYP2E1 [22].

### **3.3.3 Lidská rodina CYP3**

Rodina CYP3 má u člověka pouze jednu podrodinu, CYP3A, a v ní 4 enzymy, CYP3A4, 3A5, 3A7 a 3A43. Enzymy CYP3A4 a 3A5 jsou nejvíce zastoupenými cytochromy P450 v lidských játrech i gastrointestinálním traktu, účastní se metabolismu jak steroidů, tak většiny léčiv. Z těchto důvodů jsou tyto enzymy nejvýznamnější z celé skupiny cytochromů P450 [20].

#### **3.3.3.1 Podrodina CYP3A u člověka**

Podrodina enzymů CYP3A hraje velmi důležitou roli v metabolismu xenobiotik. Má rozsáhlou substrátovou specifitu, je indukovatelná a může být také inhibována. CYP3A4 společně s CYP3A5 je nejrozšířenějším enzymem ze skupiny lidských jaterních enzymů CYP a podílí se na přeměně většiny léčiv. Podobnost v sekvenci aminokyselin CYP3A4 a CYP3A5 je více než 85%. Jejich lokalizace není jen v játrech, ale také v extrahepatálních tkáních, zejména v gastrointestinálním traktu, kde často hrají hlavní roli v metabolismu prvního průchodu. Koncentrace proteinu a enzymová aktivita CYP3A se v tenkém střevě směrem k tlustému střevu postupně snižuje. I když je koncentrace střevních enzymů podrodiny CYP3A (počítány na mg mikrozomálního proteinu) nižší než koncentrace jaterních enzymů CYP3A (asi o 10 – 50 %), existují jedinci, kteří mají koncentraci střevních enzymů CYP3A shodnou s koncentrací jaterních CYP3A, nebo dokonce i vyšší [22]. CYP3A7 je exprimován především v játrech plodu a v endometriu dělohy, kde tvoří 50 % obsahu enzymů CYP. Po narození se však obsah CYP3A7 mění ve prospěch CYP3A4. Fyziologická funkce CYP3A7 však není dosud známá. Stejně tak není známá funkce CYP3A43 [20,21].

Protein CYP3A4 má poměrně objemné a flexibilní aktivní místo, což je příčinou jeho schopnosti vázat substráty proměnné velikosti [65]. Ukazuje se, že by se substráty mohly vázat až na 3 vazebná místa tohoto enzymu, pokud během navázání nedojde k ovlivnění struktury enzymu [17]. Takovou látkou, která neovlivňuje strukturu enzymu, může být např. metyrapon [65]. Více vazebných míst a jejich flexibilita jsou důvody, proč tento enzym metabolizuje tolik léčiv a proč se u něj vyskytuje široká substrátová specifická [17].

Regulace CYP3A je zprostředkována různými signálními cestami (např. za účasti HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , PXR, CAR, FXR, LXR, glukokortikoidního receptoru, receptoru pro vitamín D či PPAR $\alpha$ ). Molekulární podstatou indukce enzymu CYP3A je navázání ligandu na jaderný receptor PXR a následná aktivace transkripce genů *CYP3A*. Tuto transkripci mohou vyvolat malé molekuly, ale i receptor CAR. Naopak přes CAR může působit PXR, a regulovat tak *CYP2B* geny. Tyto křížové reakce mezi transkripčními faktory vytvářejí ochrannou vrstvu před škodlivými látkami z vnějšího prostředí (jako jsou rostlinné metabolity nebo léčiva se sklonem k lékovým interakcím) [20]. Ke stanovení aktivity CYP3A *in vitro* lze použít atorvastatin, midazolam nebo testosteron [70]. Ke stanovení aktivity CYP3A *in vivo* se používá 6 $\beta$ -hydroxylace kortizolu. Stanovení se provádí v moči, nicméně poměr hladin 6 $\beta$ -hydroxykortizolu a kortizolu se během dne mění, nejvyšší hladiny jsou mezi 17. a 21. hodinou. Je také možné stanovit koncentraci <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> v dechu pacienta po podání [C<sup>14</sup>-N-methyl]-erythromycinu anebo stanovit koncentraci midazolamu či nifedipinu v krevní plazmě po podání těchto látek. Jako vhodný marker stanovení aktivity CYP3A *in vivo* se zdá být i 4 $\beta$ -hydroxycholesterol [4,71,72,73,74].

Co se týče genového polymorfizmu, 2 – 9 % kavkazské populace vlastní funkční alelu *CYP3A4\*1B*. Pacienti, kteří nesou tuto alelu, mohou vyžadovat vyšší dávky léčiva, metabolizovaného přes CYP3A4 (např. cyklosporin A) [21,75]. Alela *CYP3A4\*22* je naopak spojena se sníženou aktivitou enzymu. Na aktivitu enzymu CYP3A4 má zřejmě také vliv polymorfismus PPAR $\alpha$ . CYP3A5 je polymorfní pouze u 5 až 10 % Kavkazanů, naopak u Afričanů a Afroameričanů se polymorfismus CYP3A5 ukazuje u více než 60 % populace. Běžně se vyskytující deficitní alela je *CYP3A5\*3*, u Afričanů pak ještě *CYP3A5\*6*. Funkční alela *CYP3A5\*1* se vyskytuje jen u malé části kavkazské populace. A co se týče proteinu CYP3A7, jeho zvýšenou expresí má na svědomí alela *CYP3A7\*1C* [21].

### 3.3.3.2 Porovnání potkaní podrodiny CYP3A s lidskou

Enzymy CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62 patří do potkaní podrodiny CYP3A. Analýzou genu *CYP3A1* bylo zjištěno, že enzym CYP3A23 je identický s CYP3A1. Podrodina CYP3A je u potkana rozdílná mezi pohlavími. CYP3A2 a CYP3A18 jsou specifické formy pro samčí pohlaví, zatímco CYP3A9 je převládající formou u samic. CYP3A62 je převládající formou v gastrointestinálním traktu a má podobný substrátový profil jako potkaní enzym CYP3A9 a lidský enzym CYP3A4. Naopak CYP3A1 a CYP3A2 byly detekovány jen v játrech. V obou tkáních, jaterní i střevní, se nacházejí CYP3A9 a CYP3A18. Hlavní potkaní jaterní CYP3A forma, CYP3A1, není indukovatelná rifampicinem, což je typický lidský induktor CYP3A4. Z toho důvodu není potkan vhodným modelem pro studium indukce CYP3A4. Dokonce některá léčiva, která jsou metabolizována lidským CYP3A4 (např. nifedipin), nejsou substráty potkaního enzymu CYP3A1 [22].

## 3.4 Střevní mikroflóra lidského organismu

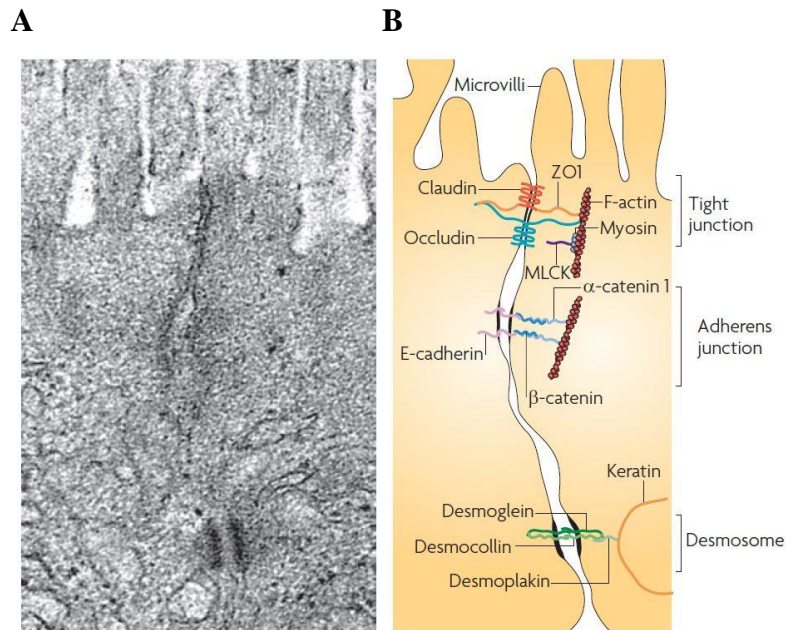
Kromě cizorodých látek je organismus také atakován mikroorganismy, přičemž samotný organismus je hostitelem obrovského množství mikroorganismů. Toto množství představuje 1 – 3 % tělesné hmotnosti. Mikroorganismy osidlují ústa, nos, genitálie, trávicí trakt a povrch celého těla [2]. Kůže sice pokrývá velkou plochu hostitele (přibližně 2 m<sup>2</sup>) [76], nicméně mukózní povrch trávicího traktu je díky výběžkům, tzv. klkům, větší než povrch kůže (činí 200 - 300 m<sup>2</sup>), a je tak významným místem pro osidlování bakterií [77,78]. Hmotnost střevních bakterií je propočítána na přibližně 1 kg [79]. Množství mikroorganismů se po celé délce trávicího traktu mění a tuto distribuci bakterií lze ukázat na třech hlavních částech trávicího traktu, a těmi jsou:

- (I) žaludek, který je osídlený 10<sup>1</sup> – 10<sup>3</sup> KTJ/ml obsahu, zahrnující kvasinky a rod *Lactobacillus* a *Streptococcus*,
- (II) tenké střevo (*jejunum* a *ileum*), které je osídlené 10<sup>4</sup> – 10<sup>8</sup> KTJ/ml obsahu, zahrnující např. rod *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Escherichia coli*, *Fusobacteria*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*,
- (III) tlusté střevo, které obsahuje nejrozsáhlejší mikrobiální populaci z celého těla, obsahuje 10<sup>10</sup> - 10<sup>12</sup> KTJ/ml obsahu [80].

Jak je vidět, nejvíce bakterií se nachází v tlustém střevě. Je to dáno tím, že peristaltika tlustého střeva je na rozdíl od žaludku pomalejší, je zde vyšší pH a nízký oxidačně-redukční potenciál. Na změny v počtu a typu bakterií, tedy na změny ve složení tzv. bakteriální flóry, mají po celé délce trávicího traktu vliv různé faktory, jako jsou:

- (I) faktory zprostředkované fyziologickými podmínkami hostitele (stáří, stres, zdravotní stav, etnické prostředí),
- (II) faktory zprostředkované trávicími podmínkami hostitele (pH prostředí, sekrece imunoglobulinů nebo žluče, peristaltika gastrointestinálního traktu, sekrece mucinu, redoxní potenciál),
- (III) faktory mikrobiální (schopnost bakterie přilnout ke střevní stěně, tzv. adheze, dále pohyb a tvar bakterie, schopnost bakterie kolonizovat)
- (IV) mikrobiální interakce (komunikace bakterie s okolím, tvorba metabolitů, přítomnost antimikrobiální složky, nutriční požadavky)
- (V) složení potravy (nestravitelné složky stravy, kontaminace patogeny, užívání léků) [77,80].

Střevní epitel je první vrstvou gastrointestinálního traktu, která je nepřetržitě ve styku s potravními antigeny, střevními komenzálními bakteriemi a potenciálními patogeny, které vstupují do organismu hostitele z přijímané potravy. Je tedy tzv. střevní bariérou, která chrání hostitele před vstupem nežádoucích látek a mikroorganismů do organismu. Tato střevní bariéra se skládá mimo jiné z resorpčních enterocytů, pohárkových buněk, které produkují hlen, a dále Panethových buněk, které produkují antimikrobiální peptidy [81]. Je utěsněna tzv. apikálním spojovacím komplexem (znázorněn na Obr. 5.), který se skládá z těsného a adhezního spoje. Tyto spoje jsou zajišťovány transmembránovými proteiny (jako jsou např. kladiny, okludiny), dále periferními membránovými proteiny (např. ZO1) a regulačními molekulami. Tyto spoje tak propojují buňky střevního epitelu, utěsňují paracelulární prostor, umožňují mezibuněčnou komunikaci a transepiteliální transport iontů a látek, které nejsou schopny přes membránu projít prostou difuzí [82]. Střevní bariéra je zároveň chráněna hlenovitou vrstvou, která je tvořena „nataženými“ silně glykosylovanými glykoproteiny, tzv. muciny, dlouhými 40 - 70 nm. Muciny mohou být uvolňovány pohárkovými buňkami (jak již bylo zmíněno výše) anebo např. žaludečními foveolárními mukózní buňkami. Je důležité, aby tato mukózní vrstva byla hydratovaná, neboť v případě velké viskozity může přispět ke střevnímu onemocnění [79]. Co se týče Panethových buněk, jejich umístění je na dně Lieberkühnových žlázek po celé délce tenkého střeva, přičemž jejich největší počet se nachází



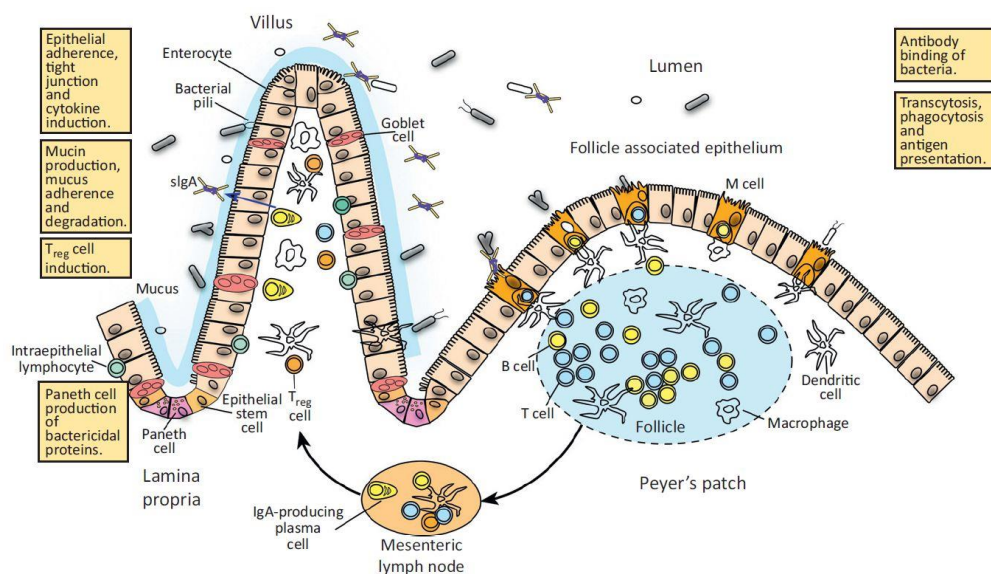
**Obrázek 5.** Snímek z elektronové mikroskopie (A) a odpovídající schéma spojovacího komplexu v buňce střevního epitelu (B).

Pod mikroklyky se nachází buňky plazmatické membrány, které k sobě přiléhají těsným a adhezním spojením, v nichž interagují transmembránové proteiny kladiny, okcludiny a E-kadherin, dále periferní membránový protein ZO1, F-aktin a funkční proteiny  $\alpha$ -catenin 1 a  $\beta$ -catenin. Spojení buněk také zajišťují desmozomy, tedy buněčné spoje, které se nachází pod apikálním spojovacím komplexem. Toto spojení je zajištěno interakcemi mezi kadheriny desmogleinem či desmokolinem, připevňujícími proteiny (např. desmoplakinem) a keratinovými vlákny [82,83].

Adherens junction, adhezní spoj; claudin, transmembránový protein patřící do rodiny kladinů; desmocollin, transmembránový protein desmokolin; desmoglein, transmembránový protein desmoglein; desmoplakin, protein desmoplakin, který souží jako kotva; desmozome, buněčný spoj desmozom; E-cadherin, transmembránový protein E-kadherin; F-actin, globulární strukturální protein F-aktin, důležitý pro tvorbu cytoskeletálních proteinových vláken; microvilli, mikroklyky, tenké a dlouhé výběžky cytoplazmy, které zajišťují dostatečně velký povrch pro absorpci a sekreci látek v tenkém střevě; MLCK, kináza lehkých řetězců myosinu, významná při kontrakci hladkého svalu; myosin, označení pro skupinu proteinů řazených mezi tzv. molekulární motory, které se podílí na svalovém stahu, aktivním vnitrobuněčném transportu váčků a pohybu membrán; occludin, transmembránový protein patřící do rodiny okcludinů; tight junction, těsný spoj; ZO1, periferní membránový protein těsného spoje.

v ileu [81]. Kromě tenkého střeva mohou být Panethovy buňky detekovány i v žaludku a tlustém střevě. Jejich hlavní úlohou je syntetizovat enzym lysozym, sekreční fosfolipázu A2 a antimikrobiální peptidy  $\alpha$ -defenziny, které mohou interagovat s bakteriemi, žijícími v lumen střeva. Panethovy buňky tak mohou významně přispět k ovlivnění střevní mikroflóry [84, 85]. Ovšem samotný střevní epitel není dostatečnou obranou před patogeny, které se snaží proniknout do organismu. Důležitou roli zde také hraje imunitní systém, který se snaží rozeznat patogenní bakterii od té nepatogenní (schematicky znázorněno na Obr. 6).

Významnou úlohu na sliznicích hraje imunoglobulin A sekrečního typu (sIgA). Jeho produkce je zprostředkována B-lymfocyty a plazmatickými buňkami v submukózních vrstvách. Hlavní funkcí sekrečního IgA je pomoci vyplavit antigeny a potenciální patogenní



**Obrázek 6.** Interakce komenzálních bakterií se střevním imunitním systémem.

Lumen tenkého střeva je od lamina propria odděleno vrstvou epitelu, která překrývá střevní klky a útvary obsahující nahromaděnou lymfatickou tkáň, tzv. Peyerovy pláty. Střevní epitel je pokryt mukózní vrstvou, která přispívá k obraně proti patogenům či antigenům. Proti škodlivým mikroorganismům bojují i Panethovy buňky, nacházející se na dně Lieberkühnových krypt. Jejich hlavní boj proti patogenům spočívá v tvorbě antimikrobiálních proteinů. Transport antigenů zajišťují M-buňky, což jsou specializované enterocyty, které endocytózou pohltí vzorky z prostředí a transportují je na opačnou stranu do Peyrova plátu. V subepiteliálních vrstvách jsou pak antigeny zpracovány buňkami prezentujícími antigen (např. dendritickými buňkami) a předloženy lymfocytům, nebo jsou přímo rozpoznány antigenně specifickými receptory lymfocytů B. Slizniční dendritické buňky mohou také vysílat své výběžky mezi epiteliální buňky až do lumen zaživacího traktu a aktivně vychytávat vzorky požitých antigenů. V případě komenzálních bakterií dochází k jejich přilnutí k apikální straně enterocytů přes specializované fimbrie (tedy vlasovité útvary na povrchu bakterie), nastává upevnění těsného mezibuněčného spoje a indukce cytokinů, tedy signálních proteinů účastnících se imunitní odpovědi. Do lumen střeva může být taktéž vyplavena dimerická protilátka imunoglobulin A sekrečního typu (sIgA), která se váže na antigeny a potenciálně patogenní mikroorganismy za účelem jejich odstranění z organismu hostitele [79,86].

Bacterial pilli, bakteriální vláčenka, tzv. fimbrie, potřebná k přichycení bakterie; B cell, B-lymfocyt; dendritic cell, dendritická buňka; enterocyte, střevní buňka; epithelial stem cell, střevní kmenová buňka; follicle, měchýřek; follicle associated epithelium, měchýřek spojený se střevním epitelem; goblet cell, pohárková buňka; IgA-producing plasma cell, plazmatická buňka produkující protilátku imunoglobulin A; intraepithelial lymphocyte, imunitní buňka lymfocyt uvnitř střevního epitelu; macrophage, imunitní buňka makrofág; mesenteric lymph node, mezenterická mízní uzlina; mucus, hlen; Paneth cell, Panethova buňka; Peyer's path, Peyerův plát; sIgA, protilátka imunoglobulin A sekrečního typu; T cell, T-lymfocyt; T<sub>reg</sub> cell, regulační T-lymfocyt; villus, střevní klk.

mikroorganismy z lumen střeva, a to především blokadí jejich přístupu k epiteliálním receptorům, jejich zachycením v mukózní vrstvě a jejich odstraněním za pomoci peristaltické a mukociliární aktivity. Tento proces se někdy nazývá imunitní exkluze. Důležité je, že sekreční IgA neaktivuje komplement, který by mohl poškozovat sliznici. Nicméně imunokomplexy obsahující IgA mohou být zachyceny např. dendritickými buňkami a vtaženy tak do sliznice. Tato aktivní reakce, zvaná někdy imunitní eliminace, může vést (na rozdíl od imunitní exkluze) k poškození tkání (např. u mikrobiálních střevních zánětů) [79,87]. Svou

roli ve střevním imunitním systému hrají také Peyerovy pláty, tedy útvary obsahující nahromaděnou lymfatickou tkáň. Jejich funkce spočívá v kooperaci M-buněk a lymfocytů [88]. Imunitní odpověď na antigen podaný na sliznici je závislá na povaze antigenu, ale také na genetickém pozadí jedince, které se podílí na skladbě mikroprostředí sliznic a druhu imunitní reakce. Střevní bariéru lze před veškerými negativními faktory ochránit, např. některými zdravými prospěšnými bakteriemi (tzv. probiotiky), které mohou posílit protektivní funkci střevní bariéry zvýšením produkce cytoprotektivních molekul.

Střevní mikroflóra hraje významnou roli v trávení potravy, produkci krátkých mastných kyselin a nepostradatelných vitamínů, ale je také důležitá ve vývoji střevního imunitního systému a v odolnosti vůči patogenním mikroorganismům [89,90]. Osídlení sliznic bakteriemi je tedy důležité již v počátcích života. Dynamika osidlování se liší podle způsobu porodu (císařský řez vs. fyziologický porod) a poporodních podmínek [79], ale také podle výživy, tedy zda je novorozenec krměn mateřským mlékem či nikoliv [91,92].

### 3.5 Probiotické mikroorganismy

Název probiotikum vzniklo z řeckého „pro bios“, což znamená „pro život“. Termín probiotikum byl poprvé použit ale až v roce 1965 autory Lilly a Stillwellem, kteří popisovali látky vylučované jedním mikroorganismem, a tyto látky stimulovaly růst dalších mikroorganismů. Jednalo se tedy o opačný jev než v případě použití antibiotik [93,94]. Bakteriemi a obecně imunitou se zabýval také Ilja Iljič Mečnikov, který získal v roce 1908 Nobelovu cenu za výzkum a poznání imunity. Tento ruský biolog předpokládal, že bakterie obsažené v jogurtu, které se účastní mléčného kvašení, potlačují ve střevech hnilobný typ kvašení. Ze svých předpokladů tedy vyvodil, že konzumace jogurtů s účinnými bakteriemi hraje roli v udržování si zdraví. Jeho teorie se osvědčila u bulharských rolníků, kteří konzumovali jogurt obsahující druh bakterií *Lactobacillus* [95].

Desítky let se mnoho vědců snažilo lépe porozumět prospěšným mikroorganismům, a z toho důvodu byla probiotika definována několikrát, vždy jinak. Dnes existuje pouze jedna definice, která je schválena Organizací pro výživu a zemědělství (FAO), Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Mezinárodní vědeckou společností pro probiotika a prebiotika. Tyto organizace definují probiotika jako živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele, pokud jsou aplikovány v adekvátním množství [1]. Mezi prospěšné účinky probiotik lze zařadit:



- (I) modifikaci střevní mikroflóry,
- (II) přilnavost ke střevní stěně se schopností zabránit tak přilnavosti patogenů nebo aktivaci patogenů,
- (III) modifikaci proteinů přijatých z potravy za pomoci střevní mikroflóry,
- (IV) modifikaci schopnosti bakteriálních enzymů, zvláště těch, které mají něco společného s indukcí nádorů,
- (V) ovlivnění střevní mukózní propustnosti [80].

Na základě těchto pozitivních efektů mají probiotika využití v prevenci a léčbě různých gastrointestinálních onemocnění (např. prevence urogenitálních onemocnění, zmírnění zácpy, prevence cestovatelského a postantibiotického průjmu, snížení hypercholesterolemie, prevence rakoviny tlustého střeva a močového měchýře, prevence osteoporózy a potravinových alergií [96,97]. Probiotické mikroorganismy jsou dostupné v potravních doplňcích (příklady jsou zobrazené na Obr. 7), ale vyskytují se i v potravinách, jako je mléko a mléčné produkty, kváskový chléb či masné výrobky. Obsah bakterií je v produktu původní anebo jsou tyto bakterie do produktu přidávány.

Minimálním množstvím probiotických bakterií za účelem získání cíleného efektu je zapotřebí, aby v 1 g produktu bylo  $10^6 - 10^7$  KTJ živých bakterií. Pokud 100 g fermentovaného mléčného produktu obsahuje v čase konzumace minimálně  $10^8$  KTJ živých bakterií, ještě neznamená, že se stejné množství živých bakterií dostane do tlustého střeva, že tam zůstane a bude mít pozitivní efekt [98].



**Obrázek 7.** Příklady probiotických potravních doplňků dostupných v České republice.

Na probiotické mikroorganismy jsou kladena bezpečnostní kritéria, díky nimž je u nich nutné stanovit:

- (I) Zařazení bakterie, to znamená, že musí být známo, o jaký rod, druh a kmen bakterie se jedná.
- (II) Míru bezpečnosti, to znamená, že musí být známo, zda je bakterie nepatogenní a netoxická a zda je původem lidská.

(III) Obecné vlastnosti bakterie, které se zjišťují na základě testů *in vitro*. Posuzuje se genetická stabilita, odolnost bakterie vůči kyselému prostředí, odolnost vůči žlučovým kyselinám, schopnost adheze k lidským epiteliálním buňkám a mukózní vrstvě, schopnost kolonizace, hemolytická aktivita, antimikrobiální aktivita proti potenciálně patogenním bakteriím, schopnost snížit adhezi patogenní bakterie k povrchům, schopnost štěpit soli žlučových kyselin, schopnost modulovat imunitní systém, životaschopnost ve zvýšeném počtu bakterií, odolnost vůči spermicidům (důležité zvláště u probiotik pro vaginální použití) a odolnost vůči antibiotikům. Bezpečnost by se měla také otestovat na zvířecích modelech a výsledky by měly korelovat s výsledky testů *in vitro*. V poslední řadě je nutné provést klinické hodnocení z důvodu zjištění případných vedlejších účinků [99].

Dalším důležitým bodem jsou technologické aspekty. Probiotický kmen by se měl adaptovat na vhodného přenašeče nebo substrát, který je schopný se fermentovat (např. mléko). Finální produkt by pak měl mít přijatelnou trvanlivost a přijatelné senzorycké vlastnosti (barva, chuť, aroma, struktura). V případě potravních doplňků jsou vhodné enterosolventní obaly, které chrání probiotický obsah před vlivem žaludeční kyseliny. Počet živých probiotických bakterií deklarovaných v produktu by měl setrvat i po datu spotřeby v dostatečném množství, přičemž bakterie by si měly udržet metabolickou aktivitu [80]. V produktu může být obsažen pouze jeden probiotický kmen anebo kombinace probiotických kmenů, přičemž kombinace více probiotických kmenů nemusí být vždy tou nejlepší volbou.

Vhodnou volbou může být kombinace probiotického kmene s prebiotikem, kdy se jedná o tzv. synbiotikum. Prebiotika jsou totiž nestravitelné složky potravy (fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, inulin), které selektivně stimulují růst a aktivitu jednoho nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě, a tím potenciálně zlepšují zdraví hostitele [100]. Účinek prebiotik spočívá v tom, že nejsou strávena a absorbována v tenkém střevě, a tudíž prochází trávicím traktem od místa podání až do tlustého střeva, kde jsou kompletně fermentována střevními bakteriemi. Produktem jsou pak mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou přeměněny na energii (účinky prebiotik v gastrointestinálním traktu jsou shrnuty v Tab. 4). Dostupná energie z nestravitelné cukerné složky je zhruba 2 kcal/g. Ovšem pokud je prebiotikum podáváno ve vysokých dávkách může u hostitele vyvolat průjem [101].

Po celém světě se používá mnoho probiotických kmenů, především kmeny rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Saccharomyces*. Nicméně v této práci bude detailněji popsán pouze rod *Lactobacillus*, konkrétně druh *Lactobacillus casei*, a dále pak kmen *Escherichia coli* Nissle 1917. *L. casei* byl vybrán na základě jeho častého využití v potravinářských výrobcích. *E. coli* Nissle 1917 byl zvolen na základě toho, že je tento kmen velice dobře prozkoumaný a jako jeden z mála je součástí probiotického přípravku, registrovaného v České republice (Mutaflor).

<p><b>Vlastnosti prebiotik v horní části gastrointestinálního traktu (žaludek, tenké střevo)</b></p>	<p>odolnost vůči trávení zpomalování vyprazdňování žaludku urychlení pohybu potravy v trávicím traktu snížení absorpce glukózy, snížení glykemického indexu hyperplazie epitelu tenkého střeva stimulace sekrece hormonálních peptidů v tenkém střevě</p>
<p><b>Vlastnosti prebiotik ve spodní části gastrointestinálního traktu (tlusté střevo)</b></p>	<p>jako potrava pro mikroorganismy v tlustém střevě jako substrát pro fermentaci v tlustém střevě tvorba konečných produktů fermentace (především SCFA) stimulace sacharidového štěpení okyselení obsahu tlustého střeva hyperplazie epitelu tlustého střeva stimulace sekrece hormonálních peptidů v tlustém střevě pozitivní vliv na velikost stolice regulace tvorby stolice (frekvence a konzistence) urychlení pohybu stolice ke konečníku</p>

**Tabulka 4.** Vlastnosti a vliv prebiotik na gastrointestinální trakt [99].  
SCFA, mastné kyseliny s krátkým řetězcem.

### 3.5.1 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou nejvíce užívanými ze všech probiotických bakterií [102]. Jedná se o širokou a heterogenní taxonomickou jednotku, obsahující více než 100 různých kmenů [99]. Z hlediska taxonomického zařazení patří tento rod (společně i s dalšími

rody, jako jsou *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*) do čeledi *Lactobacillaceae* [103].

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou rovné nebo mírně zakřivené grampozitivní tyčky nebo kokotyčky. Jsou chemoorganotrofní a nevytváří spóry ani flagely [97,104]. Vyznačují se striktně fermentativním typem metabolismu a v kultivačním prostředí vyžadují přítomnost cukrů, aminokyselin, peptidů, esterů mastných kyselin, solí, derivátů nukleových kyselin a vitamínů skupiny B. Ve vztahu ke kyslíku jsou laktobacily anaerobní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní. Produkují organické kyseliny, především kyselinu mléčnou (proto se jim také říká bakterie mléčného kvašení). Produkci těchto kyselin dochází ke snížení pH prostředí, ve kterém se nachází, a to je důležité pro ochranu sliznice před invazí jiných mikroorganismů. Kromě toho mohou laktobacily produkovat peroxid vodíku, který rovněž inhibuje jiné bakterie [105]. Některé laktobacily mohou ovlivnit střevní mikroflóru dalšími látkami, jako jsou např. bakteriociny, které mohou mít antibakteriální účinky [106].

Laktobacily se běžně vyskytují v mléce a mléčných produktech, masných výrobcích, pekařském droždí, siláži, kravském hnoji, v bachoru přežvýkavců či jako častá komenzální mikroflóra pochvy, trávicího traktu a dutiny ústní člověka a zvířat. Některé druhy laktobacilů se užívají ve formě čistých startovacích kultur k výrobě jogurtů, kefírů a zápar [107]. Významně se však také mohou projevovat při rozkládání potravin, zejména piva, vína, ovocných šťáv, mléčných a masných výrobků nebo marinovaných ryb, což se projeví zákalem a pachutí [108].

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus gallinarium</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>

**Tabulka 5.** Seznam taxonomických jednotek rodu *Lactobacillus* navržených pro status kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti [99].

Kromě prospěšných vlastností (jako je např. přilnavost k buňkám, kompetice s patogeny o epiteliální adhezi či odolnost vůči antibiotikům) se ukazuje, že by tyto bakterie mohly mít příznivý účinek na vůni masa z nevykastrovaných prasat. V takovém mase se totiž vyskytuje látka skatol (3-methylindol), která vytváří nepříjemný zápach. Ovšem při *in vitro* testech bylo zjištěno, že bakterie rodu *Lactobacillus* mají schopnost odstranit skatol z média [109]. Podobně některé bakterie tohoto rodu mohou mít schopnost vychytávat těžké kovy, čímž by se mohl např. vyřešit problém s bioakumulací těžkých kovů u ryb [110]. Teď už je jen otázkou budoucnosti, zda budou tyto bakterie využitelné i v těchto oblastech. V Tab. 5 je zobrazen seznam laktobacilů navržených pro status kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti.

### 3.5.1.1 *Lactobacillus casei*

Přesněji se jedná o druh *Lactobacillus casei*, protože zahrnuje několik kmenů (63 kmenů bylo testováno Huang et al. [111]). V takovém případě není snadné uvádět obecné účinky tohoto druhu, neboť ne každý bakteriální kmen stejného druhu má stejné účinky na zdraví hostitele. Může být alespoň zmíněno, že se jedná o bakterie mléčného kvašení, které se nachází v ústech a střevech lidského těla. Nicméně v gastrointestinálním traktu dlouho nepřežívají, proto by se dalo říci, že se jedná o alochtonní (tedy nepůvodní) bakterie [112]. Do těla hostitele se zřejmě dostávají z potravy (např. z mléka, jogurtu, sýrů, fermentovaných oliv či klobás). Tyto mikroorganismy jsou hodně využívány v potravinářském průmyslu, nicméně jako startovací kultura do mléčných produktů vhodné nejsou, protože v mléce rostou velmi pomalu. Kvůli riziku kontaminace je vhodnější použít jako starter jinou probiotickou bakterii. Z hlediska efektivity a ceny se zdá být vhodné užití zeleného čaje, který stimuloval růst kolonií *L. casei* [107,113,114]. Co se týče účinků bakterií *Lactobacillus casei*, tyto bakterie mohou mít příznivý vliv na průjem, dále snižují závažnost a zkracují dobu trvání průjmu. Mohou tak např. stimulovat imunitní systém střeva a zmírňovat příznaky Crohnovy nemoci [113]. Dále mohou např. snižovat mutagenitu v močovém měchýři [115] nebo inhibovat produkci



Obrázek 8. Bakterie *Lactobacillus casei*

protilátky IgE, která se podílí na alergických reakcích [116]. Prevence vzniku alergických reakcí je zejména důležitá v dětském věku.

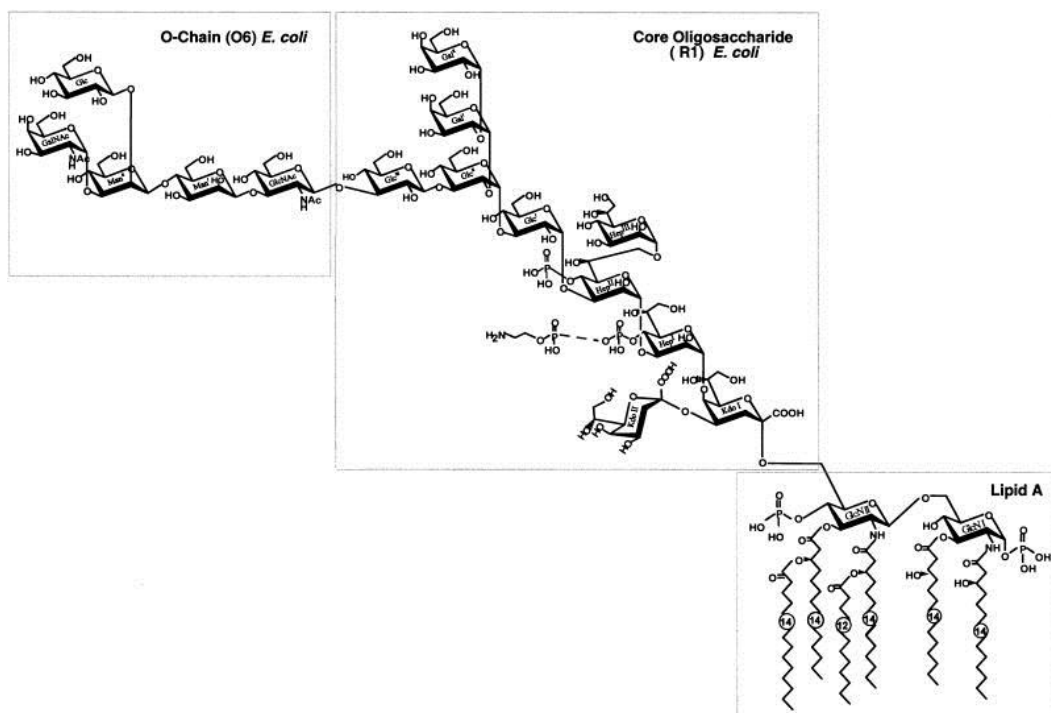
### 3.5.2 Kmen *Escherichia coli* Nissle 1917

Rod *Escherichia coli* zahrnuje gram-negativní, fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie, pohybující se pomocí bičků. Rod *Escherichia coli* zahrnuje patogenní kmeny, ale také nepatogenní a probiotické kmeny. Mezi ty probiotické patří kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN; sérotyp O6:K5:H1), který byl poprvé izolován ze stolice vojáka během první světové války. Izoloval jej německý lékař a bakteriolog Alfred Nissle, který zjistil, že tento kmen má antagonistický účinek na střevní patogeny [117]. Charakteristickou vlastností gram-negativních bakterií je, že obsahují lipopolysacharid (LPS) na vnější straně buněčné membrány. V případě LPS bakterií kmene EcN se jedná o klíčovou komponentu hrající roli v bezpečnosti těchto bakterií. Skládá se totiž z hydrofobní složky lipidu A, obsahujícího difosforylovaný hexaacylovaný disacharid, a tetradecasacharidu, obsahujícího pouze jednu opakující se jednotku, která udává sérologickou specifitu bakteriálního druhu,



Obrázek 9. Bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917

v tomto případě O6 [118, 119]. O-řetězec (O-chain, Obr. 10) se většinou skládá z několika opakujících se oligosacharidových jednotek, a to díky přítomnému funkčnímu genu *wzy*, který kóduje O6-antigen polymerázu. Bakterie kmene EcN mají gen *wzy* nefunkční, a tudíž mají na konci polysacharidového řetězce pouze jeden pentasacharid. Díky této skutečnosti jsou tyto bakterie citlivé k obranným mechanismům v krevním séru [119]. Sérologické označení K5 vyjadřuje, že bakterie EcN mohou vytvářet extracelulární kapsli (neboli obal bakterie), díky němuž mohou být bakterie odolné vůči obranným mechanismům v krevním séru. Ovšem bylo zjištěno, že v přítomnosti lidského séra jsou bakterie EcN obrannými mechanismy velice rychle usmrceny. Jedná se tedy o bezpečné netoxické bakterie. Sérotyp H1 vyjadřuje přítomnost bičků na povrchu bakterie. S jejich pomocí je bakterie velice pohyblivá, a to dokonce i ve viskózní mukózní vrstvě gastrointestinálního traktu [117]. Přítomnost bičků



**Obrázek 10.** Struktura lipopolysacharidu bakterie *E. coli* Nissle 1917, obsahující specifický O6-řetězec, oligosacharidové jádro (typ R1) a lipid A, který je spojený s vnější buněčnou membránou bakterie [119].

slouží ovšem také k adhezi bakterií k epiteliálním buňkám a hrají významnou roli v produkci antimikrobiálního peptidu  $\beta$ -defenzinu 2 (hBD-2), který působí proti střevním patogenům [120, 121]. Bakterie EcN vykazují na svém povrchu tři typy fimbrií (F1A, F1C a tzv. „curli“ fimbrie), které zajišťují adhezi ke střevním buňkám a umožňují tak schopnost buněk se kolonizovat. Za přežití a kolonizaci těchto bakterií mohou také různé způsoby příjmu železa, které je pro ně velmi důležité. Bakterie EcN totiž produkují široké spektrum sideroforů, tedy afinitních látek, které umožní přesun železa do bakterie aktivním transportním mechanismem.

Bakterie také tvoří tzv. mikrocin, které antagonisticky působí proti střevním patogenům. Kmen EcN byl zřejmě na základě působení mikrocinů objeven Alfredem Nissle (jak již bylo zmíněno výše). Kromě antimikrobiálních účinků mají tyto bakterie také protizánětlivé účinky (inhibice interleukinů IL-2, IL-5, IL-6, interferonu  $IFN\gamma$  a faktoru nádorové nekrózy  $TNF\alpha$ ) a protektivní, protože vytváří svými koloniemi a produkcí celulózy tzv. biofilm na střevní stěně hostitele. Bakterie EcN mohou tento biofilm tvořit při 37 °C na rozdíl od jiných kmenů *E. coli*, které jsou schopné tvořit biofilm při nižších teplotách ( $\leq 30^\circ C$ ) [117]. Protektivní účinek EcN spočívá také (kromě indukce produkce hBD-2) ve

zvýšené expresi periferního membránového proteinu těsného spoje ZO-2 [122, 123], čímž přispívá k obnově porušeného střevního epitelu.

Bakterie kmene *Escherichia coli* Nissle 1917 jsou svými vlastnostmi probiotické mikroorganismy, které jsou vhodné k prevenci a léčbě nejrůznějších nemocí. Jejich účinnost v léčbě onemocnění gastrointestinálního traktu byla prokázána již před desítkami let v klinických studiích, příkladem může být léčba ulcerózní a kolagenní kolitidy [124,125,126], Crohnovy choroby [127], pouchitidy [128], chronické zácpy [129] nebo profylaxe proti osídlení patogeny a zlepšení imunity novorozenců a předčasně narozených dětí [130,131,132].

V teoretické části této práce je ukázáno, jak mohou bakterie střevní mikroflóry ovlivňovat imunitní systém hostitele. Ovšem jejich působení není omezeno jen na imunomodulační nebo toxický účinek, samy mohou také metabolizovat cizorodé látky, podobně jako je to u enzymů metabolismu xenobiotik. Otázkou je, zda samy také neovlivňují expresi metabolizujících enzymů, což by pak mohlo mít dopad např. ve změně farmakokinetiky současně podaného léčiva. Složitost problematiky střevní mikroflóry může zpochybňovat význam užívání probiotik, protože v produktech nemusí být dostatečný počet bakterií, nemusí být vhodný kmen nebo kombinace kmenů pro dané použití, protože tyto kmeny se mezi sebou mohou lišit, a to i ty, které jsou stejného druhu. Mohou různě ve střevě adherovat (vázat se na specifické místo) a mohou mít různé specifické imunologické účinky [133].

Cílem práce bylo jednak studium exprese enzymů metabolismu xenobiotik v gastrointestinálním traktu včetně jater u potkana v přítomnosti i absenci probiotických bakterií a vliv těchto bakterií na farmakokinetiku modelového léčiva. Tato tematika je předmětem pěti příložených prací. Další kapitoly disertační práce proto sledují metody, výsledky a diskusní partie uvedených prací.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE

### 4.1 Seznam publikací, které jsou součástí této disertační práce

1. Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zídek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. *Neuroendocrinol Lett* 2009; 30(Suppl 1): 41-45. IF(2009): 1,047.
2. Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Šiller M, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats. *Neuroendocrinol Lett* 2010; 31(Suppl 2): 46-50. IF(2010): 1,621.
3. Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and the activity of cytochromes P450 and on the CYP mRNA level in the intestine and the liver of male rats. *Neuroendocrinol Lett* 2011; 32(Suppl 1): 8-14. IF(2011): 1,296.
4. Matušková Z, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalova-Hogenova H, Kolar M, Anzenbacher P. Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: effect of *E. coli* Nissle 1917 on amidarone absorption in rats. *PloS One* 2014; 9(2): e87150. IF(2013): 3,534
5. Matušková Z., Poruba M., Anzenbacher P. Cytochromy P450: Role v metabolismu cholesterolu. *Klin Farmakol Farm* 2014; 28(4): 142-146.

## 4.2 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

### 4.2.1 Chemikálie

Většina chemikálií byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich (Praha, česká republika). Nicméně, byly rovněž použity látky získané od jiných firem. Na celkovou anestezii pro experimentální zvířata byl použit fentanyl (Fentanyl Torrex inj., Chiesi CZ, Praha, Česká republika), dexmedetomidin (Dexdomitor inj., Orion, Espoo, Finsko) a diazepam (Apaurin inj., Krka, Novo Mesto, Slovinsko). Diklofenak, který byl použit ke stanovení farmakokinetiky u potkana, byl v tabletách od firmy Dr.R.Pfleger (Myogit 25, Bamberg, Německo). Inhibitory proteáz cOmplete byly získány od firmy Roche (Mannheim, Německo), inhibitor serinových proteáz fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) a dithioničitan sodný byly koupeny od firmy Fluka (Buchs SG, Švýcarsko), substrát Luciferin-ME EGE byl zakoupen od firmy Promega (Madison, Wisconsin, USA), glycerol, acetonitril a methanol byly získány od firmy Merck (Praha, Česká republika). Dichlormethan, dimethylsulfoxid, disodná sůl kyseliny diethyltetraaminoctové, ethanol, hydrogenfosforečnan disodný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný, chlorid sodný, chloroform, izopropylalkohol, kyselina chloristá, kyselina chlorovodíková, kyselina mravenčí, kyselina octová, n-butanol, sacharóza a síran hořečnatý byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Plynný oxid uhelnatý a plynný dusík dodala firma Linde Gas (Praha, Česká republika). Dále byly použity vývojka a ustalovač pro vyvolání fotografických filmů od firmy Kodak (Rochester, New York, USA), rentgenové filmy Medix XBU od firmy Foma (Hradec Králové, CZ), BCA protein kit na stanovení koncentrace proteinu od firmy Pierce (Rockford, Illinois, USA) a chemiluminiscenční činidlo Western Blotting Luminol Reagent kit od firmy Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Německo). Stabilizační roztok RNA later<sup>®</sup> a set na izolaci mRNA (RNeasy<sup>®</sup> Plus Minikit) byly od firmy Quiagen (Germantown, Maryland, USA). Další sety pro stanovení exprese mRNA v tkáních byly zakoupeny od firmy Roche (Mannheim, Německo). Potkaní primery byly designovány na našem pracovišti a syntetizovány firmou Invitrogen (Life Technologies, divize Praha, Česká republika). Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v jednotlivých publikacích (publikace 2 a 3). Co se týče protilátek, rabbit anti-rat CYP3A1, mouse anti-rat 2B1/2, 2C6 a CYP3A1 byly získány od firmy Abcam (Cambridge, Velká Británie). Dále byly použity protilátky goat anti-rat CYP1A1, rabbit anti-

rat CYP1A2 a CYP2E1 od firmy Daichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan) a rabbit anti-rat CY2C11 od firmy (Acris, Herford, Německo). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a., chemikálie používané pro systém HPLC byly čistoty HPLC gradient grade.

#### 4.2.2 Přístroje

V experimentech byly použity analytické váhy GR-202 (A&D Company Europe, Griesheim, Německo), laboratorní pH metr Schott CG 843 se skleněnou elektrodou (Schott AG, Mainz, Německo), homogenizátor DIAX 900 (Heidolph, Schwabach, Německo), centrifugy Minispin a 5804 R (Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika), chlazené centrifugy Z 323 K (Hermle laborotechnik, Wehingen, Německo) a Jouan BR4i (JOUAN, Unterhaching, Německo), ultracentrifuga Optima<sup>TM</sup> LE-80K s rotory 50.4 Ti a 70.0 Ti (Beckman Coulter, Pasadena, Kalifornie, USA), spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000 (Varian, Mulgrave, Victoria, Austrálie), TECAN Infinity absorbance/fluorescence/luminescence reader (Tecan Austria, Grödig, Rakousko), aparatury Miniprotean II a Mini Trans-Blot Cell se zdrojem Power Pac 200 (Bio-Rad, Praha, Česká republika), magnetická míchačka MR 1000 (Heidolph, Schwabach, Německo), Flow Box SCS – I (Merci, Brno, Česká republika), spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA), Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika), LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche, Mannheim, Německo), vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo), ultrazvuková vana (KRAINTEK CZECH, Hradec Králové, Česká republika) a systémy HPLC s UV a fluorescenční detekcí (Shimadzu LC-20A Prominence, Kyoto, Japonsko; Dionex, Sunnyvale, California, USA).

#### 4.2.3 Experimentální zvířata

Všechny experimenty byly provedeny *in vivo*. Jako modelové zvíře ke všem experimentům byly použity samice (v publikaci 1) nebo samci (v publikaci 2,3,4) potkana kmene Wistar z konvenčního chovu (Velaz, Únětice, Česká republika). Experimentální zvířata byla po dovozu přibližně 2 týdny aklimatizována a krmena standardní dietou *ad libitum*.

#### 4.2.4 Software

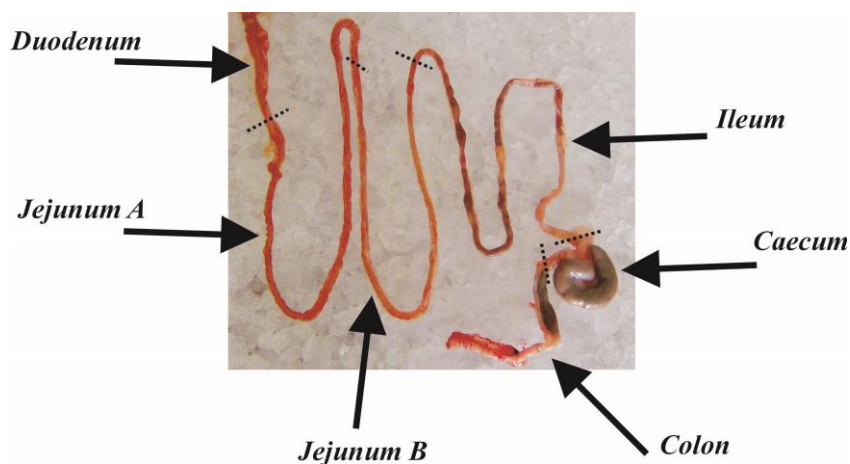
Všechny používané software byly v českém jazyce; MS Excel 2007 (Microsoft, Praha, Česká republika), Statistica (StatSoft ČR, Praha, Česká republika), Elfoman (Semecky Inc., Praha, Česká republika), LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, California, USA), Varian Cary WinUV (Varian, Mulgrave, Victoria, Austrálie), software pro použití přístroje TECAN Infinity (Tecan Austria, Grödig, Rakousko), LightCycler<sup>®</sup> 480 SW 1.5.1 (Roche, Mannheim, Německo).

### 4.3 Metody

#### 4.3.1 Odběr potkaních orgánů

Studované enzymy, cytochromy P450, se nacházejí především v játrech, ale také v dalších orgánech. Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá především vlivem probiotických mikroorganismů, jejichž působení je zejména v gastrointestinálním traktu, střevo bylo vybráno (stejně jako játra) jako vhodný orgán pro odběr za účelem studia enzymů metabolizující léčiva.

Orgány byly odebrány po usmrcení experimentálního zvířete, dle schválených etických postupů. Jaterní tkáň byla opláchnuta v „homogenizačním“ pufru (obsahující 0,25 M sacharózu, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0,2 mM PMSF, pH 7,4), střevní tkáň byla opláchnuta ve fyziologickém roztoku, obsahující tabletu směsi inhibitorů proteáz (cOmplete, Roche). Střevo bylo rozděleno na několik částí, protože zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 se po celé délce střeva mění. Celé střevo bylo rozděleno na dvanáctník (*duodenum*), 1. část lačnicku (proximální část, *jejunum A*), 2. část lačnicku (distální část, *jejunum B*), kyčelník (*ileum*), slepé střevo (*caecum*), tračník (část tlustého střeva, *colon*). Rozdělení je zobrazeno na Obr. 11. Po opláchnutí, vypláchnutí a osušení byly orgány zamrazeny a uschovány na -70°C.



**Obrázek 11.** Zobrazení rozdělení částí potkaního střeva ihned po jeho odběru.

#### 4.3.2 Izolace potkaních mikrozomů z jaterní a střevní tkáně

Mikrozomy jsou váčkovité útvary, které vznikají při dezintegraci endoplazmatického retikula *in vitro* (nejsou tedy běžně přítomny v živých buňkách). Tyto útvary obsahují mimo jiné enzymy cytochromy P450, proto bylo nezbytné mikrozomy izolovat za účelem stanovení exprese proteinu jednotlivých forem cytochromů P450 a stanovení jejich aktivit (viz publikace 1, 2, 3).

Orgány, z nichž byla mikrozomální frakce izolována, byly nejprve na ledu rozmrazeny, poté osušeny, zváženy a následně v „homogenizačním“ pufru (viz Odběr potkaních orgánů) rozstříhány a homogenizovány. Z homogenizované suspenze byla následnou frakční centrifugací za použití centrifugy Z 323 K (Hermle laborotechnik) a ultracentrifugy OptimaLE-80K (Beckman Coulter) získána mikrozomální frakce [134,135]. Tato frakce byla ovšem ještě čištěna „promývacím“ pufrům (obsahujícím 0,5 mM TRIS a 0,15 M KCl, pH 7,4) a opět ultracentrifugována (60 min při 125 000 g, při 4°C).

#### 4.3.3 Stanovení koncentrace proteinu a cytochromů P450 v potkaních mikrozomech

Před použitím mikrozomů pro jednotlivé metody (viz dále) je zapotřebí v mikrozomální frakci stanovit koncentraci celkového proteinu a koncentraci cytochromů P450. Celková koncentrace proteinu byla stanovena metodou, která využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) a roztoku síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4$ ). Protein, přítomný

v mikrozomální frakci, redukuje v zásaditém prostředí  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^{1+}$ . Následně vzniklé  $\text{Cu}^{1+}$  ionty se po vazbě s BCA detekují spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm [136]. K tomuto stanovení byl použit BCA Protein Assay kit (Pierce Company) a spektrofotometr TECAN Infinity reader (Tecan). Ke kvantifikaci byla provedena kalibrační křivka za použití hovězího sérového albuminu (jako standardu). Stanovení bylo provedeno třikrát.

Stanovení koncentrace cytochromů P450 se taktéž provádí spektrofotometricky. Po přidání dithioničitanu sodného k mikrozomální frakci dochází k redukcí hemového železa cytochromů P450. Pokud je následně mikrozomální suspenze probublána plynným oxidem uhelnatým, vznikají komplexy  $\text{Fe}^{2+}$ -CO, jejichž absorpční maximum je při vlnové délce 450 nm. Koncentrace cytochromů P450 se získá z diferenčního spektra redukovaných enzymů CYP a redukovaných enzymů CYP v komplexu s CO metodou podle Omury a Sata [8]. V této práci bylo stanovení koncentrace enzymů CYP provedeno pouze u mikrozomů získaných z jaterní tkáně. Výtěžek mikrozomální frakce z částí gastrointestinálního traktu byl nízký (přibližně 200  $\mu\text{l}$ ), z toho důvodu se toto stanovení u střevní mikrozomální frakce neprovádělo. Diferenční spektrum bylo získáno ze spektrofotometru Varian Cary UV VIS 4000 (Varian) a vypočítaná koncentrace byla použita pro další stanovení (viz dále). Množství enzymů CYP v mikrozomální frakci lze také vyjádřit jako specifický obsah, tj. poměr koncentrace enzymů CYP k celkové koncentraci proteinu.

#### **4.3.4 Stanovení aktivity vybraných forem potkaních jaterních cytochromů P450**

Ke stanovení aktivity cytochromů P450 byla použita mikrozomální frakce pouze z jater, nikoliv ze střev. Jak již bylo zmíněno výše, výtěžek mikrozomální frakce získaný z jednotlivých částí gastrointestinálního traktu byl totiž velmi nízký. Aktivity vybraných jaterních cytochromů P450 byly stanoveny již zavedenými enzymologickými metodami založenými na analogii lidských a potkaních forem enzymů CYP a jejich příslušných substrátů.

Princip stanovení spočívá v inkubaci reakčního systému při 37°C (obsahujícího mikrozomální frakci s enzymy CYP, dále NADPH nebo enzymový systém generující NADPH [137,138,139] a příslušný substrát) a detekci vzniklého metabolitu či metabolitů. Délka inkubace se liší podle enzymu CYP a příslušného substrátu. Po stanovené době inkubace se reakce zastaví, po zastavení reakce nastane vysrážení přítomných proteinů v reakční směsi. Po úpravě vzorku je pak provedena detekce metabolitu.

Ke stanovení aktivit vybraných enzymů CYP byly použity tyto substráty: 7-ethoxyresorufin (substrát lidského i potkaního CYP1A), kumarin (substrát lidského CYP2A6), 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (substrát lidského CYP2B6), diklofenak (substrát lidského CYP2C9), bufuralol nebo methylether-ethylenglykolether luciferinu (luciferin-ME EGE; substrát lidského CYP2D6 a potkaního CYP2D1), chlorzoxazon (substrát lidského i potkaního CYP2E1), testosteron (substrát lidského CYP3A4). Množství metabolitů bylo měřeno spektroskopicky na přístroji TECAN Infinity reader (Tecan) anebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, Shimadzu) s UV či fluorescenční detekcí. Stručné údaje o podmínkách inkubace a o detekci stanovované látky jsou shrnuty na následující straně v Tab. 6. Stanovení těchto aktivit je také stručně popsáno v publikacích 1 a 3. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického softwaru Statistica (StatSoft ČR). K vyhodnocení byla použita analýza rozptylu a Studentův t-test na hladině významnosti 0,05.

<b>Stanovení aktivity odpovídající lidskému enzymu CYP</b>	<b>CYP1A</b>	<b>CYP1A</b>	<b>CYP2A6</b>
<b>Sledovaná reakce</b>	<i>O</i> -dealkylace resorufinu	<i>O</i> -dealkylace resorufinu	7-hydroxylace kumarinu
<b>Potřebné množství enzymů CYP</b>	35 pmol	35 pmol	35 pmol
<b>Substrát</b>	2,5 μM 7-ethoxyresorufin	2,5 μM 7-ethoxyresorufin	10 μM kumarin
<b>Doba inkubace mikrozomální frakce se substrátem a NADPH při 37°C</b>	15 min	15 min	15 min
<b>Metoda stanovení</b>	fluorescenční detekce	HPLC s fluorescenční detekcí	fluorescenční detekce
<b>Metoda podle literatury</b>	[137]	[140]	[141]
<b>Stanovení aktivity odpovídající lidskému enzymu CYP</b>	<b>CYP2B6</b>	<b>CYP2C9</b>	<b>CYP2D6</b>
<b>Sledovaná reakce</b>	<i>O</i> -deethylace EFC	4'-hydroxylace diklofenaku	6'-dealkylace luciferin-ME EGE
<b>Potřebné množství enzymů CYP</b>	35 pmol	35 pmol	20 pmol
<b>Substrát</b>	60 μM EFC	16 μM diklofenak	30 μM luciferin-ME-EGE
<b>Doba inkubace mikrozomální frakce se substrátem a NADPH při 37°C</b>	15 min	25 min	30 min
<b>Metoda stanovení</b>	fluorescenční detekce	HPLC s UV detekcí	luminiscenční detekce
<b>Metoda podle literatury</b>	[142]	[138]	[143]



<b>Stanovení aktivity odpovídající lidskému enzymu CYP</b>	<b>CYP2D6</b>	<b>CYP2E1</b>	<b>CYP3A4</b>
<b>Sledovaná reakce</b>	1'-hydroxylace bufuralolu	6'-hydroxylace chlorzoxazonu	6β-hydroxylace testosteronu
<b>Potřebné množství enzymů CYP</b>	67,3 pmol	160 pmol	100 pmol
<b>Substrát</b>	25 μM bufuralol	2,5 μM chlorzoxazon	100 μM testosteron
<b>Doba inkubace mikrozomální frakce se substrátem a NADPH při 37°C</b>	20 min	20 min	20 min
<b>Metoda stanovení</b>	HPLC s fluorescenční detekcí	HPLC s UV detekcí	HPLC s UV detekcí
<b>Metoda podle literatury</b>	[139]	[144]	[145]

**Tabulka 6.** Podmínky inkubace a metody detekce metabolitu pro stanovení aktivity vybraných cytochromů P450 (CYP). EFC, 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin; luciferin-ME EGE, methylether-ethylenglykoether luciferinu.

### 4.3.5 Stanovení exprese jednotlivých forem CYP na úrovni proteinu

Stručný popis stanovení exprese CYP na úrovni proteinu je zmíněn v publikacích 1, 2 a 3. Tato část se tedy bude zabývat detailnějším popisem jednotlivých metod.

#### 4.3.5.1 Elektroforéza SDS-PAGE

Mikrozmální frakce izolovaná z jaterní nebo střevní tkáně jednotlivých experimentálních zvířat byla zředěna fosfátovým pufrům (100 mM roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) a smíchána v poměru 1:1 se „vzorkovacím“ pufrům, obsahující 62,5 mM Tris s upraveným pH na 6,8, 10% (v/v) glycerol, 4% (v/v) merkaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 10% bromfenolovou modř). Merkaptoethanol způsobil rozštěpení disulfidových můstků mezi proteinovými řetězci, a tím umožnil rozbalení proteinu. Naopak SDS poskytl všem proteinům záporný náboj, aby mohly všechny proteiny migrovat během elektroforézy stejným směrem. Bromfenolová modř sloužila k obarvení vzorku. Takto připravený vzorek byl ještě vložen do vodní lázně horké 95°C na 5 min, centrifugován 5 min při 600 x g, a poté byl aplikován na polyakrylamidový gel. Tento gel se skládal z dělicího (spodního) gelu, obsahujícího 8% (w/v) akrylamid, 0,375 M Tris s pH 8,8, 0,1% SDS (w/v), 0,05% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 0,05% (v/v) TEMED, a dále ze zaostřovacího (horního) gelu, obsahujícího 4% (w/v) akrylamid, 0,125 M Tris s pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 0,1% (v/v) TEMED. Na polyakrylamidový gel bylo aplikováno vždy 10  $\mu\text{g}$  proteinu u jaterních vzorků nebo 35  $\mu\text{g}$  proteinu u střevních vzorků. Gely s aplikovanými vzorky byly vloženy do aparatury Miniprotean II se zdrojem Power Pac 200 (Bio-Rad) a zality dělicím „running“ pufrům, obsahující 25 mM Tris, 192 mM glycin a 0,1% (w/v) SDS. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 120 V po dobu 5 minut, a poté za konstantního napětí 180 V po dobu 40 min.

#### 4.3.5.2 Western blot analýza (imunoblot)

Separované proteiny z elektroforézy byly přeneseny na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu pomocí aparatury Mini Trans-Blot Cell se zdrojem Power Pac 200 (Bio-Rad) a „přenosového“ pufru (obsahující 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol).

Přenesené proteiny byly na PVDF membráně zablokovány pomocí roztoku TBS s 0,05% roztokem TWEEN 20 a 6 % nízkotučného mléka. Poté byla membrána inkubována s primární protilátkou po dobu 60 min při laboratorní teplotě a za stálého míchání. Po 60 min byla membrána promyta roztokem TBS s 0,05% roztokem TWEEN 20, a poté byla inkubována se sekundární protilátkou (konjugovanou s křenovou peroxidázou) po dobu 60 min při laboratorní teplotě a za stálého míchání. Po 60 min byla membrána opět promyta roztokem TBS s 0,05% roztokem TWEEN 20. Detekce proteinů s navázanými protilátkami byla provedena pomocí chemiluminiscenčního činidla WB Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology). Jednotlivé protilátky, používané ke stanovení exprese proteinů jednotlivých forem CYP, jsou zmíněny v sekci Chemikálie a v jednotlivých publikacích (1, 2, 3).

#### **4.3.5.3 Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků**

Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software Elfoman (Semecky Inc.). Data byla vyhodnocena Studentovým t-testem na hladině významnosti 0,05. Statistická analýza dat byla provedena softwarem Statistica (StatSoft ČR).

#### **4.3.6 Stanovení exprese jednotlivých forem CYP na úrovni mRNA**

Expresa mRNA v potkaní jaterní a střevní tkáni byla stanovena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR). Odebrání jaterních a střevních vzorků bylo provedeno ihned po usmrcení experimentálních zvířat, dle schválených etických postupů. Vzorky byly vloženy do stabilizujícího roztoku RNA later<sup>®</sup> a uskladněny na -70°C. Izolace mRNA byla provedena podle postupů firmy Quiagen, ve kterých byly použity komerční sady od stejné firmy. Pro stanovení exprese mRNA jednotlivých forem enzymů CYP byly použity především nespecifické primery (LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green Master I mix) od firmy Roche, pro stanovení exprese CYP1A1, 2E1 a 3A9 mRNA byla použita TaqMan<sup>®</sup> sonda (Roche; [www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)), která je specifitější než primer SYBR Green. Použité primery byly navrženy na našem pracovišti a syntetizovány firmou Invitrogen (Life Technologies). Sekvence jednotlivých primerů a detailnější postup stanovení exprese mRNA jednotlivých forem CYP jsou uvedeny v publikacích 1 a 2.

Vzorky byly změřeny na přístroji LightCycler<sup>®</sup> 480 a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler<sup>®</sup> 480 SW 1.5.1, který je součástí přístroje. Data byly normalizovány k hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáze (HPRT) a analyzovány Studentovým t-testem na hladině významnosti 0,05 pomocí statistického softwaru Statistica (StatSoft ČR).

#### **4.3.7 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

##### **4.3.7.1 Stanovení koncentrace diklofenaku v potkaní krevní plazmě**

Diklofenak je látka, která patří do skupiny léčiv zvaných nesteroidní protizánětlivé léčivé přípravky a je indikována především ke zmírnění zánětu a bolesti pohybového aparátu. Protože tato látka patří mezi dostupné a často předepisované léky, byla zvolena jako modelové léčivo pro studium vlivu probiotických bakterií na farmakokinetiku léčiva.

Krevní plazma byla získána z krve experimentálních zvířat, dle schválených etických postupů, a byla uskladněna na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Rozmrazena byla opět až v den stanovení plazmatických hladin diklofenaku. Ke 100  $\mu\text{l}$  krevní plazmy bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  1M kyseliny fosforečné, která umožnila uvolnění diklofenaku z plazmatických proteinů. Po promíchání byly ke směsi přidány 2 ml dichlormethanu. Tato směs byla 15 s promíchávána a poté centrifugována při 1600 x g po dobu 5 min při  $4^{\circ}\text{C}$  pomocí centrifugy Jouan BR4i. Poté bylo odebráno 1,5 ml spodní vrstvy skleněnou pipetou a toto množství bylo odpařeno pod plynným dusíkem při  $40^{\circ}\text{C}$ . Odparek byl rozpuštěn ve 150  $\mu\text{l}$  50% methanolu. 50  $\mu\text{l}$  takto připraveného vzorku bylo nastříknuto do systému HPLC (Shimadzu). K separaci látek byla použita reverzní stacionární fáze C18, 250 x 4 mm i.d., s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  (LichroCart, Merck, Darmstadt, Germany) s předklonou od stejné firmy (C18, 4 x 4 mm i.d., velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ). Separace probíhala při  $30^{\circ}\text{C}$ . Dále byla použita mobilní fáze s obsahem 10mM  $\text{HClO}_4/\text{CH}_3\text{OH}/\text{ACN}$  (20/70/10) a průtokem 1 ml/min. Jednotlivé složky byly eluovány isokraticky. Separovaný diklofenak byl detekován průtokovým absorpčním spektrofotometrem při 280 nm. Plazmatické koncentrace diklofenaku byly vypočítány z kalibrační křivky.

#### 4.3.7.2 Stanovení koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu v potkaní krevní plazmě

Amiodaron (AMI) je látka, která byla vybrána jako další modelové léčivo pro studium vlivu probiotických bakterií na farmakokinetiku léčiva. AMI je antiarytmikum, které je indikováno k léčbě supraventrikulárních i komorových arytmií a metabolizuje se v těle na další látky pomocí enzymů CYP. Jeho velkou nevýhodou jsou závažné nežádoucí účinky [146]. Jeho hlavní metabolit je N-desethylamiodaron (DEA), který je taktéž účinný jako jeho parentní látka [147]. Obě látky, AMI i DEA, byly stanoveny v potkaní krevní plazmě pomocí HPLC (Dionex).

Krevní plazma byla získána z krve experimentálních zvířat, dle schválených etických postupů, a byla uskladněna na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Rozmražena byla opět až v den stanovení plazmatických hladin AMI a DEA. Ke 100  $\mu\text{l}$  krevní plazmy bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  0,02 mM trifluoperazinu dihydrochloridu, jako vnitřního standardu. Vzorek byl vysrážen přidáním 300  $\mu\text{l}$  acetonitrilu a tato směs byla centrifugována při 18 400 x g po dobu 5 min a při  $4^{\circ}\text{C}$ . Následně byl supernatant opatrně převeden do čisté skleněné zkumavky a odpařen pod plynným dusíkem při  $40^{\circ}\text{C}$ . Odparek byl poté rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  50% methanolu. 30  $\mu\text{l}$  takto připraveného vzorku bylo nastříknuto do systému HPLC. Příprava standardních roztoků a HPLC podmínky stanovení jsou detailně popsány v publikaci 4.

Vzhledem k tomu, že tato metoda nebyla na pracovišti zavedena, bylo nutné nejprve metodu zavést a provést validaci. Byla provedena kalibrační křivka s koncentracemi 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 a 1,6  $\mu\text{g/ml}$  amiodaronu a 0,02, 0,05, 0,07, 0,1, 0,2, 0,3 a 0,4  $\mu\text{g/ml}$  N-desethylamiodaronu v čisté potkaní krevní plazmě. Stanovení bylo provedeno osmkrát, aby mohla být vypočítána přesnost a správnost měření. Tato data byla získána z výsledků měřených v rámci jednoho dne, ale také mezi dny. Ke stanovení hodnoty výtěžku pro obě látky byly měřeny také kalibrační křivky se stejnými koncentracemi bez krevní plazmy a bez přípravy vzorku. Také byl u obou látek stanoven limit kvantifikace, tedy nejmenší možná odezva, která je desetkrát větší než šum (u odezvy detekovaných pod touto hranicí nemusí získaná hodnota odpovídat správné koncentraci).

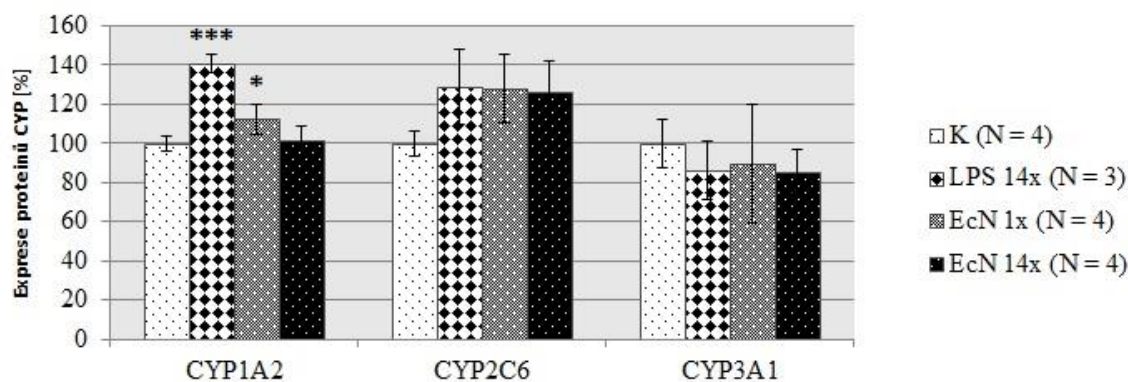
## 5. VÝSLEDKY

V této kapitole jsou uvedeny výsledky studií tak, jak logicky následovaly. Jsou zde proto uvedena data z nepublikovaných experimentů spolu s výsledky, které již byly publikovány.

Práce se zaměřuje především na studium vlivu probiotických bakterií na expresi proteinů CYP a aktivity CYP. Vzhledem k tomu, že největší množství enzymů CYP se nachází v játrech, první výsledky budou ukázány právě z tohoto orgánu.

V prvním experimentu byla použita bakteriální suspenze probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN), která byla podávána samicím potkana kmene Wistar v dávce  $10^{11}$  KTJ. Tato suspenze byla podávána experimentálním zvířatům orálně žaludeční sondou přímo do žaludku. Detailní postup experimentu byl následující: První skupině (kontrolní; N = 4) byl podáván žaludeční sondou pouze fyziologický roztok každý den po dobu 14 dní. Druhé skupině (N = 4) byla podávána probiotická suspenze každý den taktéž po dobu 14 dní. Třetí skupině (N = 4) byla podána pouze jedna dávka EcN, a to 14. den experimentu. Čtvrté skupině (N = 3) byl podáván lipopolysacharid probiotické bakterie EcN (LPS) v dávce 150  $\mu\text{g/ml}$  PBS. Tento lipopolysacharid byl experimentálním zvířatům podáván opět žaludeční sondou každý den po dobu 14 dní. Po 14 dnech byli všichni potkani usmrceni dle schválených etických postupů a následně jim byla odebrána jaterní tkáň. Z jaterní tkáně byly připraveny mikrozomy, které byly použity na stanovení exprese proteinů CYP a na stanovení jejich aktivity. Celý experiment je popsán v publikaci 1.

V jaterních mikrozomech byla stanoveny exprese proteinů CYP1A2, 2C6, 2C11, 2E1 a 3A1. Ze stanovení bylo zjištěno, že změny byly v expresi proteinů CYP1A2, 2C6, 2C11 a 3A1. Western bloty se změnami v expresi proteinů jsou zobrazeny v publikaci 1 (Fig. 2) a graficky znázorněny níže na Obr. 12. CYP2C11 se vyskytuje zejména u samců [4,148] a v tomto experimentu byly použity samice. Z toho důvodu jsou proužky nebo tzv. „bandy“ exprese proteinu CYP2C11 na western blotu slabé, a proto nebyl tedy CYP2C11 vybrán pro grafické znázornění výsledků, i když byla u tohoto proteinu detekována změna. Data jsou vyjádřena relativně vždy ke kontrolní skupině.

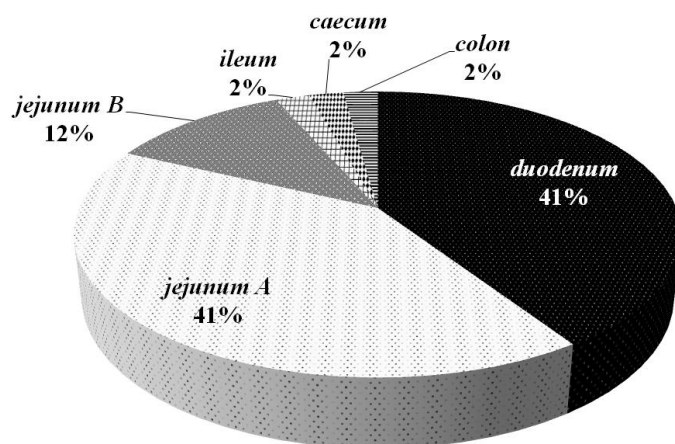


**Obr. 12.** Porovnání exprese potkaních jaterních proteinů CYP1A2, 2C6 a 3A1 bez nebo s aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN) nebo jen jeho lipopolysacharidu (LPS). Každá skupina byla porovnána jen s první, tedy kontrolní skupinou (K).

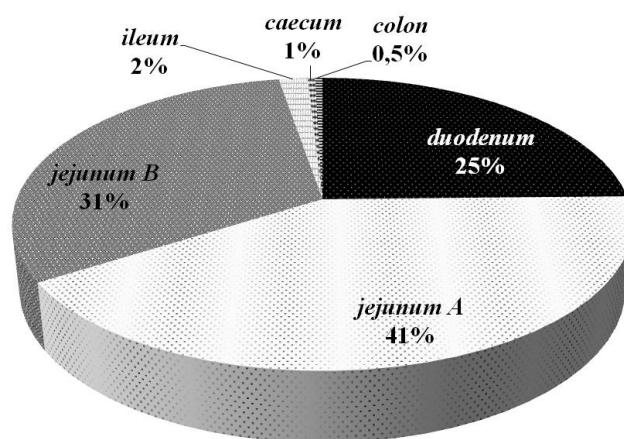
K, kontrolní skupina; LPS 14x, aplikace lipopolysacharidu kmene *E. coli* Nissle 1917 po dobu 14 dní; EcN 1x, aplikace probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 pouze 1 den; EcN 14x, aplikace probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 po dobu 14 dní; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$

V jaterních mikrozomech byly také změřeny aktivity, které odpovídají lidským CYP1A, 2A6, 2B6, 2C9, 2D6 a 3A4. Tyto aktivity byly vyjádřeny vždy relativně ke kontrolní skupině a jsou zobrazeny také v publikaci 1 (Fig. 3). Změny v aktivitách CYP (s použitím substrátů typických pro lidské formy) nebyly statisticky významné s výjimkou CYP2C, kdy trend ke zvýšení aktivity vlivem LPS i EcN byl zřejmý a u LPS dokonce signifikantní.

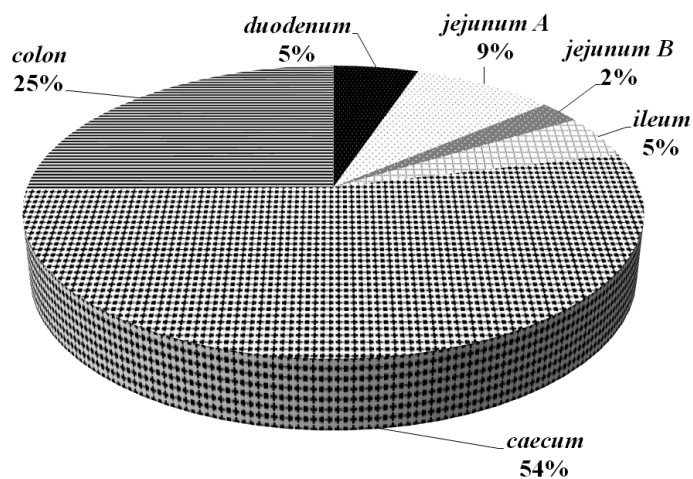
Vzhledem k tomu, že práce byla zaměřena především na studium interakce mikrobiomu s enzymy a s procesy v gastrointestinálním traktu, bylo v další etapě přikročeno ke studiu intestinálních enzymů CYP. V prvním kroku bylo třeba získat informace v zastoupení jednotlivých CYP. Toto bylo u jater zbytečné, protože výsledky studií o expresi různých forem jaterních CYP u potkanů jsou k dispozici v literatuře [22,135]. Je známo, že se obsah jednotlivých forem enzymů CYP mění po celé délce gastrointestinálního traktu [46]. Bylo tedy zapotřebí nejprve stanovit exprese vybraných forem CYP v jednotlivých částech střeva u zdravého, neléčeného samce potkana kmene Wistar z konvenčního chovu (Obr. 13-17), který byl našim experimentálním modelem. Ukázalo se, že např. forma CYP3A1 (orthologní lidské formě CYP3A4) se vyskytuje podél celého potkaního střeva.



Obrázek 13. Expres potkaniho proteinu CYP1A1 po celé délce střeva.

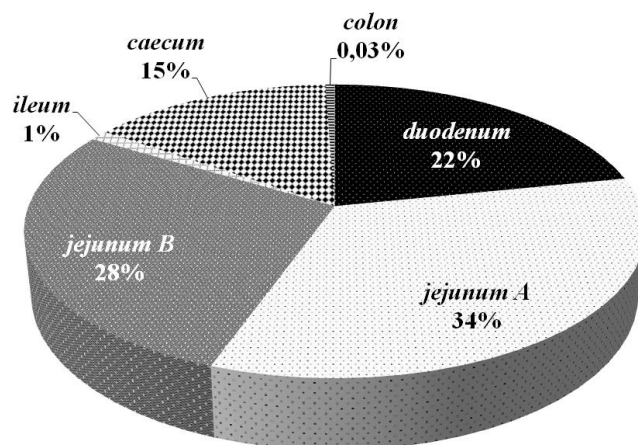


Obrázek 14. Expres potkaniho proteinu CYP2B1/2 po celé délce střeva.

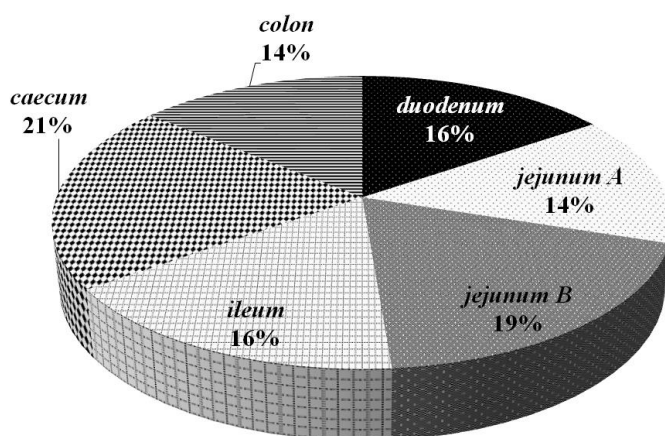


Obrázek 15. Expres potkaniho proteinu CYP2C6 po celé délce střeva.





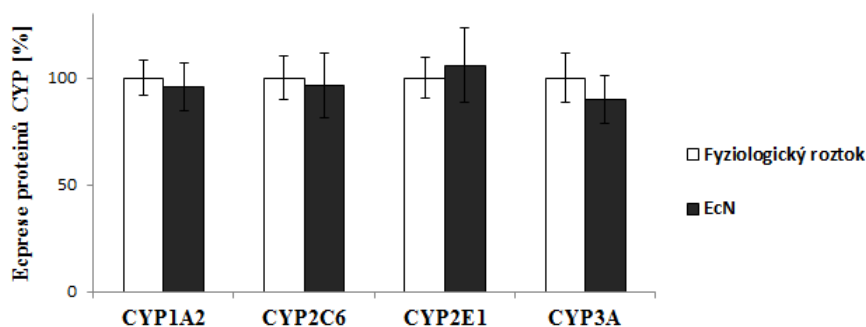
**Obrázek 16.** Expresie potkaního proteinu **CYP2E1** po celé délce střeva.



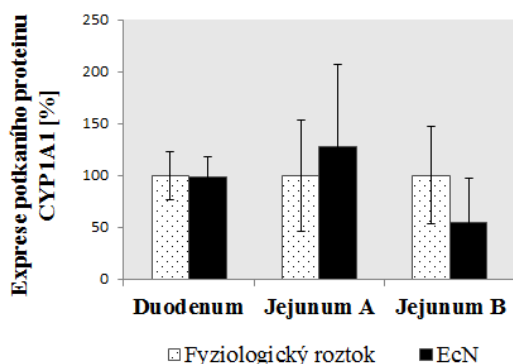
**Obrázek 17.** Expresie potkaního proteinu **CYP3A1** po celé délce střeva.

Třetím tématem práce, popsaným ve druhé publikaci, bylo zjištění vlivu probiotického kmene EcN na expresi potkaních střevních CYP jak na úrovni proteinu, tak i na úrovni mRNA. Suspenze probiotického kmene EcN byla podávána tentokrátě samcům potkana kmene Wistar (N = 6) v dávce  $10^{10}$  KTJ. Tato suspenze byla podávána experimentálním zvířatům orálně žaludeční sondou přímo do žaludku každý den po dobu sedmi dní. Kontrolní skupině (N = 4) byl podáván žaludeční sondou pouze fyziologický roztok. Osmý den byli všichni potkani usmrceni postupem schváleným etickou komisí a následně jim byla odebrána jaterní i střevní tkáň. Z obou tkání byly připraveny mikrozomy, které byly použity na stanovení exprese proteinů CYP. Celý experiment je popsán v publikaci 2.

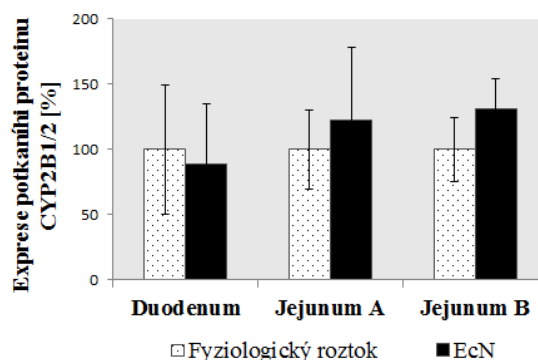
Nejprve byla stanovena exprese proteinu CYP1A2, 2C6, 2E1 a 3A1 v jaterních mikrozomech (Obr. 18). U jaterních vzorků nebyly zjištěny významné rozdíly. Poté byla stanovena exprese proteinu CYP1A1 (Obr. 19), 2B1/2 (Obr. 20), 2C6 (Obr. 21), 2E1 (Obr. 22) a 3A (Obr. 23) v mikrozomech získaných z jednotlivých částí střevního traktu. Stanovení bylo provedeno u všech potkanů.



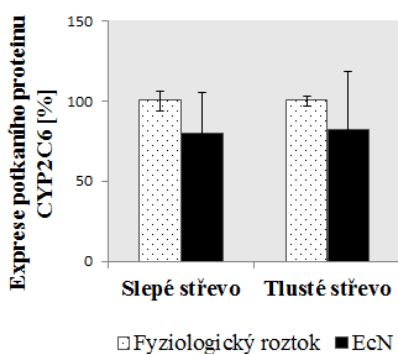
**Obrázek 18.** Porovnání exprese potkaních jaterních proteinů CYP1A2, 2C6, 2E1 a 3A bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN).



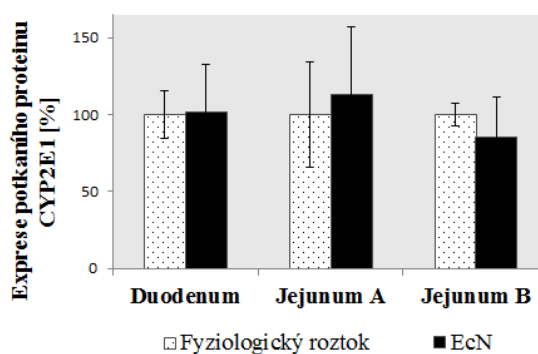
**Obrázek 19.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP1A1 v různých částech tenkého střeva bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN).



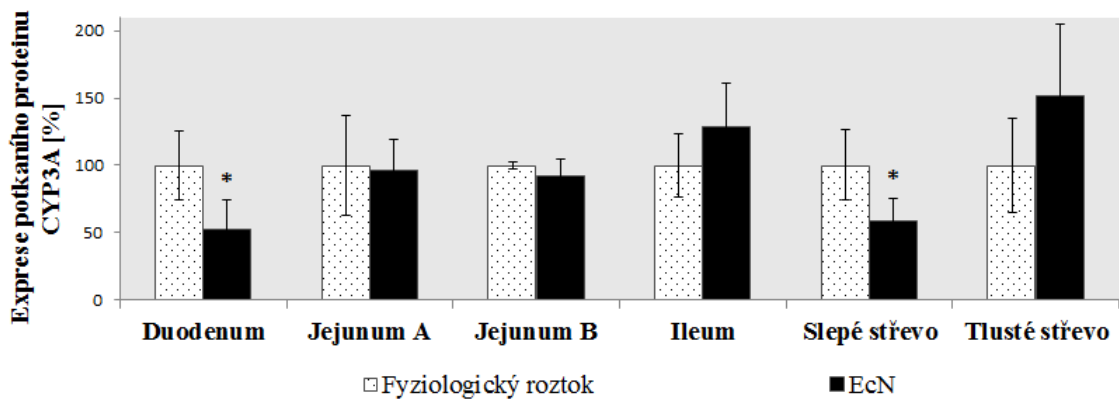
**Obrázek 20.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP1B1/2 v různých částech tenkého střeva bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN).



**Obrázek 21.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP2C6 ve slepém a tlustém (*colon*) střevě bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN).

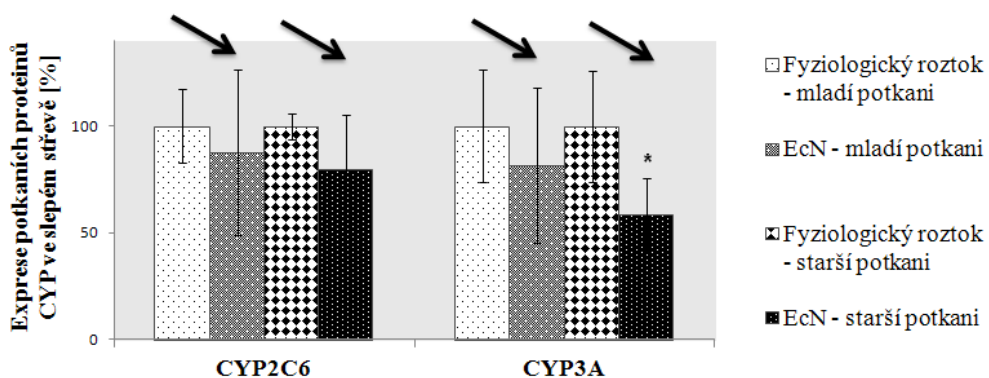


**Obrázek 22.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP2E1 v různých částech tenkého střeva bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN).

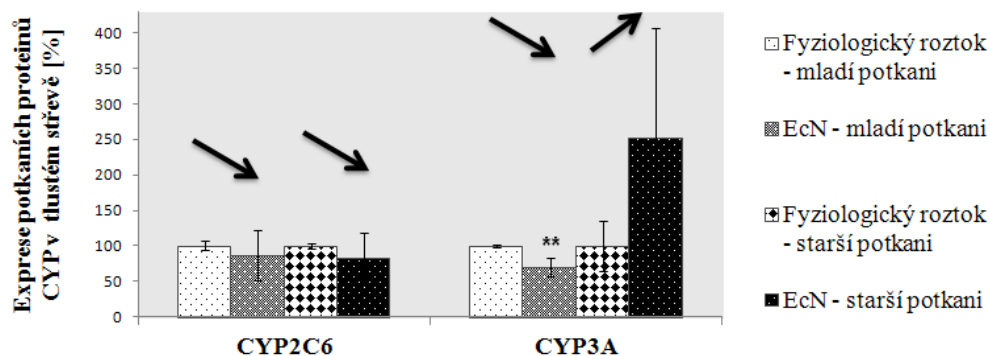


**Obrázek 23.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP3A po celé délce střevního traktu bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Tlusté střevo je myšleno *colon*.  
\*,  $p < 0,05$ .

V tomto experimentu byly použity starší potkani (s hmotností 400 – 580 g), proto byl pokus opakován s mladšími potkany (s hmotností přibližně 300 g). Na Obr. 24 a 25 jsou zobrazeny exprese proteinů CYP pouze v *caecu* a *colon*. Jedná se o exprese proteinu CYP2C6 a CYP3A. U proteinu CYP2C6 byl výsledek potvrzen, ovšem v případě proteinu CYP3A došlo v *colon* u starších potkanů k opačnému (ale nesignifikantnímu) trendu, tj. nárůstu exprese proteinu.



**Obrázek 24.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP2C6 a CYP3A u mladších a starších jedinců, bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Stanovení bylo provedeno ve slepém střevě (*caecum*). Šipky naznačují trend změny po aplikaci EcN v porovnání s kontrolní skupinou.  
\*,  $p < 0,05$ .

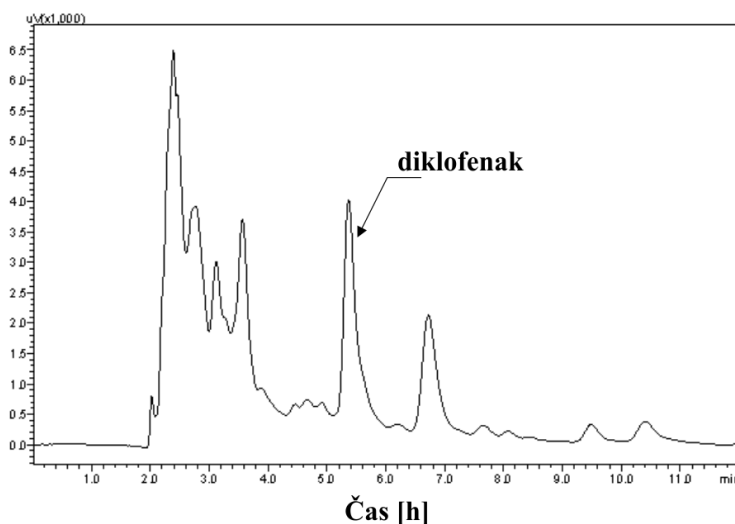


**Obrázek 25.** Porovnání exprese potkaního proteinu CYP2C6 a CYP3A u mladších a starších jedinců, bez (N = 4) a s (N = 6) aplikací probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Stanovení bylo provedeno v tlustém střevě (*colon*). Šipky naznačují trend změny po aplikaci EcN v porovnání s kontrolní skupinou. \*\*, p < 0,01.

Expresí proteinů CYP u starších potkanů byly rovněž porovnány s jejich expresí mRNA. Konkrétně se jedná o CYP2B1/2, 2C6, 2E1 a 3A1. Získaná data jsou zobrazena v publikaci 2 (Fig. 3-6). Na úrovni mRNA došlo u starších potkanů rovněž k nárůstu (signifikantnímu) exprese mRNA CYP3A1 v tlustém střevě.

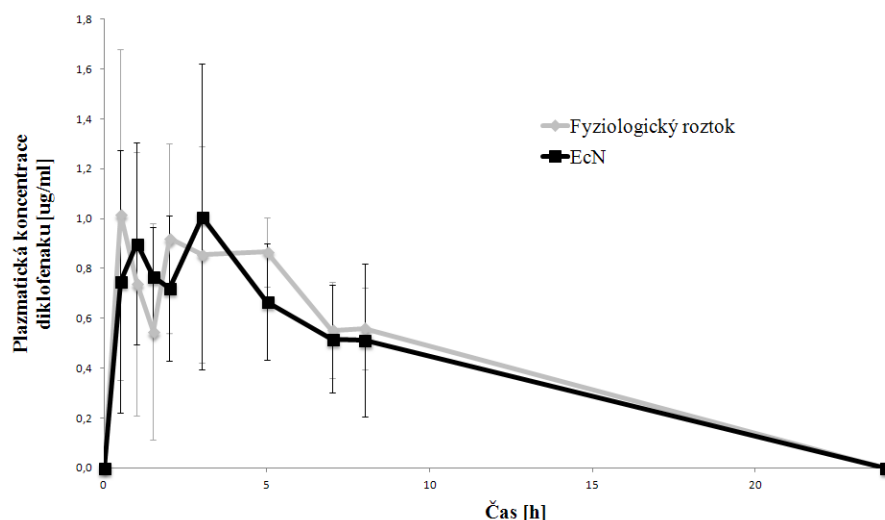
Třetí publikace (tedy čtvrté téma práce) popisuje experiment, který má podobný design jako je v publikaci 2. Místo probiotického kmene EcN byl zde použit jiný, a to *Lactobacillus casei*. Bakteriální suspenze tohoto kmene byla podávána samcům potkana kmene Wistar (N = 6) v dávce  $10^{10}$  KJT každý den po dobu sedmi dní. Kontrolní skupině (N = 6) byl podáván každý den fyziologický roztok. Opět zde byla použita žaludeční sonda, která umožnila vpravit bakterie *L. casei* nebo fyziologický roztok až do žaludku zvířete. V tomto experimentu bylo provedeno stanovení aktivity jaterních enzymů CYP, které odpovídají lidským CYP1A, 2C9, 2D6, 2E1 a 3A4. Tyto aktivity byly vyjádřeny vždy relativně ke kontrolní skupině a jsou zobrazeny v publikaci 3 (Fig. 2). Dále byly stanoveny exprese jaterních proteinů CYP1A2, 2C6, 2C11, 2E1 a 3A1 a taktéž exprese mRNA CYP2C6, 2C11, 2E1 a 3A1. Výsledky jsou zobrazeny v publikaci 3 (Fig. 3). Stejně tak byly stanoveny exprese proteinu i mRNA v jednotlivých částech střeva pro CYP1A1, 2B1/2, 2C6, 2E1 a 3A (v případě stanovení proteinu byla použita protilátka proti CYP3A1, nicméně pro stanovení mRNA byla použita specifická sonda proti CYP3A9, protože bylo zjištěno, že v potkaních samčích střevech je větší koncentrace CYP3A9). Grafy s výsledky jsou opět zobrazeny v publikaci 3 (Fig. 4). Zde stojí za zmínku, že po aplikaci *L. casei* byl detekován trend ke snížení exprese proteinu i mRNA CYP1A1 po celé délce potkaního střeva.

Dalším (pátým) cílem této disertační práce bylo zjistit, zda mohou probiotické bakterie ovlivnit farmakokinetiku současně podaného léčiva. Jako první modelové léčivo byl (v nepublikované studii) vybrán diklofenak, a to z toho důvodu, že je v lékárnách běžně dostupný a patří mezi často předepisované léky. Samcům potkana kmene Wistar (N = 6) byla každý den podávána bakteriální suspenze kmene EcN v dávce  $7 \times 10^8$  KTJ po dobu sedmi dní. Kontrolní skupině (N = 4) byl do žaludku každý den podáván fyziologický roztok taktéž po dobu sedmi dní. Osmý den byla všem potkanům podána suspenze diklofenaku v jedné dávce 10 mg/kg potkana. Bakteriální kmen, fyziologický roztok i suspenze diklofenaku byla potkanům podána do žaludku žaludeční sondou. Všichni potkani byly uvedeni do celkové anestezie směsí fentanylu (40  $\mu$ l/kg), metedomidinu (200  $\mu$ l/kg) a diazepamem (5 mg/kg), podáním i.m. Po 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 a 8 hodinách bylo všem potkanům odebráno 300  $\mu$ l krve z *vena jugularis* do stříkačky s 20  $\mu$ l 0,2M EDTA- $\text{Na}_2$ . Po 8 hod. byli všichni potkani standardně usmrceni. Z odebrané krve byla získána krevní plazma, která byla uskladněna na  $-70^\circ\text{C}$ . Na Obr. 26 je zobrazen chromatogram vzorku s diklofenakem. Tento vzorek byl odebrán potkanovi po 3 hodinách od aplikace suspenze diklofenaku.



**Obrázek 26.** Chromatogram získaný z potkaní krevní plazmy. Vzorek byl odebrán po 3 hodinách od aplikace suspenze diklofenaku.

Po změření všech vzorků a dosazení získaných hodnot do grafu, kde je závislá proměnná koncentrace diklofenaku a nezávislá proměnná hodina odebrání vzorku, byla získána farmakokinetika léčiva. Průměrné hodnoty pro farmakokinetiku diklofenaku s a bez aplikace EcN jsou graficky zobrazeny na Obr. 27.



**Obrázek 27.** Porovnání farmakokinetik diklofenaku u potkana s (N = 6) a bez (kontrolní skupina; N = 4) aplikace probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka.

Byly také stanoveny farmakokinetické parametry, díky nimž lze lépe rozhodnout, zda na úrovni farmakokinetiky došlo ke změně či nikoliv. Přehledná tabulka (Tab. 7) s vypočítanými farmakokinetickými parametry je zobrazena níže, výsledky neukazují významné změny ve farmakokinetice diklofenaku.

Stanovovaná látka	Diklofenak	
	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (N = 6)	Fyziologický roztok (N = 4)
$t_{1/2}$ [h]	2,14 ± 1,94	2,94 ± 2,48
$c_{max}$ [µg/ml]	1,34 ± 0,48	1,14 ± 0,33
$t_{max}$ [h]	1,75 ± 1,03	1,75 ± 0,90
AUC <sub>0-24h</sub> [h*µg/ml]	14,51 ± 5,55	14,34 ± 3,53

**Tabulka 7.** Farmakokinetické parametry u potkana po orální aplikaci diklofenaku (v jedné dávce 10 mg/kg) s nebo bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *Escherichia coli* Nissle 1917.  $t_{1/2}$ , biologický poločas;  $c_{max}$ , maximální plazmatická koncentrace léčiva;  $t_{max}$ , čas při dosažení  $c_{max}$ ; AUC, plocha pod křivkou. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatná odchylka.

Jako další modelové léčivo byl vybrán amiodaron (AMI), a to z toho důvodu, že se jedná o látku, která může vyvolat závažné nežádoucí účinky a navíc inhibuje transportní protein P-glykoprotein, který se mimo jiné nachází ve střevě. Vzhledem k tomu, že hladiny amiodaronu v krevní plazmě nebyly dosud na našem pracovišti měřeny, bylo nutné metodu na

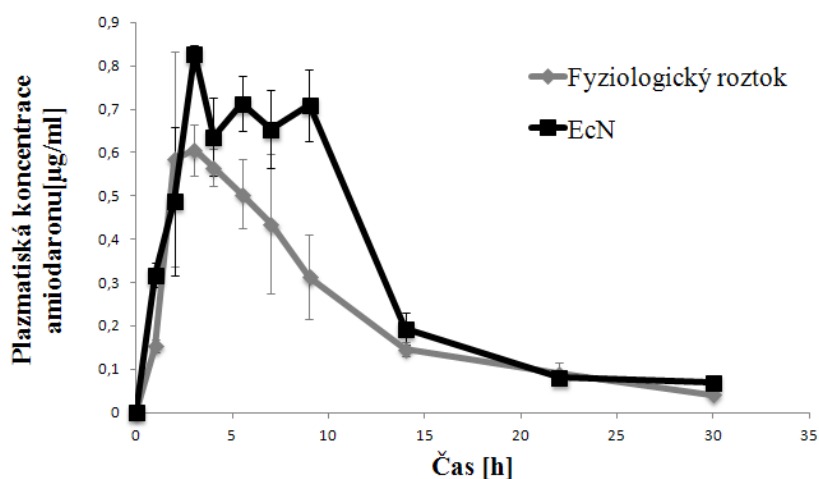
HPLC zavést a validovat ji. V Tab. 8 je přehled informací týkajících se validace metody, tedy linearita kalibrační křivky, přesnost a správnost metody a také limit kvantifikace.

Parametr	Amiodaron	N-desethylamiodaron
Rozmezí koncentrací kalibrační křivky (µg/ml)	0,1 – 1,6	0,02 – 0,4
Korelační koeficient linearity	r = 0,9961	r = 0,9990
Limit kvantifikace (µg/ml)	0,05 ± 0,008	0,018 ± 0,003
Výtěžnost (%)	75	85
Přesnost – v rámci jednoho dne (%)		
0,1 µg/ml	3,65	
0,4 µg/ml	8,36	
0,8 µg/ml	7,78	
0,05 µg/ml		2,85
0,1 µg/ml		3,84
0,4 µg/ml		6,85
Přesnost – v rámci dní (%)		
0,1 µg/ml	14,78	
0,4 µg/ml	9,91	
0,8 µg/ml	4,59	
0,05 µg/ml		8,51
0,1 µg/ml		1,47
0,4 µg/ml		12,01
Správnost – v rámci jednoho dne (%)		
0,1 µg/ml	89,09	
0,4 µg/ml	96,99	
0,8 µg/ml	100,10	
0,05 µg/ml		90,18
0,1 µg/ml		96,75
0,4 µg/ml		98,80
Správnost – v rámci dní (%)		
0,1 µg/ml	90,01	
0,4 µg/ml	96,90	
0,8 µg/ml	96,69	
0,05 µg/ml		107,59
0,1 µg/ml		96,65
0,4 µg/ml		111,28

**Tabulka 8.** Parametry validace metody na stanovení amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu v potkaní krevní plazmě.

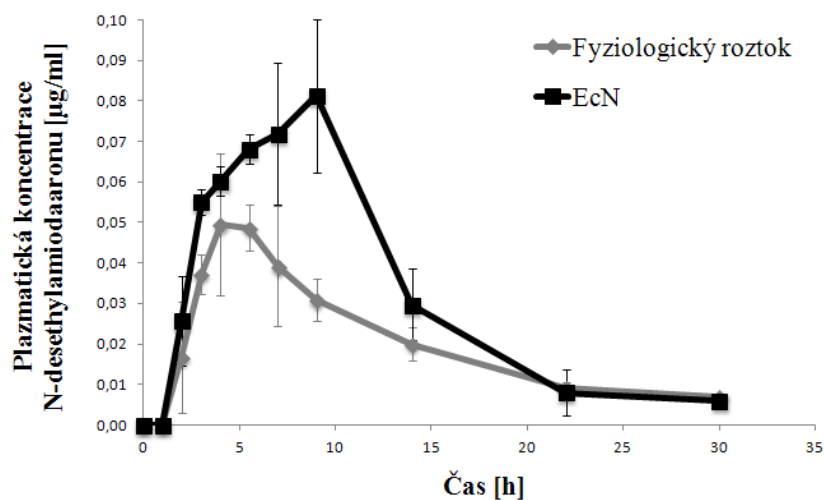
Farmakokinetika AMI byla stanovena celkem u 60 samců potkana kmene Wistar. Prvním 30 potkanům (kontrolní skupina) byl do žaludku aplikován fyziologický roztok a dalším 30 potkanům byla aplikována bakteriální suspenze EcN v dávce  $7 \times 10^8$  KTJ.

Bakteriální suspenze i fyziologický roztok byl potkanům podán žaludeční sondou přímo do žaludku jednou denně po dobu sedmi dní. Osmý den byla všem potkanům podána suspenze hydrochloridu amiodaronu (opět žaludeční sondou) v jedné dávce 50 mg/kg. Po 0, 1, 2, 3, 4, 5,5, 7, 9, 14, 22 a 30 hodinách byly potkani uvedeni do celkové anestezie směsí fentanylu (40 µl/kg), metedomidinu (200 µl/kg) a diazepamu (5 mg/kg), podání bylo i.m. Po daném intervalu jim byla odebrána krev z bifurkace aorty tak, že jeden bod farmakokinetiky odpovídá jedné trojici potkanů. Jako protisrážlivé činidlo byla použita 0,2M EDTA-Na<sub>2</sub> (57 µl/1 ml krve). Z krve byla získána krevní plazma, která byla použita ke stanovení AMI a DEA pomocí HPLC. Chromatografický profil AMI, jeho metabolitu N-desethylamiodaronu (DEA) a vnitřního standardu trifluoperazinu ve vzorku po 3 hod. od aplikace amiodaronu hydrochloridu je zobrazen v publikaci 4 (Fig. 1). Grafické znázornění jednotlivých farmakokinetik pro obě látky, AMI a DEA, a farmakokinetické parametry jsou taktéž zobrazeny v publikaci 4 (Fig. 2, Table S1). Vzhledem k tomu, že výsledky experimentu s EcN naznačují existenci významných rozdílů ve farmakokinetice v důsledku přítomnosti probiotika, byl tento experiment proveden ještě jednou, ovšem probiotický kmen EcN byl vyměněn za neprobiotický referenční kmen *E. coli* ATCC 25922 (v dávce  $7 \times 10^8$  KTJ). Grafické znázornění jednotlivých farmakokinetik pro AMI a DEA a farmakokinetické parametry jsou sice zobrazeny v publikaci 4 (Fig. 3, Table S2), nicméně jsou zobrazeny i v této práci na Obr. 28, 29, 30 a 31.

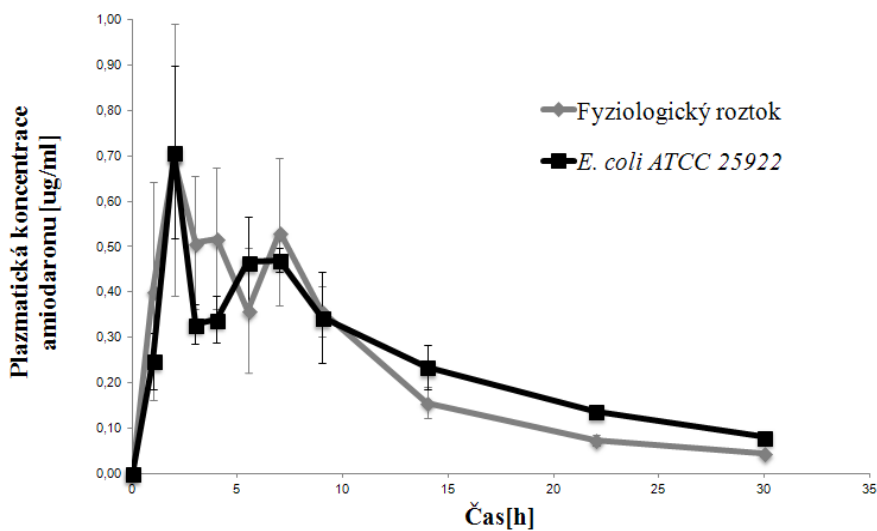


**Obrázek 28.** Porovnání farmakokinetik amiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.

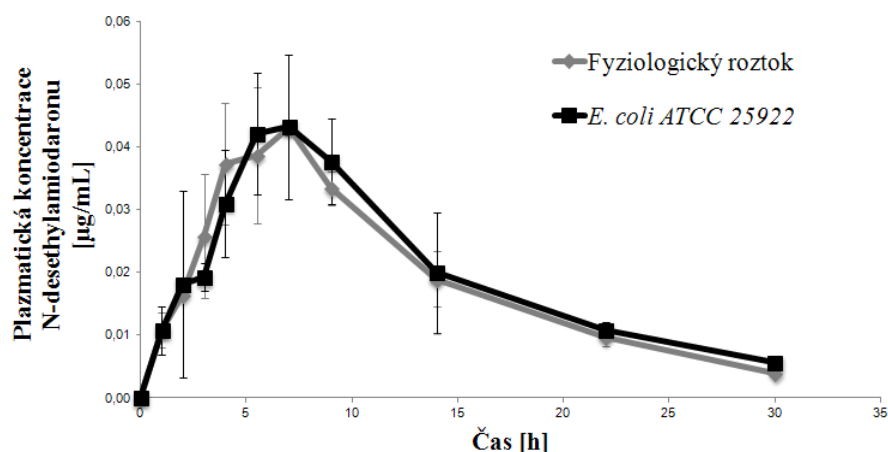




**Obrázek 29.** Porovnání farmakokinetik N-desethylamiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.

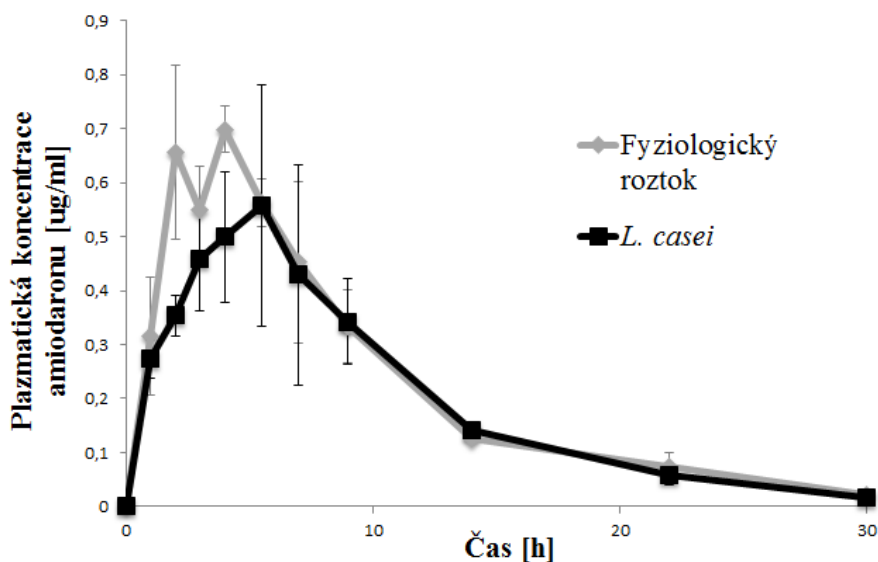


**Obrázek 30.** Porovnání farmakokinetik amiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace nepatogenního neprobiotického kmene *Escherichia coli* ATCC 25922. Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.

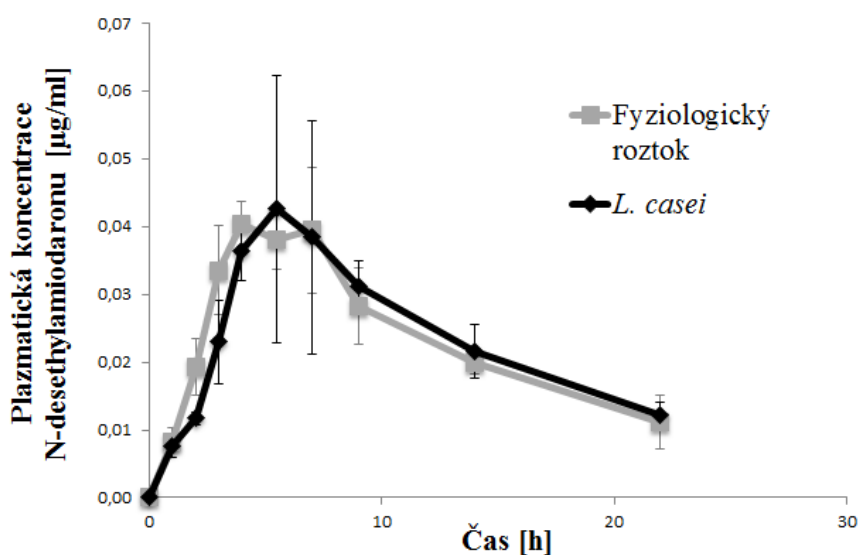


**Obrázek 31.** Porovnání farmakokinetik N-desethylamiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace nepatogenního neprobiotického kmene *Escherichia coli* ATCC 25922. Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.

Farmakokinetika AMI byla provedena taktéž s probiotickým kmenem *L. casei* (nepublikované výsledky). Design experimentu byl stejný jako v předchozím případě. Experimentální zvířata vážila průměrně 270 g a počet bakterií v jedné dávce bylo  $1,5 \times 10^9$  KTJ. Jednotlivé farmakokinetiky pro AMI a DEA jsou zobrazeny na Obr. 32 a 33.



**Obrázek 32.** Porovnání farmakokinetik amiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *L. casei*. Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.



**Obrázek 33.** Porovnání farmakokinetik N-desethylamiodaronu u potkana s a bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *L. casei*. Každý bod představuje průměr ± směrodatná odchylka; N = 3.

Byly také stanoveny farmakokinetické parametry pro AMI a DEA, které jsou přehledně uvedeny v Tab. 9. Parametry farmakokinetiky AMI a DEA nebyly ovlivněny aplikací *L. casei* s jednou výjimkou, a to s výrazným prodloužením doby potřebné k dosažení maximální koncentrace ( $t_{max}$ ) AMI a DEA u potkanů po aplikaci *L. casei*.

Stanovovaná látka	Amiodaron		N-desethylamiodaron	
	<i>L. casei</i>	Fyziologický roztok	<i>L. casei</i>	Fyziologický roztok
$t_{1/2}$ [h]	5,04 ± 0,59	6,16 ± 1,27	9,98 ± 2,12	10,78 ± 4,16
$c_{max}$ [µg/ml]	0,62 ± 0,15	0,77 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,00
$t_{max}$ [h]	<b>5,00 ± 0,71</b>	2,7 ± 0,94	5,00 ± 0,71	4,67 ± 1,70
AUC <sub>0-(22)30h</sub> [h*µg/ml]	5,94 ± 1,12	6,70 ± 0,58	0,52 ± 0,09	0,51 ± 0,04
AUC <sub>0-∞h</sub> [h*µg/ml]	6,06 ± 1,12	6,90 ± 0,67	0,69 ± 0,11	0,71 ± 0,16

**Tabulka 9.** Farmakokinetické parametry u potkana po orální aplikaci amiodaronu (v jedné dávce 50 mg/kg) s nebo bez (kontrolní skupina) aplikace probiotického kmene *L. casei*.

$t_{1/2}$ , biologický poločas;  $c_{max}$ , maximální plazmatická koncentrace léčiva;  $t_{max}$ , čas při dosažení  $c_{max}$ ; AUC, plocha pod křivkou. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatná odchylka; N = 3. Hodnoty tučně zvýrazněné jsou významně odlišné od kontroly.

Výsledky v této disertační práci ukazují, že probiotické mikroorganismy nemají jednoznačný efekt na enzymy metabolizující léčiva a ani nevykazují obecný, stejný či podobný vliv na farmakokinetiku současně podané látky.

## 6. DISKUZE

Probiotické bakterie jsou využívány především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, kde jsou přidávány např. do mléčných produktů nebo potravních doplňků. V odborné veřejnosti jsou diskutovány otázky, zda je možné současně s probiotiky užívat probiotika jiná, bylinné čaje anebo dokonce léky, zda mohou probiotika ovlivnit léčbu pacienta nebo v horším případě, zda by mohla probiotika způsobit toxické účinky současně podané látky. Tato disertační práce vznikla jako pokus přispět k poznání této problematiky s cílem zjistit, zda mohou mít probiotické bakterie vliv na enzymy metabolizující léčiva a zda mohou způsobit změny ve farmakokinetice současně podané látky.

První publikace se zabývá vlivem probiotického kmene *Escherichia coli* Nissle 1917 na expresi proteinů cytochromů P450 a na jejich aktivitu v potkaních samičích játrech. Tento bakteriální kmen byl experimentálním zvířatům podáván 14 dní nebo 1 den. Ze získaných dat bylo zjištěno, že nedošlo k významným změnám v expresi proteinu CYP1A2, 2C6, 2E1 a 3A1, jen k mírnému zvýšení exprese proteinu CYP1A2 a CYP2C6 a k mírnému snížení exprese proteinu CYP3A1. Co se týče aktivit vybraných enzymů, nebyly detekovány statisticky významné změny v aktivitě odpovídající lidským enzymům CYP1A, 2A6, 2B6, 2C9, 2D6 a 3A4. Experimentálním zvířatům byl taktéž podán lipopolysacharid tohoto probiotického kmene a ukázalo se, že tato část bakterie měla značný vliv na expresi proteinu CYP1A2 (zvýšená exprese proteinu po podání LPS v porovnání s kontrolní skupinou;  $p < 0,001$ ), ovšem nikoliv významný vliv na aktivitu tohoto proteinu (stanovení aktivity bylo provedeno pomocí nespecifického substrátu 7-ethoxyresorufinu, který je metabolizován jak lidským, tak i potkaním enzymem CYP1A1/2 [4,135]). Dále se ukázalo, že LPS způsobil mírné zvýšení v expresi proteinu CYP2C6 po podání LPS v porovnání s kontrolní skupinou a taktéž bylo detekováno statisticky významné zvýšení v aktivitě odpovídající lidskému enzymu CYP2C9 ve srovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Při tomto stanovení byla pozorována zvýšená 4'-hydroxylace diklofenaku, za kterou odpovídá také potkaní CYP2C6 i CYP2C11 [135,149]. Opačný efekt byl pozorován u proteinu CYP3A1, u kterého byla lehce snížena exprese proteinu po podání LPS ve srovnání s kontrolní skupinou, a stejný efekt byl

pozorován u aktivity odpovídající lidskému enzymu CYP3A4. Expresе jaterních proteinů CYP byly také stanoveny u samců potkana kmene Wistar, kterým byl aplikován probiotický kmen EcN každý den po dobu sedmi dní (viz [publikace 2](#)). Výsledky nepotvrdily zvýšení v expresi proteinu CYP1A2 a 2C6 (jako tomu bylo u samic), ale bylo potvrzeno jemné snížení v expresi proteinu CYP3A. [Publikace 1](#) tedy hovoří o tom, že probiotický kmen EcN nemá zásadní vliv na aktivitu a expresi potkaních jaterních cytochromů P450.

Další otázkou je, zda mohou probiotika ovlivnit obsah a aktivitu CYP, tedy hlavních enzymů metabolizujících léčiva, v gastrointestinálním traktu. Vzhledem k tomu, že je zejména tento orgán osidlován bakteriemi a zároveň zde dochází k prvnímu kontaktu xenobiotik s enzymy, které je metabolizují, byla provedena studie vlivu probiotického kmene EcN na střevní enzymy CYP. Touto studií, ve které byly tentokráte (ale i v těch následujících studiích) použiti samci potkana kmene Wistar, se zabývá [publikace 2](#). Stanovením expresе vybraných proteinů cytochromů P450 v jednotlivých částech střevního traktu bylo potvrzeno, že koncentrace CYP se po celé délce střeva mění [46]. Naše výsledky ukazují, že v tenkém střevě (v *duodenu*, *jejunu* a *ileu*) je vysoká koncentrace enzymů CYP1A1 a 2B1/2, zatímco CYP2E1 je ve vysokých koncentracích jak v tenkém střevě, tak i ve slepém střevě. Naopak CYP2C6 se nachází především v tlustém střevě (*caecum* i *colon*). Enzym CYP3A1 je lokalizován ve zřetelně detekovatelných koncentracích po celé délce potkaního střeva. Na základě těchto informací bylo provedeno stanovení expresе jednotlivých proteinů CYP v takovém segmentu střeva, kde je vysoká koncentrace sledovaného proteinu.

[Publikace 2](#) popisuje vliv probiotického kmene EcN na expresi proteinu i mRNA vybraných cytochromů P450. Po sedmi dnech aplikace bakterií EcN potkanům byly detekovány ve střevě změny v expresi mRNA i proteinu CYP3A v porovnání s kontrolní skupinou. Na úrovni proteinu došlo k významnému snížení expresе CYP3A v *duodenu* a *caecu*, naopak v *colon* byl zvyšující se trend v expresi proteinu. Na úrovni mRNA byla detekována změna pouze v *colon*, ve kterém došlo (stejně jako u expresе proteinu) k významnému nárůstu expresе mRNA CYP3A1 (v *duodenu* nebyla stanovena expresе mRNA z důvodu příliš malé části tkáně). Různé změny v různých částech střevního traktu vedly k provedení dalšího experimentu, tentokráte s mladšími potkany (v předchozím experimentu vážili potkani průměrně 490 g, v následujícím experimentu vážili potkani přibližně 300 g). Výsledky expresе proteinů CYP z tohoto experimentu potvrdily výsledky z předchozího experimentu, kromě proteinu CYP3A. Po týdenní aplikaci bakterií EcN měli mladí potkani po celé délce střevního traktu sníženou expresi CYP3A. Dle těchto výsledků se ukazuje, že stáří potkana by mohlo mít vliv na expresi proteinu CYP3A.

Otázkou ale je, zda tyto relativně malé změny mohou vést k významnějším změnám na úrovni farmakokinetiky současně podaného léčiva. Tím jsme se zabývali v dalších experimentech, ve kterých byly studovány farmakokinetiky modelových léčiv po aplikaci probiotik. Po sedmidenní aplikaci bakterií kmene EcN potkanům nenastaly žádné změny ve farmakokinetice protizánětlivého a analgetického léčiva diklofenaku. Jinak tomu bylo po aplikaci EcN a podání amiodaronu. V tomto případě byly detekovány změny ve farmakokinetice tohoto antiarytmického léčiva. Amiodaron byl v krevní plazmě stanoven nově zavedenou a úspěšně validovanou metodou pomocí HPLC a bylo zjištěno, že sedmidenní aplikace EcN způsobila zvýšení plazmatické koncentrace amiodaronu u potkana ve srovnání s kontrolními potkany.  $AUC_{0-30h}$  pro amiodaron byla 1,4x vyšší a  $AUC_{0-30h}$  pro jeho hlavní metabolit N-desethylamiodaron byla dokonce 1,6x vyšší. V případě farmakokinetiky N-desethylamiodaronu byl navíc čas k dosažení maximální plazmatické koncentrace o 2,5 hodiny prodloužen v porovnání s kontrolními vzorky. Tyto výsledky jsou uvedeny v [publikaci 4](#) a není snadné vysvětlit, jakým mechanismem bakterie působily, aby došlo k takové změně ve farmakokinetice. Mechanismus působení těchto bakterií lze odvodit na základě jejich vlastností, které byly popsány ve studiích *in vitro*. Bakterie kmene EcN vytváří ve střevě organické kyseliny s krátkým alifatickým řetězcem (zejména kyselinu octovou), které snižují pH prostředí a které jsou ochotně střevním epitelem vstřebány [150]. Mohou tak pozitivně přispět k lepší absorpci amiodaronu, který se rozpouští se v rozmezí pH 3,5 – 5,5 [151,152]. Bakterie kmene EcN dále snižují sekreci prozánětlivého cytokinu TNF $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy) [117], který způsobuje snížení hladin mRNA membránových transportních proteinů OATP (transportní polypeptidy organických aniontů) [153]. Snížením sekrece TNF $\alpha$  se pravděpodobně zvýší hladina mRNA těchto OATP, což by opět mohlo přispět k lepší resorpci amiodaronu z lumen střeva. Amiodaron se totiž váže na influxní transportér OATP2B1, který se mimo jiné nachází v enterocytech, a díky němu se snadněji dostává ke krevnímu řečišti [154]. Zajímavá je také skutečnost, že transportér OATP2B1 je aktivnější právě v kyselém prostředí [155]. Vzhledem k tomu, že bakterie kmene EcN snižují pH prostředí produkcí již zmíněnými organickými kyselinami, mohou rovněž tímto způsobem přispět k lepšímu vstřebávání amiodaronu z gastrointestinálního traktu. Dalším možným vysvětlením zvýšených plazmatických koncentrací amiodaronu po podání bakterií kmene EcN by mohla být snížená exprese proteinu CYP3A ve střevním traktu, která byla zjištěna u stejně starých potkanů. Amiodaron se totiž u potkana metabolizuje na N-desethylamiodaron mimo jiné přes CYP3A1 [147,156] a v případě snížené exprese střevního proteinu CYP3A se část amiodaronu nestačí přeměnit na N-desethylamiodaron již ve střevě, a proto se větší část

amiodaronu dostane do krevního oběhu (v porovnání s kontrolní skupinou). Podobný efekt byl pozorován v literatuře [157], kde byl použit ovšem patogenní lipopolysacharid kmene *E. coli* a antibiotikum telithromycin, které se také metabolizuje cestou přes potkaní CYP3A1/2. I v tomto experimentu z literatury byly nalezeny zvýšené plazmatické koncentrace látky (v tomto případě antibiotika) po podání patogenního LPS v porovnání s kontrolou.

Na základě lepšího vstřebání amiodaronu z lumen střeva se zřejmě více amiodaronu dostalo krevním řečištěm do jater (ve srovnání s kontrolou), kde tato látka byla metabolizována (cestami přes CYP1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 2D1, 2D2 a 3A1 [147,156]). Pravděpodobně proto vzniklo více metabolitu N-desethylamiodaronu a tento jev se projevil zvýšenou hodnotou jeho AUC<sub>0-30h</sub>. K vyšším plazmatickým koncentracím N-desethylamiodaronu by mohla také přispět zvýšená aktivita odpovídající lidskému enzymu CYP2C9 (u potkana se jedná o aktivitu CYP2C6 a CYP2C11), která byla ovšem zjištěna po podání LPS EcN samicím potkana kmene Wistar v porovnání s kontrolou.

Pro srovnání vlivu probiotického kmene EcN na farmakokinetiku amiodaronu s vlivem neprobiotických bakterií *E. coli* byl proveden experiment, kdy byl potkanům podáván nepatogenní neprobiotický kmen *E. coli* ATCC 25922. Experiment byl realizován stejně jako v předchozím případě, ale výsledky získané z tohoto experimentu byly odlišné. Průběh farmakokinetické křivky amiodaronu a N-desethylamiodaronu po podání *E. coli* ATCC 25922 se v tomto případě nezměnil (ve srovnání s kontrolní skupinou). Na těchto experimentech bylo tedy ukázáno, že bakterie stejného rodu (*E.coli*) nemusí mít stejné vlastnosti a stejný vliv na farmakokinetiku současně podaného stejného léčiva (amiodaronu). Stejně tak bylo ukázáno, že jeden kmen bakterie (EcN) nemusí působit stejným způsobem na různé současně podané látky (viz Výsledky).

Tato disertační práce také dokumentuje výsledky experimentu s jinými probiotickými bakteriemi, *L. casei*. Experimenty byly provedeny stejným způsobem jako v případě bakterií kmene EcN. Byla studována aktivita enzymů a exprese proteinů i mRNA cytochromů P450 jak ve střevech, tak i v játrech samce potkana kmene Wistar ([publikace 3](#)). Po sedmidenní aplikaci probiotického kmene *L. casei* nedošlo ke statisticky významným změnám v aktivitě jaterních CYP, stejně tak nebyly pozorovány žádné významné změny v expresi proteinu a mRNA jaterních CYP v porovnání s kontrolními potkany. Naopak ve střevním traktu způsobil *L. casei* snížení ( $p < 0,05$ ) v expresi duodenální mRNA CYP3A9 (v *duodenu* nebyla stanovena exprese proteinu z důvodu malé části tkáně). Dále bylo detekováno významné snížení ( $p < 0,05$ ) nebo snižující se trend v expresi proteinu CYP1A1 od *jejuna* po *colon*

a významné snížení ( $p < 0,05$ ) v expresi mRNA CYP1A1 taktéž od *jejuna* po *colon* po sedmidenní aplikaci *L. casei* v porovnání s kontrolní skupinou. Zajímavé je, že po podání *L. casei* bylo stanoveno snížení exprese CYP2E1 mRNA ( $p < 0,001$ ), nikoliv proteinu, a to pouze ve slepém střevě.

Cytochromy P450 1A se účastní metabolismu polycyklických aromatických uhlovodíků, které jsou přítomny např. ve znečištěném prostředí, v tabákovém kouři nebo se dostávají do grilovaného masa na dřevěném uhlí. Enzymy CYP1A přeměňují tyto látky na kancerogeny, a tudíž podávání probiotického kmene *L. casei* by mohlo působit preventivně proti vzniku nádorového bujení. Z literatury je známo, že probiotika *L. casei* produkují polysacharid, který potlačil karcinogenezi v tlustém střevě u myši snížením syntézy prozánětlivého cytokinu interleukinu IL-6 [158,159]. Specifický polysacharid *L. casei* by tak mohl hrát důležitou roli v protizánětlivém působení rovněž u chronických střevních zánětlivých onemocnění.

U bakterií *L. casei* byl také sledován jejich vliv na farmakokinetiku amiodaronu (nepublikované výsledky). I v tomto případě lze pozorovat změny ve farmakokinetice amiodaronu po podání *L. casei* v porovnání s kontrolní skupinou, ovšem ne tak výrazné, jako v případě použití bakterií kmene EcN. Po aplikaci *L. casei* došlo k nevýznamnému poklesu  $AUC_{0-30h}$  pro amiodaron a k výraznému posunu času k dosažení maximální plazmatické koncentrace amiodaronu (přibližně o 2 hodiny později). Farmakokinetické parametry jeho hlavního metabolitu N-desethylamiodaronu nebyly ale po podání *L. casei* změněny. Lze tedy říci, že navzdory změnám v expresi proteinu i mRNA CYP1A1 po aplikaci bakterií *L. casei*, tyto probiotické bakterie nemají zásadní vliv na průběh farmakokinetiky amiodaronu.

Výsledky předkládané disertační práce včetně publikací 1-4 ukazují, že probiotika mohou mít vliv na farmakokinetiku současně podaného léčiva; ale nevykazují obecný, stejný či podobný vliv, protože zřejmě velmi záleží jak na vlastnostech podaného probiotika, tak na vlastnostech interagujícího léčiva a v neposlední řadě i na aktuálním stavu organismu. Je rovněž skutečností, že všechny tyto experimenty *in vivo* byly provedeny na laboratorních zvířatech a výsledky z těchto experimentů nelze jednoznačně a přímo vztahovat na člověka. Nicméně, výsledky této práce upozorňují na možnost, že podávání probiotických bakterií může ovlivnit působení (např. biodostupnost) současně podaného léčiva.



## 7. ZÁVĚRY

V této disertační práci byl na experimentálním modelu potkana především sledován vliv administrace probiotických bakterií *E. coli* Nissle 1917 a *L. casei* na expresi vybraných jaterních a střevních CYP jak na úrovni proteinu, tak i mRNA, a případně aktivity těchto enzymů. Byl rovněž studován vliv obou probiotik na farmakokinetiku současně podaného léčiva diklofenaku nebo amiodaronu.

Z výsledků jednotlivých experimentů *in vivo* vyplývají následující poznatky a závěry:

- Hladiny jednotlivých vybraných enzymů CYP se po celé délce střevního traktu potkana mění. V tenkém střevě se nacházejí především formy CYP1A1 a 2B1/2, zatímco enzym CYP2E1 je významně přítomen jak v tenkém střevě, tak i ve střevě slepém. Naopak forma CYP2C6 se nachází především v tlustém střevě (*caecum* i *colon*). Enzym CYP3A1 je lokalizován ve zřetelně detekovatelném množství po celé délce potkaního střeva.
- Probiotický kmen *E. coli* Nissle 1917 nezpůsobil významnou změnu v enzymové aktivitě vybraných jaterních CYP potkana. Podobně tomu bylo i u probiotických bakterií *L. casei*. Vzhledem k tomu, že enzymové aktivity byly určovány se substráty typickými pro lidské formy CYP, přenos výsledků na člověka je vždy určitou aproximací.
- Probiotický kmen *E. coli* Nissle 1917 neměl významný vliv na expresi jaterních proteinů CYP u potkana. Bylo detekováno pouze mírné snížení v expresi jaterního proteinu CYP3A1. Nicméně, po podání *E. coli* Nissle 1917 potkanovi byly v porovnání s kontrolní skupinou nalezeny významné změny ( $p < 0,05$ ) v expresi proteinu CYP3A po celé délce střevního traktu. U ostatních proteinů (CYP1A1, 2B1/2, 2C6 a 2E1) exprese nebyla ovlivněna.
- Po podání probiotické bakterie *L. casei* experimentálnímu zvířeti nedošlo ke změnám exprese vybraných jaterních CYP jak na úrovni proteinu, tak i mRNA, naopak ve střevním traktu tyto bakterie způsobily snížení v expresi

duodenální mRNA CYP3A9 a významné snížení nebo snižující se trend v expresi proteinu CYP1A1 od tenkého střeva (*jejunum*) po střevo tlusté (*colon*). Stejně tak bylo po aplikaci *L. casei* detekováno významné snížení v expresi mRNA CYP1A1 od tenkého střeva (*jejunum*) po tlusté střevo (*colon*). *L. casei* měl také vliv na snížení exprese CYP2E1 mRNA ve slepém střevě.

- Podání *E. coli* Nissle 1917 by tak mohlo ovlivnit metabolismus současně podaných látek, které podléhají přeměně prostřednictvím CYP3A, zatímco podání *L. casei* by mohlo ovlivnit metabolismus těch současně podaných látek, které podléhají přeměně za účasti CYP1A.
- Podání probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 neovlivnilo farmakokinetiku diklofenaku, zatímco v případě současného podání *E. coli* Nissle 1917 a amiodaronu způsobilo zvýšení  $AUC_{0-30h}$  pro amiodaron a jeho hlavní metabolit N-desethylamiodaron. Navíc v případě farmakokinetiky metabolitu N-desethylamiodaronu byl čas k dosažení maximální plazmatické koncentrace posunut v porovnání s kontrolní skupinou o 2,5 hodiny (v čase později). Zvýšené plazmatické koncentrace obou látek způsobené podáním *E. coli* Nissle 1917 by tak mohly za určitých okolností ovlivnit odpověď organismu. Toto zvýšení není však tak dramatické, aby bylo klinicky významné. V případě současného podání *L. casei* a amiodaronu nenastala významná změna ve farmakokinetice amiodaronu a jeho metabolitu.

## 8. SOUHRN

Cílem předkládané disertační práce bylo zjistit, zda probiotické bakterie, *Escherichia coli* Nissle 1917 a *Lactobacillus casei*, ovlivňují cytochromy P450 (zkráceně CYP, nejdůležitější enzymy metabolismu cizorodých látek včetně léčiv) v játrech a ve střevě potkana. V první části práce byla sledována enzymová aktivita, exprese mRNA a exprese proteinů jednotlivých forem CYP (k tomu byla rovněž provedena studie distribuce CYP v potkaním střevě) po premedikaci oběma probiotiky. Ve druhé části práce bylo studováno, jestli aplikovaná probiotika mohou alterovat farmakokinetické parametry modelových léčiv (amiodaronu a diklofenaku).

V předběžné studii distribuce forem CYP v potkaním střevě bylo zjištěno, že se zastoupení jednotlivých vybraných enzymů CYP po celé délce střevního traktu potkana mění. V tenkém střevě se nachází především CYP1A1 a 2B1/2, zatímco CYP2E1 je ve vysokých koncentracích jak v tenkém střevě, tak i ve slepém. Naopak CYP2C6 se nachází především v tlustém střevě (*caecum* i *colon*). Enzym CYP3A1 je lokalizován ve zřetelně detekovatelných koncentracích po celé délce potkaního střeva. Po aplikaci probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 bylo v porovnání s kontrolní skupinou stanoveno významné snížení v expresi proteinu CYP3A po celé délce střevního traktu a po aplikaci probiotických bakterií *L. casei* bylo především detekováno významné snížení nebo snižující se trend v expresi proteinu i mRNA CYP1A1 od tenkého střeva po střevo tlusté. Podání *E. coli* Nissle 1917 by tak mohlo ovlivnit metabolismus současně podaných látek, které podléhají přeměně za účasti CYP3A, zatímco podání *L. casei* by mohlo ovlivnit metabolismus současně podaných látek, které podléhají přeměně prostřednictvím CYP1A. Na druhé straně, podání *E. coli* Nissle 1917 i *L. casei* nezpůsobilo významnou změnu v aktivitě a expresi jaterních proteinů CYP v játrech, kde je největší zastoupení enzymů CYP.

Podání probiotického kmene *E. coli* Nissle 1917 neovlivnilo farmakokinetiku současně podaného léčiva diklofenaku, nicméně byly detekovány významné změny ve farmakokinetice jiného léčiva amiodaronu. Zvýšení AUC<sub>0-30h</sub> pro amiodaron (přibližně o 50 % proti výsledkům získaným u nepremedikovaných potkanů) a pro jeho hlavní metabolit N-desethylamiodaron (rovněž přibližně o 50%) po aplikaci *E. coli* Nissle 1917 by mohlo mít i důsledky na účinek léčiva, zejména u predisponovaných pacientů. Na druhou stranu nebyla významně ovlivněna farmakokinetika amiodaronu současně podávaným probiotikem *L. casei*.

Výsledky získané v předkládané disertační práci ukazují, že probiotika mohou mít vliv na farmakokinetiku současně podaného léčiva, ale nevykazují obecný, stejný či podobný vliv, protože zřejmě velmi záleží jak na vlastnostech podaného probiotika, tak na vlastnostech interagujícího léčiva a v neposlední řadě i na aktuálním stavu organismu.

## 9. SUMMARY

The aim of this work was to find if probiotic bacteria *E. coli* Nissle 1917 and *Lactobacillus casei* influence cytochromes P450 (abrev. CYP, the most important enzymes of metabolism of xenobiotics inc. drugs) in liver and in the gastrointestinal tract of experimental model (Wistar rat). In the first part of this thesis, enzyme activities, the expression of the mRNA as well as the protein expression of the individual CYP forms after premedication of animals by both the above mentioned probiotics were determined. Before start of this, a study on the distribution of CYP forms along the gastrointestinal tract of the rat has been examined. The second part of this work has been focussed on the studies of possible changes in pharmacokinetic parameters of the model drugs (amiodarone, diclofenac) induced by premedication of animals by both *E. coli* Nissle 1917 and *L. casei*.

In the preliminary study on the distribution of CYP enzymes along the rat intestine it has been found that the relative contribution of the individual selected CYP forms is changed along the rat gastrointestinal tract. Whereas in the small intestine there are the CYP1A1 and CYP2B1/2 present, the CYP2E1 form has been detected in high level both in the small intestine and in the caecum. On the contrary, the CYP2C6 was detected mainly in the caecum and in the colon. The CYP3A1 enzyme has been detected in all areas of the rat intestine. Application of the *E. coli* Nissle 1917 has led to a decrease of the expression of the CYP3A1 protein along the gastrointestinal tract; on the other hand, the premedication of animals with *L. casei* was reflected in a significant lowering or a clear trend (depending on the respective part of the rat intestine) to lower values of the CYP1A protein as well as mRNA expression. In other word, the administration of *E. coli* Nissle 1917 could affect the intestinal metabolism of drugs by CYP3A enzyme(s); the *L. casei* might be able to influence the biotransformation of drugs by CYP1A proteins present in the intestine. On the contrary, the content of the CYP enzymes in the liver has not been affected by administration either of *E. coli* nor *L. casei*.

Regarding the pharmacokinetics of the drugs studied, the administration of probiotic *E. coli* Nissle 1917 did not affect the pharmacokinetic parameters of concomitantly taken drug diclofenac; however, there were detected significant changes in pharmacokinetics of other drug amiodarone. An increase of the  $AUC_{0-30h}$  for amiodarone and for its main metabolite N-desethylamiodarone after application of *E. coli* Nissle 1917 by one half has been observed (whereas the non-probiotic strain was not able to produce a comparable effect). In fact, the results indicate that administration of a probiotic could, at least in predisposed patients, alter pharmacokinetic parameters of concomitantly taken drugs. On the other hand, the pharmacokinetics of amiodarone was not affected by probiotic *L. casei*.

Results presented in this thesis show that probiotics can exhibit an effect on pharmacokinetics of concomitantly taken drugs; however, this effect is apparently not a general, same or similar one. Most probably, it is because it depends on many factors as the properties of the administered probiotics, properties of the interacting drug and least but not least on the current state of the organism.

## 10. LITERATURA

- [1] FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada 2002: 1–11.
- [2] Trivedi B. Microbiome: The surface brigade. *Nature* 2012; 492: S60-S61.
- [3] Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, 2004; 695.
- [4] Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD: Toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill, New York, USA 2001; 133-224.
- [5] Meunier B, de Visser SP, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev* 2004; 104(9): 3947-3980.
- [6] Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy* 1999; 93: 229-237.
- [7] Shimada T, Guengerich FP. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2, and 1B1- mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 288-294.
- [8] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239(7): 2370-2378.
- [9] Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, Evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002; 3(6): 561-597.
- [10] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6(1): 1-42.
- [11] Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 737-747.
- [12] Kawashima A, Satta Y. Substrate-dependent evolution of cytochrome P450: Rapid turnover of the detoxification-type and conservation of the biosynthesis-type. *Plos One*. 2014; 9(6): e100059.
- [13] Groves JT. The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3569-3574.
- [14] Feidt DM, Klein K, Nüssler A, Zanger UM. RNA-interference approach to study functions of NADPH:cytochrome P450 reductase in human hepatocytes. *Chem Biodivers* 2009; 6(11): 2084-2091.

- [15] Gamemara D, Seoane GA. Enzymes involved in redox reactions: Natural sources and mechanistic overview. In: Gamemara D, Seoane GA, Menez PS et al. Redox biocatalysis: Fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2013; 1-85.
- [16] Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem* 2004; 279(37): 38091-38094.  
Online databáze: RCSB Protein Data Bank:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TQN> (citováno 19.10.2014)
- [17] Ekroos M, Sjögren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(37): 13682-13687.  
Online databáze: RCSB Protein Data Bank:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2J0D> (citováno 19. 10. 2014)
- [18] Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Vinković DM, Jhoti H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 2003; 424(6947): 464-468.  
Online databáze: RCSB Protein Data Bank:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OG2> (citováno 19.10. 2014)
- [19] Wester MR, Yano JK, Schoch GA, Yang C, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2004; 279: 35630-35637.  
Online databáze: RCSB Protein Data Bank:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1R9O> (citováno 19.10. 2014)
- [20] Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360(9340): 1155-1162.
- [21] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013; 138(1): 103-141.
- [22] Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; 2(6): 875-894.
- [23] Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998; 28(12): 1203-1253.
- [24] Hill S. Pharmacology. In: Tomlin M, ed. *Pharmacology & Pharmacokinetics: A basic reader*. Springer-Verlag, London, UK, 2010; 1-12.
- [25] Roberts BJ, Song B-J, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem* 1995; 270(50): 29632-29635.

- [26] Ferguson SS, Chen Y, LeCluyse EL, Negishi M, Goldstein JA. Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4 $\alpha$ . *Mol Pharmacol* 2005; 68(3): 747-757.
- [27] Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 2009; 9: 187.
- [28] Dvorak Z. Transcriptional regulation of human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. In: Anzenbacher P, Zanger UM, eds. *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012; 223-258.
- [29] Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature website: A peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics* 2010; 4(4): 278-281.
- [30] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effect. *Am Fam Physician* 2007; 76(3): 391-396.
- [31] Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76(2): 128-138.
- [32] Zanger UM. The CYP2D family. In: Ioannides C, ed. *Cytochromes P450: Role in metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics (Issues in Toxicology)*. Royal Society of Chemistry, 1<sup>st</sup> ed. Cambridge, UK, 2008; pp. 241-275.
- [33] Klein K, Winter S, Turpeinen M, Schwab M, Zanger UM. Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. *Front Pharmacol* 2010; 1: 129.
- [34] Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Spandidos DA. Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids. *Bioorg Med Chem* 2011; 19(9): 2842-2849.
- [35] Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(8): 883-891.
- [36] Shimada T, Murayama N, Yamazaki H, Tanaka K, Takenaka S, Komori M, Kim D, Guengerich FP. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aryl and heterocyclic amines by human cytochrome P450 2A13 and 2A6. *Chem Res Toxicol* 2013; 26(4): 529-537.
- [37] Kramlinger VM, von Weymarn LB, Murphy SE. Inhibition and inactivation of cytochrome P450 2A6 and cytochrome P450 2A13 by methofuran,  $\beta$ -nicotyrine and menthol. *Chem Biol Interact* 2012; 197(2-3): 87-92.



- [38] Ridderström M, Zamora I, Fjellström O, Andersson TB. Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRIP/CPCA. *J Med Chem* 2001; 44: 4072-4081.
- [39] Kartha JS, Yost GS. Mechanism-based inactivation of lung-selective cytochrome P450 CYP2F enzymes. *Drug Metab Dispos* 2008; 36(1): 155-162.
- [40] Streeten EA, Levine MA. Vitamin D metabolism or action. In: Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf BR. *Emery and Rimoin's principles and practise of medical genetics*. 6<sup>th</sup> ed. Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, 2013; 1-28.
- [41] Bui P, Imaizumi S, Beedanagari SR, Reddy ST, Hankinson O. Human CYP2S1 metabolizes cyclooxygenase- and lipoxygenase-derived eicosanoids. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 180-190.
- [42] Saarikoski ST, Rivera SP, Hankinson O, Husqafvel-Pursiainen K. CYP2S1: a short review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(Suppl 2):62-69.
- [43] Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovich M, Jones G, Korczak B. CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* 2004; 279: 6305-6314.
- [44] Stenstedt K, Travica S, Guo J, Barragan I, Pors K, Patterson L, Edler D, Mkrtchian S, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. CYP2W1 polymorphism: functional aspects and relation to risk for colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2013; 14(13): 1615-1622.
- [45] Shin H-C, Kim H-R, Cho H-J, Yi H, Cho S-M, Lee D-G, El-Aty AMA, Kim J-S, Sun D, Amidon GL. Comparative gene expression of intestinal metabolizing enzymes. *Biopharm Drug Dispos* 2009; 30(8): 411-421.
- [46] Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos* 2008; 36(6): 1039-1045.
- [47] Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, Potter JD. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* 2000; 21(6): 1157-1162.
- [48] Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A, Watkins PB. Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology* 1999; 117(1): 89-98.
- [49] Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 1997; 57(14): 3026-3031.

- [50] Gajjar K, Martin-Hirsch PL, Martin FL. *CYP1B1* and hormone-induced cancer. *Cancer Lett* 2012; 324(1): 13-30.
- [51] Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the *GLC3A* locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 1997; 6(4): 641-647.
- [52] Chiang H-C, Wang C-K, Tsou T-C. Differential distribution of *CYP2A6* and *CYP2A13* in the human respiratory tract. *Respiration* 2012; 84(4): 319-326.
- [53] Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M. *CYP2A6*: a human kumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 2000; 144(1-3): 139-147.
- [54] Fukami T, Nakajima M, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. *CYP2A7* polymorphic alleles confound the genotyping of *CYP2A6\*4A* allele. *Pharmacogenomics J* 2006; 6(6): 401-412.
- [55] Oscarson M, McLellan RA, Asp V, Ledesma M, Bernal Ruiz ML, Sinues B, Rautio A, Ingelman-Sundberg M. Characterization of a novel *CYP2A7/CYP2A6* hybrid allele (*CYP2A6\*12*) that causes reduced *CYP2A6* activity. *Hum Mutat* 2002; 20(4): 275-283.
- [56] Miksys S, Tyndale RF. Nicotine induces brain CYP enzymes: relevance to Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006; 70: 177-180.
- [57] Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG. Hepatic *CYP2B6* expression: Gender and ethnic differences and relationship to *CYP2B6* genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(3): 906-922.
- [58] Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front Genet* 2013; 4: 24.
- [59] Hodgson E, Rose RL. Human metabolite interactions of environmental chemicals. *J Biochem Mol Toxicol* 2007; 21(4): 182-186.
- [60] Crane AL, Klein K, Olson JR. Bioactivation of chlorpyrifos by *CYP2B6* variants. *Xenobiotica* 2012; 42(12): 1255-1262.
- [61] Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Zeruesenay D. The cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: Implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of *CYP2B6* catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(1): 287-300.
- [62] Desta Z, Saussele T, Ward B, Blievernicht J, Li L, Klein K, Flockhart DA, Zanger UM. Impact of *CYP2B6* polymorphism on hepatic efavirenz metabolism *in vitro*. *Pharmacogenomics* 2007; 8(6): 547-558.

- [63] Keeney DS, Skinner C, Friedberg T. Identification of two monooxygenases, CYP2B15 and CYP2B12, highly expressed in rat skin. *J Invest Dermatol* 1996; 106(4):901.
- [64] Keeney DS, Skinner C, Wei S, Friedberg T, Waterman MR. A keratinocyte-specific epoxygenase, CYP2B12, metabolizes arachidonic acid with unusual selectivity, producing a single major epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem* 1998; 273(15): 9279-9284.
- [65] Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Lange R, Skopalík J, Otyepka M. Active sites of cytochrome P450: what are they like? *Acta Chim Slov* 2008; 55: 63-66.
- [66] Uno Y, Matsuno K, Nakamura C, Utoh M, Yamazaki H. Identification and characterization of CYP2C18 in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* 2010; 72(2): 225-228.
- [67] Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* 2000; 355(9208): 979-983.
- [68] Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y. Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 970-976.
- [69] Cederbaum AI. CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* 2006; 73(4): 657-672.
- [70] Feidt DM, Klein K, Hofmann U, Riedmaier S, Knobloch D, Thasler WE, Weiss TS, Schwab M, Zanger UM. Profiling induction of cytochrome P450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2010; 38(9): 1589-1597.
- [71] Diczfalusy U, Miura J, Roh H-K, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, Bodin KG, Allqvist A, Jande M, Kim J-W, Aklillu E, Gustafsson LL, Bertilsson L. 4 $\beta$ -hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(3): 201-208.
- [72] Diczfalusy U, Nylén H, Elander P, Bertilsson L. 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71(2): 183-189.
- [73] Björkhem-Bergman L, Bäckström T, Nylén H, Rönquist-Nii Y, Bredberg E, Andersson TB, Bertilsson L, Diczfalusy U. Comparison of endogenous 4 $\beta$ -hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction of by rifampicin. *Drug Metab Dispos* 2013; 41(8): 1488-1493.
- [74] Mårde Arrhén Y, Nylén H, Lövgren-Sandblom A, Kanebratt KP, Wide K, Diczfalusy U. A comparison of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol : cholesterol and 6 $\beta$ -hydroxycortisol : cortisol as markers of CYP3A4 induction. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75(6): 1536-1540.

- [75] Żochowska D, Wyzgał J, Pączek L. Impact of *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3* polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann Transplant* 2012; 17(3): 36-44.
- [76] Wilson M, McNab R, Henderson B. Bacterial disease mechanisms: an introduction to cellular microbiology. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2002; 656.
- [77] Hao WL, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol* 2004; 268: 491-502.
- [78] Kato T, Owen RL. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W et al. *Mucosal immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic press, Waltham, Massachusetts, USA, 2005; pp. 131-151.
- [79] Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. 4<sup>th</sup> ed. TRITON, Praha, ČR, 2009; 316.
- [80] Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 85-101.
- [81] Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27(2): 125-131.
- [82] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(11): 799-809.
- [83] Turner JR. "Putting the squeeze" on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(4): 301-308.
- [84] Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(1): 43-50.
- [85] Chassaing B, Kumar M, Baker MT, Singh V, Vijay-Kumar M. Mammalian gut immunity. *Biomed J* 2014; 37(5): 246-258.
- [86] Ventura M, Turrone F, Motherway MO, MacSharry J, van Sinderen D. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol* 2012; 20(10): 467-476.
- [87] Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 2011; 4(6): 603-611.
- [88] Jarry A, Robaszekiewicz M, Brousse N, Potet F. Immune cells associated with M cells in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 255: 293-298.
- [89] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292(5519): 1115-1118.
- [90] Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(3): a010074.

- [91] Beerens H, Romond C, Neut C. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. *Am J Clin Nutr* 1980; 33(Suppl 11): 2434-2439.
- [92] Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl 2): 399S-405S.
- [93] Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147(3659): 747–748.
- [94] Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2): 361S-364S.
- [95] Mečnikov II, Chalmers M, ed. *The prolongation of life: Optimistic studies*. G. P. Putnam's Sons, New York, USA, 1908; 343.
- [96] Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 2001; 11: 1-17.
- [97] Socol CR, Vandenberghe LPS, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, De Dea Lindner J, Pandey A, Thomaz-Socol V. The potential of probiotics: a review. *Food Technol Biotech* 2010; 48(4): 413-434.
- [98] Sidira M, Kandylis P, Kanellaki M, Kourkoutas Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening. *Meat Sci* 2015; 100: 41-51.
- [99] Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 2010; 141(Suppl 1): S15-S28.
- [100] Cummings JH, Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002; 87(Suppl 2): S145-S151.
- [101] Oku T, Nakamura S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure Appl Chem* 2002; 74(7): 1253-1261.
- [102] Haukioja A. Probiotics and oral health. *Eur J Dent* 2010; 4: 348-355.
- [103] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, J-H Lee, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(42): 15611-15616.
- [104] Hammes WP, Vogel RF. The Genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapel WH, eds. *The Lactic Acid Bacteria*, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall, London, UK, 1995; 19–54.

- [105] Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1<sup>st</sup> ed. Marvil, Praha, ČR, 1996; 558.
- [106] Vuyst LD, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; 13(4): 194-199.
- [107] Zanirati DF, Abatemarco M Jr, de Cicco Sandez SH, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 2014; 32C: 70-76.
- [108] Aquirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 95-107.
- [109] Meng X, He Z-F, Li H-J, Zhao X. Removal of 3-methylindole by lactic acid bacteria *in vitro*. *Exp Ther Med* 2013; 6(4): 983-988.
- [110] Bhakta JN, Ohnishi K, Muneke Y, Iwasaki K, Wei MQ. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J Appl Microbiol* 2012; 112(6): 1193-1206.
- [111] Huang CH, Chang MT, Huang MC, Lee FL. Application of the SNaPshot minisequencing assay to species identification in the *Lactobacillus casei* group. *Mol Cell Probes* 2011; 25(4): 153-157.
- [112] Walter J. Ecological role of lactobacili in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 4985-4996.
- [113] Florou-Paneri P, Christaki E, Bonos E. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In: Kongo M, ed. *Lactic acid bacteria – R & D for food, health and livestock purposes*. InTech, 2013; 589-614.
- [114] Ma C, Gong G, Liu Z, Ma A, Chen Z. Stimulatory effects of tea supplements on the propagation of *Lactobacillus casei* in milk. *Int Dairy J* 2015; 43: 1-6.
- [115] Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000; 1(1): 13-24.
- [116] Shida K, Makino K, Morishita A. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 278-287.
- [117] Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic *Escherichia coli* Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health D* 2009; 21: 122-158.
- [118] Appelmek BJ, An Y-Q, Hekker TAM, Thijs LG, MacLaren DM, de Graaf J. Frequencies of lipopolysaccharide core types in *Escherichia coli* strains from bacteraemic patients. *Microbiology* 1994; 140(Pt5): 1119-1124.

- [119] Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, Knirel YA, Schombel U, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Rietschel ET, Dobrindt U. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 2002; 184(21): 5912-5925.
- [120] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human  $\beta$ -Defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 2007; 75(5): 2399-2407.
- [121] Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, Stange EF, Oelschlaeger TA. More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int J Med Microbiol* 2012; 302(7-8): 304-314.
- [122] Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 2007; 9(3): 804-816.
- [123] Schultz M, Butt G. *E. coli* Nissle 1917 in the treatment of inflammatory bowel disease. In: Katz S, ed. *Inflammatory bowel disease: a practical approach*. *Pract Gastroenterol* 2010; 11-19.
- [124] Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354(9179): 635-639.
- [125] Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53(11): 1617-1623.
- [126] Tromm A, Niewerth U, Khoury M, Baestlein E, Wilhelms G, Schulze J, Stolte M. The probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-labelled trial. *Z Gastroenterol* 2004, 42(5): 365-369.
- [127] Malchow HA. Crohn's Disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 1997; 25(4): 653-658.
- [128] Kuzela L, Kascak M, Vavrecka A. Induction and maintenance of remission with nonpathogenic *Escherichia coli* in patients with pouchitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(11):3218-3219.
- [129] Möllenbrink M, Bruckschen E. Behandlung der chronischen Obstipation mit physiologischen *Escherichia-coli*-Bakterien. Ergebnisse einer klinischen Studie die Wirksamkeit und Verträglichkeit von mikrobiologischen Therapie mit dem *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor). *Med Klin (Munich)* 1994, 89(11): 587-593.

- [130] Lodinová-Žádníková R, Tlaskalová-Hogenová H, Sonnenborn U. Local and serum antibody response in fullterm and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor). *Pediatr Allergy Immunol* 1992; 3: 43-48.
- [131] Lodinová-Žádníková R, Sonnenborn U. Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biol Neonate* 1997; 71(4): 224-232.
- [132] Cukrowska B, Lodinová-Žádníková R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalová-Hogenová H. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 2002; 55(2): 204-209.
- [133] Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 2002; 50(Suppl 3): iii54-iii59.
- [134] Lake BG. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: Snell K, Mullock B, eds. *Biochemical toxicology: A practical approach*. IRL Press, Oxford, UK, 1987; 183-215.
- [135] Bruyère A, Declevès X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, Parmentier Y. Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica* 2009; 39: 22–32.
- [136] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1): 76-85.
- [137] Chang TKH, Waxman DJ. Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with ethoxyresorufin as a substrate. In: Phillips IR, Shephard EA, eds. *Cytochrome P450 Protocols*. Humana, Totowa, NJ, USA, 1998; 103-122.
- [138] Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ. Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. In: Phillips IR, Shephard EA, eds. *Cytochrome P450 Protocols*. Human, Totowa, NJ, USA, 1998; 109-113.
- [139] Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ. CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. In: Phillips IR, Shephard EA, eds. *Cytochrome P450 Protocols*. Humana, Totowa, NJ, USA, 1998; 141-146.
- [140] Leclercq I, Desager JP, Vandenplas C, Horsmans Y. Fast determination of low-level cytochrome P-450 1A1 activity by high-performance liquid chromatography with fluorescence or visible absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 681(2): 227 – 232.



- [141] Waxman DJ, Chang TK. Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods Mol Biol* 2006; 320: 91-96.
- [142] Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(7), 699-706.
- [143] Promega Corporation. Technical manual: P450-Glo™ Assays. USA, 2013. [www.promega.com](http://www.promega.com).
- [144] Lucas D, Menez JF, Berthou F. Chlorzoxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Method Enzymol* 1996; 272, 115-123.
- [145] Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986; 261(11): 5051-5060.
- [146] Jiravská Godula B, Jiravský O, Vávra P, Branny M. Nežádoucí účinky amiodaronu. *Klin Farmakol Farm* 2004; 18, 171-174.
- [147] Elsherbiny ME, El-Kadi AOS, Brocks DR. The metabolism of amiodarone by various CYP isoenzymes of human and rat, and the inhibitory influence of ketoconazole. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2008; 11(1): 147–159.
- [148] Wauthier V, Verbeeck RK, Calderon PB. The effect of ageing on cytochrome P450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. *Curr Med Chem* 2007; 14(7): 745-757.
- [149] Masubuchi Y, Ose A, Horie T. Mechanism-based inactivation of CYP2C11 by diclofenac. *Drug metab dispos* 2001; 29: 1190-1195.
- [150] Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(3): 235-243.
- [151] Bonati M, Gaspari F, D'Aranno V, Benfenati E, Neyroz P, Galleti F, Tognoni G. Physicochemical and analytical characteristics of amiodarone. *J Pharm Sci* 1984; 73(6): 829-831.
- [152] Sigurdson HH, Kirch J, Lehr C-M. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Int J Pharm* 2013; 453(1): 56–64.
- [153] Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Drug Metab Dispos* 2009; 37(3): 685–693.
- [154] Seki S, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Contribution of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 to amiodarone accumulation in lung epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(5): 911-917.

- [155] Gong IY, Kim RB. Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response. *Drug Metab Pharmacokinet* 2013; 28(1): 4-18.
- [156] Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1303–1310.
- [157] Lee JH, Cho YK, Jung YS, Kim YC, Lee MG. Effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on telithromycin pharmacokinetics in rats: inhibition of metabolism via CYP3A. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3): 1046-1051.
- [158] Matsumoto S, Hara T, Nagaoka M, Mike A, Mitsuyama K, Sako T, Yamamoto M, Kado S, Takada T. A component of polysaccharide peptidoglycan complex on *Lactobacillus* induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Immunology* 2009; 128(Suppl 1): e170-180.
- [159] Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, Kumar P, Poddar D, Aggarwal PK, Henry CJK, Jain S, Yadav H. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr* 2010; 61(5): 473-496.

## 11. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### 11.1 Práce související s disertační prací

#### 11.1.1 Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zídek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. *Neuroendocrinol Lett* 2009; 30(Supp 1): 41-45.

IF(2009): 1,047.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Šiller M, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats. *Neuroendocrinol Lett* 2010; 31(Suppl 2): 46-50.

IF(2010): 1,621.

Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and the activity of cytochromes P450 and on the CYP mRNA level in the intestine and the liver of male rats. *Neuroendocrinol Lett* 2011; 32(Suppl 1): 8-14.

IF(2011): 1,296.

Matušková Z, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Kolář M, Anzenbacher P. Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: effect of *E. coli* Nissle 1917 on amidarone absorption in rats. *PloS One* 2014; 9(2): e87150.

IF(2013): 3,534

### 11.1.2 Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Matušková Z., Poruba M., Anzenbacher P. Cytochromy P450: Role v metabolismu cholesterolu. *Klin Farmakol Farm* 2014; 28(4): 142-146.

### 11.1.3 Publikovaná abstrakta

Matušková Z., Tunková A, Anzenbacherová E, Zidek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. *Interdiscip Toxicol* 2009; 2(2): 125.

Matušková Z., Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z, Anzenbacher P. Influence of *Escherichia coli* Nissle 1917 on cytochrome P450 protein expression in the intestine of male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 107 (Suppl 1): 445.

Matušková Z., Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z, Anzenbacher P. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 in the gastrointestinal tract of male rats. *Interdiscip Toxicol* 2010; 3(3): A66.

Matušková Z., Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z, Anzenbacher P. Effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 in the caecum of male rats. *Front Pharmacol* 2010; doi: 10.3389/conf.fphar.2010.60.00161.

Matušková Z., Tunková A, Anzenbacherová E, Šiller M, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z, Anzenbacher P. Probiotic *E. coli* Nissle 1917 and its influence on the expression of cytochromes P450. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154(Suppl 4):S1.

IF(2010): 0,716

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Expression of biotransformation enzymes in the liver and in the intestine of male rat after application of the probiotic *Lactobacillus casei*. Interdiscip Toxicol 2011; 4(2): A49.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and activity of cytochromes P450 in the liver and the intestine of male rat. FEBS J 2011; 278 (Suppl 1): 170.  
IF(2011): 3,790

Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Probiotic *Lactobacillus casei* and cytochromes P450 in the rat intestine. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2011; 155(Suppl 4): S1–S6.  
IF(2011): 0,702

Matušková Z, Zachařová A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Urbánek K, Kolář M, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Administration of a probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 increases the bioavailability of amiodarone in the male rat. FEBS J 2012; 279 (Suppl 1): 403.  
IF(2012): 4,250

#### **11.1.4 Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech**

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zídek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. 14<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON), Brno, Česká republika, 1. -3. 6. 2009.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová A, Zídek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Vliv lipopolysacharidu izolovaného z *Escherichia coli* Nissle 1917 na aktivitu potkaních jaterních cytochromů P450. XXV. Xenobiochemické symposium, Mikulov, Česká republika 22. - 25. 9. 2009.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherova E, Večeřa R, Anzenbacher P. Does the *Escherichia coli* Nissle 1917 probiotic strain cause changes in the expression of cytochrome P450 proteins in the male rat intestine? Konference Biotechnologie v medicíně (Seminář záměru MŠM 6198959216), Vílanec u Jihlavy, Česká republika, 27. - 29. 5. 2010.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Influence of *Escherichia coli* Nissle 1917 on cytochrome P450 protein expression in the intestine of male rats. 16<sup>th</sup> IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology (WorldPharma), Kodaň, Dánsko, 17. - 23. 7. 2010.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 in the gastrointestinal tract of male rats. 15<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON), Stará Lesná, Slovensko, 8. – 10. 9. 2010.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 in the caecum of male rats. 8<sup>th</sup> Southeast European Congress on Xenobiotic Metabolism and Toxicity (XEMET), 1. – 5. 10. 2010, Soluň, Řecko.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Šiller M, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Probiotic *E. coli* Nissle 1917 and its influence on the expression of cytochromes P450. Conference to project 303/09/H048, Drnovice, Česká republika 22. -23. 10. 2010.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Expression of biotransformation enzymes in the liver and in the intestine of male rat after application of the probiotic *Lactobacillus casei*. 16<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON), Praha Česká republika, 17. – 20. 5. 2011.

Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and activity of cytochromes P450 in the liver and the intestine of male rat. 36<sup>th</sup> Conference of European biochemical societies (FEBS), Turín, Itálie, 26. 6. – 1. 7 2011.

Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Cytochromes P450 in the rat intestine: Probiotics modulate the expression of CYPs along the rat intestine. XXVI. Xenobiochemické symposium, Trenčianske Teplice, Slovensko, 7. - 9. 9. 2011.

Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zachařová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P (2011). Probiotic *Lactobacillus casei* and cytochromes P450 in the rat intestine. Conference to project 303/09/H048, Drnovice, Česká republika 25. – 26. 10. 2011.

Matušková Z, Zachařová A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Urbánek K, Kverka M, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. The effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on the pharmacokinetics of amiodarone in the male rat. 19<sup>th</sup> International symposium on microsomes and drug oxidations (MDO) and 12<sup>th</sup> European international Society for the study of xenobiotics (ISSX) meeting, Noordwijk aan Zee, Nizozemsko, 17. – 21. 6. 2012.

Matušková Z, Zachařová A, Večeřa R, Urbánek K, Anzenbacherová E, Kverka M, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. The influence of probiotic *Lactobacillus casei* on the pharmacokinetics of amiodarone in the male rat. 12<sup>th</sup> International nutrition & diagnostics conference (INDC), Praha, Česká republika 27. -30. 2012.

Matušková Z, Zachařová A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Urbánek K, Kolář M, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Administration of a probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 increases the bioavailability of amiodarone in the male rat. 22<sup>th</sup> International union of biochemistry and molecular biology (IUBMB) congress and 37<sup>th</sup> Conference of European biochemical societies FEBS, Sevilla, Španělsko, 4. – 9. 9. 2012.

## 11.2 Ostatní publikace

### 11.2.1 Původní vědecké publikace *in extenso* uveřejněné v časopisech s IF

Matal J, Matušková Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. *Neuroendocrinol Lett* 2009; 30(Suppl 1): 36-40.

IF(2009): 1,047.

Večeřa R, Zachařová A, Šiller M, Matušková Z, Škottová N, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. The influence of Rosuvastatin on liver microsomal CYP2C6 in hereditary hypertriglyceridemic rat. *Neuroendocrinol Lett* 2012; 33(Suppl 3): 48-52.

IF(2012): 0,932.

Večeřa R, Zachařová A, Kazdová L, Matušková Z, Škottová N, Strojil J, Oliyarnyk O, Anzenbacher P. Silybin affects the liver microsomal CYP2C6 in HHTg rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; 157(Suppl 1): S60–S64.

IF(2013): 1,661.

Rác M, Křupka M, Binder S, Sedlářová M, Matušková Z, Raška M, Pospíšil P. Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation, *Plos One* 2015 (v tisku), DOI: 10.1371/journal.pone.0116958.

IF(2013): 3,534.

Poruba M, Kazdová L, Oliyarnyk O, Malinská H, Matušková Z, Tozzi di Angelo I, Škop V, Večeřa R. Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica* 2015 (v tisku).

IF(2013): 2,101



### **11.2.2 Původní vědecké publikace *in extenso* uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech**

Večeřa R, Zachařová A, Šiller M, Matušková Z, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Effect of fenofibrate on metabolism of drugs in rat by CYP2C11. *Atherosklerosa* 2009; 94-97.

Večeřa R, Zachařová A, Matušková Z, Šiller M, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Rosuvastatin induces expression of CYP4A in hereditary hypertriglyceridemic rat. *Atherosklerosa* 2011; 48-51.

Urbánek K, Šiller M, Večeřa R, Zachařová A, Matušková Z. Porovnání originálních a generických přípravků karbapenemových antibiotik. *Klin Farmakol Farm* 2011; 25(1): 11-17.

Poruba M, Kazdová L, Zachařová A, Matušková Z, Oliyarnyk O, Škottová N, Anzenbacher P, Večeřa R. Silymarin up-regulated cytochrome P450 in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Atherosklerosa* 2013; 47-50.

Poruba M, Kazdová L, Škop V, Matušková Z, Večeřa R. The positive effect of silymarin in different pharmaceutical forms – inhibition of cytochrome P450. *Atherosklerosa* 2014; 38-41.

### **11.2.3 Publikovaná abstrakta**

Matal J, Matušková Z, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Porcine CYP2A19 and CYP2E1 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. *Interdiscip Toxicol* 2009; 2(2), 124.

Matušková Z, Rác M, Křupka M, Anzenbacher P. Vliv peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu na tvorbu malondialdehydu v buňkách U937. *Chem Listy* 2012; 106: 496.

IF(2012): 0,453.

#### **11.2.4 Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech**

Matušková Z, Matal J, Tunková A, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Prasečí enzymy CYP2A19, CYP2E1 a CYP1A2 jsou odpovědné za biotransformaci skatolu v rekonstituovaném systému. Konference vědeckých prací studentů DSP, Olomouc, Česká republika, 8. - 9. 9. 2009.

Matušková Z, Rác M, Křupka M, Anzenbacher P. Vliv peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu na tvorbu malondialdehydu v buňkách U937, 64. Sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností, soutěž o Cenu Shimadzu 2012, Olomouc, Česká republika, 25. – 27. 6. 2012.

Matušková Z, Klein K, Hofmann U, Anzenbacher P, Zanger UM. Assessment of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol as an endogenous marker of CYP3A4 phenotype in human liver. 20<sup>th</sup> International symposium on microsomes and drug oxidation (MDO), Stuttgart, Německo, 18. – 22. 5. 2014.

# 1. Publikace

**Matuškova Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Zídek Z, Tlaskalová-Hogenová H, Anzenbacher P. Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. Neuroendocrinol Lett 2009; 30(Supp 1): 41-45. IF(2009): 1,047.**

# Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes

Zuzana MATUSKOVA<sup>1</sup>, Alena TUNKOVA<sup>1</sup>, Eva ANZENBACHEROVA<sup>2</sup>, Zdenek ZIDEK<sup>3</sup>, Helena TLASKALOVA-HOGENOVA<sup>4</sup>, Pavel ANZENBACHER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Czech Republic.

<sup>2</sup> Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Czech Republic.

<sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic.

<sup>4</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic.

Correspondence to: Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.,  
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
Palacky University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic.  
PHONE: +420-585 632 569, FAX: +420-585 632 966  
EMAIL: pavel.anzenbacher@upol.cz

Submitted: 2009-07-14 Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-11-15

Key words: probiotic; *Escherichia coli*; bacterial lipopolysaccharide; cytochrome P450; rat liver

Neuroendocrinol Lett 2009; 30(Suppl 1): 41-45 PMID: 20027143 NEL300709A06 © 2009 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

## Abstract

**OBJECTIVES:** The aim of the study was to find, whether probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 O6:K5:H1 (EcN) influence the amount and activity of cytochromes P450 (CYP) in rat liver.

**DESIGN:** Live bacterial suspension of EcN was applied to the female Wistar rats in single dose or for 14 days consecutively. The bacterial lipopolysaccharide (LPS) isolated by phenol extraction from the EcN was given to the rats for 14 days as well. Control rats were treated with the saline solution daily for 14 days. Relative amount of CYP2C6, CYP2C9 (corresponding to rat CYP2C11), CYP3A1 and CYP1A2 protein expression in rat liver microsomes was determined by Western blotting. For the determination of six CYP activities (corresponding to human CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6) fluorescence, luminescence or absorbance detection was used.

**RESULTS:** The data presented show that the changes of the total content of the CYP enzymes in rat liver are not significant after administration of the probiotic for 1 or 14 days as well as of the LPS. Western blots revealed a slight increase in CYP2C6 protein expression; level of another rat CYP2C protein (readings with anti-human CYP2C9 antibody corresponding to the rat CYP2C11) as well as of CYP1A2 was elevated after administration of LPS; a small decrease was observed with CYP3A1 protein. Changes in activities of CYP forms are not significant, only the activity of rat CYP2C forms in liver microsomal samples of rats given free LPS appeared to exhibit a small, but significant tendency to increase.

**CONCLUSION:** The results show that the p.o. administration of probiotics to rat does not markedly influence the rat hepatic CYP enzymes.

#### Abbreviations & Units:

CYP	- cytochrome P450
EcN	- probiotic <i>E. coli</i> Nissle 1917 O6:K5:H1
EFC	- 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin
ETR	- 7-ethoxyresorufin
HPLC	- high performance liquid chromatography
LPS	- bacterial lipopolysaccharide

## INTRODUCTION

The processes of absorption in the digestive tract are a key step in the oral delivery of a drug. Orally administered drugs have to pass epithelial cell layer consisting of enterocytes (in the case of small intestine) or colonocytes (in the colon). Intestinal cells have a variety of specific features as tight junctions, influencing paracellular permeability, or a presence of a variety of drug transporters or enzymes metabolizing xenobiotics which can effectively affect the entry of drugs into the bloodstream (Krizkova *et al.* 2008).

Another factor which can affect the absorption of drug from gastrointestinal tract is bacterial composition of the gut. Gut bacterial (commensal) microflora consists of about hundred trillions of cells of more than five hundred different bacterial species which can be divided as being either beneficial or potentially pathogenic due to their metabolic activities and fermentation end-products (Guarner & Malagelada, 2003). On the other hand, probiotics – contrary to the commensal microorganisms – can be defined as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” ([www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm](http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm)). The effects of probiotics should be hence beneficial including e.g. prevention of antibiotic-associated diarrhea, eradication of *C. difficile* infection and enhancement of intestinal immunity (Preidis & Versalovic, 2009). However, being present in the intestine, the probiotics could in principle also interfere with processes determining bioavailability of orally administered drugs, namely, with drug biotransformation by enzymes acting in the gastrointestinal tract and in the liver.

Among enzymes involved in drug metabolism, cytochromes P450 are the most important being responsible for more than three quarters of known biotransformation pathways during the first phase of drug metabolism (Evans & Relling, 1999). The aim of this work was to prove whether the presence of probiotic bacteria (*Escherichia coli* strain Nissle 1917) in the gut may influence the amount and activity of cytochrome P450 (abbrev. CYP) enzymes. The probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 has been reported to maintain remission of ulcerative colitis and pouchitis or to prevent colitis in different murine models of colitis (Rembacken *et al.* 1999; Schultz *et al.* 2004). To date, several reports on the influence of probiotic bacteria and of the lipopolysaccharide endotoxin derived from them on activities of liver CYP enzymes were published (reviewed in Yang & Lee, 2008). However, the doses applied as well as the

route of administration did not correspond to the usual route in the man being intravenous or intraperitoneal instead of oral. Hence, there is a need of obtaining the data on possible effect of probiotics on drug metabolizing enzyme activities which will help in evaluating the possibility of probiotic-drug interaction in the man.

## MATERIAL AND METHODS

**Material.** All reagents and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic) if not stated otherwise. The CYP3A1 and CYP2C6 antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-rat CYP1A2 antibody was obtained from Daichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan). Anti-human CYP2C9 antibody was acquired from BD Gentest (Woburn, MA). The chemiluminescence kit for Western blotting (Immun Star) was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA), and the nitrocellulose membrane was obtained from Amersham Biosciences UK, Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Luciferin-ME EGE was obtained from Promega (through East Port Scientific, Prague, CZ), Miniprotean electrophoresis and Western blotting apparatus was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). The TECAN Infinity absorbance/fluorescence/luminescence reader (Tecan, Vienna, Austria) was used for detection of the respective spectral data. HPLC-UV analyses were performed on Shimadzu LC-20A Prominence (Kyoto, Japan).

### Methods

**Preparation of samples.** Live bacterial suspension of *E. coli* Nissle 1917 O6:K5:H1 (abbrev. EcN) was applied to female Wistar rats ( $10^{11}$  CFU/dose, orally). Four rats were stressed by oral application of the saline solution daily for 14 days. This group was used as control. The probiotic was applied daily to four animals for 14 days; four rats were given the probiotic only once, the last day of the experiment. To evaluate the effect of bacterial lipopolysaccharide (abbrev. LPS), the LPS isolated by phenol extraction from the same *E. coli* strain Nissle was given orally to fourth group of animals as an EcN-free supernatant containing 150 µg of free LPS per mL. The LPS was applied to three rats daily for 14 days.

After 14 days the rats were sacrificed and livers were removed and weighted. The liver samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C until used. The protocol of the experiment was approved by the institutional Ethics Committee. For preparation of liver microsomes, the liver samples were rinsed in cold 0.25 M sucrose in 1 mM EDTA (pH 7.4). The tissue was then homogenized and subjected to differential centrifugation to obtain the microsomal fraction according to standard procedures (Bruyere *et al.* 2009).

**Determination of total protein and cytochrome P450.** Total protein content was determined by bicinchoninic acid method with a standard BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL). Determination was done in three

parallels using a calibration curve using bovine serum albumin as a standard. Differences between determinations were below 15%. Cytochrome P450 content was determined by the method described by Omura & Sato, (1964).

**Western blotting.** Microsomal proteins from liver (10 µg) were separated on 8%-SDS (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes according to the method of Towbin *et al.* (1979). Immunodetection of CYP was achieved by anti-rat CYP1A2, anti-rat CYP2C6 and anti-rat CYP3A1 as the primary antibodies. For detection of CYP2C11, the anti-human CYP2C9 antibody was used. The bands were visualized with respective peroxidase-conjugated secondary antibodies and their relative intensity was evaluated with Elfoman (Semecky Inc., Prague, Czech Republic) software.

**Determination of activities of individual CYP forms.** The activities and relative amounts of selected CYP enzymes were followed by established enzymological techniques based on analogy between human and rat forms and their respective substrates: 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation (substrate of CYP1A2) (Chang & Waxman, 1998, Siskova *et al.*, 2008); 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin *O*-deethylation (substrate of CYP2B6) (Donato *et al.* 2004); diclofenac 4'-hydroxylation (substrate of CYP2C9) (Crespi *et al.* 1998), coumarin 7-hydroxylation (substrate of CYP2A6) (Soucek, 1999); luciferin-ME EGE 6'-dealkylation (substrate of CYP2D6) (Promega Technical Bulletin No. 325, <http://www.promega.com>); and testosterone 6β-hydroxylation (substrate of CYP3A4) (Guengerich *et al.* 1986). Tecan Infinite reader was used for fluorescence detection of products of 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation (excitation at 535 nm, emission at 585 nm), 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin *O*-deethylation (excitation at 410 nm, emission at 510 nm), coumarin 7-hydroxylation (excitation at 360 nm, emission at 465 nm) and for luminescence detection of product of luciferin-ME EGE 6'-dealkylation. The metabolites of diclofenac 4'-hydroxylation and testosterone 6β-hydroxylation were measured by an HPLC with UV detection using C-18 analytical reversed phase column (250 x 4 mm i.d., 5 µm particle size, Merck, Darmstadt, Germany). To the determination of metabolite of diclofenac 4'-hydroxylation was used mobile phase consisted of two solvents, A (2 mM perchloric acid in an acetonitril in a ratio 7:3 (v/v)) and B (methanol) with the following gradients: 0 min, 30% B; 20 min, 100% B; 22 min, 100 % B; 23 min, 30% B; 33 min, 30% B. The flow rate was set at 1 ml/min. The temperature of oven was set at 50°C and absorbance was monitored at 280 nm. Testosterone 6β-hydroxylation was measured in an isocratic mode. Mobile phase contained 64% methanol and the flow rate was set at 1 ml/min. The temperature of oven was set at 30°C and absorbance was monitored at 245 nm; 50 µl of samples were injected. Enzyme activities were expressed both as nmol product/min/mg

microsomal protein and as nmol product/min/nmol total CYP, i.e. as specific CYP activity.

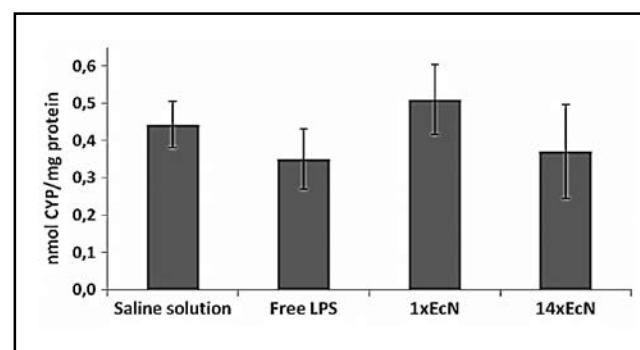
## RESULTS AND DISCUSSION

**Total content of protein and of the CYP enzymes; Western blot analyses of protein expression of individual CYP forms.** Application of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 either once, or for 14 consecutive days as well as application of LPS-containing supernatant did not lead to significant changes in the protein content in livers of experimental animals (**Tab. 1**). Similarly, also the total content of the CYP enzymes did not change markedly; the specific content of cytochrome P450 enzymes expressed as ratio of total CYP to total protein content shows only a tendency to decrease in samples from rats given *E. coli* for 14 days or from rats to which the LPS was administered (**Fig. 1**). Hence, the main functional parameters of the liver microsomal drug metabolizing CYP system do not indicate any significant influence of probiotic which could alter the ability of these systems to metabolize concomitantly administered drugs.

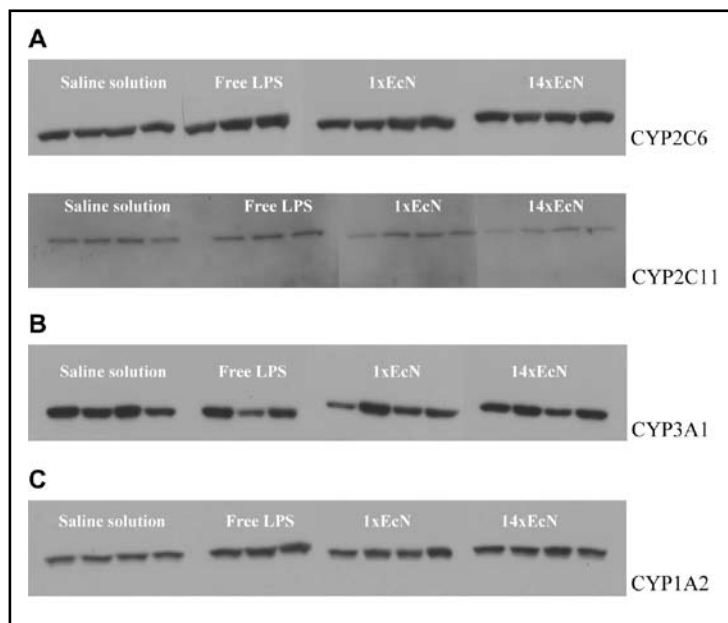
Western blots have shown minor, however detectable changes in expression of CYP proteins (Fig. 2A, B, C). The expression of rat CYP2C forms, CYP2C6 and human CYP2C9-like rat protein, according to literature data (Wang *et al.* 2009) and according to BLAST ([www](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

**Table 1.** The protein content in rat liver microsomes obtained after treatment with bacterial lipopolysaccharide daily for 14 days (Free LPS) and *E. coli* Nissle 1917 in single dose (1xEcN) or daily for 14 days (14xEcN). Control rats were treated with the saline solution daily for 14 days.

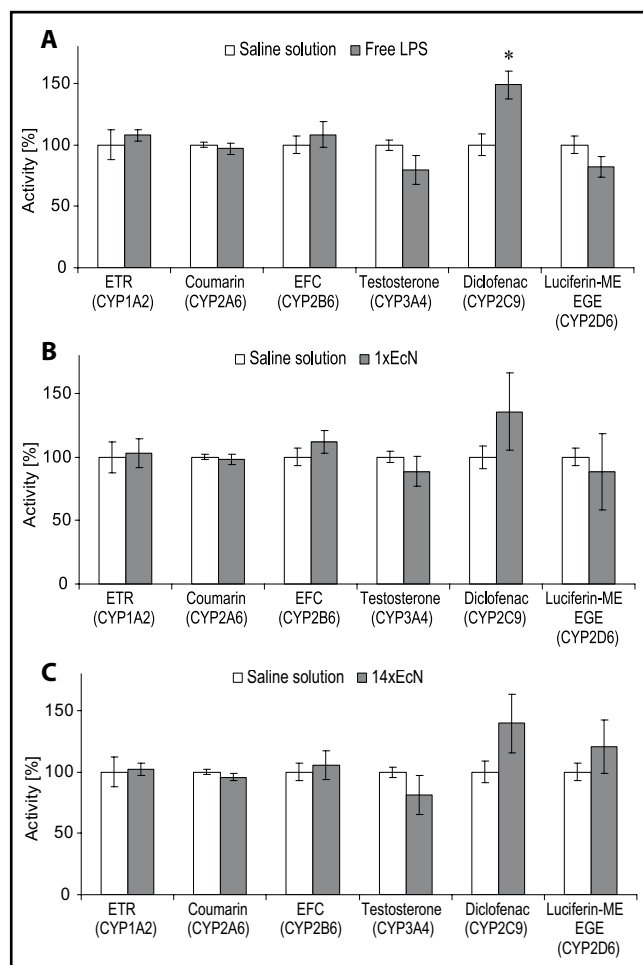
	Protein [mg/ml]	
	Average	S.D.
Saline solution	33.30	4.33
Free LPS	33.89	3.44
1xEcN	33.37	5.36
14xEcN	30.60	4.11



**Figure 1.** The total content of the cytochrome P450 (CYP) is expressed as nmol CYP/mg protein. The rats were treated with bacterial lipopolysaccharide daily for 14 days (Free LPS) and *E. coli* Nissle 1917 in single dose (1xEcN) or daily for 14 days (14xEcN). Control rats were treated with the saline solution for 14 days. The bars express the ± S.D. (N=4).



**Figure 2.** Western blots of expression of cytochromes P450 (CYP) from rat liver. Expression of CYP2C6 and human CYP2C9-like rat protein CYP2C11 (A), CYP3A1 (B) and CYP1A2 protein (C) are shown. The rats were treated with bacterial lipopolysaccharide daily for 14 days (Free LPS), and *E. coli* Nissle 1917 in 1 dose (1xEcN) or daily for 14 days (14xEcN). Control rats were treated with the saline solution for 14 days.



**Figure 3.** Specific activities of CYP enzymes in rat liver microsomes after treatment with bacterial lipopolysaccharide daily for 14 days (Free LPS; A) and *E. coli* Nissle 1917 in a single dose (1xEcN; B) or daily for 14 days (14xEcN; C). Control samples were obtained by treatment with the saline solution for 14 days. The activity of rat CYP2C form (corresponding to human CYP2C9) significantly increased vs. control (\*\*\*)  $p < 0.05$  after application free LPS (A). The results presented as means  $\pm$  S.D.,  $N = 4$ ; ETR, 7-ethoxyresorufin; EFC, 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin.

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) structurally corresponding to CYP2C11 (Fig. 2A), exhibits a slight increase in expression in samples obtained after administration of the LPS, and, in the case of CYP2C6, a slight increase in protein expression also after administration of the probiotic strain in comparison to control.

For the CYP3A1 protein (Fig. 2B), a small degree of decrease is observed for all samples (after treatment with LPS, the probiotic for 1 or 14 days). On the contrary, an apparent increase of CYP1A2 protein (Fig. 2C) can be traced after administration of LPS; application of probiotic for 1 or 14 days caused only minor changes relatively to the controls. In a summary, the differences in expression of CYP proteins after administration of probiotic or LPS are not uniform, some forms exhibit a slight increase in expression (CYP2C proteins, CYP1A2), other a minor decrease (CYP3A1).

**Enzyme activities of liver microsomal CYP forms.** Fig. 3A shows all six activities determined (using substrates prototypic of the corresponding human CYP forms) in liver microsomal samples obtained after treatment of experimental animals with bacterial LPS. A relatively significant increase ( $p < 0.05$ ) of activity has been observed with diclofenac, substrate of human CYP2C (2C8, 2C9, 2C10, 2C18, 2C19) as well as of rat CYP2C forms (2C6, 2C11) (Masubuchi *et al.* 2001; Bruyere *et al.* 2009). The increase in this CYP2C activity is in line with an observed increase in CYP2C protein expression (Fig. 2A). Similarly, also a decrease in the CYP3A4 prototypic activity (testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation) is in line with the results of Western blots (expression of rat CYP3A1, Fig. 2B); a slight but nonsignificant increase in the CYP1A2 prototypic activity (7-ethoxyresorufin O-deethylation) most probably reflects a corresponding increase in expression of the CYP1A2 protein (Fig. 2C).

Fig. 3B shows all six activities determined in liver microsomal samples again, but obtained after treatment of experimental animals with only single dose of EcN. Changes of CYP activities are not significant even in the case of diclofenac (the substrate of human CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10, CYP2C18 and CYP2C19 as well as of rat CYP2C6 and CYP2C11) (Masubuchi *et al.* 2001; Bruyere *et al.* 2009). A tendency of a decrease of the CYP3A4 prototypic activity (testosterone

6 $\beta$ -hydroxylation) is in line with the results of Western blots (Fig. 2B). A slight increase in the CYP1A2 prototypic activity (7-ethoxyresorufin O-deethylation) is correspondent with an increase in expression of the CYP1A2 protein (Fig. 2C).

Fig. 3C represents similar changes of activities of CYP enzymes as described in the former cases. These samples were obtained after application of EcN to experimental animals daily for 14 days. The greatest change of CYP activity is with diclofenac 4'-hydroxylation (substrate of rat CYP2C6 and CYP2C11 protein); however, this change is statistically not significant. The figure shows also a decrease of the CYP3A4 prototypic activity (testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation) and a very slight increase of the CYP1A2 prototypic activity (7-ethoxyresorufin O-deethylation) which is in line with an observed increase of levels of expressed CYP1A2 protein (Fig. 2C).

In a summary, six substrates of CYP enzymes was used to find changes of specific rat CYP activities after administration of bacterial LPS for 14 days, and EcN in only single dose or daily for 14 days consecutively. The activity of rat CYP2C forms (CYP2C6 and CYP2C11) in liver microsomal samples of rats given LPS containing supernatant appeared to exhibit an increase. A tendency of a decrease in the CYP3A4 activity and of the CYP3A1 protein expression is apparent for testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation. This conclusion is important for evaluation of possible changes in drug metabolism after intake of the probiotics in human food showing that there is most likely either little or no influence of probiotics to liver drug metabolism by CYP enzymes.

## Acknowledgements

Financial support from Grant Agency of Czech Republic (305/08/0535 and 303/09/H048) is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- 1 Bruyere A, Declèves X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, *et al.* (2009). Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica*. **39**: 22–32.
- 2 Chang TKH, Waxman DJ (1998). Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with ethoxyresorufin as a substrate. In: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ: Humana. p. 103–122.
- 3 Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ (1998). Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. In: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ: Humana. p. 129–133.
- 4 Donato MT, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2004). Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. **32**: 699–706.
- 5 Evans WE, Relling MV (1999). Pharmacogenomics: Translating function genomics into rational therapeutics. *Science*. **286**: 487–491.
- 6 FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- 7 [www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm](http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm), accessed June 12, 2009.
- 8 Guarner F, Malagelada JR (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*. **361**: 512–519.
- 9 Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ (1986). Characterization of rat human-liver microsomal cytochrome-P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic-polymorphism in oxidative drug-metabolism. *J Biol Chem*. **261**: 5051–5060.
- 10 Krizkova J, Burdova K, Hudecek J, Stiborova M, Hodek P (2008). Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds. *Neuroendocrinol Lett*. **29**: 717–721.
- 11 Masubuchi Y, Ose A, Horie T (2001). Mechanism-based inactivation of CYP2C11 by diclofenac. *Drug Metab Disposition*. **29**: 1190–1195.
- 12 Omura T, Sato R (1964). The carbon-monoxide binding protein of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. **239**: 2370–2378.
- 13 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA*. **76**: 4350–4353.
- 14 Preidis GA, Versalovic J (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*. **136**: 2015–2031.
- 15 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *The Lancet*. **354**: 635–639.
- 16 Schultz M, Strauch UG, Linde HJ, Watzl S, Obermeier F, Gottl C, *et al.* (2004). Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol*. **11**: 372–378.
- 17 Siskova J, Hudecek J, Hodek P, Frei E, Schmeiser H, Stiborova M (2008). Human cytochromes P450 1A1 and 1A2 participate in detoxication of carcinogenic aristolochic acid. *Neuroendocrinol Lett*. **29**: 733–737.
- 18 Soucek P (1999). Novel sensitive high-performance liquid chromatographic method for assay of coumarin 7-hydroxylation. *J Chromatogr B*. **734**: 23–29.
- 19 Wang H, Cheng JD, Montgomery D, Cheng KC (2009). Evaluation of the binding orientations of testosterone in the active site of homology models for CYP2C11 and CYP2C13. *Biochem Pharmacol*. **78**: 406–413.
- 20 Yang KH, Lee MG (2008). Effects of endotoxin derived from *Escherichia coli* lipopolysaccharide on the pharmacokinetics of drugs. *Arch Pharm Res*. **31**: 1073–1086.



## 2. Publikace

**Matuškova Z, Tunková A, Anzenbacherová E, Večeřa R, Šiller M, Tlaskalová-Hogenová H, Zídek Z, Anzenbacher P. Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats. Neuroendocrinol Lett 2010; 31(Suppl 2): 46-50. IF(2010): 1,621.**

# Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats

Zuzana MATUŠKOVÁ<sup>1</sup>, Alena TUNKOVÁ<sup>1</sup>, Eva ANZENBACHEROVÁ<sup>2</sup>,  
Rostislav VEČEŘA<sup>1</sup>, Michal ŠILLER<sup>1</sup>, Helena TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ<sup>3</sup>,  
Zdeněk ZÍDEK<sup>4</sup>, Pavel ANZENBACHER<sup>1</sup>

- 1 Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic
- 2 Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic
- 3 Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic
- 4 Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DSc.  
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
Palacky University, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic.  
TEL: +420-585 632 569; FAX: +420-585 632 966;  
E-MAIL: pavel.anzenbacher@upol.cz

Submitted: 2010-09-10 Accepted: 2010-11-22 Published online: 2010-00-00

Key words: probiotic; *Escherichia coli*; cytochrome P450; rat intestine

Neuroendocrinol Lett 2010; 31(Suppl.2):46-50 PMID: 21187832 NEL31S210A07 © 2010 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

## Abstract

**OBJECTIVES:** The aim of the study was to find whether probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 O6:K5:H1 (EcN) influences the expression of cytochromes P450 (CYP) in the rat intestine. **DESIGN:** Live bacterial suspension of EcN was administered to healthy male Wistar rats daily for 7 days. Control group of rats was stressed by oral application of the saline solution daily for 7 days as well. Sections of the duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon have been taken from each experimental animal. With all individual samples, microsomal fraction has been prepared and expression of selected CYPs was determined by Western blotting. The levels of expression of CYPs were also evaluated by mRNA using real-time PCR. **RESULTS:** It was found that there are changes in expression of CYP enzymes studied along the intestine. CYP1A1, 2B1/2 and 2E1 are present mainly in the duodenum and jejunum; on the other hand, CYP2C6 is expressed mainly in the caecum and colon. CYP3A was found all over the rat intestine. The results show that there are no prominent differences between control samples and samples with EcN, only the expression of CYP3A protein in the duodenum appears to exhibit a clear tendency to decrease. In the case of the colon, a significant increase in the expression of CYP3A (most likely CYP3A1) after treatment of rats with EcN was found. **CONCLUSION:** This *in vivo* study revealed that the levels of colon CYP3A could be significantly increased in rats treated with probiotic EcN. On the contrary, the expression of CYP3A in the duodenum decreased. However, the changes in the expression of CYP enzymes are probably not as extensive to be clinically important in man; hence, most likely the probiotic EcN has little influence on the intestinal drug metabolism by CYP enzymes.

**Abbreviations:**

CYP	- Cytochrome P450
EcN	- Probiotic <i>E. coli</i> Nissle 1917 O6:K5:H1
LPS	- Bacterial lipopolysaccharide

**INTRODUCTION**

The epithelial lining of the intestine is a complex and dynamic tissue that is responsible for maintaining the barrier and absorptive functions of the gastrointestinal tract (Kojima *et al.* 2004). Probiotics are microbial organisms which, when they are administered in adequate amounts, have beneficial effects on the gastrointestinal tract (Schlee *et al.* 2007).

*Escherichia coli* are microorganisms which can be pathogenic (causing a wide range of gastrointestinal infections) and nonpathogenic (used as a probiotic against a variety of intestinal disorders) (Hancock *et al.* 2010). Both nonpathogenic and pathogenic *E. coli* strains are able to colonize the gut and are well adapted to the conditions found in the large intestine. *Escherichia coli* Nissle 1917 with serotype O6:K5:H1 (abbrev. EcN) is a typical example of a nonpathogenic strain which is marketed under the name Mutaflor (Grozdanov *et al.* 2004). These gramnegative bacteria possess a lipopolysaccharide (LPS) which is a key component of their outer membrane. LPS chemical structure comprises three regions: a lipid (called lipid A), an internal oligosaccharide bound to lipid A by 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid, and specific O-chain bound to the internal oligosaccharide (Brabetz *et al.* 2000; Pupo & Hardy 2009). However, the EcN has a special O6 antigen oligosaccharide corresponding to the so-called biological repeating unit which is assembled on a lipid carrier and then polymerized in the O-antigen. A defect in the O-antigen polymerase gene may result in the inability of the enzyme to produce a polysaccharide and thus give rise to a semirough-type LPS, like LPS of EcN. (Grozdanov *et al.* 2002).

According to the literature data, probiotics can ameliorate the function of liver in humans with hepatic cirrhosis (Lata *et al.* 2006), they can assist in a therapy of a habitual constipation and diverticular illness of colon and in a therapy of a mycotic infection, nonspecific intestinal inflammation and they are suitable to a regeneration of an intestinal microflora after therapy by antibiotics (Stibůrek *et al.* 2009). Probiotics have a wide spectrum of the use; however, they could, in principle, also interfere with processes determining bioavailability of orally administered drugs, namely, with drug biotransformation by cytochrome P450 (CYP) enzymes. These enzymes are monooxygenases metabolizing xenobiotics and endogenous substrates (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001; Hodek *et al.* 2009) and they in fact comprise the major drug-metabolizing enzyme system in humans, accounting for the metabolism of many clinically useful medications (Bai & Liu 2005). The CYP enzymes are localized mainly in the liver as

well as in the other tissues and organs such as the intestine (Paine *et al.* 2006; Křížková *et al.* 2008). Therefore the aim of this work was to prove whether the presence of probiotic bacteria EcN in the rat gut may influence the expression of intestinal CYP enzymes.

**MATERIAL & METHODS**Material

All reagents and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich CZ (Prague, Czech Republic) if not stated otherwise. Other chemicals as sodium chloride, potassium chloride, hydrochloric acid, potassium hydroxide, EDTA, sucrose and methanol, which were used for isolation of microsomal fraction and Western blotting, were purchased from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Glycerol that was used as a cryoprotectant was obtained from Merck (Prague, Czech Republic). Protease inhibitor cocktail tablets were obtained from Roche (Mannheim, Germany). Mouse anti-rat CYP3A1, 2B1/2 and 2C6 monoclonal antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Goat anti-rat CYP1A1 polyclonal and rabbit anti-human CYP2E1 monoclonal antibodies were obtained from Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan). Rabbit anti-rat Villin polyclonal antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). The chemiluminescence kit for Western blotting (Immun Star) was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA) and the nitrocellulose membrane was obtained from Amersham Biosciences UK, Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and Miniprotean electrophoresis and Western blotting apparatus was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). The TECAN Infinity absorbance/fluorescence/luminescence reader (Tecan, Vienna, Austria) was used for detection of the respective spectral data.

Preparation of samples

Live bacterial suspension of probiotic *E. coli* Nissle 1917 O6:K5:H1 (abbrev. EcN) was administered ( $10^{10}$  CFU/dose, orally) to male Wistar rats (body weight 400–580 g). Four rats were stressed by oral application of the saline solution daily for 7 days. This group was used as the control one. The probiotic was applied daily to six animals for 7 days as well.

After 7 days the rats were sacrificed. The duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon were removed and weighted. The intestinal samples were frozen on the dry ice and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. The protocol of the experiment was approved by the institutional Ethics Committee. For preparation of intestinal microsomes, the intestinal samples were rinsed in cold 0.25 M sucrose in 1 mM EDTA (pH 7.4) with a phenylmethanesulfonyl fluoride and a protease inhibitor cocktail. The tissue was then homogenized and subjected to differential centrifugation to obtain the microsomal fraction according to standard procedures (Lake 1990).

Determination of total protein

Total protein content was determined by bicinchoninic acid method with a standard BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL). Determination was done in three parallels using a calibration curve with human serum albumin as a standard. Differences between determinations were below 15%. Content of CYP was determined by the method described by Omura and Sato (1964).

Western blotting

Microsomal proteins from all various parts of the intestine (35 µg) obtained from all experimental rats were separated on 8%-SDS (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes according to the method of Towbin *et al.* (1979). Immunodetection of CYP was achieved by anti-rat CYP1A1, anti-rat CYP2C6, anti-human CYP2E1, anti-rat CYP2B1/2 and anti-rat CYP3A1 as the primary antibodies. For reference, a villin was detected using a polyclonal antibody (1:500). The bands were visualized with respective peroxidase-conjugated secondary antibodies and their relative intensity evaluated with Elfoman (Semecky Inc., Prague, Czech Republic) software.

RNA isolation and real-time PCR procedures

A sample of about 30 mg of each rat intestinal tissue was stabilized in RNA later® (Quiagen, Germantown, MD, USA) and subsequently homogenized with homogenizer DiAx 900, Heidolph, Kelheim, Germany). The sample was then applied onto the QIAshredder columns to eliminate tissue microparticles. RNA was isolated with use of RNeasy® Plus Minikit (Quiagen, Germantown, MD, USA) enabling degradation of contaminating genomic DNA. One microgram of each isolated RNA was subjected to reverse-transcription using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) with random hexamer primers.

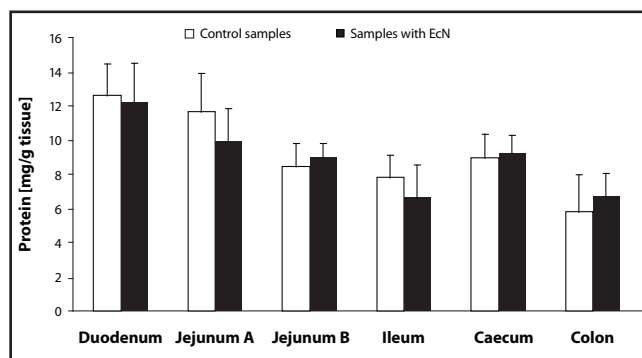
New synthesized cDNA was applied for real-time PCR using Light Cycler® 480 SYBR Green Master I mix in a Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) with the following thermal cycling conditions: preincubation for 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s, 58 °C for 15 s and 72 °C for 15 s for denaturation, annealing and elongation. All samples for real-time PCR were prepared in triplicates. Rat primers were designed in our laboratory and synthesized by Invitrogen (LifeTechnologies, division Prague, Czech Republic). Absolute quantification method was applied for obtaining gene expression data. The following primer sequences were used:

CYP2B1/2 Fw: 5'-TCC CAG GGA GCC CCA CTG GAT CCC A-3'  
 CYP2B1/2 Rev: 5'-GAA CCC AGA GAA GAA CTC AAA CAC CTG G-3'  
 CYP2C6 Fw: 5'-GCC TTG TGG AGG AAC TGA GG-3'  
 CYP2C6 Rev: 5'-GCA CAG CCC AGG ATA AAC GT-3'  
 CYP2E1 Fw: 5'-CCA AGG GTA CAG TTG TGA TTC CAA C-3'  
 CYP2E1 Rev: 5'-CAA CAC ACA CAC GCT TTC CTG CAG A-3'  
 CYP3A1 Fw: 5'-GTG CTC CTC TAC GGA TTT GGG A-3'  
 CYP3A1 Rev: 5'-TCC ACA TCG AAT TTC CAT AAA CCC-3'

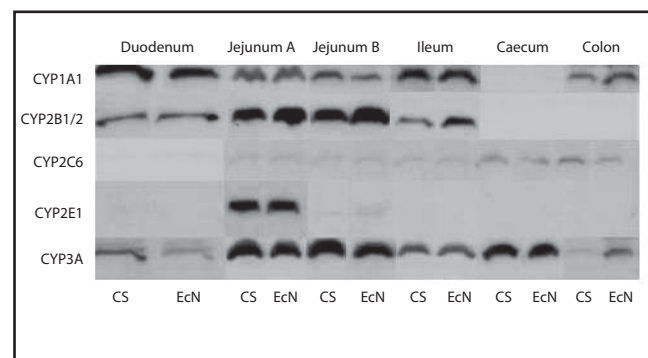
**RESULTS AND DISCUSSION**

Application of probiotic EcN to rats for 7 consecutive days led to a result showing no changes in the protein content in all parts of the intestine of experimental animals (Figure 1).

Representative Western blots have shown that the expression of CYP enzymes differed through individual parts of the intestine (Figure 2). The expression of rat CYP3A was found all over the intestine (from duodenum to colon) of all experimental animals. The relative content of immunoreactive CYP3A protein in the duodenum of rats after treatment with EcN was lowered to approximately 60 % compared with control samples.



**Fig. 1.** The protein content in the intestinal microsomes in rats after treatment with probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Control rats were treated with the saline solution. The results are presented as means ± S.D.; N ≥ 4.



**Fig. 2.** Representative Western blots of all analyzed P450 enzymes. CYP3A: two immunoreactive bands were detected after incubation with CYP3A1 antibody used. The double band was detected in all samples as well as in the liver (data not shown), suggesting cross-reactivity with other isoforms of the CYP3A family. For data evaluation, the density of both bands was taken and named CYP3A. For reference, a villin was detected using a polyclonal antibody (data not shown).

This result has not been confirmed by real-time PCR method, because the whole duodenum (very small part of the intestine) was used for Western blotting experiment. The changes in the expression of CYP3A in the jejunum (the longest part of intestine, therefore it was divided into two parts, A and B), ileum and caecum after administration of probiotic EcN were not markedly changed and these findings were also supported by results obtained by real-time PCR method (Figure 3). On the other hand, a statistically significant change in protein expression was found in the case of the CYP3A enzyme in the colon of rats pretreated with EcN (Figure 2). The CYP3A form level was increased on average by about 50 % in comparison to the CYP3A protein level in control samples. Also, real-time PCR analysis detected significantly higher levels of CYP3A1 mRNA in these samples (Figure 3).

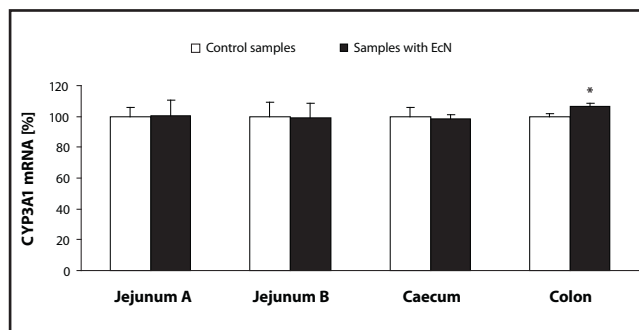
The expression of cytochrome P450 2B1/2 was detected by Western blotting mainly in the duodenum, jejunum and ileum; its presence in the caecum and colon was not detected (Figure 2). The expression of CYP2B1/2 in rats after treatment with probiotic EcN was slightly increased compared with control samples. This statistically nonsignificant change was however

not proved by real-time PCR method, where no prominent changes were detected (Figure 4).

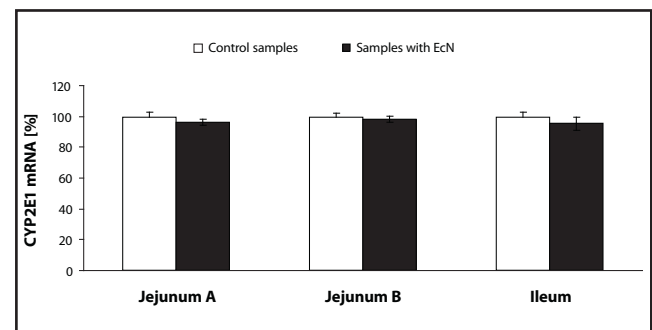
Similarly, the CYP2E1 enzyme is present mainly in the duodenum and jejunum. It was also detected in the ileum, but in the lower extent (Figure 2). No significant changes in the expression of CYP2E1 were found in the duodenum, jejunum and ileum in rats after administration of EcN in comparison to control samples. The same results were obtained by Western blotting as well as by real-time PCR method (Figure 5).

In case of the CYP2C6, a small decrease in protein level was observed only in the caecum (after treatment with probiotic EcN) (Figure 2). The caecum is the major site of expression of the CYP2C6 enzyme, however, the change in the expression of CYP2C6 was detectable, but not significant. A nonsignificant change in the expression of CYP2C6 was also confirmed in the real-time PCR experiment (Figure 6).

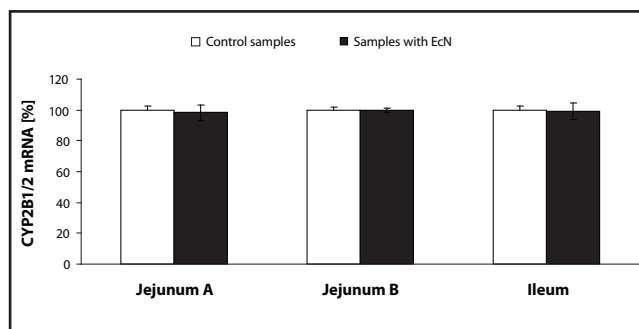
Expression of the CYP1A1 enzyme was also studied in all parts of the intestine. The CYP1A1 protein was detected in the duodenum, jejunum, ileum, and colon by Western blotting (Figure 2). No significant changes in the expression of CYP1A1 were found after treatment of rats with probiotic EcN. Changes in the expres-



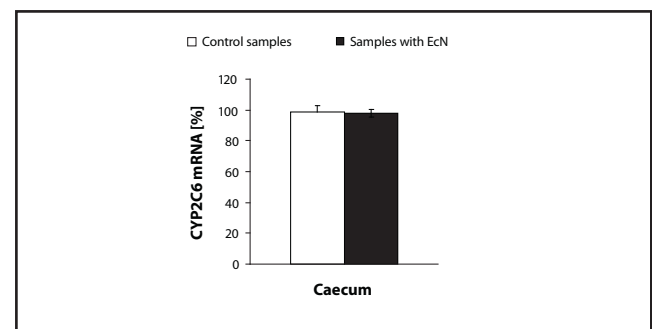
**Fig. 3.** The CYP3A1 mRNA level in the rat jejunum, caecum and colon after treatment of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. The CYP3A1 mRNA level in the colon in rats after administration of EcN significantly increased vs. control (\* $p < 0.05$ ). The results are presented as means  $\pm$  S.D.;  $N \geq 4$ .



**Fig. 5.** The CYP2E1 mRNA level in the rat jejunum and ileum after treatment of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. The results are presented as means  $\pm$  S.D.;  $N \geq 4$ .



**Fig. 4.** The CYP2B1/2 mRNA level in the rat jejunum and ileum after administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. The results are presented as means  $\pm$  S.D.;  $N \geq 4$ .



**Fig. 6.** The CYP2C6 mRNA level in the rat caecum after administration of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. The results are presented as means  $\pm$  S.D.;  $N \geq 4$ .

sion of CYP1A1 were not measured by real-time PCR method either.

It should be noted here that the experiments were performed *in vivo* with rat experimental model and this is why the results have shown in principle a great variability. The greatest differences among the biological samples within one group were with expression of the CYP1A1. Despite the variability among the biological samples, the tendencies and statistical significance are clear. For example, a measurable decrease in the expression of CYP3A in the duodenum and as well as an increase in CYP3A expression in the colon after treatment of rats with probiotic EcN could be seen. In fact the rat CYP3A forms (3A1, 3A2, 3A9, 3A18 and 3A23) are similar to human CYP3A4 and CYP3A5 (Matsubara *et al.* 2004). The human CYP3A4 is known as the most important CYP enzyme of drug metabolism in humans (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001). The human CYP3A4 is a major CYP enzyme present in critical tissues such as the liver, gastrointestinal tract, brain (Tanaka 1999). Therefore, there could be a risk of potential drug interaction of probiotic with concomitantly administered drugs metabolized by this enzyme. However, the changes in the expression of CYP3A form (most likely CYP3A1) in the duodenum and colon found in this work will have probably no relevance in clinical practice. In addition, the question whether any other factors (such as age or sex) influence an action of probiotic EcN in the gut (for example by change in the expression of CYP enzymes) has not been answered yet. These questions are very important, because nowadays the consumption of probiotics became more popular among people of all age.

In conclusion, in this work, the influence of probiotic EcN on the expression of intestinal CYP1A1, 2B1/2, 2C6, 2E1 and 3A was studied. This *in vivo* study revealed that treatment of rats with EcN did not have a prominent influence on the expression of intestinal CYP enzymes. However, the results indicate that the levels of colon CYP3A1 could be significantly increased in rats treated with probiotic EcN. On the contrary, the expression of CYP3A in the duodenum apparently decreased. This conclusion is important for evaluation of possible changes in the intestinal drug metabolism after administration of the probiotics in human food.

## ACKNOWLEDGMENT

Financial support from Grant Agency of Czech Republic (305/08/0535, 303/09/H048) and IGA UPOL 911100071/31 is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life. Sci.* **58**: 737–747.
- Bai X-B, Liu Ch-X (2005). Overview of major CYP450 isoforms and „Coctail Approach“. *Asian journal of drug metabolism and pharmacokinetics.* **5**(4): 257–264.
- Brabetz W, Schirmer ChE, Brade H (2000). 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferase of *legionella pneumophila* transfers two Kdo residues to a structurally different lipid A precursor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* p. 4654–4657.
- Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, Knirel YA, Schombel U, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Rietschel ET, Dobrindt U (2002). A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **184**(21): 5912–5925.
- Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U (2004). Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**(16): 5432–5441.
- Hancock V, Dahl M, Klemm P (2010). Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 out-competes intestinal pathogens during biofilm formation. *J Med Microbiol.* **59**: 392.
- Hodek P, Tepla M, Krizkova J, Sulc M, Stiborova M (2009). Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuroendocrinol Lett.* **30**(Suppl 1): 67–71.
- Kojima K, Musch MW, Ropeleski MJ, Boone DL, Ma A, Chang EB (2004). *Escherichia coli* LPS induces heat shock protein 25 in intestinal epithelial cells through MAP kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**: G645–G652.
- Křížková J, Burdová K, Hudeček J, Stiborová M, Hodek P (2008). Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds. *Neuroendocrinol Lett.* **29**: 717–721.
- Lake BG in: *Biochemical toxicology. A practical approach* (Snell K, Mullock B, Eds) kap. 8, IRL press, Oxford (1990) 183–215.
- Lata J, Juránková J, Příbramská V, Frič P, Šenkyřík M, Dítě P, Kroupa R (2006). Vliv podání *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) na střevní osídlení, endotoxemii, funkční stav jater a minimální jaterní encefalopatii u nemocných s jaterní cirhózou. *Vnitřní lékařství.* **3**: 215–219.
- Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y (2004). Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**(3): 1282–1290.
- Omura T, Sato R (1964). The carbon-monoxide binding protein of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* **239**: 2370–2378.
- Paine MF, Hart HK, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC (2006). The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *DMD.* **34**: 880–886.
- Pupo E, Hardy E (2009). Complexity and solutions to the isolation problem of Gram negative lipopolysaccharides' bacteria molecular species. *Biotechnologia Aplicada.* **26**: 9–15.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K (2007). Induction of human -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and immunity.* **75**(5): 2399–2407.
- Stibůrek O, Příbramská V, Lata J (2009). Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob. *Interní Med.* **11**(1): 25–29.
- Tanaka E (1999). Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* **24**: 339–346.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Nat Acad Sci USA.* **76**: 4350–4353.

### 3. Publikace

**Matušková Z, Šiller M, Tunková A, Anzenbacherová E, Zacharová A, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z, Anzenbacher P. Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and the activity of cytochromes P450 and on the CYP mRNA level in the intestine and the liver of male rats. Neuroendocrinol Lett 2011; 32(Suppl 1): 8-14. IF(2011): 1,296.**

# Effects of *Lactobacillus casei* on the expression and the activity of cytochromes P450 and on the CYP mRNA level in the intestine and the liver of male rats

Zuzana MATUŠKOVÁ<sup>1</sup>, Michal ŠILLER<sup>1</sup>, Alena TUNKOVÁ<sup>1</sup>,  
Eva ANZENBACHEROVÁ<sup>2</sup>, Alice ZACHAŘOVÁ<sup>1</sup>, Helena TLASKALOVÁ HOGENOVÁ<sup>3</sup>,  
Zdeněk ZÍDEK<sup>4</sup>, Pavel ANZENBACHER<sup>1</sup>

1 Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

2 Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

3 Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

4 Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

*Correspondence to:* Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DSc.  
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
Palacky University, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic.  
TEL: +420-585 632 569; FAX: +420 585 632 966; E-MAIL: pavel.anzenbacher@upol.cz

*Submitted:* 2011-05-20 *Accepted:* 2011-08-25 *Published online:* 2011-11-05

*Key words:* probiotic; *Lactobacillus casei*; cytochrome P450; intestine; liver; microsomes

Neuroendocrinol Lett 2011;32(Suppl.1):8-14 PMID: 22167211 NEL32S111A01 © 2011 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

## Abstract

**OBJECTIVES:** The aim of the study was to find whether probiotic *Lactobacillus casei* influences the expression or the activity of cytochromes P450 (CYP) and whether it has an influence on the level of CYP mRNA in male rats.

**DESIGN:** Live bacterial suspension of *L. casei* was administered orally (gavage) to healthy male Wistar rats daily for 7 days. Control group of rats was treated with the saline solution. Sections of the duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon were dissected from each experimental animal. In all individual samples, the expression of selected CYPs was determined by Western blotting. The levels of expression of CYPs were also evaluated by mRNA using the real-time PCR method.

**RESULTS:** There were changes observed in the expression of CYP enzymes and in the CYP mRNA levels along the intestine after application of *L. casei*. The expression of CYP1A1 enzyme was found to be decreased in the proximal part of the jejunum and colon, CYP1A1 mRNA level was decreased in the distal part of the jejunum, ileum and caecum. Thus, the changes in CYP1A1 protein or mRNA were observed along the intestine of male rats. Similarly, a decreased expression of the caecal CYP2E1 mRNA and of the duodenal CYP3A9 mRNA after treatment of rats with *L. casei* was found.

**CONCLUSION:** Probiotic *L. casei* might be able to contribute to prevention against colorectal cancer by decreasing levels of certain forms of xenobiotic-metabolizing enzymes; moreover, in general, there is a possibility of interactions with concomitantly taken pharmacotherapeutic agents.



**Abbreviations:**

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CYP	cytochrome P450
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
<i>L. casei</i>	probiotic <i>Lactobacillus casei</i>
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons

**INTRODUCTION**

The whole gastrointestinal tract represents an ecosystem of high complexity (Holzapfel *et al.* 2002). The intestine is important for the metabolism of xenobiotics such as dietary toxins and orally absorbed drugs due to its extremely large surface area and the presence of xenobiotic metabolism enzymes and transport systems (Ito *et al.* 2007). The complex communities of microorganisms that colonize the gastrointestinal tract play an important role in human or animal health. Probiotics are viable microbes frequently administered from food or feed supplements which favourably influence the microbial balance of the host (Fuller 1989) and are believed to temporarily colonize the intestine by adhering to intestinal surfaces. The adhesive ability of bacteria to intestinal cells has been considered as one of the selection criteria for probiotic strains (Tuomola *et al.* 1998). Specific probiotic microorganisms can modulate inflammation, produce inhibitory compounds, which down-regulate virulence factor expression by pathogens, or which directly kill or impede pathogens in the gastrointestinal tract. Probiotics are capable of inducing mucous production by enterocytes and can compete with pathogens for binding sites on the gastrointestinal enterocytes (Forssten *et al.* 2011).

The lactic acid bacteria are the major representatives of probiotics, both in the food and marketed food supplements (Holzapfel *et al.* 2002). Lactic acid bacteria are gram-positive organisms that ferment hexose sugars to produce primarily lactic acid (Makarova *et al.* 2006). In addition, they play an important role in the spoilage of processed and fermented foods, and beverages (the spoilage of wine, beers and fruit juices as evidenced by cloudiness and off-flavours). However, these organisms are particularly suitable as antagonistic microorganisms in foods, because they are capable of inhibiting other food-borne bacteria by a variety of means including production of organic acids, hydrogen peroxide or bacteriocins (Aguirre *et al.* 1993). Lactic acid bacteria include a variety of industrially important genera, involving *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* species (Makarova *et al.* 2006). The most widely used probiotic *Lactobacillus* genus is known to colonize the human gastrointestinal tract, to protect the intestines against enteropathogenic infection (Won *et al.* 2011) and to protect against colon cancer (Liong 2008). The aim of this work was to prove whether the presence of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* in the rat gut

may influence the expression and the activity of cytochromes P450, i.e. monooxygenases metabolizing both endo- and xenobiotics (Hodek *et al.* 2009), including a plethora of widely prescribed drugs. These enzymes constitute a superfamily of heme enzymes, involved in a variety of metabolic and biosynthetic processes (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001). In humans, approximately 80% of oxidative metabolism and almost 50% of the overall elimination of commonly used drugs can be attributed to one or more of the various CYP enzymes (Paine *et al.* 2006). Hence, the studies on possible interactions of drugs with these enzymes are of considerable importance.

**MATERIAL AND METHODS***Chemicals and enzymes*

All reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich CZ (Prague, Czech Republic) if not stated otherwise. Other chemicals as sodium chloride, potassium chloride, hydrochloric acid, potassium hydroxide, EDTA, sucrose and methanol, which were used for isolation of microsomal fraction and Western blotting, were obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Glycerol that was used as a cryoprotectant was obtained from Merck (Prague, Czech Republic). Protease inhibitor cocktail tablets were purchased from Roche (Mannheim, Germany). The RNA stabilization reagent, RNA later<sup>®</sup>, was purchased from Qiagen (Germantown, MD, USA). Mouse anti-rat CYP3A1, 2B1/2 and 2C6 monoclonal antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Goat anti-rat CYP1A1 polyclonal and goat anti-rat CYP2E1 monoclonal antibodies were obtained from Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan). The chemiluminescence kit for Western blotting (Immun Star) was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA) and the nitrocellulose membrane was obtained from Amersham Biosciences UK, Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Miniprotean electrophoresis and Western blotting apparatus were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). The UV-Vis spectrophotometer Cary 4000 (Varian, Palo Alto, USA) was used for determination of the content of cytochromes P450. The TECAN Infinity absorbance/fluorescence/luminescence reader (Tecan, Vienna, Austria) was used for detection of the respective spectral data. HPLC-UV analyses were performed on Shimadzu LC-20A Prominence system (Kyoto, Japan).

*Preparation of biological samples*

Live bacterial suspension of probiotic *Lactobacillus casei* was applied intragastrically ( $1 \times 10^9$  CFU/dose) to male Wistar rats (body weight 300–360 g). The probiotic suspension was administered daily to six animals for 7 days. Other six rats were stressed by oral application of the saline solution daily for 7 days as well. This group was used as the control one. After 7 days the rats were sacrificed. The protocol of the experiment was

approved by the institutional Ethics Committee. The liver and all parts of the intestine (duodenum, proximal part of jejunum (A), distal part of jejunum (B), ileum, caecum and colon) were removed and weighted. The whole duodenum as well as small samples of the liver, jejunum (A), jejunum (B), caecum and colon were used for determination of CYP mRNA levels. These samples were inserted into RNA stabilization reagent. The rest of intestinal samples (without duodenum) were washed by cold saline solution; the liver was washed by cold 0.25 M sucrose in 1 mM EDTA (pH 7.4). All samples were stored at -70 °C until used. For preparation of intestinal and hepatic microsomes, the samples were rinsed in cold 0.25 M sucrose in 1 mM EDTA (pH 7.4) with 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and a protease inhibitor cocktail. The tissue was then homogenized and subjected to differential centrifugation to obtain the microsomal fraction according to standard procedures (Lake 1990).

#### Determination of total protein and specific content of cytochrome P450

Total protein content was determined by bicinchoninic acid method with a standard BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL). Determination was done in three parallel samples using a calibration curve. S.D. differences from the respective means between determinations were below 15%. Cytochrome P450 content in liver microsomes was determined by the method described by Omura and Sato (1964). Specific content of liver cytochrome P450 was obtained as a ratio of the cytochrome P450 content (in nmol) to the amount of the total protein (in mg).

#### Determination of activities of individual CYP forms in liver microsomes

The activities and relative amounts of selected CYP enzymes were determined by established enzymological techniques based on analogy between human and rat forms and their respective substrates: 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation (substrate of CYP1A2) (Chang & Waxman 1998); bufuralol 1'-hydroxylation (substrate of CYP2D6) (Crespi *et al.* 1998b); testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation (substrate of CYP3A4) (Guengerich *et al.*, 1986); chlorzoxazone 6'-hydroxylation (substrate of CYP2E1) (Lucas *et al.* 1996); diclofenac 4'-hydroxylation (substrate of CYP2C9) (Crespi *et al.* 1998a). The metabolites of testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation (at 245 nm), chlorzoxazone 6'-hydroxylation (at 287 nm) and diclofenac 4'-hydroxylation (at 280 nm) were measured by an HPLC with UV detection. The HPLC with fluorescence detection was used for determination of metabolites of 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation (excitation at 535 nm, emission at 585 nm) and bufuralol 1'-hydroxylation (excitation at 252 nm, emission at 302 nm). Activities of individual CYP forms in the presence of probiotic were compared relatively to the activities of the control sample in percentage.

**Western blotting.** Microsomal proteins from liver (10  $\mu$ g) and from all various parts of the intestine (35  $\mu$ g) obtained from each experimental rat were separated on 8%-SDS (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose membranes according to the method of Towbin *et al.* (1979). Immunodetection of CYP was carried out using anti-rat CYP1A1, anti-rat CYP2B1/2, anti-rat CYP2C6, anti-rat CYP2E1 and anti-rat CYP3A1 as the primary antibodies. The bands were visualized with respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies using a Luminol reagent kit (Santa Cruz, CA) and their relative intensity evaluated with Elfoman software (Semecky Inc., Prague, Czech Republic).

#### RNA isolation and real-time PCR procedures

Samples of intestinal and hepatic tissue (about 30 mg) of each rat was stabilized in RNA stabilization reagent and subsequently homogenized with homogenizer DiAx 900 (Heidolph, Kelheim, Germany). The sample was then applied onto the QIAshredder columns to eliminate tissue microparticles. RNA was isolated with use of RNeasy<sup>®</sup> Plus Minikit (Quiagen, Germantown, MD, USA) enabling degradation of contaminating genomic DNA. One microgram of each isolated RNA was subjected to reverse-transcription using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) with random hexamer primers. New synthesized cDNA was applied for real-time PCR using Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green Master I mix in a Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany) with the following thermal cycling conditions: preincubation for 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles at 95 °C for 10 s, at 58 °C for 15 s and at 72 °C for 15 s for denaturation, annealing and elongation respectively. All samples for real-time PCR were prepared in triplicates. Rat primers were designed in our laboratory and synthesized by Invitrogen (Life Technologies, division Prague, Czech Republic). Absolute quantification method was applied for obtaining gene expression data. The following primer sequences were used:

CYP2B1/2 Fw: 5'-TCC CAG GGA GCC CCA CTG GAT CCC A-3'  
CYP2B1/2 Rev: 5'-GAA CCC AGA GAA GAA CTC AAA CAC CTG G-3'  
CYP2C6 Fw: 5'-GCC TTG TGG AGG AAC TGA GG-3'  
CYP2C6 Rev: 5'-GCA CAG CCC AGG ATA AAC GT-3'  
CYP2E1 Fw: 5'-CCA AGG GTA CAG TTG TGA TTC CAA C-3'  
CYP2E1 Rev: 5'-CAA CAC ACA CAC GCT TTC CTG CAG A-3'  
CYP3A1 Fw: 5'-GTG CTC CTC TAC GGA TTT GGG A-3'  
CYP3A1 Rev: 5'-TCC ACA TCG AAT TTC CAT AAA CCC-3'  
HPRT Fw: 5'-GAAGAGCTACTGTAATGACCAGTC-3'  
HPRT Rev: 5'-CGT TCT TTC CAG TTA AAG TTG AGA GA-3'

For determination of mRNA levels of the CYP1A1, CYP3A9 and CYP2E1, the universal hybridization probes with recommended primers were used ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) (Roche, Germany).

## RESULTS

Application of probiotic *L. casei* to rats for 7 consecutive days resulted in no significant changes in the specific content of the cytochrome P450 in the liver of experimental animals (Figure 1). Only a small increase of the specific content of cytochrome P450 in the liver was found. Figure 2 shows no significant changes in activities of liver CYP enzymes, namely of the CYP1A1/2, 2D6, 3A4, 2E1 and 2C9 prototypic activity after administration of *L. casei*. While not statistically significant, the largest change of CYP activity was with chlorzoxazone 6'-hydroxylation (substrate of rat CYP2E1 protein).

Protein expression of rat liver CYP1A2, 3A, 2E1, 2C6 and 2C11 enzymes in samples from rats without and with *L. casei* applied was detected by Western blotting (Figure 3A). Two immunoreactive bands were detected after incubation with CYP3A1 antibody due to known cross-reactivity with other isoforms of the CYP3A family. The density of both bands was taken collectively as CYP3A showing no change after administration of *L. casei*. A slight decrease of the expression of the liver

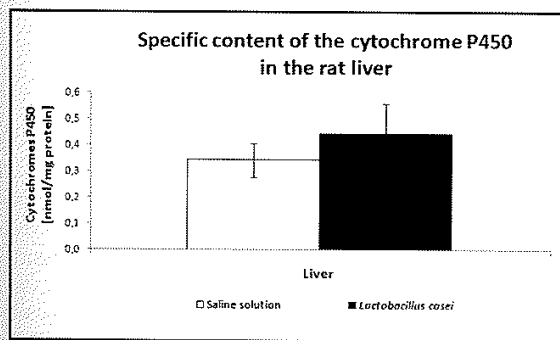
CYP2E1 protein corresponded to a decrease of CYP2E1 prototypic activity (chlorzoxazone 6'-hydroxylation) (Figure 2). Expression of rat CYP2C forms, CYP2C6 and CYP2C11 (being a human CYP2C9-like rat protein according to Wang *et al.* (2009), moreover, according to BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST))), exhibited a slight increase in expression in samples obtained after administration of *L. casei* in comparison to control (Figure 3A). These changes were not statistically significant again. The real-time PCR method did not reveal significant changes as well (Figure 3B).

Cytochromes P450 are localized in the liver as well as in the gastrointestinal tract; however, their localization along the intestine is variable (Mitschke *et al.* 2008). In other words, the data for each CYP from each part of the intestine could not be, in principle, obtained since not all CYP forms are present in all parts of the intestine. In addition, the jejunum is the longest part of the intestine; therefore, it was divided into two parts, A and B.

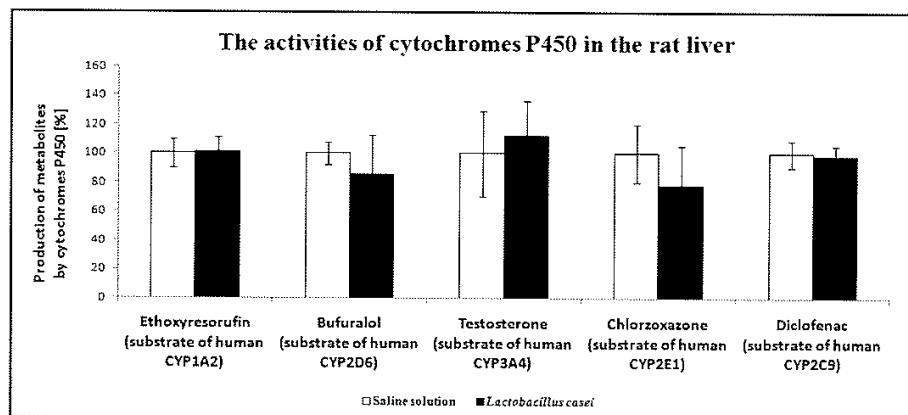
Activities of cytochrome P450 in the intestinal samples were not measured due to limited sample amount.

The expression of cytochrome P450 2B1/2 was detected by Western blotting in the small intestine; its presence in the caecum and colon was not detected. The expression of CYP2B1/2 protein among experimental animals was very variable; however, no significant changes were found after treatment with *L. casei* compared to control samples (Figure 4A). A slightly non-significant decrease of the level of CYP2B1/2 mRNA was detected in the duodenum (the sample of this smallest part of the intestine was enough only for the real-time PCR method) (Figure 4F). The level of CYP2B1/2 mRNA in the jejunum and ileum was not changed after application of probiotic *L. casei*.

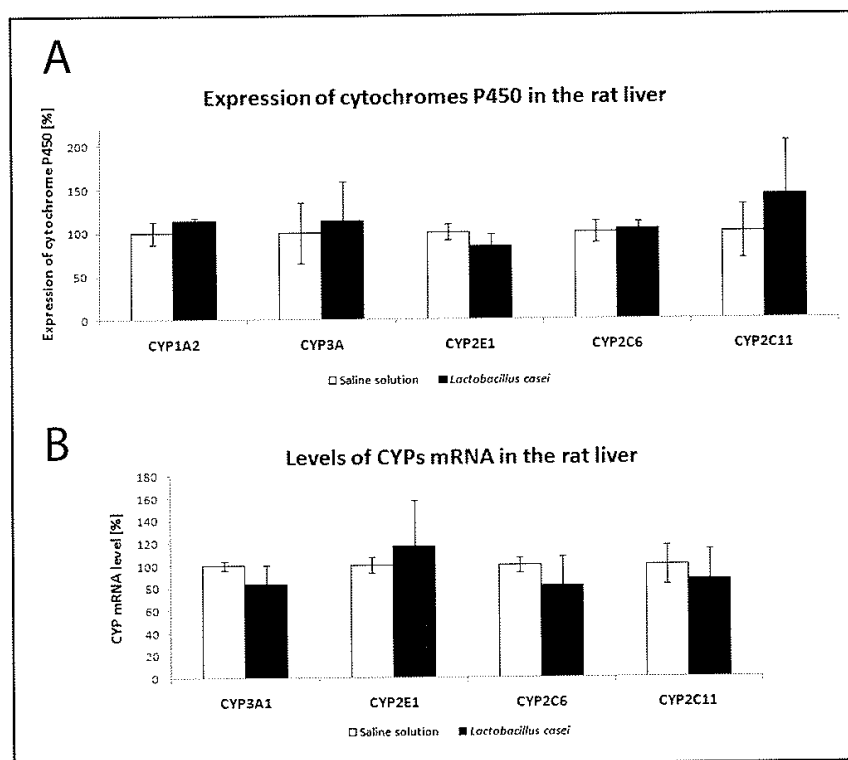
Similarly, the expression of cytochrome P450 2E1 was detected by Western blotting mainly in the small intestine. No significant changes in the expression of CYP2E1 protein were found; only slight decrease at the beginning and at the end of the small intestine after administration of *L. casei* in comparison to control samples was observed (Figure 4B). A significant decrease of



**Fig. 1.** The specific content of the cytochrome P450 in the hepatic microsomes in rats after treatment with probiotic *L. casei*. Control rats were treated with the saline solution. The specific content of the CYP is expressed as nmol CYP/mg protein. Results are presented as means  $\pm$  S.D.; N = 6.



**Fig. 2.** Relative activities of CYP enzymes in rat liver microsomes after treatment with probiotic *L. casei* daily for 7 days. Control samples were obtained by treatment with the saline solution for 7 days as well. Results presented as means  $\pm$  S.D.; N = 6.



**Fig. 3.** Expression of cytochrome P450 (A) and the level of the CYP mRNA (B) in the rat liver after treatment by probiotic *Lactobacillus casei* daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. Results are presented as means  $\pm$  S.D.; N = 6.

the CYP2E1 mRNA level was found in the caecum after application of *L. casei* by real-time PCR method (Figure 4G). In the other parts of the rat intestine (duodenum, whole jejunum, ileum, colon), no changes of CYP2E1 mRNA level were detected.

The expression of rat CYP3A form was found by Western blotting all over the intestine of all experimental animals. A slight decrease in the expression of CYP3A was detected at the beginning of the jejunum (sample "jejunum A") after treatment of *L. casei* (Figure 4C). This change was confirmed by real-time PCR method (Figure 4H). A significant decrease of the level of CYP3A9 mRNA after application of *L. casei* was found in the duodenum (the smallest part of the intestine, enough only for real-time PCR method).

The CYP2C6 protein has been shown to be present mainly in the caecum and the colon (Matuskova *et al.* 2010). A small increase in the expression of CYP2C6 protein was observed in these parts of the intestine (after treatment with probiotic *L. casei*) (Figure 4D). These changes were not significant and real-time PCR method confirmed this observation (Figure 4I).

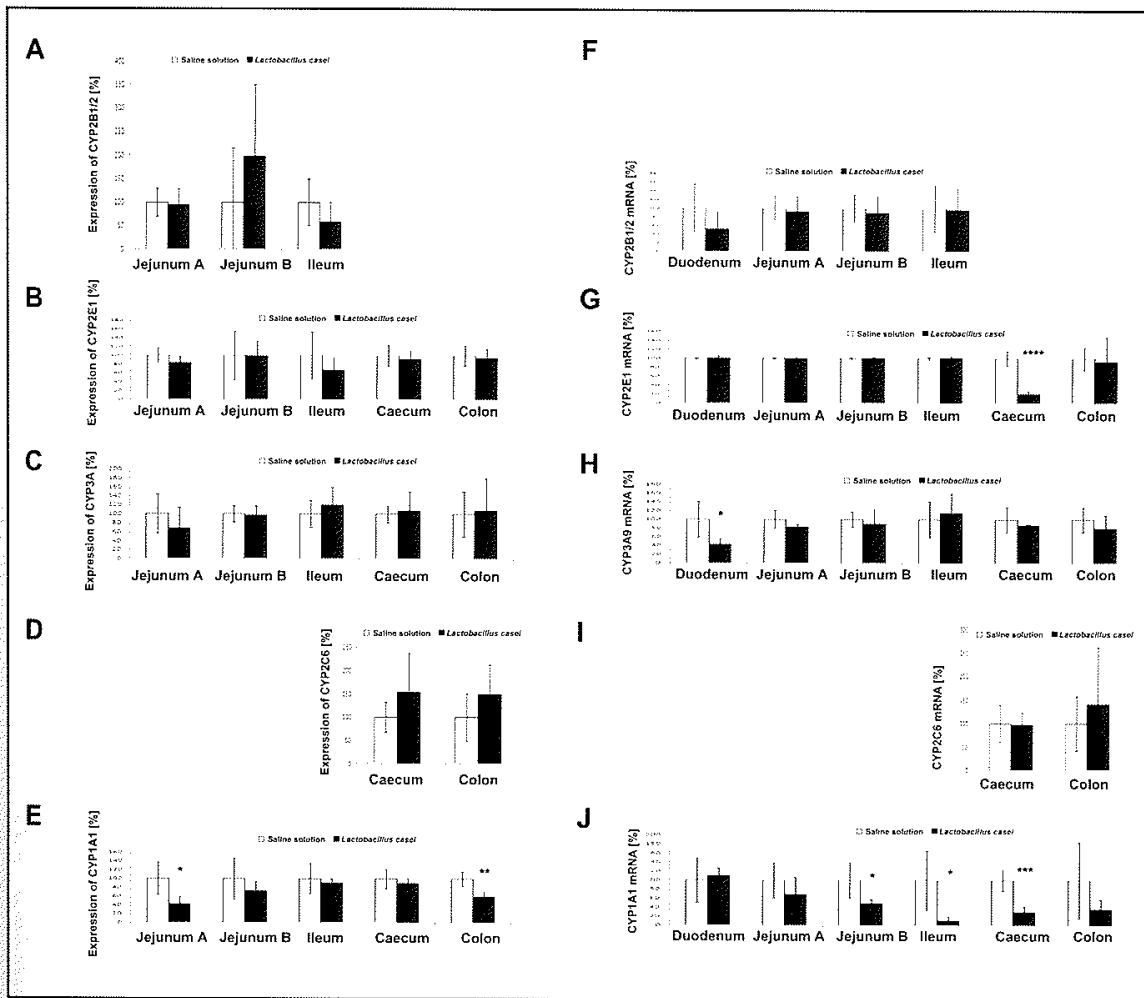
Expression of cytochrome P450 1A1 was also studied by Western blotting in all parts of the intestine. The CYP1A1 protein was detected mainly in the small intestine; it was also localized in a smaller extent in the caecum and colon (as described also in Matuskova *et al.*

2010). A decrease in the expression of CYP1A1 enzyme was observed in the jejunum (part A) as well as in the colon (after application of probiotic *L. casei*) (Figure 4E). The decrease of the CYP1A1 mRNA level in the jejunum (part A) and colon was found also by real-time PCR method (Figure 4J); however, this change was not significant. On the other hand, a significant decrease of CYP1A1 mRNA was observed in the jejunum B, ileum as well as in the caecum.

## DISCUSSION

The experiments discussed here were performed *in vivo* with rat experimental model; for this reason, the results show, in principle, a great variability. Despite the variability among the biological samples within one group, the tendencies and statistical significance of differences between the data for samples with or without *L. casei* administered can be seen.

In this study, a marked decrease of CYP1A1 mRNA level was found in the distal jejunum (part B), ileum and caecum; a decrease in the CYP1A1 protein expression was found in the jejunum (part A) and colon; as for the CYP2E1, a decrease of CYP2E1 mRNA level was found in the caecum. Cytochrome P450 1A1 is one of the well-characterized xenobiotic-metabolizing enzymes regulated by the arylhydrocarbon receptor. The CYP1A1



**Fig. 4.** Expression of rat CYP2B1/2 (A), CYP2E1 (B), CYP3A (C), CYP2C6 (D), CYP1A1 (E) protein and the level of the CYP2B1/2 (F), CYP2E1 (G), CYP3A9 (H), CYP2C6 (I), CYP1A1 (J) mRNA along the intestine after treatment by probiotic *Lactobacillus casei* daily for 7 days. Control rats were treated with the saline solution for 7 days as well. Un-reported values in different parts of the intestine were under detection limit of the used method. Results are presented as means  $\pm$  S.D.; N = 6; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ =0.0011, \*\*\* $p$ =0.000125, \*\*\*\* $p$ =0.000049.

enzyme has an important role in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a group of stable and ubiquitous organic contaminants released in the environment (Khan *et al.* 2008). These PAHs are converted to highly reactive electrophilic metabolites that can form DNA adducts and lead to gene mutations and cellular transformation. The CYP2E1 enzyme metabolizes a large number of low-molecular-weight compounds including compounds of toxicological and carcinogenic significance (Guengerich 2005). The inhibition of these two carcinogen-activating CYP enzymes is considered to be one of the major health promoting effects of chemopreventive compounds (Krizkova *et al.* 2008). Hence, the results presented here indicate that the probiotic strain *L. casei* might help in the defence of

the organism against formation of reactive metabolites in the gastrointestinal tract by CYP2E1 and CYP1A1.

In rats, the CYP3A subfamily consists of five related genes, CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18, and CYP3A23 (Anakk *et al.* 2003). In fact, the rat CYP3A forms (3A1, 3A2, 3A9, 3A18 and 3A23) are similar to human CYP3A4 (the most important CYP form in human liver) and CYP3A5 (Matsubara *et al.* 2004). While CYP3A1 and CYP3A2 mRNA were detected by real-time PCR only in the liver, CYP3A9 mRNA was detected in both, in the liver and in the intestinal tract (Matsubara *et al.* 2004) and this was why the CYP3A9 mRNA probe for the real-time PCR method was used in this study. It was found here that the CYP3A9 mRNA level was reduced in duodenum by approximately 50%

after application of probiotic *L. casei*. In other words, a potential decrease in the CYP3A level in duodenum could lead to a less effective metabolism of drugs by CYP3A in this first part of the intestine.

In conclusion, in this work, the influence of probiotic *Lactobacillus casei* on the level of intestinal CYP1A1, 2E1 and 3A9 mRNA was found. This *in vivo* study revealed that treatment of rats with *L. casei* could exhibit, in defined parts of the intestine, an influence on the level of CYP enzymes. Probiotic *L. casei* can possibly contribute to prevention against colorectal cancer by decreasing levels of certain forms of xenobiotic-metabolizing enzymes. The results obtained in this study, however, cannot be easily extrapolated to the man; on the other hand, they document the complexity of effects associated with the intestinal microbiome.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from Grant Agency of Czech Republic (305/08/0535, 303/09/H048) as well as of the IGA UPOL 2011\_005 is gratefully acknowledged. Infrastructural part of the project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational Programme Research and Development for Innovations (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

## REFERENCES

- Aguirre M, Collins MD (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infections. *J Appl Bacteriol* **75**: 95–107.
- Anakk S, Ku ChY, Vore M, Strobel HW (2003) Insights into gender bias: Rat cytochrome P450 3A9. *JPET* **305**: 703–709.
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* **58**: 737–747.
- Chang TKH, Waxman (1998) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with ethoxyresorufin as a substrate. In: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ, Humana, pp. 103–122.
- Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ (1998a) Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. In: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ, Humana, pp. 129–133.
- Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ (1998b) CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. In: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Humana, Totowa, NJ, pp. 141–146.
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**: 365–378.
- Forssten SD, Lahtinen J, Ouwehand AC (2011) In: Malago JJ, editors. *Probiotic bacteria and enteric infections*. Springer Dordrecht, pp. 39–86.
- Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ (1986) Characterization of rat human-liver microsomal cytochrome-P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic-polymorphism in oxidative drug-metabolism. *J Biol Chem*. **261**: 5051–5060.
- Guengerich FP (2005) In: Ortiz de Montellano PR, editors. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic Plenum. New York, 3<sup>rd</sup> edition, pp. 377–530.
- Hodek P, Tepič M, Krizkova J, Sulc M, Stiborova M (2009) Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuroendocrinol Lett*. **30**(Suppl 1) 67–71.
- Holzappel WH, Schillinger U (2002) Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int* **35**: 109–116.
- Ito S, Chen Ch, Satoh J, Yim S, Gonzalez FJ (2007) Dietary phytochemicals regulate whole-body CYP1A1 expression through an arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-dependent system in gut. *J Clin Invest* **117**(7): 1940–1950.
- Khan S, Cao Q, Lin A-J, Zhu YG (2008) Concentrations and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater-irrigated soil using *in vitro* gastrointestinal test. *Environ Sci Pollut Res* **15**:344–353
- Krizkova J, Burdova K, Hudecek J, Stiborova M, Hodek P (2008) Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds. *Neuroendocrinol Lett* **29**(5): 717–721.
- Lake BG (1990) In: Snell K, Mullock B, editors. *Biochemical toxicology. A practical approach*, chap. 8. IRL press, Oxford, pp. 183–215.
- Liong MT (2008) Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and *in-vivo* evidence. *Int J Mol Sci* **9**: 854–863.
- Lucas D, Menez JF, Berthou F (1996) Chlorzoxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Method Enzymol* **272**: 115–123.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlov N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar R, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins, Plengvidhya TV, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, I. Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* **103**(42): 15611–15616.
- Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y (2004) Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 1282–1290.
- Matuskova Z, Tunkova A, Anzenbacherova E, Vecera R, Šiller M, Tlaskalova-Hogenova H, Zidek Z, Anzenbacher P (2010) Effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on expression of cytochromes P450 along the gastrointestinal tract of male rats. *Neuroendocrinol Lett* **2010**; **31**(Suppl.2): 46–50.
- Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U (2008) Characterization of Cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos* **36**: 1039–1045.
- Omura T, Sato R (1964) The carbon-monoxide binding protein of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. **239**: 2370–2378.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* **34**: 880–886.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Nat Acad Sci USA*. **76**: 4350–4353.
- Tuomola EM, Salmiinen SJ (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol* **41**: 45–51.
- Wang H, Cheng JD, Montgomery D, Cheng KC (2009) Evaluation of the binding orientations of testosterone in the active site of homology models for CYP2C11 and CYP2C13. *Biochem Pharmacol*. **78**: 406–413.
- Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee DI, Park ES, Min H, Park S-Y, Hwang KW (2011) Modulation of Th1/Th2 balance by *Lactobacillus* strains isolated from *Kimchi* via stimulation of macrophage cell line J774A.1 *in vitro*. *J Food Sci* **76**(2): 55–61.

## 4. Publikace

**Matušková Z, Anzenbacherová E, Večeřa R, Tlaskalová-Hogenová H, Kolář M, Anzenbacher P. Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: effect of *E. coli* Nissle 1917 on amidarone absorption in rats. PloS One 2014; 9(2): e87150. IF(2013): 3,534**

# Administration of a Probiotic Can Change Drug Pharmacokinetics: Effect of *E. coli* Nissle 1917 on Amidarone Absorption in Rats

Zuzana Matuskova<sup>1</sup>, Eva Anzenbacherova<sup>2\*</sup>, Rostislav Vecera<sup>1</sup>, Helena Tlaskalova-Hogenova<sup>3</sup>, Milan Kolar<sup>4</sup>, Pavel Anzenbacher<sup>1</sup>

**1** Department of Pharmacology and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic, **2** Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic, **3** Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, **4** Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

## Abstract

The growing interest in the composition and effects of microbiota raised the question how drug pharmacokinetics could be influenced by concomitant application of probiotics. The aim of this study was to find whether probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN) influences the pharmacokinetics of concomitantly taken antiarrhythmic drug amiodarone (AMI). Live bacterial suspension of probiotic EcN (or non-probiotic *E. coli* strain ATCC 25922) was applied orally to male Wistar rats for seven days, while a control group of rats was treated with a saline solution. On the eighth day, the amiodarone hydrochloride was administered as one single oral dose (50 mg/kg) to all rats (N=60). After 0, 1, 2, 3, 4, 5.5, 7, 9, 14, 22, and 30 hours, blood samples were taken from the rat abdominal aorta. The plasma level of AMI and its metabolite N-desethylamiodarone (DEA) was determined using the HPLC with UV detection. Administration of EcN led to a 43% increase of AMI AUC<sub>0-30</sub> in comparison with control samples. However, this effect was not observed if EcN was replaced by a reference non-probiotic *E. coli* strain. Thus, EcN administration was most probably responsible for better drug absorption from the gastrointestinal tract. Plasma levels of DEA were also increased in plasma samples from animals treated with EcN. This change was again not found in the experiment with the reference non-probiotic strain. Higher DEA levels in samples from EcN-treated rats may be explained either by better absorption of AMI and/or by an increased activity of CYP2C forms, known to participate in metabolism of this drug, after EcN administration. In this paper, it is documented that concomitantly taken probiotic EcN may modulate pharmacokinetics of a drug; in this case, it led to an increased bioavailability of AMI.

**Citation:** Matuskova Z, Anzenbacherova E, Vecera R, Tlaskalova-Hogenova H, Kolar M, et al. (2014) Administration of a Probiotic Can Change Drug Pharmacokinetics: Effect of *E. coli* Nissle 1917 on Amidarone Absorption in Rats. PLoS ONE 9(2): e87150. doi:10.1371/journal.pone.0087150

**Editor:** Maria A. Deli, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary

**Received:** September 5, 2013; **Accepted:** December 18, 2013; **Published:** February 5, 2014

**Copyright:** © 2014 Matuskova et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors gratefully acknowledge financial support from Czech Science Foundation (P303/12/0535, P303/12/G163, P304/11/1252), IGA Ministry of Health of the Czech Republic (NT 13482-4/2012) as well as of the students' project IGA UPOL LF\_2013\_007 is gratefully acknowledged. Infrastructural part of this work (at the Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational Programme Research and Development for Innovations (CZ.1.05/2.1.00/01.0030). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: anzeneva@tunw.upol.cz

## Introduction

Most of epithelial surfaces of human body such as the skin and the mucosa are colonized by a vast number of microorganisms, which are collectively known as microbiota or microbiome. Our microbiota contains trillions of bacterial cells and most of them never cultivated by classical methods, and represents a complex ecosystem with enormous microbiota diversity. Molecular biological methods had allowed revolutionary advance in microbiological research: the components of the human microbiota started to be analysed and identified. Our microbiome is producing enormous quantity of molecules able to interact with the host; however, the role of these molecules remains to be elucidated. Molecular analytical methods bring every day new pieces of knowledge about the major bacterial groups present in various body compartments, their changes during ontogeny, and their alterations in patients with organ and systemic disease when compared with healthy subjects, as well as other features of the

microbiota. The largest number of bacteria resides in the digestive tract, with the highest density in the colon. Bacteria present in the intestine participate in nutrition and metabolism processes. The effect of the microbiota on the macroorganism started to be elucidated in a number of functional studies [1]. The role of microbiota and the function of mucosal barrier in maintaining human health were recently appreciated. There is a growing interest concerning the role of microbiota in etiopathogenesis of inflammatory and neoplastic diseases [2]. However, the studies concentrated on the microbiota influence on drug pharmacokinetics are still very sparse.

Based on the growing evidence of the importance of microbiota for health, the efforts to affect the composition of microbiota in an optimal direction are gathering momentum. In recent years, there has been considerable progress in understanding the mechanisms of probiotic action and in the future this should help to select suitable bacterial strains which could beneficially affect mucosal barrier function, immune responses, and suppression of inflammation



[3]. The knowledge of the effects of simultaneous administration of drugs and probiotics on drug pharmacokinetics is still very limited. The complexity of mechanisms by which the fate of orally administered drugs could be affected by probiotics is discussed in recently published comprehensive review Stojančević et al., 2013 [4]. The importance of both, human and commensal microbiota components in drug efficacy and toxicity was recently documented and pointed out Haiser et al., 2013 [5].

The aim of our study was to analyse the effect of probiotic bacteria applied orally on a drug (amiodarone) pharmacokinetics in a rat model. The gram-negative bacterium of *Escherichia coli* Nissle 1917 of serotype O6:K5:H1 (EcN) is a fecal isolate with a lipopolysaccharide (LPS) consisting of a bisphosphorylated hexaacetyl lipid A and a tetradecasaccharide containing one *E. coli* O6 antigen repeating unit. EcN was shown to have immunomodulating properties without showing immunotoxic effects [6,7]. It has been used as a probiotic agent in medicine for the treatment or prevention of intestinal disorders and diseases since the early 1920s [8] and is commercially available [9]. For example, EcN can be used in treatment of diverticulosis, non-ulcer dyspepsia, antibiotic-associated colitis, intestinal mycoses, chronic constipation, inflammatory bowel disease, protracted or chronic recurrent diarrhea, or, primarily, in the treatment of irritable bowel syndrome [10]. The administration of EcN is safe and well tolerated [11].

On the other hand, the unlimited use of probiotics may lead to unwanted side-effects [12]. Thus, a question arises whether these microorganisms are safe when a drug is taken. For example, it is not known if the probiotic EcN (and other probiotics as well) can affect the pharmacokinetics of concomitantly taken drugs. In this paper, the antiarrhythmic drug amiodarone (AMI) was used to study whether the probiotic EcN can affect AMI pharmacokinetics. AMI is a drug used for treatment of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation [13,14] and is metabolized by cytochrome P450 enzymes (CYPs) [15,16]. N-desethylamiodarone (DEA) is its main, less active metabolite. Because of its long half-life (on an average 58 day) [17], AMI organ toxicity is potentially more severe and difficult to manage than toxic reactions of other drugs with shorter half-lives [18]. The combination of AMI with probiotics like EcN could, in principle, influence its pharmacokinetics and hence become another factor influencing bioavailability of AMI.

The current work belongs to first studies dealing with the potential influence of probiotic bacteria on pharmacokinetics of a drug. In 2008, studies were published showing changes of gliclazide pharmacokinetics in diabetic rats pre-treated by a mixture of three probiotics (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*) in suspension prepared from freeze-dried probiotic powders mixed with HPLC water (Al Salami et al. [19]). They have found that in presence of probiotics, the biodistribution of gliclazide in rats was suppressed; however, in the diabetic animals, the effect was just the opposite [19]. The authors suggested an alteration of regulation of the mucosal transporting systems [20]. In the most recent literature, there is only a note on increased azoreductase activity during concomitant administration of sulfasalazine (SSZ) and mixture of three probiotic bacteria [21]; however, pharmacokinetic parameters of the drug as well as of its metabolite were not significantly different from control rats given SSZ alone. Also, according to Kunes et al. [22], the pharmacokinetics of 5-aminosalicylic acid in rat was not significantly changed by EcN medication compared to control animals. Our current studies demonstrate an increase in bioavailability of a drug (AMI) after premedication of rats with probiotic EcN bacteria, documented here for the first time.

## Materials and Methods

### Chemicals

All reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich CZ (Prague, Czech Republic), except for sodium chloride and EDTA used for preparation of the saline solution or for sampling, respectively, which were obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic).

### Ethics Statement

The experiment was carried out in accordance with the Act No. 359/2012 Coll. on the protection of animals against abuse. All procedures with animals were approved by the Ethics Committee, Ministry of Education, Czech Republic.

### Study design and sampling

Live bacterial suspension of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in a phosphate buffered saline was applied intragastrically ( $0.7 \times 10^9$  CFU/dose) to male Wistar rats (body weight 230–258 g, average weight 254 g, nine weeks old). The probiotic suspension was administered daily to thirty animals for seven days. Another group of thirty rats (body weight 222–258 g, average weight 250 g, nine weeks old) were stressed by oral application of a saline solution daily for seven days as well. This group was used as the control. On the eighth day, the suspension of amiodarone hydrochloride in water was applied as one single oral dose (50 mg/kg) to all rats (N = 60). After 0, 1, 2, 3, 4, 5.5, 7, 9, 14, 22, and 30 hours, blood samples were taken from the rat abdominal aorta. The reference, non-pathogenic but non-probiotic strain of *E. coli* ATCC 25922, was also used in this study. This strain of *E. coli* was administered also intragastrically ( $0.7 \times 10^9$  CFU/dose) to thirty male Wistar rats (body weight 314–354 g, average weight 320 g, ten weeks old). This group was compared with another group of thirty rats (body weight 296–360 g, average weight 312 g, ten weeks old) stressed by oral application of the saline solution. The experiment with this reference strain was performed using the same protocol as described above for the *E. coli* Nissle 1917 strain. Subsequently, 7 ml blood samples with 0.2 mol/L EDTA were centrifuged and the plasma samples were frozen at  $-70^\circ\text{C}$ .

### Preparation of biological samples

In a 1.5 ml Eppendorf tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), 100  $\mu\text{L}$  of the plasma sample was mixed with 5  $\mu\text{L}$  of an internal standard solution of 0.02 mmol/L trifluoperazine dihydrochloride. After deproteinization by the addition of 300  $\mu\text{L}$  acetonitrile, the mixture was centrifuged at  $18\,400 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 5 min. The supernatant was carefully transferred to a clean test tube and evaporated under nitrogen at  $40^\circ\text{C}$ . The residue in the test tube was dissolved in a 100  $\mu\text{L}$  of the methanol: water (1:1) mixture. Thirty  $\mu\text{L}$  of this prepared sample was then analyzed by HPLC.

### Preparation of standards

AMI and DEA were dissolved in the mixture of acetonitrile: water (1:1). Plasma standards were prepared by the addition of an appropriate volume of AMI and DEA to drug-free plasma to obtain final concentrations of 0.1 to 1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMI, and 0.02 to 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of DEA. The stock solution of the internal standard trifluoperazine dihydrochloride was prepared by dissolving in water to a final concentration of 0.02 mmol/L; 5  $\mu\text{L}$  of this solution was added to each sample. Control samples for determination of the intra-day and inter-day determinations of precision and accuracy were prepared by the addition of AMI and DEA to drug-free plasma to obtain concentrations of 0.1, 0.4, and

0.8 µg/mL of AMI and 0.05, 0.1, and 0.4 µg/mL of DEA, respectively. All samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

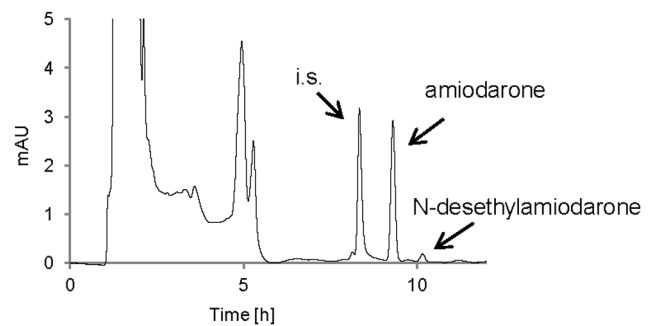
### HPLC conditions

HPLC-UV analyses were performed on the Ultimate 3000 system (Dionex, Sunnyvale, California, USA). The plasma levels of AMI and DEA were obtained using a Kinetex PFP column (150×4.6 mm ID) with a 2.6 µm particle size (Phenomenex, Torrance, California, USA) protected by a Security Guard (4×2 mm ID) precolumn with a C18 reverse phase of the same origin. The mobile phase for separation of AMI, DEA, and internal standard (trifluoperazine) consisted of 24 mmol/L acetic acid with 8.2 mmol/L triethylamine: methanol: acetonitrile (3:6:16 (v/v)) delivered at a flow-rate of 1 mL/min at  $40^{\circ}\text{C}$ . The typical run time was 12 min. The separated components were detected by UV detector at 242 nm [23]. The internal standard was used for the construction of AMI and DEA calibration curves. For calibration, the following ranges of concentration levels were chosen: AMI, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 and 1.6 µg/mL, and DEA, 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.2, 0.3 and 0.40 µg/mL. Linear regression gave the values of the coefficient of determination  $r^2=0.9961$  for AMI, and  $r^2=0.9990$  for DEA. The average recovery for AMI and for its metabolite DEA was 75% and 82%, respectively. The coefficient of variation of the precision and the accuracy determination (intraday and interday) was less than 15%. The limit of AMI and DEA quantitation was determined as 0.050 µg/mL and 0.018 µg/mL, respectively, established as a peak signal to noise of baseline ratio equivalent to 10:1. Data collection, integration, and calibration were accomplished using the Chromeleon Chromatography Data System Version 6.80 (Dionex, Sunnyvale, California, USA).

### Results

Figure 1 shows a typical HPLC chromatogram to document the separation of AMI, DEA, and trifluoperazine (an internal standard). Amiodarone pharmacokinetics was obtained from both EcN probiotic-premedicated experimental animals as well as animals with the administration of the non-probiotic *E. coli* strain. Results of both of these experiments, i.e. two types of AMI pharmacokinetics, were compared to data obtained in a control experiment when no bacteria were administered to experimental animals, just the AMI. Fig. 2A shows the experimental data for AMI and Fig. 2B for its main metabolite DEA after EcN premedication, while Figs. 3A and 3B document the time course of the AMI and DEA pharmacokinetics obtained with a non-probiotic strain administration. Based on these pharmacokinetics data, it can be seen that the administration of probiotic EcN bacteria has led to increased bioavailability of the drug.

The pharmacokinetic parameters (i.e. the time required to reduce the maximal level of a drug ( $c_{\max}$ ) to one half,  $t_{1/2}$ ; time needed to reach the maximal level of the respective drug  $t_{\max}$ ; area under the curve for 30 hours, i.e. time of the experiment,  $\text{AUC}_{0-30}$ ; or the AUC extrapolated to infinity,  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ ) were derived from the plasma level *vs.* time curve for AMI and DEA and are shown in Table S1 and Table S2. The increased plasma levels of AMI were observed after EcN administration to rats ( $\text{AUC}_{0-30}=9.31\pm 0.65$  h.µg/mL) in comparison with samples from the control rats ( $\text{AUC}_{0-30}=6.52\pm 0.60$  h.µg/mL). On the other hand, the administration of reference non-probiotic strain of *E. coli* ATCC 25922 did not markedly affect the pharmacokinetics of AMI in the rat ( $\text{AUC}_{0-30}=7.37\pm 0.53$  h.µg/mL) in comparison with the application of saline solution to the control rats ( $\text{AUC}_{0-30}=6.74\pm 0.56$  h.µg/mL).



**Figure 1. Chromatographic profile of three compounds in biological sample: trifluoperazine (an internal), amiodarone, N-desethylamiodarone.** Legend Fig. 1: i.s.: an internal standard trifluoperazine (8.32 min); amiodarone (9.31 min); N-desethylamiodarone (10.11 min). The HPLC chromatogram was obtained from the rat blood plasma sample taken 3 hours after amiodarone application. doi:10.1371/journal.pone.0087150.g001

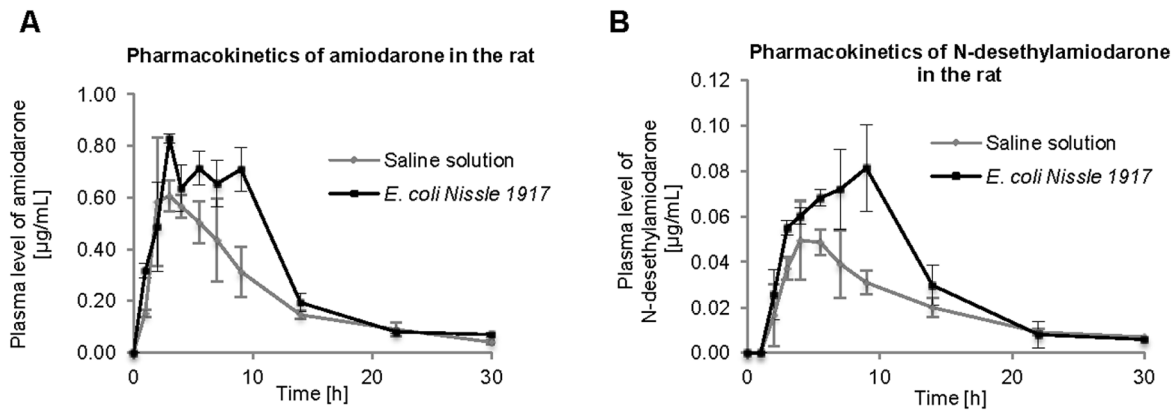
In the case of amiodarone metabolite DEA, the peak concentration of DEA after application of EcN to rats (Fig. 2B) was higher ( $c_{\max}=0.09\pm 0.01$  µg/mL) and shifted by more than 2.5 hours in comparison with control samples ( $c_{\max}=0.06\pm 0.01$  µg/mL). Its peak concentration, as well as the pharmacokinetic plasma level *vs.* time course, was not markedly changed after the administration of reference strain of *E. coli* ATCC 25922 in comparison with control samples, as documented in Fig. 3B.

### Discussion

The experiments discussed here were performed *in vivo* with experimental animals as models to assess the influence of probiotic bacteria on the drug pharmacokinetics. As demonstrated by our results (Figs. 2A, 2B), the pharmacokinetics of AMI and its metabolite DEA in animals treated with probiotic *E. coli* bacteria markedly differ from the data obtained from control animals. The  $\text{AUC}_{0-30}$  of AMI was 1.4 times higher in the rat plasma from EcN-treated animals in comparison with the treatment using saline solution (a control). Also, the pharmacokinetics of its main metabolite DEA exhibited a different time course, with maximum levels shifted by more than 2.5 hours to a longer time interval; moreover, the  $\text{AUC}_{0-30}$  was 1.6 times higher in EcN-treated animals.

Interestingly, these changes in drug pharmacokinetics were not observed with the non-probiotic strain of the *E. coli* bacteria (ATCC 25922). In this case, the pharmacokinetics of both the AMI as well as its main metabolite did not markedly differ (Figs. 3A, 3B).

The reasons for increased bioavailability of orally applied AMI due to administration of the probiotic EcN are difficult to explain as there are several simultaneously occurring phenomena which are based on the properties and local effects of the probiotic as well as the drug. Moreover, the current knowledge about the detailed mechanisms of EcN action and effects as well as about the regulation of expression and function of the corresponding proteins is scattered and obtained usually *in vitro* and under various conditions being thus only an approximation of processes occurring *in vivo*. Hence, the attempts to elucidate the effects obtained in this work remain to a great extent speculative. Nevertheless, on the basis of data known from the literature it is possible to delineate two ways which may suggest an explanation.

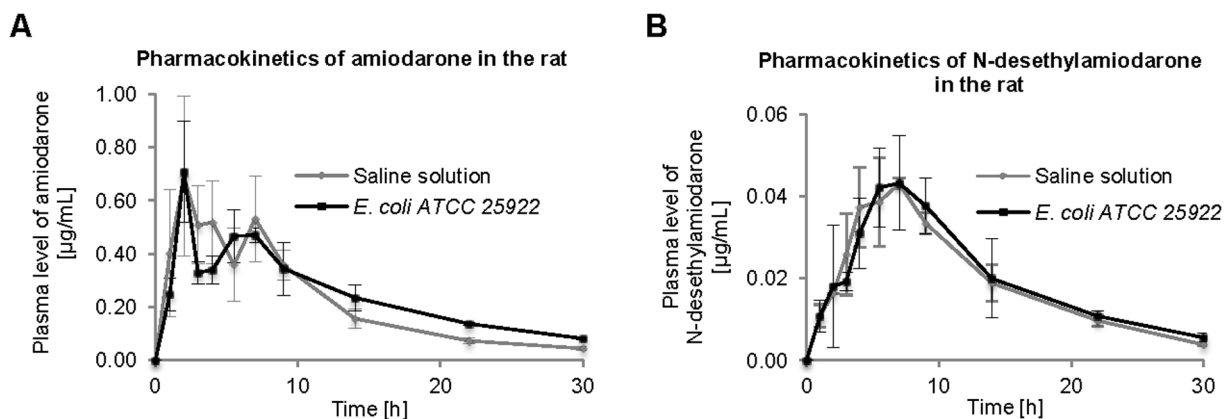


**Figure 2. Influence of *E. coli Nissle 1917* on the pharmacokinetics of amiodarone (A) and N-desethylamiodarone (B).** Legend Fig. 2A: Pharmacokinetics of amiodarone with or without (control group) probiotic *E. coli Nissle 1917* pre-treatment. Each point is presented as means  $\pm$  S.D.; N=3. Legend Fig. 2B: Pharmacokinetics of N-desethylamiodarone (metabolite of amiodarone) with or without (control group) probiotic *E. coli Nissle 1917* pre-treatment. Each point is presented as means  $\pm$  S.D.; N=3. doi:10.1371/journal.pone.0087150.g002

First, there is a decrease of local pH in the intestine due to the presence of EcN [24]. This effect has been attributed to production of short chain fatty acids. Amiodarone, a weak base (pKa of AMI is 8.7 at 37°C [25,26]), is then better ionized in lower pH which may facilitate its movement across the mucosal layer and finally its disposition. Intestinal mucosal layer is known to be a barrier to lipophilic drugs and the ionization of a drug may have a positive effect on its diffusion through mucus [27]. Another attempt to explain better disposition of amiodarone may be based on an increased expression of the Oatp2B1 (Slco2B1) transporter known to mediate the influx of amiodarone in the intestinal cells [28]. The expression of this transporter was shown to be regulated by levels of proinflammatory cytokine TNF-alpha [29]. It may be speculated that in response to lowered levels of this cytokine in presence of EcN (for a review, see [30]), the expression of the Oatp2B1 transporter may be in turn higher leading to better bioavailability of this drug. In fact, also the changes in gliclazide permeation in diabetic and normal rats after premedication with probiotics were ascribed to changes in regulation of mucosal transporting systems [20].

AMI is metabolized to the main active metabolite DEA by CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C19, 2D6, and 3A4 enzymes in humans and by CYP1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 2D1, 2D2, and 3A1 enzymes in rats [15,16]. Following the administration of AMI in the presence of EcN, increased plasma levels of DEA were observed in comparison with control samples. The higher  $c_{max}$  value and its shift to longer time intervals (approximately by 3 h) are probably caused by a better disposition of AMI, which is discussed above. Moreover, moderately increased activity of the liver CYP2C forms after administration of EcN found in our earlier study [31] may contribute to increased levels of the DEA. These changes were observed again only in the experiment with EcN administration while no changes were found in the experiment with the reference non-probiotic *E. coli* strain ATCC 25922 application.

In conclusion, this study shows an effect of administration of a probiotic strain, here the *Escherichia coli Nissle 1917*, on the pharmacokinetics of amiodarone in rats. Increased drug absorption caused by this probiotic can be the result of the interplay of various factors influencing regulation of transport systems in the intestine including metabolic reactions and changes in intestinal microbiota composition [4,32]. Interestingly, on the contrary, the



**Figure 3. Influence of a non-probiotic bacteria on the pharmacokinetics of amiodarone (A) and N-desethylamiodarone (B).** Legend Fig. 3A: Pharmacokinetics of amiodarone with or without (control group) non-probiotic *E. coli ATCC 25922* pre-treatment. Each point is presented as means  $\pm$  S.D.; N=3. Legend Fig. 3B: Pharmacokinetics of N-desethylamiodarone (metabolite of amiodarone) with or without (control group) non-probiotic *E. coli ATCC 25922* pre-treatment. Each point is presented as means  $\pm$  S.D.; N=3. doi:10.1371/journal.pone.0087150.g003

non-probiotic strain of these bacteria does not possess the properties leading to a better bioavailability of amiodarone. In conclusion, concomitantly taken probiotic EcN may modulate the pharmacokinetics of AMI as well as its metabolite DEA by increasing the bioavailability of this drug. The changes caused by the probiotic are probably not so prominent that they are likely to be important in clinical use except perhaps for the time delay in reaching the concentration maximum. It should be mentioned here that the results obtained cannot be directly extrapolated to other drugs or probiotic bacteria due to apparent complexity of the processes in the intestine. In other words, there may be similar or even greater effects observed with other drugs and microbiota or, in other cases, no influence of probiotics on pharmacokinetics of a drug may be seen. In the case of AMI and EcN, on the basis of results described here it can be reasonably expected that the simultaneous uptake of the EcN strain and this drug would most probably pose no harm to the patient.

## Supporting Information

### Table S1 Pharmacokinetic (PK) parameters in rats after oral administration of amiodarone (50 mg/kg)

## References

- Sommer F, Bäckhed F (2013) The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11(4): 227–238.
- Taskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, et al. (2011) The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 8(2): 110–120.
- Meijerink M, Mercenier A, Wells JM (2013) Challenges in translational research on probiotic lactobacilli: from in vitro assays to clinical trials. *Benef Microbes* 4(1): 83–100.
- Stojančević M, Bojić G, Salami HA, Mikov M (2013) The influence of intestinal tract and probiotics on the fate of orally administered drugs. *Curr Issues Mol Biol* 16(2):55–68.
- Haïser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, Sirasani G, Balskus EP, et al. (2013) Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science* 341(6143):295–8.
- Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, et al. (2002) A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol* 184(21): 5912–5925.
- Sonnenborn U, Schulze J (2009) The non-pathogenic *Escherichia coli* Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology Hlth Dis* 21: 122–158.
- Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Tapadar D, Hunger JK, et al. (2005) Intestinal immunity of *Escherichia coli* Nissle 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 373–384.
- Tammock GW, Tiong IS, Priest P, Munro K, Taylor C, et al. (2011). Testing probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor) for its ability to reduce carriage of multidrug-resistant *E. coli* by elderly residents in long-term care facilities. *J Med Microbiol* 60: 366–370.
- Krammer H, Kämper H, von Büna R, Zieseniß E, Stange C, et al. (2006) Probiotische Arzneimitteltherapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3807 Patienten. *Z Gastroenterol* 44: 651–656.
- Henker J, Laass M, Blokhin BM, Bolbot YK, Maydannik VG, et al. (2007) The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatrics* 166: 311–318.
- Guarner F, Schlaafsma GJ (1998) Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39: 237–238.
- Roden DM (1993) Current status of class III antiarrhythmic drug therapy. *Am J Cardiol* 72: 44B–49B.
- Van Herendael H, Dorian P (2010) Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. *Vasc Hlth Risk Management* 6: 465–472.
- Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, et al. (2000) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: An approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* 28: 1303–1310.
- Elsherbiny ME, El-Kadi AOS, Brocks DR (2008) The metabolism of amiodarone by various CYP isoenzymes of human and rat, and the inhibitory influence of ketoconazole. *J Pharm Pharmacol* 11(1): 147–159.
- Meng X, Mojaverian P, Doedée M, Lin E, Weinryb I, et al. (2001) Bioavailability of amiodarone tablets administered with and without food in healthy subjects. *Am J Cardiol* 87: 432–435.
- Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli G, Olshansky B, Singh B (2000) Practical guidelines for clinicians who treat patients with amiodarone. *Arch Intern Med* 160: 1741–1748.
- Al-Salami H, Butt G, Fawcett JP, Tucker IG, Golocorbin-Kon S, et al. (2008) Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eur J Drug Metabol Pharmacokinetics* 33(2):101–106.
- Al-Salami H, Butt G, Tucker I, Srbic R, Golocorbin-Kon S, et al. (2008) Probiotic pre-treatment reduces gliclazide permeation (ex vivo) in healthy rats but increases it in diabetic rats to the level seen in untreated healthy rats. *Arch Drug Info* 1:35–41.
- Lee HJ, Zhang H, Orlovich DA, Fawcett JP (2012) The influence of probiotic treatment on sulfasalazine metabolism in rat. *Xenobiotica* 42(8): 791–797.
- Kunes M, Kvetina J, Kholova D, Bures J, Taskalova-Hogenova H, et al. (2011) Absorption kinetics of 5-aminosalicylic acid in rat: influence of indomethacin-induced gastrointestinal lesions and *Escherichia coli* Nissle 1917 medication. *Neuro Endocrinol Lett*. (Suppl 1): 46–52.
- Jun AS, Brocks DR (2001). High-performance liquid chromatographic assay of amiodarone in rat plasma. *J Pharm Pharmacol* 4(3): 263–268.
- Sartor RB (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126: 1620–1633.
- Chatelain P, Ferreira J, Laruel R, Ruyschaert JM (1986) Amiodarone-induced modifications of the phospholipid physical state. A fluorescence polarization study. *Biochem Pharmacol* 35(18): 3007–3013.
- Boury F, Gautier J-C, Bouligand Y, Proust J-E (2001) Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions. *Coll Surf B: Biointerfaces* 20: 219–227.
- Sigurdson HH, Kirch J, Lehr C-M (2013) Mucus as a barrier to lipophilic drugs. *Intl J Pharmaceutics* 453: 56–64.
- Koehn A, Kroemer HK, Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE (2011) Current understanding of hepatic and intestinal OATP-mediated drug-drug interactions. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4(6): 729–742.
- Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, Fardel O (2009) Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Drug Metab Dispos* 37(3): 685–693.
- Jacobi CA, Malferttheiner P (2011) *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): New insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis* 29: 600–607.
- Matuskova Z, Tunkova A, Anzenbacherova E, Zidek Z, Taskalova-Hogenova H, et al. (2009) Influence of probiotics on rat liver biotransformation enzymes. *Neuroendocrinol Lett* (Suppl 1): 41–45.
- Darwich AS, Neuhoff S, Jamei M, Rostami-Hodjegan A (2010) Interplay of metabolism and transport in determining oral drug absorption and gut wall metabolism: a simulation assessment using the “Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)” model. *Curr Drug Metab* 11(9): 716–729.

**Table S1. Pharmacokinetic (PK) parameters in rats after oral administration of amiodarone (50 mg/kg) with or without (control group) probiotic *E. coli* Nissle 1917 pre-treatment.**

Determined compound	AMI		DEA	
	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Saline solution	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Saline solution
$t_{1/2}$ [h]	11.19 ± 1.34	8.63 ± 0.91	6.92 ± 1.93	11.38 ± 2.76
$c_{max}$ [µg/mL]	0.82 ± 0.02	0.78 ± 0.16	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01
$t_{max}$ [h]	3.83 ± 1.18	3.50 ± 1.47	<b>8.33 ± 0.94</b>	5.50 ± 1.22
AUC <sub>0-30h</sub> [h·µg/mL]	<b>9.31 ± 0.65</b>	6.52 ± 0.60	<b>0.97 ± 0.10</b>	0.60 ± 0.03
AUC <sub>0-∞h</sub> [h·µg/mL]	<b>10.47 ± 0.67</b>	7.06 ± 0.50	<b>1.03 ± 0.08</b>	0.72 ± 0.05

AMI: amiodarone; DEA: N-desethylamiodarone;  $t_{1/2}$ : half-life;  $c_{max}$ : maximum drug concentration;  $t_{max}$ : time to reach  $c_{max}$ ; AUC: area under the curve. Results are expressed as mean ± S.D., N = 3. Values of parameters significantly differing from controls are in bold.

**Table S2. Pharmacokinetic parameters in rats after oral administration of amiodarone (50 mg/kg) with or without (control group) non-probiotic *E. coli* ATCC 25922 pre-treatment.**

Determined compound	AMI		DEA	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Saline solution	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Saline solution
$t_{1/2}$ [h]	11.00 ± 2.71	7.08 ± 0.69	7.86 ± 0.33	7.32 ± 1.31
$c_{max}$ [µg/mL]	0.66 ± 0.16	0.84 ± 0.18	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
$t_{max}$ [h]	3.17 ± 1.65	3.67 ± 2.36	6.50 ± 0.70	6.00 ± 1.40
AUC <sub>0-30h</sub> [h·µg/mL]	7.37 ± 0.53	6.74 ± 0.56	0.60 ± 0.09	0.54 ± 0.01
AUC <sub>0-∞h</sub> [h·µg/mL]	8.70 ± 0.23	7.27 ± 0.50	0.66 ± 0.11	0.59 ± 0.02

AMI: amiodarone; DEA: N-desethylamiodarone;  $t_{1/2}$ : half-life;  $c_{max}$ : maximum drug concentration;  $t_{max}$ : time to reach  $c_{max}$ ; AUC: area under the curve. Results are expressed as mean ± S.D., N = 3.

## 5. Publikace

**Matušková Z., Poruba M., Anzenbacher P. Cytochromy P450: Role v metabolismu cholesterolu. Klin Farmakol Farm 2014; 28(4): 142-146.**

# Cytochromy P450: Role v metabolismu cholesterolu

Zuzana Matušková<sup>1,2</sup>, Martin Poruba<sup>1</sup>, Pavel Anzenbacher<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav farmakologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>2</sup>Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Cytochromy P450 (CYPs) jsou enzymy, které se podílí nejen na metabolismu léčiv, ale také na přeměně řady endogenních látek, mj. cholesterolu, který hraje v lidském organismu významnou roli. V případě dysfunkce těchto enzymů mohou nastat závažná onemocnění, případně komplikace při léčbě. Tento článek se zabývá nejen samotným cholesterolem, ale především přehledem poruch enzymů metabolizujících cholesterol, a rovněž terapií následků enzymových insuficiencí. Léčba onemocnění tohoto typu spočívá především v substituční terapii, nicméně, i bez včasného vyšetření jednotlivých markerů nemusí být samotná léčba dostatečná.

**Klíčová slova:** cholesterol, cytochromy P450, enzymová insuficience, léčba.

## Cytochromes P450 in the main role in a metabolism of cholesterol

Cytochrome P450 (CYPs) are enzymes which are involved in drug metabolism and also in biotransformation of a variety of endogenous compounds incl. cholesterol, which plays an important role in human body. In the case of malfunction of these CYP enzymes, complications in the treatment of diseases can take place and/or enzymes can also cause various diseases itself. This paper deals with cholesterol, disorders of enzymes metabolizing cholesterol and consequences of therapies of enzyme insufficiency. Treatment of diseases of this type consists mainly in replacement therapy; however, without the early testing of the individual markers, the treatment may not be sufficient.

**Key words:** cholesterol, cytochromes P450, enzyme insufficiency, therapy.

Klin Farmakol Farm 2014; 28(4): 142–146

### Seznam zkratk

ABC transportéry – transportní proteiny (adenosin triphosphate-binding cassette transporters)

ABS – Antley-Bixlerův syndrom

BSEP – exportní pumpa solí žlučových kyselin

CAH – kongenitální adrenální hyperplazie

CAR – konstitutivní androstanový receptor

CETP – cholesterol-ester transfer protein

CYPs – cytochromy P450

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A

OATP1B1 – transportní polypeptid organických aniontů 1B1

PCSK 9 – protein konvertáza subtilisin/kexin typ 9

POR – gen kódující NADPH-cytochrom P450-reduktázu

PPAR – nukleární receptory, které jsou obecně aktivované proliferátory peroxizomů

PXR – pregnanový receptor X

### Cholesterol a jeho důležité funkce v lidském těle

Cholesterol je steroidní látka, která se v organismu účastní různých biochemických cest (1). Podílí se na stavbě buněčných membrán, a to zejména na její fluiditě (2), dále je substrátem pro syntézu biologicky významných látek, jako jsou oxysteroly, žlučové kyseliny nebo steroidní hormony (3, 4). Cholesterol je regulátorem genové transkripce, degradace proteinů, enzymových aktivit a bývá zapojený do programované buněčné smrti a transdukce signálu (5). Cholesterol

je tedy pro lidský organismus nesmírně důležitý. Je syntetizován *de novo* (600–900 mg/den) z acetylkoenzymu A a jeho biosyntéza probíhá u lidí prakticky ve všech tkáních, přičemž nejvíce v játrech a mozku (5, 6). Cholesterol se do organismu dostává také z přijímané potravy. Množství přijímaného cholesterolu by mělo dosahovat 300–500 mg/den (5). Zvýšený příjem cholesterolu, a tím zvýšené hladiny cholesterolu v organismu, má za následek zvýšení rizika vzniku aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění.

### Enzymy metabolizující cholesterol

Cytochromy P450 (CYPs) jsou hemové proteiny, které jsou odpovědné za přeměnu nemalého množství látek v těle. Vyskytují se především v játrech, ale nacházejí se také v dalších tkáních, jakou jsou např. plíce, ledviny, gastrointestinální trakt, kůže, mozek nebo nadledviny (7). V lidském těle je dosud známo 57 aktivních genů, které jsou rozděleny do 18 rodin. Aby mezi označením těchto enzymů nevzniklo nedorozumění, označují se číselně podle rodiny. V každé rodině jsou enzymy, které mají minimálně 40% podobnost v sekvenci aminokyselin. Pokud je mezi enzymy podobnost větší než 55%, řadí se společně do podrodiny, která se označuje písmenem. Konečné číslo pak označuje individuální gen, např. CYP3A4 (8). CYPs metabolizují exogenní látky, jako jsou léčiva nebo nečistoty životního prostředí, ale také endogenní látky.

Mezi ně patří např. cholesterol, který je těmito hemovými proteiny metabolizován na steroidní hormony a žlučové kyseliny. Tvorbě žlučových kyselin se účastní především CYP7A1, dále pak CYP27A1, 8B1, 39A1, 3A4 a 46A1. Naopak enzymy CYP11A1 a CYP17A1 se podílejí na tvorbě gestagenů, estrogenů, glukokortikoidů i mineralokortikoidů. Biosyntéza glukokortikoidů a mineralokortikoidů probíhá dále za přítomnosti CYP21A2 a CYP11B, zatímco biosyntézu pohlavních hormonů umožňuje CYP19A1. Již samotný cholesterol vzniká působením enzymu CYP51 a jeho prekurzor 7-dehydrocholesterol se postupně přeměňuje za účasti CYP2R1, CYP27A1 a CYP27B1 na kalcitriol, tedy aktivní formu vitamínu D (9, 10). Metabolismus cholesterolu zahrnuje tedy několik biochemických cest, ve kterých hrají důležitou roli cytochromy P450 (obrázek 1).

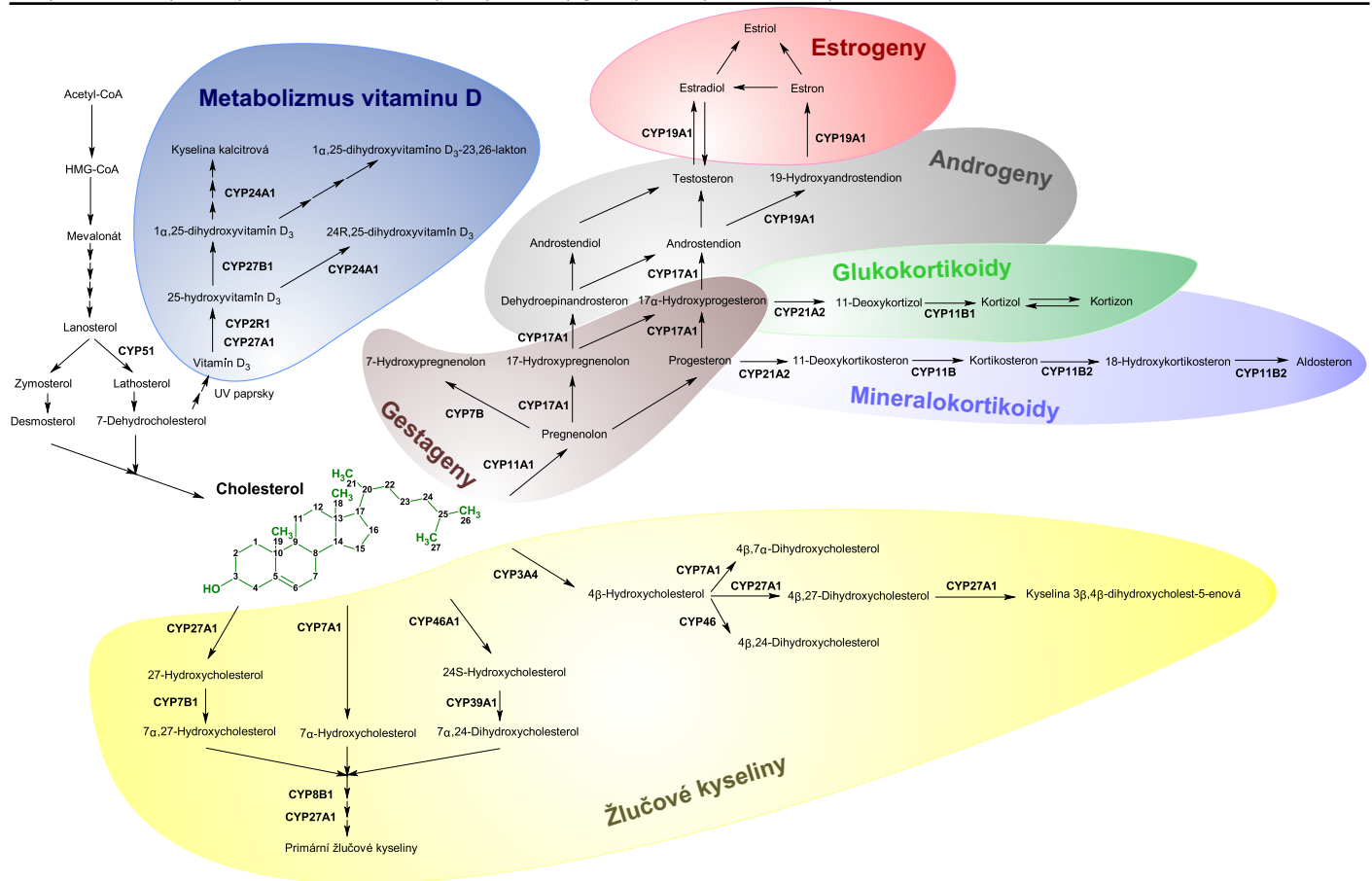
### Léčba zvýšené plazmatické hladiny cholesterolu

Cholesterol je pro lidský organismus nezbytnou látkou, nicméně pokud jsou jeho hladiny v krevní plazmě vysoké, zvyšuje se riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Biosyntéza cholesterolu je řízena jeho příjmem v potravě, proto jedna z léčebných metod snížení plazmatické hladiny cholesterolu je dodržování správné životosprávy. Mezi registrovaná léčiva, vhodná pro léčbu hypercholesterolemie, patří statiny (*atorvastatin*, *fluvastatin*, *lovastatin*,



**Obrázek 1.** Schématické znázornění biosyntézy cholesterolu a jeho metabolismu: biochemické cesty za účasti cytochromů P450 směřující k syntéze žlučových kyselin, mineralokortikoidů a glukokortikoidů, gestagenů, androgenů, estrogenů a vitamínu D.

Acetyl-CoA – acetylkoenzym A; HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A; CYP – cytochrom P450



**rosuvastatin, simvastatin).** Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici aktivity 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A (HMG-CoA) reduktázy, která se podílí na biosyntéze cholesterolu (5, 11). Dalšími používanými hypolipidemiky jsou fibráty (**ciprofibrát, fenofibrát**), což jsou agonisté receptorů PPAR $\alpha$ . Nukleární receptory PPAR mají funkci transkripčních faktorů, které regulují expresi genů. Obecně jsou tyto receptory aktivované proliferátory peroxizomů, jako jsou např. právě fibráty (11). Účinná je také **kyselina nikotinová**, nicméně její přínos nepřevážil rizika léčby, a proto byla její registrace pozastavena. Pro snížení plazmatické hladiny cholesterolu by mohlo být účinné snížení absorpce cholesterolu nebo zvýšení jeho eliminace. Klíčovou roli v absorpci cholesterolu zaujímá specifický transportní protein Niemann-Pick C1-Like 1. Mezi inhibitory tohoto transportního proteinu se řadí **ezetimib**. Jeho působením dochází ke snížení absorpce cholesterolu v tenkém střevě a zároveň k blokadě zpětné reabsorpce cholesterolu vyloučeného z hepatocytů do žluče (12). Ezetimib sice nemá významný pozitivní vliv na kardiovaskulární onemocnění, nicméně jeho hypolipidemický účinek se využívá při dysfunkci ABCG5/8 transportérů.

Tyto ABC transportní proteiny (**A**denosin triphosphate-**b**inding **c**assette transporters) se starají o zpětnou exkreci absorbovaného cholesterolu. Působí tedy jako effluční pumpy, které snižují absorpci cholesterolu z lumen střeva, zatímco v játrech naopak zvyšují jeho exkreci do žluče (13). Případná mutace a následná deplece exprese ABCG5/8 transportérů má za následek autozomálně recesivní onemocnění zvané sitosterolémie, u níž pacienti vykazují zvýšené plazmatické hladiny sterolů, a především jsou ohroženi předčasným rozvojem aterosklerózy a zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Toto onemocnění je sice velmi vzácné a na celém světě je asi 100 případů, nicméně podávání vyšších dávek fytosterolů, tedy přírodních sterolů, by mohlo mít při nerozpoznané sitosterolémii nepříznivé účinky (14). V současné době jsou testovány látky, které inhibují cholesterol-ester transfer protein (CETP), a tím v organismu způsobí zvýšení hladiny HDL cholesterolu a snížení hladiny LDL cholesterolu. Tuto strategii ke snížení rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění využívají látky **anacetrapib** a **evacetrapib**, které jsou stále ve třetí fázi klinického testování (15). Stejně tak jsou ve třetí fázi klinického testování

látky, které inhibují protein konvertázu subtilisin/kexin typ 9 (PCSK 9). Tyto inhibitory snižují degradaci LDL-receptorů, a tím dochází ke snížení plazmatické hladiny LDL cholesterolu (16). Mezi doplňky základní farmakoterapie lze zahrnout **silymarin**, což je směs přírodních flavonoidů z ostropestřice mariánské, jež má antisklerotické a hepatoprotektivní účinky (17). Je také možné podat probiotické mikroorganismy rodu **Lactobacillus** nebo **Bifidobacterium**, u nichž se ukazuje, že mají hypocholesterolemický účinek (18, 19). Tyto účinky silymarinu i probiotik se opírají o experimentální data; nicméně, co se týče klinického hodnocení, v případě silymarinu není dostatek důkazů, zda má tato látka opravdu takový efekt u lidí. Naproti tomu určitá probiotika se zdají být vhodná jako doplněk základní farmakoterapie hypercholesterolémie (19). Jedna z možností snížení hladiny cholesterolu by mohla být také kompetitivní inhibice CYP51, který se podílí na biosyntéze cholesterolu. Bohužel, u látek, ovlivňujících aktivitu tohoto enzymu, převažovaly nežádoucí účinky, a proto se tyto látky nepoužívají ke snížení hladiny cholesterolu u člověka, nýbrž především k léčbě mykotických onemocnění (5).

## Enzymová insuficience při tvorbě žlučových kyselin a její léčba

Jedna z možných cest degradace cholesterolu probíhá v játrech za vzniku žlučových kyselin (5). I při biosyntéze žlučových kyselin jsou nezbytné cytochromy P450. V případě jejich dysfunkce by mohlo dojít k akumulaci cholesterolu v játrech, a tím ke zvýšenému riziku vzniku kardiovaskulárního onemocnění. První krok v biosyntéze žlučových kyselin je zprostředkován jaterním mikrozomálním enzymem CYP7A1. Jedná se o neutrální, nebo tzv. klasickou, cestu syntézy žlučových kyselin, ve které dochází k hydroxylaci cholesterolu v poloze 7 $\alpha$  (20). CYP7A1 je rychlost limitující a především iniciačně regulační enzym v syntéze žlučové kyseliny cholové a chenodeoxycholové (21). Porucha funkce CYP7A1 není u lidí smrtelná, nicméně jeho nefunkčnost vede ke zvýšení plazmatické hladiny celkového a LDL cholesterolu, k nahromadění cholesterolu v játrech (5, 20), k akumulaci hepatotoxických nenasyčených monohydroxylovaných žlučových kyselin (22) a ke zvýšení progresse aterosklerózy (23). Je třeba brát v úvahu, že lidé se sníženou aktivitou CYP7A1 mají nižší odpověď na podání atorvastatinu, který snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Pro stimulaci funkce a aktivity enzymu CYP7A1 mohou pomoci látky se schopností snižovat absorpci žlučových kyselin v ileu, jako jsou **cholestyramin** a **kolestipol**. Tato hypolipidemika ze skupiny pryskyřic jsou schopna ve střevě vázat žlučové kyseliny, a tím bránit jejich zpětnému vstřebávání. Nicméně, kromě zpětného vstřebávání žlučových kyselin mohou také stejným mechanismem zabránit vstřebávání lipofilních látek, jako jsou např. vitaminy rozpustné v tucích, a tím vést k jejich nedostatku.

Žlučové kyseliny mohou být také tvořeny cestou alternativní, neboli tzv. kyselou, která je katalyzována enzymem CYP27A1, a následně pak CYP7B1. Inaktivace enzymu CYP27A1 vede ke snížení produkce žlučových kyselin (především kyseliny chenodeoxycholové), ke zvýšení tvorby cholestanolu v mozku a šlachách, a také ke zvýšení tvorby žlučových alkoholů. Důsledkem toho se u této populace může rozvinout onemocnění zvané cerebrotendinální xantomatóza, tedy onemocnění, které se klinicky projevuje předčasnou demencí, ataxií, šedým zákalem a vznikem xantomů (20). V takovém případě se při léčbě podává samotná **kyselina chenodeoxycholová** nebo v kombinaci se statiny. Aby byla léčba účinná, je zapotřebí tuto nemoc včas diagnostikovat (24).

CYP7B1 je na rozdíl od předcházejícího enzymu CYP27A1 obsažen v endoplazmatickém retikulu buněk v mnoha tkáních, přičemž je nej-

více exprimován v mozku a ledvinách (20). Jedná se o 7 $\alpha$ -hydroxylázu, která oxiduje 25- a 27-hydroxycholesterol na příslušné metabolity. CYP7B1 hraje roli nejen v syntéze žlučových kyselin, ale také v metabolismu steroidních hormonů, receptorových ligandů estrogeneru, a také v produkci imunoglobulinu. Díky tomu má tento enzym široké spektrum substrátů a v každé obsažené tkáni vykonává různé fyziologické funkce (25). Při ztrátě funkce CYP7B1 dochází v séru i moči k akumulaci celkových oxysterolů (20). Defekt v genu *CYP7B1* vede u novorozenců dětí k selhání jater, a to z důvodu zvýšené koncentrace kyseliny 3 $\beta$ -hydroxychol-5-en-24-ové, u dětí a dospělých dochází k progresivní neuropatii až spastické paraplegii. Pro toto onemocnění není dosud známá specifická léčba (25).

CYP8B1 je dalším enzymem, který se podílí na vzniku žlučových kyselin. Polymorfismus jeho genu není dosud spojován s žádnou nemocí (20), nicméně porucha aktivity CYP8B1 by mohla vést k modifikaci syntézy žlučových kyselin a změně ve vylučování cholesterolu. Aktivitu tohoto enzymu je možné zvýšit **cholestyraminem** nebo **kolestipolem** (jako v případě u nízké aktivity CYP7A1).

Přestup cholesterolu přes hematoencefalickou bariéru z CNS do krevní plazmy umožňují CYP46A1, který je lokalizován především v mozku, kde hydroxyluje cholesterol na 24-hydroxycholesterol (26). Samotný cholesterol přes hematoencefalickou bariéru projít nedokáže, nicméně jeho oxidovaná forma projít může. Zajímavé je, že transkripční aktivita CYP46A1 není regulována cholesterolem, oxysteroly, žlučovými kyselinami ani dalšími látkami hrajícími roli v rovnováze cholesterolu. Bylo zjištěno, že up-regulaci transkripce CYP46A1 způsobuje pouze oxidativní stres (27). Polymorfismus genu *CYP46A1* je spojený s Alzheimerovou chorobou (20), která je v současnosti léčena především kognitivní – inhibitory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy (**donepezil**, **galantamin**, **rivastigmin**) nebo se podává antagonistu N-methyl-D-aspartátového receptoru (**memantin**).

CYP3A4 je nejvíce zastoupeným enzymem z řady cytochromů P450 v játrech a je také odpovědný za přeměnu většiny léčiv. CYP3A4 metabolizuje cholesterol na 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, který je dále pravděpodobně metabolizován na žlučové kyseliny přes CYP7A1, CYP27A1 nebo CYP46. Jak se ukazuje, 4 $\beta$ -hydroxycholesterol by mohl být endogenním markerem aktivity CYP3A4. Studie totiž ukazují, že pacienti s vyšší aktivitou CYP3A4 mají vyšší plazmatické hladiny 4 $\beta$ -hydroxycholesterolu (28). Stejně tak se používá i kortizol, jehož

metabolit 6 $\beta$ -hydroxykortizol se stanovuje v moči pacienta společně s parentní látkou. CYP3A4 přeměňuje další steroidní látky, jako je např. testosteron, jehož metabolit 6 $\beta$ -hydroxytestosteron se používá ke stanovení enzymové aktivity CYP3A *in vitro*. Informace o aktivitě tohoto enzymu je pro farmakologa i lékaře velmi důležitá, protože může pomoci předejít předávkování pacienta, případně usnadnit úpravu dávkování podávaného léčiva během léčby.

## Enzymová insuficience při tvorbě steroidních hormonů a její léčba

Cholesterol je také metabolický prekurzor všech steroidních hormonů. Metabolismus v tomto případě probíhá odlišným způsobem než v případě vzniku žlučových kyselin, nicméně i zde hrají významnou roli cytochromy P450. Mezi ně patří např. CYP11A1, který se nachází především v nadledvinách, vaječnicích, varlatech, placentě a mozku. Zajišťuje první krok v biosyntéze steroidních pohlavních hormonů a hormonů kůry nadledvin (29). Jeho úkolem je odštěpení postranního řetězce z molekuly cholesterolu za vzniku pregnenolonu, který podléhá dalším reakcím za vzniku androgenů, estrogeneru, gestagenů nebo kortikosteroidů. Tyto hormony jsou velmi důležité při zvládnání stresu a zátěže, v krvi udržují normální hladinu cukru nebo udržují rovnováhu minerálních látek, zajišťují správný vývoj pohlavních orgánů a jsou nezbytné pro reprodukci. Mutace v genu *CYP11A1* by mohla vést k narušení biosyntézy těchto důležitých hormonů. Onemocnění, jehož hlavním rysem je porucha biosyntézy steroidních hormonů kůry nadledvin, tedy glukokortikoidů i mineralokortikoidů, se nazývá kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) (30). Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, které vzniká především mutací v genu *CYP21A2* nebo *CYP11B* a prevalence tohoto onemocnění je v Evropě 1:15 000–20 000 živě narozených dětí (31). Více než 90% pacientů tohoto onemocnění má poruchu funkce 21-hydroxylázy, tedy CYP21A2, a v případě této příčiny onemocnění dochází ke zvýšení hladiny 17-hydroxyprogesteronu, androstendionu a testosteronu, snížení hladiny kortizolu a ve vážných případech k nedostatku aldosteronu. 5–8% pacientů onemocnění CAH má poruchu funkce 11 $\beta$ -hydroxylázy, tedy CYP11B, která způsobuje nedostatečnou přeměnu 11-deoxykortizolu na kortizol a 11-deoxykortikosteronu na kortikosteron. Dochází tak opět ke snížení produkce kortizolu a ostatních glukokortikoidů (32). Nedostatek aldosteronu způsobuje ztrátu sodíku z ledvin, dochází k hypovolemii a hyper-

kalemii. Nedostatek kortizolu má za následek slabou srdeční kontraktilitu a cévní tonus. Díky hormonu melanokortinu se objevuje hyperpigmentace pokožky, především na genitáliích. V důsledku negativní zpětné vazby se zvyšuje produkce kortikoliberinu, a tedy i kortikotropinu, jehož výsledkem je akumulace steroidních prekurzorů. Pacienti s CAH se neobejdou bez hormonální substituční terapie. Běžně se podává glukokortikoid **hydrokortizon**, případně mineralokortikoid **fludrokortizon**. Kojenci s nemocí CAH se díky fyziologické mineralokortikoidní rezistenci léčí vysokými dávkami fludrokortizonu, nicméně mezi 12. a 18. měsícem života by měla být dávka bezpečně snižována, aby se předešlo hypertenzi. Je tedy důležité sledovat krevní tlak, množství elektrolytů v krevní plazmě a plazmatickou aktivitu reninu. Pacientům se solnou poruchou CAH je také potřeba dodat sodík ve formě solných tobolek.

CYP17A1 je klíčovým enzymem v biosyntéze kortizolu, ale také pohlavních steroidních hormonů. Má totiž funkci 17 $\alpha$ -hydroxylázy i 17,20-lyázy. Porucha funkce 17 $\alpha$ -hydroxylázy je příčinou onemocnění CAH, nicméně tato příčina je vzácná. Vyskytuje se pouze u 1 % pacientů s CAH. Nízká nebo žádná aktivita CYP17A1 má za následek snížené nebo neměřitelné hladiny pohlavních hormonů. Dívky s poruchou CYP17A1 se rodí s normálními genitáliemi, nicméně nedochází u nich k vývoji dělohy a vejcovodů. Chlapci se rodí s ženskými genitáliemi z důvodu nekompletního nebo žádného vývoje mužských genitálií (32). Ženský pohlavní hormon se doplňuje ve formě **17 $\alpha$ -ethinylestradiolu** nebo jeho prekurzoru **mestranolu**. Při nedostatku mužského pohlavního hormonu se perorálně podává **testosteron undekanoát**.

Aktivita CYPs je také dána přítomností genu NADPH-cytochrom P450-reduktázy (POR), jehož deficit by mohl způsobit inhibici cytochromů P450 nebo také vznik Antley-Bixlerova syndromu (ABS) (33). ABS je neobvyklé onemocnění novorozenců projevující se kraniosynostózou s hypoplazií středové části obličeje a dysplazií uší a nosu. Deformace postihují i kosti končetin. Může být také narušena tvorba steroidních hormonů, zejména pohlavních, jejímž důsledkem je narušený vývoj pohlavních orgánů (34). Prevence proti tomuto geneticky podmíněnému onemocnění v současné době není, nicméně je třeba se vyvarovat podávání flukonazolu během těhotenství. Flukonazol může totiž vyvolat ABS u dětí, jejichž matky tento lék užívaly ve vyšších dávkách v raném stadiu těhotenství. Léčba ABS se řeší chirurgickými a ortopedickými zákroky (20).

## Vliv léčiv na metabolismus cholesterolu a lékové interakce

Ovlivnění funkce cytochromů P450 nemusí být jen geneticky podmíněné, ale může být vyvolané podanými léčivy. Příkladem může být inhibice CYP11B, tedy enzymu, důležitého pro tvorbu kortikosteroidů. Může být selektivně inhibován celkovým anestetikem **etomidátem** nebo jinými léčivy, jako jsou **metyrapon** či **aminoglutetimid**. Některá léčiva mohou inhibovat vylučování solí žlučových kyselin z jater do žluče prostřednictvím exportní pumpy solí žlučových kyselin (BSEP). Léky, jako **cyklosporin A**, **glibenklamid** nebo **bosentan**, mohou tuto pumpu inhibovat přímo v hepatocytu, čímž mohou snížit sekreci solí žlučových kyselin do střeva a způsobit tak vznik cholestatického onemocnění (35). K léčbě cholestázy se pak používá **cholestyramin**, ale může se také použít antibiotikum **rifampicin**, které je silným agonistou pregnanového receptoru X (PXR) a způsobuje inhibici genové transkripce CYP7A1, čímž dojde ke snížení biosyntézy žlučových kyselin (36, 37).

Podané léčivo může mít nežádoucí účinek na metabolismus cholesterolu, ovšem účinek léků podávaných s cílem ovlivnit hladinu cholesterolu nebo jeho metabolitů v lidském těle může být ovlivněn také jiným, současně podávaným, léčivem. Aktivace nukleárních receptorů, vyvolaná podanými léčivy, může být příčinou indukce transportních proteinů a enzymů metabolizujících léčiva a způsobit tak farmakokinetické lékové interakce. Mezi příklady klinicky významných interakcí rifampicinu prostřednictvím kompetice ve vazbě na PXR patří **cyklosporin A**, **fenobarbital**, **midazolam**, **verapamil** nebo **warfarin**. Vysokou aktivitu k PXR receptoru má i přírodní sedativum **hyperforin**, který je obsažený v extraktu třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Již v nízkých koncentracích významně indukuje jaterní i střevní CYP3A4 a CYP2C9, a tím může ovlivnit biotransformaci jiných léčiv (např. některá **kontraceptiva**, **digoxin**, **warfarin**) (38). **Statiny**, které se používají k terapii hypercholesterolemie, jsou ligandy PXR, ale také konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a metabolizují se přes CYP3A4. Pacienti by se tedy měli vyhnout látkám, které působí přes tyto nukleární receptory anebo inhibují aktivitu CYP3A4 (antibiotika **klarithromycin** a **erythromycin**, **azolová antimykotika**). Inhibice CYP3A4 může způsobit akumulaci statinů v těle a zvýšit tak výskyt jejich nežádoucích účinků, především na kosterní sval. Navíc všechny statiny jsou substráty transportního proteinu OATP1B1, tedy i na této úrovni může

dojít k lékovým interakcím (39, 40). Je tedy nutno brát v úvahu možnost vzniku interakce vyvolané jak současně podaným léčivem, tak i podanou přírodní látkou, a snažit se tak zamezit vzniku nežádoucích účinků.

## Závěr

Metabolismus cholesterolu zahrnuje různé biochemické cesty, v nichž hrají významnou roli enzymy z rodiny cytochromů P450 (CYPs). Aktivita CYPs může být ovlivněna různými faktory, mj. lékovými interakcemi a genetickými vlivy. Může tak dojít ke vzniku geneticky determinovaných onemocnění, a rovněž k manifestaci nežádoucích účinků.

*Tato práce vznikla na základě zahraniční stáže Zuzany Matuškové v laboratoři prof. Zangera (Institut klinické farmakologie Dr. Margarete-Fischer-Bosch, Stuttgart, Německo). Autoři děkují za podporu projektům CZ.1.07/2.4.00/17.0015, GAČR 13-10813S a IGA UPOL LF\_2014\_008.*

## Literatura

1. McLean KJ, Hans M, Munro AW. Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(3): 587–593.
2. Schroeder F, Wood WG, Kier AB. Lipid domains and biological membrane function. In: Sperelakis N. *Cell physiology sourcebook*, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, 2001: 81–94.
3. Schroefer GJ Jr. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 2000; 80(1): 361–554.
4. Lubanda H, Vecka M. Cholesterol – přítel či nepřítel? *Chem Listy* 2009; 103: 40–51.
5. Pikuleva IA. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 761–773.
6. Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(5): 806–815.
7. Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, et al. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy* 1999; 93: 229–237.
8. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 737–747.
9. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(20): 7711–7715.
10. Tieu EW, Tang EKY, Tuckey RC. Kinetic analysis of human CYP24A1 metabolism of vitamin D via the C24-oxidation pathway. *FEBS J* 2014; 281(14): 3280–3296.
11. Salakhutdinov NF, Laev SS. Triglyceride-lowering agents. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 3551–3564.
12. Krysiak R, Żmuda W, Okopień B. The effect of ezetimibe on adipose tissue hormones in patients with isolated hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep* 2014; 66: 442–447.
13. Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, et al. The ABCG5/8 cholesterol transporter and myocardial infarction versus gallstone disease. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(20): 2121–2128.
14. Melenotte C, Carrié A, Serratrice J, et al. Sitosterolemia: A new mutation in a Mediterranean patient. *J Clin Lipidol* 2014; 8: 451–454.
15. Mohammadpour AH, Akhlaghi F. Future of cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitors: A pharmacological perspective. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52(8): 615–626.
16. Ling H, Burns TL, Hilleman DE. An update on the clinical development of proprotein convertase subtilisin kexin 9 inhibitors, novel therapeutic agents for lowering low-density lipoprotein cholesterol. *Cardiovasc Ther* 2014; 32(2): 82–88.

17. Solhi H, Ghahremani R, Kazemifar AM, et al. Silymarin in treatment of non-alcoholic steatohepatitis: A randomized clinical trial. *Caspian J Intern Med* 2014; 5(1): 9–12.
18. Yazid AM, Sabet MR, Abdulah S, et al. Probiotic microorganisms: Potential use in the reduction of serum cholesterol level. *Pak J Biol Sci* 1999; 2(4): 1663–1667.
19. Kumar M, Naggal R, Kumar R, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 902917.
20. Lorbek G, Lewinska M, Rozman D. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids – from mouse models to human diseases. *FEBS J* 2012; 279: 1516–1533.
21. Shinkyo R, Guengerich FP. Cytochrome P450 7A1 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylation: individual reaction steps in the catalytic cycle and rate-limiting ferric iron reduction. *J Biol Chem* 2011; 286(6): 4632–4643.
22. Setchell KDR, Schwartz M, O'Connell NC, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the Oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest* 1998; 102(9): 1690–1703.
23. Hofman MK, Princen HM, Zwinderman AH, et al. Genetic variation in the rate-limiting enzyme in cholesterol catabolism (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase) influences the progression of atherosclerosis and risk of new clinical events. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 539–545.
24. Pikuleva IA, Waterman MR. Cytochromes P450: Roles in Diseases. *J Biol Chem* 2013; 288(24): 17091–17098.
25. Stiles AR, McDonald JG, Bauman DR, et al. CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *J Biol Chem* 2009; 284: 28485–28489.
26. Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7238–7243.
27. Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, et al. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 2006; 281: 3810–3820.
28. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome P4503A4. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38685–38689.
29. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 669–679.
30. Katsumata N, Ohtake M, Hojo T, et al. Compound heterozygous mutations in the cholesterol side-chain cleavage enzyme gene (CYP11A) cause congenital adrenal insufficiency in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8): 3808–3813.
31. Khalid JM, Oerton JM, Dezateux C, et al. Incidence and clinical features of congenital adrenal hyperplasia in Great Britain. *Arch Dis Child* 2012; 97: 101–106.
32. New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 75–83.
33. Miller WL, Agrawal V, Sandee D, et al. Consequences of POR mutations and polymorphisms. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 336: 174–179.
34. McGlaughlin KL, Witherow H, Dunaway DJ, et al. Spectrum of Antley-Bixler syndrome. *J Craniofac Surg* 2010; 21(5): 1560–1564.
35. Mareček Z. Farmakoterapie jaterní cholestázy. *Remedia* 2007; 17(4): 316–322.
36. Li T, Chiang JY. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(1): G74–G84.
37. Rezen T, Rozman D, Pascucci J-M, et al. Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1814(1): 146–160.
38. Pávek P, Červený L, Mičuda S, et al. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* 2005; 5: 4–5.
39. Patel AM, Shariff S, Bailey DG, et al. Statin toxicity from macrolide antibiotic coprescription: a population-based cohort study. *Ann Intern Med* 2013; 158(12): 869–876.
40. Chauvin B, Drouot S, Barrail-Tran A, et al. Drug-drug interactions between HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and antiviral protease inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52(10): 815–831.

Článek přijat redakcí: 14. 4. 2014  
Článek přijat k publikaci 21. 5. 2014

---

**Mgr. Zuzana Matušková**

Ústav farmakologie,  
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc  
zuzu.Matuskova@seznam.cz

---