

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2023

Marie Chvátalová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus cizorodých látek

Bakalářská práce

Autor: Marie Chvátalová

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D

Rok: 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, všechny použité zdroje a literaturu jsem řádně citovala a bakalářskou práci jsem nepoužila k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Olomouci dne: 17. 5. 2023

.....

Marie Chvátalová

Poděkování:

Touto formou bych ráda poděkovala Mgr. Lence Jourové, Ph.D. za ochotu, odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady, které mi poskytla při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za odborný dohled při psaní teoretické části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Veronice Frýbortové a Mgr. Štefanu Šatkovi za pomoc s prací v laboratoři, a také mé rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení:	Marie Chvátalová
Název práce:	Studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus cizorodých látek
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Školitel:	Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023

Abstrakt:

Střevní mikrobiom má významný vliv na lidský organismus a je spojován s rozvojem celé řady onemocnění. Střevní mikrobiom ovlivňuje také metabolismus léčiv a tím potencionálně i výsledek farmakoterapie. Nejdůležitějšími biotransformačními enzymy I. fáze jsou cytochromy P450 (CYP), které jsou zodpovědné za biotransformaci 70–80 % všech klinicky užívaných léčiv.

Cílem bakalářské práce bylo studium vlivu střevního mikrobiomu na enzymovou aktivitu vybraných CYP v mikrosomální frakci izolované z jater myších samců a samic. Pro posouzení vlivu mikrobiomu byly použity gnotobiotické myši s přesně definovaným složením střevního mikrobiomu.

Ze získaných dat vyplývá, že střevního mikrobiom a kolonizace bezmikrobních myši probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) ovlivňuje aktivity vybraných CYP v játrech. Zároveň byly pozorovány rozdíly vlivu bezmikrobního stavu a kolonizace EcN u samců a samic. Vliv střevního mikrobiomu spolu s dalšími faktory (např. pohlaví) by tak neměl být opomíjen při hledání bezpečné a efektivní farmakoterapie.

Klíčová slova:	Střevní mikrobiom, Cytochromy P450, Metabolismus cizorodých látek, Gnotobiotické modely
Počet stran:	46
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Marie Chvátalová

Title: Study of the influence of the gut microbiome on metabolism of xenobiotics

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of medical chemistry and biochemistry, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc

Advisor: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract:

The gut microbiome influences significantly human health and predisposition to many diseases. The gut microbiome also influences drug metabolism and thus potentially the outcome of pharmacotherapy. The most important phase I biotransformation enzymes are cytochromes P450 (CYPs), which are responsible for the metabolism of 70–80 % of all clinically used drugs.

The aim of the bachelor thesis was to study the influence of the gut microbiome on the enzyme activity of selected CYPs in the microsomal fraction isolated from the livers of male and female mice. To assess the effect of microbiome, gnotobiotic mice with a precisely defined composition of the intestinal microbiota were used.

The obtained data has shown that the gut microbiome and the colonization of germ-free mice with the probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) influence the activities of selected CYPs in the liver. Further, differences in the effect of the germ-free state and EcN colonization were observed in male and female mice. Therefore, the influence of the gut microbiome along with other factors (e. g. gender) should not be neglected in the search for safe and effective pharmacotherapy.

Keywords: Gut microbiome, Cytochromes P450, Metabolism of xenobiotics, Gnotobiotic models

Number of pages: 46

Language: Czech

Seznam zkratek:

5-ASA – 5-aminosalicylová kyselina

ACN – acetonitril

AIDS – soubor příznaků a infekcí způsobených oslabením imunitního systému virem HIV

BCA – kyselina bicinchoninová

CYP – cytochromy P450

CYPOR – cytochrom P-450 oxidoreduktasou

EcN – *Escherichia coli* Nissle 1917

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ETRR – ethoxyresorufin

FAD – flavinadenindinukleotid

FMN – flavinmononukleotid

GF – germ free – postrádající mikrobiální osídlení, bezmikrobní

GIT – gastrointestinální trakt

HP – homogenizační pufr

IDH – isocitrát dehydrogenasa

ISO – kyselina DL-isocitronová

MS – mikrosomální frakce

NADP⁺ – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NADPH – redukovaný β -nikotinamidadenindinukleotid fosfát

PMSF – fenylmethanlsulfonyl fluorid

PP – promývací pufr

SPF – specific pathogen free – *in vivo* modely s normální střevní mikroflórou, bez přítomnosti patogenních bakterií, kontrolní skupina myši

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan

UDP-glukuronosyltransferasa – uridin 5'-difosfo-glukuronosyltransferasa

Obsah

Seznam zkratk:	7
Cíle bakalářské práce	10
Úvod	11
Teoretická část	12
1. Lidský mikrobiom	12
2. Střevní mikrobiom	13
2.1. Složení střevního mikrobiomu	14
2.1.1. Žaludek	14
2.1.2. Tenké střevo	14
2.1.3. Tlusté střevo	15
2.2. Faktory ovlivňující složení a funkci střevního mikrobiomu	15
2.2.1. Strava	16
2.2.2. Věk	17
2.2.3. Genetické predispozice hostitele	17
2.2.4. Fyzická aktivita	18
2.2.5. Antibiotika	18
2.3. Střevní mikrobiom a metabolismus xenobiotik	18
2.3.1. Mechanismy působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv	19
3. Metabolismus xenobiotik	21
3.1. Cytochromy P450	22
3.1.1. Nomenklatura	23
3.1.2. Podrodina CYP1A	23

3.1.3.	Podrodina CYP2A	24
3.1.4.	Podrodina CYP3A	24
4.	<i>In vivo</i> modely pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv..	25
Experimentální část.....		26
5.	Materiál	26
5.1.	Chemikálie	26
5.2.	Přístrojové vybavení	26
6.	Metody	27
6.1.	Navržení experimentu.....	27
6.2.	Příprava jaterní mikrosomální frakce	28
6.3.	Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci.....	28
6.4.	Stanovení celkové koncentrace proteinů	29
6.5.	Stanovení aktivit CYP	30
7.	Výsledky	34
7.1.	Charakterizace mikrosomální frakce	34
7.2.	Stanovení aktivit CYP	34
7.2.1.	Stanovení aktivity CYP1A.....	35
7.2.2.	Stanovení aktivity CYP2A.....	35
7.2.3.	Stanovení aktivity CYP3A.....	36
Diskuze	38
Závěr	40
Literatura	41

Cíle bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat teoretický přehled o střevním mikrobiomu, jeho složení a funkci v lidském organismu. Zdůrazněna byla jeho role při metabolismu cizorodých látek, především léčiv. Popis metabolismu xenobiotik byl zaměřen na nejdůležitější biotransformační enzymy I. fáze, cytochromy P450 (CYP).

Dalším cílem bylo naučit se správně pracovat s biologickým materiálem a osvojit si metody, které slouží ke stanovení aktivit enzymů CYP.

Dílčí cíle experimentální části:

- Připravit mikrosomální frakci z jaterního homogenátu gnotobiotických myší diferenciální centrifugací.
- Osvojit si spektrofotometrické metody pro stanovení koncentrace proteinů a CYP v jaterní mikrosomální frakci.
- Provést stanovení enzymové aktivity u vybraných jaterních CYP s využitím specifických substrátů a HPLC s fluorescenční/UV detekcí.
- Zpracovat získaná data a zhodnotit, zda má střevní mikrobiom vliv na aktivitu enzymů CYP, a jakým způsobem se tyto změny liší u samců a samic myší.

Úvod

Mikroorganismy, které osídlují lidské tělo, mají vliv na hostitelský organismus. Druhově nejrozmanitější je soubor mikroorganismů, které se vyskytují v gastrointestinálním traktu (GIT) a jsou označovány jako střevní mikrobiom/mikrobiota. Mezi nejvýznamnější funkce střevního mikrobiomu patří syntéza antimikrobiálních látek, štěpení komplexních sacharidů, udržení integrity střevní bariéry a rozvoj imunitního systému. Podílí se také na biosyntéze vitamínů a mnoha dalších biologicky aktivních látek. Narušení druhové bakteriální rozmanitosti neboli dysbióza, může mít za následek řadu onemocnění, mezi které patří zánětlivá střevní onemocnění, neurodegenerativní poruchy, metabolické poruchy jako je obezita nebo cukrovka, dále například ateroskleróza nebo astma¹. Na složení střevního mikrobiomu, a tudíž i na jeho funkci má vliv hned několik faktorů jako je například strava, fyzická aktivita, genetické predispozice hostitele anebo stres².

V předkládané bakalářské práci se zabývám vlivem střevního mikrobiomu na metabolismus cizorodých látek neboli xenobiotik. K interakci mezi střevními mikroorganismy a xenobiotiky dochází hned několika mechanismy, které lze rozdělit na přímé a nepřímé. Xenobiotika mohou být přímo metabolizována enzymy střevního mikrobiomu, kdy dochází ke změně chemické struktury, což může vést ke změně bioaktivity, biologické dostupnosti nebo toxicity. K nepřímým mechanismům řadíme například změnu kinetiky enzymatických reakcí, kterou způsobují metabolity produkované střevními mikroorganismy. Přítomnost střevního mikrobiomu a jeho metabolitů má také vliv na expresi genů, včetně těch, které kódují jaterní a střevní biotransformační enzymy³⁻⁵.

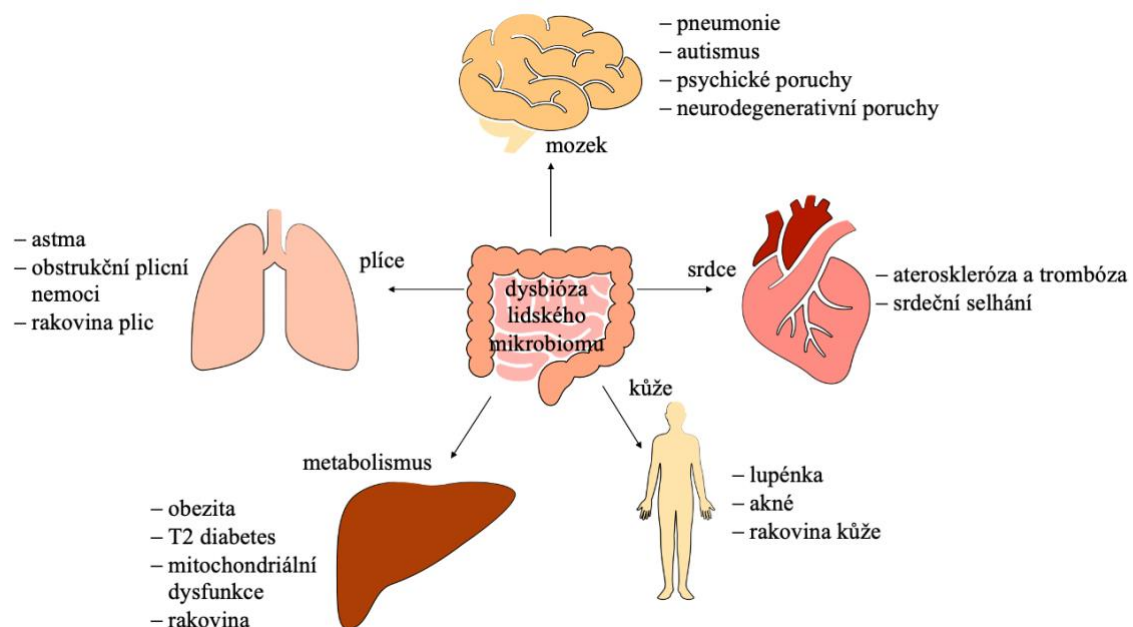
Mezi nejvýznamnější biotransformační enzymy patří cytochromy P450 (CYP), které metabolizují přibližně 70–80 % všech klinicky užívaných léčiv⁶. Experimentální část je zaměřena na měření aktivit těchto enzymů v játrech gnotobiotických myších modelů (samců i samic) pro posouzení role mikrobiomu.

Teoretická část

1. Lidský mikrobiom

Soubor všech mikroorganismů včetně jejich genomů, které osídlují lidské tělo je označován pojmem mikrobiom, nebo mikrobiota. Mikroorganismy jsou zastoupeny bakteriemi, archei, houbami a viry, kdy bakterie jsou nejpočetnějším zástupcem mikrobiomu¹.

Mikroby vytvářejí složité, specifické, adaptivní ekosystémy, které odrážejí měnící se fyziologii hostitele. Narušení rovnováhy taxonomického složení se označuje pojmem dysbióza a může přispívat ke vzniku různých chorob, jako je například zánětlivé střevní onemocnění, roztroušená skleróza, diabetes, alergie, astma, rakovina a další (Obr. 1)⁷. Dysbiózu lze těžko definovat, protože nelze zcela říct, jak vypadá složení zdravého mikrobiomu. Nalezení charakteristických znaků, které budou definovat zdravý a nezdravý mikrobiom může vést k lepší prevenci vzniku onemocnění nebo ke zlepšení prognózy. Mezi takové znaky patří například rozmanitost mikroorganismů, které tvoří lidský mikrobiom nebo stabilita jeho složení. Mikrobiom je ovšem velice rozmanitý a dynamický systém, což komplikuje charakterizaci složení „normální“ střevní mikrobioty u zdravého člověka a stejně tak charakterizaci dysbiózy².



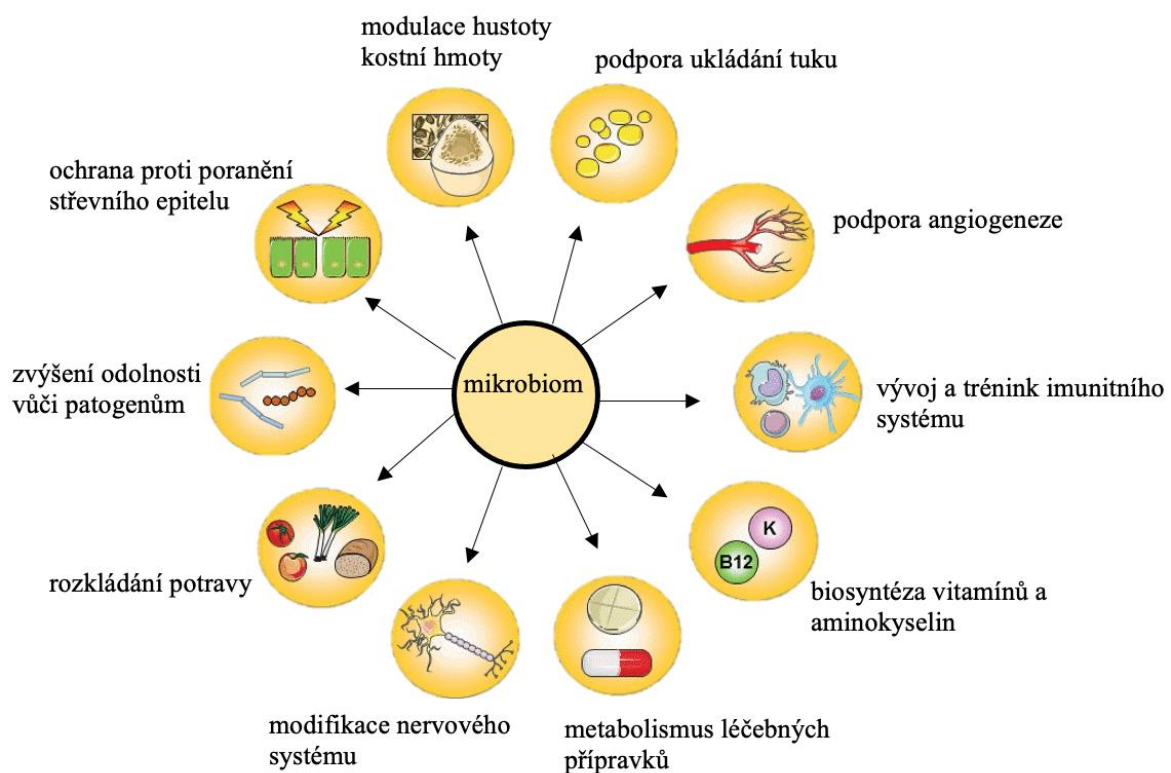
Obr. 1: Vliv dysbiózy mikrobiomu na lidské zdraví (modifikování podle⁸).

2. Střevní mikrobiom

Mikroorganismy žijící v trávicím traktu hostitele se označují jako střevní mikrobiom, který je v porovnání s ostatními částmi těla druhově nejrozmanitější. Utváření mikrobiomu probíhá ihned po narození a během života se jeho složení mění v závislosti na celé řadě faktorů⁹.

Střevní mikrobiom zastupuje v lidském těle mnoho významných funkcí a podílí se na metabolických procesech hostitelského organismu. Vytváří různé antimikrobiální látky, je nezbytný pro rozvoj imunitního systému, napomáhá trávení a metabolismu látek, v neposlední řadě udržuje integritu střevní bariéry a svou přítomností ve střevech zabraňuje osídlení střevní stěny patogenními mikroorganismy (Obr. 2)².

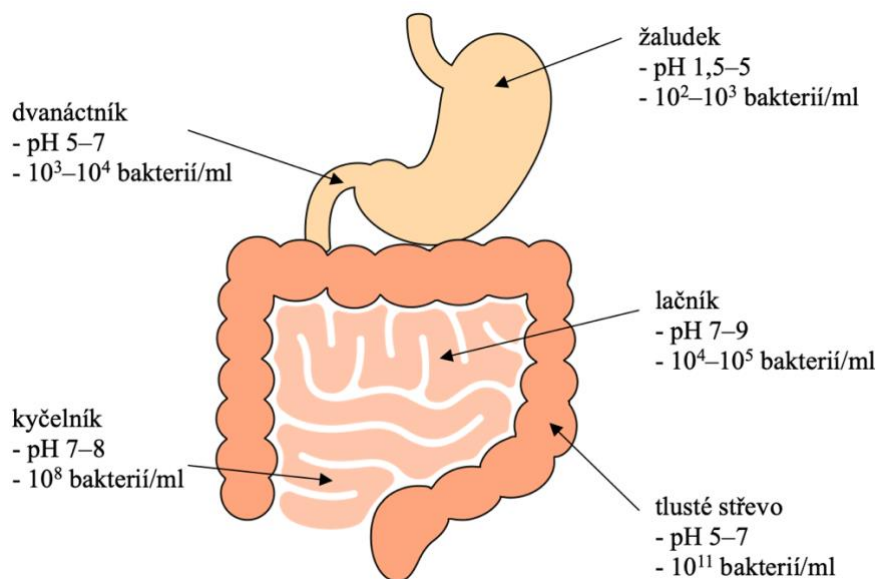
Střevní mikroorganismy jsou schopny syntetizovat velké množství metabolických produktů, které ovlivňují nejrůznější procesy v lidském těle. Díky nim je umožněna například komunikace mezi mozkiem a střevem, což má vliv na mentální a neurologické funkce hostitele¹⁰.



Obr. 2: Vliv mikrobiomu na fungování hostitelského organismu (modifikováno podle¹¹).

2.1. Složení střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom je složen z více jak 1500 druhů mikroorganismů, které se řadí do 50 různých kmenů. Až 90 % celkové mikrobiální populace je tvořeno kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Nejvíce zaznamenané bakteriální rody jsou *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* a *Peptostreptococcus*. Většina bakterií ve střevech je anaerobní, pouze v oblasti slepého střeva byly identifikovány aerobní bakterie. GIT se funkčně a anatomicky dělí na žaludek, tenké a tlusté střevo. Vnitřní prostředí jednotlivých částí GI traktu je odlišné, což má za následek různé zastoupení mikrobů v těchto částech(Obr. 3)¹².



Obr. 3: Vlastnost prostředí a zastoupení mikrobů v jednotlivých částech GIT (modifikováno podle¹³).

2.1.1. Žaludek

Díky rezistenci bakterií vůči kyselinám je i žaludek osídlen mikroby. Ve zdravém lidském žaludku se vyskytuje 5 bakteriálních kmenů a to: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* a *Proteobacteria*¹².

2.1.2. Tenké střevo

Funkcí tenkého střeva je trávení a vstřebávání živin. Tenké střevo se dělí na tři části: dvanáctník, lačník a kyčelník. Dvanáctník obsahuje žlučové kyseliny, pankreatické sekrety a antimikrobiální látky. Hustota bakteriálního osídlení ve dvanáctníku není tak vysoká, a to

z důvodu rychlého průchodu potravy a dostatku kyslíku. Ve dvanáctníku převládají kmeny *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Prostředí lačníku a kyčelníku je pro hustotu osídlení a rozmanitost bakterií vhodnější¹².

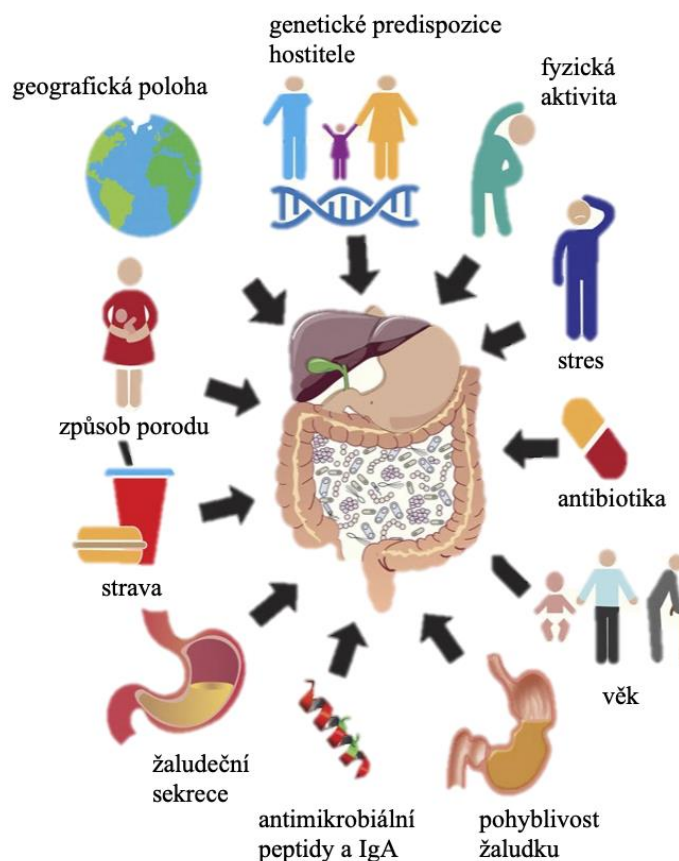
2.1.3. Tlusté střevo

Mezi hlavní funkce tlustého střeva patří vstřebávání vody a fermentace nestrávených potravin. Tlusté střevo je nejbohatší na zastoupení mikrobů, přičemž mezi dominantní kmeny patří *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Poměr těchto dvou kmenů je považován za prediktivní ukazatel zdraví a nemocí, protože se mění v různých fázích života a závisí na patofyziologických podmínkách¹².

Bylo zjištěno, že nízký poměr *Firmicutes* a *Bacteroidetes* je spojován se zdravým kardiovaskulárním systémem, vyváženým imunitním systémem a celkovým zdravím hostitele¹⁴.

2.2. Faktory ovlivňující složení a funkci střevního mikrobiomu

Existuje široká škála faktorů, které mohou ovlivňovat složení a funkci střevního mikrobiomu. Mezi tyto faktory patří mimo jiné genetické predispozice hostitele, strava, věk, způsob porodu nebo antibiotika (Obr. 4)².



Obr. 4: Faktory, které ovlivňují složení střevního mikrobiomu (modifikováno podle¹⁵).

2.2.1. Strava

Přijímanou stravou lze pozitivně i negativně ovlivnit složení střevního mikrobiomu. Na složení střevního mikrobiomu má především vliv zastoupení jednotlivých makroživin v potravě.

U kojenců jsou ve střevním mikrobiomu zastoupeny především mikroorganismy, které se podílejí na trávení oligosacharidů přítomných v mateřském mléce. Kmen *Actinobacteria* napomáhá metabolizovat oligosacharidy, které jsou přeměněny na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, což vede k rozvoji imunitního systému.

Strava bohatá na bílkoviny a tuky podporuje zastoupení druhů, které jsou tolerantní vůči žluči. Tento typ stravy snižuje imunitu, zvyšuje náchylnost k infekcím a může podpořit rozvoj metabolického onemocnění¹⁶.

Vláknina je řazena mezi sacharidové polymery, které mají tři a více monomerních jednotek a které jsou odolné vůči trávicím enzymům, což má za následek, že nejsou hydrolyzovány a ani absorbovány v tenkém střevě. Vláknu lze dělit podle rozpustnosti na nerozpustnou nebo rozpustnou. Jako příklad nerozpustné vlákniny lze uvést celulosu, což

je hlavní stavební složka buněčných stěn rostlin. Nerozpustná vláknina je téměř nevyužitelná pro střevní mikrobiom. Naopak rozpustná vláknina je snadno a rychle metabolizována střevním mikrobiomem, a tak významně ovlivňuje jeho složení a metabolickou aktivitu. Vláknina je mikroorganismy metabolizována například na krátké mastné kyseliny, které jsou spojovány s pozitivními účinky na lidské zdraví. Právě dlouhodobě snížený příjem vlákniny v dietě u západní populace může být zodpovědný za snížení bakteriální diverzity a zvýšený výskyt autoimunitních onemocnění¹⁷.

2.2.2. Věk

V každé životní fázi hostitele je složení střevního mikrobiomu různé. Způsob porodu výrazně ovlivní to, jaké mikroorganismy kolonizují hostitele jako první. Dítě, které bylo na svět přivedeno přirozenou cestou, je jako první osídlováno vaginální a střevní flórou matky. Dítě, které se narodilo císařským řezem, je jako první osídlováno mikroby z okolního prostředí a kožního mikrobiomu matky¹⁸. Při narození je taxonomická diverzita mikrobiomu poměrně nízká, ale s přibývajícím věkem se zvyšuje.

Významný vliv na složení a funkci střevního mikrobiomu má stárnutí. S procesem stárnutí souvisí změny stravovacích návyků, celkově změna životního stylu a fyziologické změny, jako je například ztráta chrupu, snížení trávení a vstřebávání živin. U starších osob se celkově snižuje rozmanitost mikrobiomu a zvyšuje se přítomnost patogenních mikroorganismů¹⁹.

2.2.3. Genetické predispozice hostitele

Genetické predispozice hostitele mají vliv na rozmanitost a hojnost jednotlivých taxonů mikrobiomu a také na citlivost jedinců k patogenním mikroorganismům.

Důležitost genetiky na složení střevního mikrobiomu ukázala studie, která porovnávala fekální mikrobiom jedinců s různým stupněm genetické příbuznosti, od jednovaječných dvojčat po nepříbuzné jedince. Zajímavé je, že jednovaječná dvojčata, která léta žila odděleně, vykazovala vysokou podobnost ve svých mikrobiálních profilech, zatímco manželští partneři, kteří žili ve stejném prostředí a se srovnatelnými stravovacími návyky, nikoli²⁰.

2.2.4. Fyzická aktivita

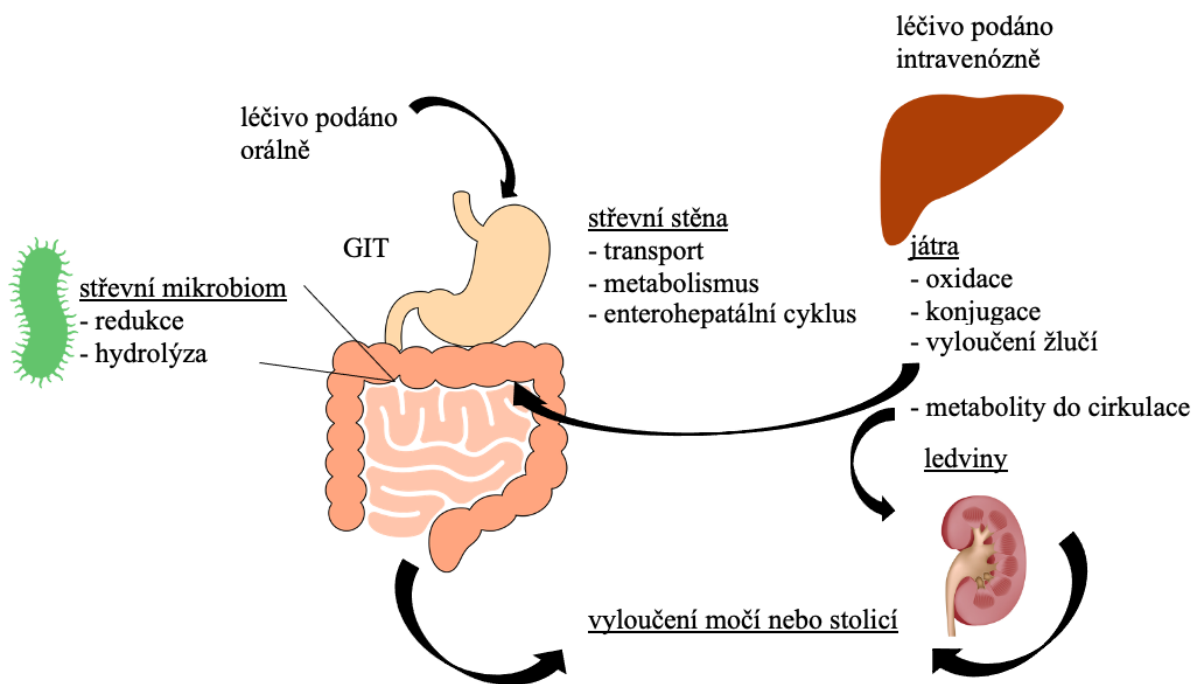
Fyzická aktivita napomáhá k rozmanitému složení střevního mikrobiomu. Obecně platí, že sportovci dodržují zdravý životní styl, který napomáhá k bohatší mikroflóře, například adaptace na vytrvalostní trénink, kdy dochází k snížení průtoku krve a tkáňové hypoxii vede ke změnám v GIT. U sportovců je úroveň *Bacteroidetes* nižší a úroveň *Firmicutes* vyšší než u nesportovců²¹.

2.2.5. Antibiotika

Antibiotika ničí patogenní i prospěšné mikroby, a to má za příčinu dysbiózu. Rozsah dysbiózy závisí na druhu podávaného antibiotika a délce dávkování. Může dojít i k nenávratnému poškození složení střevního mikrobiomu bez možnosti zotavení²².

2.3. Střevní mikrobiom a metabolismus xenobiotik

Jak již bylo zmíněno střevní mikrobiom má mnoho významných funkcí v lidském těle, mezi které patří mimo jiné metabolismus cizorodých látek neboli xenobiotik, které se do organismu dostávají nechtěně z životního prostředí anebo cíleně ve formě léčiv. Střevní mikrobiota je vybavena velkým množstvím enzymů a vykazuje tak značný metabolický potenciál. Díky tomu je schopna metabolizovat xenobiotika ve srovnatelné míře jako játra nebo další orgány^{23,24}. Metabolismus xenobiotik, který bude popsán v následující kapitole, by měl být chápán jako souběžná biotransformace cizorodých látek jak lidskými, tak mikrobiálními enzymy²⁵. Většina léčiv je absorbována na začátku tenkého střeva, kde není koncentrace mikroorganismů tak vysoká, a nedochází k intenzivnímu přímému metabolismu střevními bakteriemi. Avšak léčiva, která mají horší absorpční vlastnosti a/nebo rozpustnost, se vstřebávají v nižších částech GIT, a dochází k jejich interakci s bakteriemi a jejich enzymy. I léčiva, která jsou podávána intravenózně, mohou přijít do kontaktu se střevním mikrobiomem, a to díky enterohepatálnímu cyklu, kdy jsou žlučí vyloučeny do GIT (Obr. 5)²³. Bakteriálním metabolismem může dojít ke změně farmakologické aktivity, biodostupnosti a toxicity léčiva, proto by vliv střevního mikrobiomu na stabilitu léčiv neměl být opomíjen. V současné době jsou známy desítky léčiv metabolizované bakteriálními enzymy, ve většině případů však nebyl dosud identifikován bakteriální druh a enzym účastnící se reakce, ani přesný mechanismus²⁶.



Obr. 5: Osud léčiva v lidském organismu (modifikováno podle²⁷).

2.3.1. Mechanismy působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv

Přestože detailní mechanismus vlivu mikrobiomu na metabolismus léčiv není zatím přesně objasněn, můžeme interakce mezi střevním mikrobiomem a léčivem obecně rozdělit na dvě základní skupiny, mechanismy přímé a nepřímé (Obr. 6).

Při přímé interakci mezi střevním mikrobiomem a léčivem dochází k vazbě léčiva na bakteriální buňky, kdy jsou bakteriální enzymy zodpovědné za jeho biotransformaci. Důsledkem mikrobiální biotransformace může dojít k aktivaci neaktivního léčiva (tzv. prodrug) na jeho aktivní formu. Například neaktivní forma proléčiva sulfasalazinu je tvořena kyselinou 5-aminosalicylovou (5-ASA), která je prostřednictvím dvojné vazby N-N spojena s molekulou sulfapyridinu. Jakmile dojde k interakci sulfasalazinu s enzymy střevního mikrobiomu dochází enzymem azoreduktasou k rozštěpení dvojné vazby N-N a uvolnění farmakologicky aktivní 5-ASA²⁸.

Střevní mikrobiom je vybaven také enzymy, které se podílejí na detoxikaci léčiv, jejímž výsledkem může být změna v účinnosti a/nebo toxicitě léčiva. Jako příklad lze uvést srdeční glykosid digoxin, za jehož inaktivaci je zodpovědná bakterie *Eggerthella lenta*. Enzymy bakterie *Eggerthella lenta* redukuje dvojnou vazbu v α,β -nenasyceném laktonovém kruhu digoxinu, a tak dochází k přeměně na neaktivní metabolit dihydrodigoxin, který se neváže na srdeční receptor²⁹.

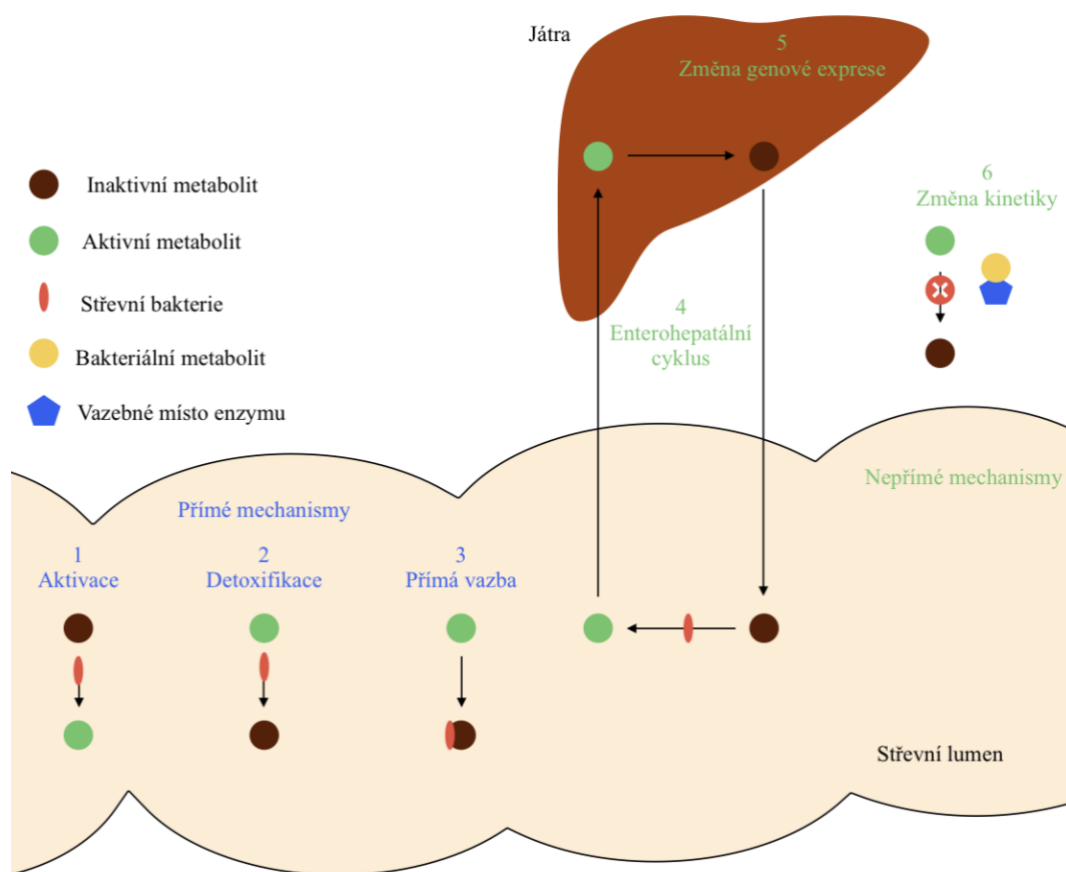
Dalším možným přímým mechanismem je vazba bakterie na léčivo, která může ovlivnit jeho biologickou dostupnost.

Bylo popsáno také několik nepřímých mechanismů ovlivnění metabolismu léčiv střevním mikrobiomem. K nepřímé interakci mezi enzymy střevního mikrobiomu a xenobiotiky může docházet prostřednictvím enterohepatálního cyklu. Xenobiotika jsou konjugována s kyselinou glukuronovou pomocí jaterní UDP-glukuronosyltransferasy. Touto konjugací vznikají polární sloučeniny, které se snadno vyloučí žlučí. Žlučí se konjugát dostává do střeva, kde interaguje se střevním mikrobiomem a mikrobiální β -glukuronidasou je štěpen. Toto štěpení může způsobovat nežádoucí následky. Například irinotekan, lék proti kolorektálnímu karcinomu, se díky enzymům střevního mikrobiomu zpět přeměňuje na cytotoxickou formu, což má vedlejší účinky na zažívací trakt³⁰.

Přítomnost střevních mikroorganismů a jejich metabolitů má za následek také změny v genové expresi hostitele, včetně exprese genů pro střevní a jaterní biotransformační enzymy. Řada studií ukázala rozdíly mezi mRNA expresí cytochromů P450, nejvýznamnějších biotransformačních enzymů, v játrech bezmikrobních myší (GF) postrádajících zcela střevní bakterie v porovnání s kontrolními zvířaty s normální střevní mikrobiotou (SPF)^{3,4}. Bylo prokázáno, že také kolonizace GF zvířat může ovlivnit mRNA expresi cytochromů P450⁵.

Střevní mikrobiom produkuje velké množství různých metabolických meziproductů, které se propojují s metabolickými dráhami hostitele. Metabolity produkované střevním mikrobiomem soutěží s léčivem o stejná vazebná místa biotransformačních enzymů a tím mohou měnit účinnost nebo toxicitu léčiva³⁰. Do této skupiny patří například jeden z nejčastěji užívaných volně prodávaných léků proti bolesti a horečce, paracetamol. Bakteriální metabolit p-kresol soutěží s paracetamolem o vazebné místo lidského jaterního enzymu sulfotransferasy 1A1 a může tak zpomalit eliminaci paracetamolu z organismu a zvýšit riziko hepatotoxicity³¹.

Střevní mikrobiom může nepřímo působit na metabolismus léčiv také vlivem interakce s imunitním systémem hostitelského organismu³².



Obr. 6: Mechanismy přímé a nepřímé interakce mezi střevním mikrobiomem a xenobiotiky (modifikováno podle³⁰).

3. Metabolismus xenobiotik

Xenobiotika (také cizorodé látky), jsou látky cizí pro lidský organismus, které v něm nejsou za běžných podmínek produkovány. Mezi cizorodé látky řadíme různé složky výživy nebo látky z okolního prostředí, které se do našeho organismu dostávají nevědomě. Patří mezi ně polutanty, pesticidy, herbicidy, konzervační látky nebo mykotoxiny. Další velkou skupinou cizorodých látek jsou synteticky připravené sloučeniny, včetně léčiv. Hlavním cílem metabolismu cizorodých látek je snadnější vyloučení xenobiotika z organismu a tím snížení jeho potenciálního toxického účinku. Tento proces je označován také jako biotransformace xenobiotik, při kterém dochází k přeměně lipofilních látek na látky více rozpustné ve vodě. Biotransformace xenobiotik se tradičně rozděluje do I. a II. fáze.

V I. fázi probíhají reakce, které přeměňují prvotní formu xenobiotika na více polární metabolit, a to odkrytím nebo navázáním polární funkční skupiny jako je hydroxylová,

aminová nebo sulfanylová skupina. Mezi takové reakce patří N- a O-dealkylace, alifatické a aromatické hydroxylace nebo N- a S-oxidace. Mezi enzymy I. fáze patří zejména cytochromy P450, na které je zaměřena předkládaná práce. Dále můžeme zmínit peroxidasy, flavinové monooxygenasy, epoxid hydrolasy a další⁶.

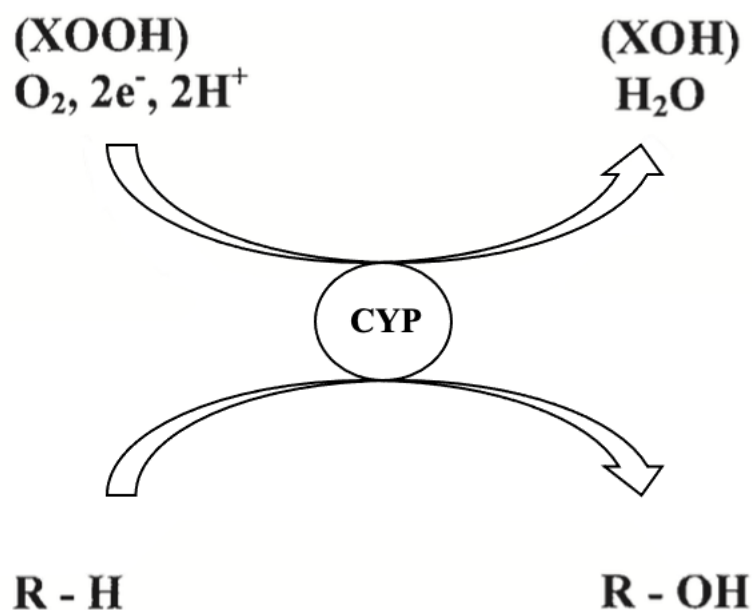
Reakce typické pro fázi II jsou konjugační reakce, při kterých dochází k přenosu endogenní molekuly, nejčastěji glukuronové kyseliny na polárnější metabolit za vzniku polárních konjugátů, které jsou vyloučeny z organismu močí. Mezi enzymy II. fáze patří především transferasy, jako jsou UDP-glukuronosyltransferasy, glutathiontransferasy, sulfotransferasy, acetyltransferasy a methyltransferasy³³.

3.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450, zkráceně označovány CYP, se řadí mezi hemové enzymy, které jsou přítomny téměř ve všech živých organismech. Číslovka 450 je dána maximem v absorpčním spektru komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým o délce 450 nm, které je pro tyto hemové enzymy charakteristické³⁴.

Jedná se o membránové enzymy, patřící mezi monooxygenasy, které se v buňce vyskytují převážně v endoplasmatickém retikulu a v mitochondriích. CYP jsou zodpovědné za biotransformaci 70–80 % všech klinicky užívaných léčiv, nejhojněji jsou zastoupeny v játrech, ale nacházejí se téměř ve všech částech lidského těla jako například v plicích, mozku, GIT, srdci nebo ledvinách³⁵.

Nejčastější reakcí CYP je hydroxylace, která probíhá díky schopnosti hemové skupiny železa vázat a aktivovat dva atomy kyslíku, kdy je jeden atom zabudován do molekuly substrátu a druhý je uvolněn v podobě vody. Centrální atom železa je vázán sírou ze zbytku cysteinu na bílkovinu. Monooxygenázový systém je tvořen nejen CYP, ale také flavoprotein NADPH: cytochrom P-450 oxidoreduktasou (CYPOR), která přenáší elektrony. Donorem elektronů je redukovaný β -nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH) a pro reakci jsou nezbytné také FAD, FMN, cytochrom b5, fosfolipidy a kyslík (Obr. 7)⁶.



Obr. 7: Schéma reakce CYP se substrátem. R-H substrát; R-OH hydroxylovaný produkt (modifikováno podle⁶).

3.1.1. Nomenklatura

V současné době je známo 57 genů pro různé formy CYP v lidském genomu. Za metabolismus přibližně 75 % všech klinicky užívaných léčiv a celé řady dalších xenobiotik je zodpovědných přibližně 15 enzymů, které patří do prvních tří skupin (CYP 1–3). Pro přehlednost bylo zavedeno systematické názvosloví a jednotlivé formy CYP uspořádány do rodin a podrodin podle podobnosti aminokyselinové sekvence apoproteinu³⁶. Za zkratkou CYP vždy následuje arabská číslice (CYP1A1), která udává rodinu CYP. Enzymy patřící do stejné rodiny musí vykazovat 40% nebo vyšší podobnost aminokyselinové sekvence. Následuje písmeno, které označuje podrodinu (CYP1A1) s podobností sekvence 55% a vyšší. Poslední číslo označuje konkrétní formu CYP v rámci podrodiny (CYP1A1).

Mezi nejdůležitější jaterní CYP metabolizující léčiva patří zejména CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. CYP3A4 je vůbec nejvýznamnější z hlediska metabolismu léčiv u lidí a zároveň nejhojněji zastoupenou formou CYP játrech³⁵.

3.1.2. Podrodina CYP1A

Pro podrodinu CYP1A jsou typické hydroxylace mnoha polycyklických aromatických uhlovodíků a dalších aromatických látek. Zatímco CYP1A1 preferuje planární aromatické

uhlovodíky, CYP1A2 dává přednost aromatickým aminům a heterocyklickým sloučeninám. Díky vysoké expresi v játrech hraje CYP1A2 významnou roli v biotransformaci několika klinicky významných léčiv, mezi které patří analgetika a antipyretika (acetaminofen, lidokain), antipsychotika (olanzapin, klozapin), protizánětlivé léky, hypnotický zolpidem používaný v krátkodobé léčbě nespavosti nebo kardiovaskulární léčiva³⁵.

3.1.3. Podrodina CYP2A

U lidí je nejdůležitějším enzymem z této podrodiny CYP2A6. Tvoří přibližně 4 % všech CYP v játrech, metabolizuje některá léčiva a také endogenní látky jako je například bilirubin. Významně se podílí na oxidačním metabolismu psychoaktivní tabákové složky nikotinu na neaktivní kotinin a jeho následné hydroxylaci. Mezi léčiva, které CYP2A6 metabolizuje, patří antiretrovirální léčivo efavirenz užívané k prevenci a léčbě AIDS. Dalším příkladem je chemoterapeutické proléčivo tegafur, které je primárně metabolizováno CYP2A6 na aktivní metabolit 5-fluorouracil³⁵.

3.1.4. Podrodina CYP3A

Hlavní roli v metabolismu klinicky užívaných léčiv a detoxikaci xenobiotik u lidí hraje forma CYP3A4, která tvoří až 30 % celkových jaterních CYP. Aktivní místo CYP3A4 je natolik velké a flexibilní, že dokáže metabolizovat celou řadu lipofilní sloučenin, malých i velkých. Patří mezi ně například imunosupresiva (cyklosporin A, takrolimus) antibiotika jako erytromycin, protinádorová léčiva (např. taxol), antidepressiva, statiny, opiáty a mnoho dalších³⁵.

Velké vazebné místo a široké spektrum léčiv metabolizovaných CYP3A4 umožňuje vznik tzv. lékových interakcí, které mohou vést až k toxickému efektu jednoho z podaných léčiv nebo k selhání farmakoterapie. Kromě metabolismu cizorodých látek je CYP3A4 zapojen také v metabolismu endogenních steroidů, jako je testosteron, progesteron, kortizol nebo žlučové kyseliny³⁷.

4. *In vivo* modely pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv

Gnotobiotická zvířata jsou hodnotným modelem pro studium střevního mikrobiomu na metabolické dráhy hostitele, protože jsou osídleny přesně definovanými mikroorganismy.

Bezmikrobní zvířata GF (germ free) jsou zcela bez mikroorganismů uvnitř těla i na pokožce a získávají se dvěma způsoby. Mláďata jsou chirurgicky vyjmuta z matčiny dělohy, tak aby nedošlo ke kontaktu s vaginální nebo kožní mikroflórou. Nebo jsou embrya přenesena do dělohy GF myši, která mláďata porodí a stará se o ně jako o vlastní. Tento způsob zvyšuje procento přežití. GF mláďata se po celý život chovají ve sterilním prostředí a kolonii jde dále rozšiřovat křížením GF jedinců³⁸.

Cílenou kolonizací GF myši lze připravit druh s jediným nebo více přesně definovanými mikroorganismy, jejichž vliv na hostitele lze následně sledovat. Na GF myši lze přenášet také lidskou střevní mikroflóru, a tak simulovat podobné podmínky jako u pacientů. Lidská střevní mikroflóra však nemá přesně definované složení, tudíž se nejedná o gnotobiotické modely³⁹. SPF (specific pathogen free) myši neboli myši bez specifických patogenních kmenů mají normální střevní mikroflóru a slouží jako kontrolní skupina⁴⁰.

Kromě SPF a GF myši byly v experimentální části použity také GF myši osídlené *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). EcN patří do rodiny *Enterobacteriaceae* a jedná se o nepatogenní probiotický kmen⁴¹.

Experimentální část

5. Materiál

5.1. Chemikálie

Abcam (Cambridge, Spojené království): midazolam

Fluka (Buchs, Švýcarsko): fenylmethanlsulfonyl fluorid (PMSF)

Lach-Ner (Neratovice, Česká republika): kyselina octová (CH_3COOH), síran hořečnatý (MgSO_4), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4), octan sodný (CH_3COONa), chlorid draselný (KCl), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

Linde Gas (Praha, Česká republika): oxid uhelnatý

Merck (Praha, Česká republika): methanol (MeOH)

Penta chemicals (Praha, Česká republika): hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)

Sigma Aldrich (Praha, Česká republika): kumarin, testovací souprava pro stanovení celkových proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA), isocitrát dehydrogenasa (IDH), nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADP^+), kyselina DL-isocitronová (ISO), Trizma base – tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), glycerol, ethoxyresorufin (ETRR)

VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika): acetonitril (ACN)

5.2. Přístrojové vybavení

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

Analytické váhy GR-202 (dodáno firmou Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Homogenizátor podle Pottera a Elvehjema (P-E homogenizátor) s teflonovým pístem (VWR International, Česká republika)

Chlazená centrifuga LISA, AFI Group (Château-Gontier, Francie)

Chlazená centrifuga Z 323 K, Hermle LaborTechnik GmbH (Wehingen, Německo)

Magnetická míchačka s ohřevem IKA RH digital, Merci (Brno, Česká republika)

pH metr XS Instruments pH 50 (Carpi, Italy)

Ponorný homogenizátor Ultra-Turrax T 25 basic (IKA-Werke, Německo)

Spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Spektrofotometr UV-VIS, TECAN Infinite M200 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika)

Systém HPLC s UV a fluorescenční detekcí (Shimadzu LC-10A Prominence; software CLASS-VP), Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Systém HPLC s UV a fluorescenční detekcí (Shimadzu LC-20A Prominence; software LC-Solution), Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Termomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Německo)

Ultracentrifuga Optima XPN-90, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

Ultrazvuková lázeň UCC4, Notus-Powersonic (Vráble, Slovensko)

Vortex V-1plus, Biosan (Riga, Lotyšsko)

6. Metody

6.1. Navržení experimentu

Pro experimenty byly použity vzorky jaterní tkáně myši, které byly chovány v Laboratoři gnotobiologie v Novém Hrádku (Ústav mikrobiologie AV ČR) v souladu s etickými principy a za dodržování platné české legislativy. V experimentech byly použity 8 týdnů staré BALB/c myši – samci i samice, pro posouzení vlivu pohlaví. Obě skupiny (samci i samice) byly dále rozděleny do tří skupin na základě mikrobiálního osídlení. První skupinou byly kontrolní SPF myši s normálním nezměněným mikrobiomem. Druhou skupinu tvořily GF myši, které zcela postrádají mikrobiom a poslední skupinou byly GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Rozdělení do jednotlivých skupin je graficky znázorněno v Tab. 1.

Tab. 1: Rozdělení samců a samic myši do experimentálních skupin pro studium vlivu mikrobioty na aktivitu vybraných jaterních CYP.

	Skupina	Pohlaví
1.	SPF	♂ + ♀
2.	GF	♂ + ♀
3.	GF + EcN	♂ + ♀

6.2. Příprava jaterní mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce byla připravena diferenciální centrifugací jaterního homogenátu všech experimentálních skupin myši (5 myši v každé skupině).

Mikrosomální frakce byla připravena na ledu a v chladicím boxu. Všechny pracovní nástroje a pomůcky byly předem vychlazeny. Zvážená játra byla vložena do kádinky a zalita homogenizačním pufrům (HP; $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosa; $1,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; pH 7,4; těsně před použitím přídavek $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF – inhibitor proteas). Játra byla rozstříhána pomocí nůžek a pufr slit přes gázu. Promytí HP bylo ještě dvakrát zopakováno. Promytá játra byla rozdělena do menších plastových centrifugačních zkumavek, byla přidána část HP (celkové množství homogenizačního pufru je $3\times$ násobek váhy jater) a směs byla zhomogenizována ponorným homogenizátorem. Zhomogenizovaná tkáň byla přelita do větší plastové zkumavky a zbylým objemem HP byla vypláchnuta menší zkumavka a homogenizátor a opět přelita do větší zkumavky. Větší zkumavky byly vyváženy a centrifugovány po dobu 10 min při 6500 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant byl odlit do větší čisté zkumavky a centrifugován po dobu 25 min při 11000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant byl odlit do UC zkumavky, zkumavka byla doplněna HP až po okraj a uzavřena víčkem, tak aby nevznikla vzduchová bublinka. Další centrifugace trvala 60 min při 35000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzniklý sediment byla mikrosomální frakce. Supernatant byl slit a sediment setřen skleněnou tyčinkou do promývacího pufru (PP; $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS; $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl; pH 7,4; těsně před použitím přídavek $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF), PP se sedimentem byl odlit do P-E homogenizátoru, zhomogenizován a přelit do čisté UC zkumavky. Zkumavka byla opět doplněna PP po okraj, uzavřena a centrifugována po dobu 60 min při 35000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant byl vylit a vzniklý sediment (přečištěná mikrosomální frakce) byl opět setřen skleněnou tyčinkou a v P-E homogenizátoru se zhomogenizován s rehomogenizačním pufrům ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; 20% glycerol; pH 7,4), tak aby celkové množství rehomogenizačního pufru bylo $0,2\times$ násobek váhy jater. Zhomogenizované mikrosomy byly rozpipetovány do 1,5ml plastových zkumavek a zamrazeny na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.3. Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci

Koncentrace CYP v mikrosomální frakci byla stanovena spektrofotometricky po redukcii dithioničitanem sodným a následným navázáním oxidu uhelnatého.

Mikrosomy byly zředěny $20\times$ do 2 ml fosfátového pufru a vzniklá směs byla promíchána. Dithioničitanem sodným se provedla redukce a zredukovaný systém byl

přenesen do dvou kyvet po 1 ml. Byla změřena baseline mezi 500 až 400 nm. Vzorková kyveta byla probublána oxidem uhelnatým po dobu 1 min. Poté bylo opět provedeno spektrofotometrické měření. Celková koncentrace CYP v mikrosomální frakci byla vypočítána podle vzorce:

$$c_{\text{CYP}} = \frac{A_{450} - A_{500}}{0,091} \cdot 20 \text{ (ředění)}$$

c_{CYP} – koncentrace cytochromů P450

A_{450} – absorbance při 450 nm

A_{500} – absorbance při 500 nm

0,091 – hodnota molárního absorpčního koeficientu pro CYP [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]

6.4. Stanovení celkové koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometrickým měřením za využití metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA). K měření byl použit komerční kit (Pierce Rockford, USA). Cu^{2+} kationt přítomný v pentahydrátu síranu měďnatého byl bílkovinou zredukován na Cu^{1+} kationt a ten reagoval s BCA za vzniku fialového komplexu.

Vzorek byl naředěn podle potřeby fosfátovým pufrém, bylo přidáno činidlo A (BCA a vínan sodný v alkalickém roztoku uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného) a činidlo B (4% roztok pentahydrátu síranu měďnatého) v poměru 50:1. Vzorčky byly inkubovány po dobu 25 min při 37°C. Absorbance byla měřena při 562 nm a celková koncentrace proteinů [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$] byla stanovena z kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci proteinu.

Z poměru koncentrací CYP a celkové koncentrace proteinu v mikrosomální frakci byl u každé skupiny myší vypočítán specifický obsah CYP.

$$\text{specifický obsah} = \frac{c_{\text{CYP}}}{c_{\text{protein}}} = \frac{[\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]}{[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]} = \frac{[\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}]}{[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]} = [\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}]$$

Grafické znázornění specifického obsahu CYP v jednotlivých experimentálních skupinách myší je na Obr. 8 v sekci Výsledky.

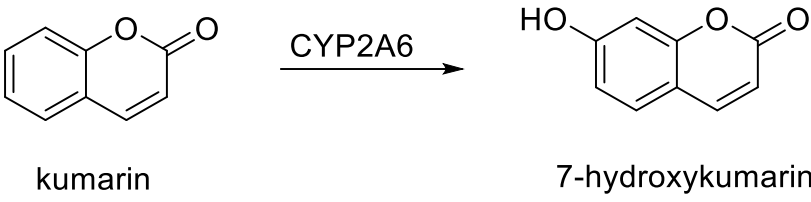
6.5. Stanovení aktivit CYP

Enzymové aktivity vybraných CYP byly měřeny v jaterní mikrosomální frakci myši s využitím specifických substrátů. Koncentrace produktů byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Aktivita CYP1A, CYP2A a CYP3A byla stanovena podle zavedených protokolů Phillips et al. (1998) a publikace Kronbach et al. (1989)^{42,43}. Při měření aktivit CYP1A a CYP2A byla použita kolona *LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)*, při měření aktivity CYP3A byla použita kolona *Kinetex® F5 (2,6 μm) 100 Å*. V následujících tabulkách (Tab. 2–4) je zaznamenáno schéma přípravy reakční směsi pro stanovení aktivity lidského CYP1A1/2, CYP2A6 a CYP3A4, včetně specifických substrátů, složení mobilní fáze a podmínek detekce.

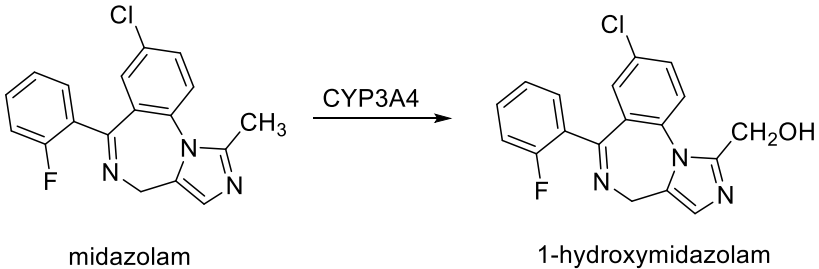
Tab. 2: Reakční podmínky pro stanovení aktivity enzymu CYP1A1/2 v mikrosomální frakci myšího homogenátu jater – metody používané pro lidské formy CYP.

CYP1A1/2	
Reakce:	<p style="text-align: center;">ethoxyresorufin → resorufin</p>
Typ reakce:	<i>O</i> -deethylace
Objem reakční směsi:	100 μ l
Pufr:	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
MS – množství CYP:	35 pmol
Koncentrace substrátu:	2,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém:	7,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 83,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO ₄ ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Inkubace:	15 min; 37 °C; 350 rpm
Zastavení reakce:	200 μ l vychlazeného 100% MeOH
Mobilní fáze:	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH ₂ PO ₄ o pH = 7 : 100% MeOH (58:42)
Stacionární fáze:	C18
Eluce:	isokratická
Průtok MF:	0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku:	50 μ l
Čas měření:	10 min
Detekce:	Fluorescenční, excitace při 535 nm, emise při 585 nm
Po zastavení reakce se vzorek centrifuguje při 14000 rpm po dobu 10 minut a za teploty 4 °C.	

Tab. 3: Reakční podmínky pro stanovení aktivity enzymu CYP2A6 v mikrosomální frakci myšího homogenátu jater – metody používané pro lidské formy CYP.

CYP 2A6	
Reakce:	 <p style="text-align: center;">kumarin 7-hydroxykumarin</p>
Typ reakce:	7-hydroxylace
Objem reakční směsi:	100 μ l
Pufř:	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
MS – množství CYP:	35 pmol
Koncentrace substrátu:	6,26 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém:	7,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 83,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO ₄ ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Inkubace:	30 min; 37 °C; 350 rpm
Zastavení reakce:	200 μ l vychlazeného 100% MeOH
Mobilní fáze:	0,5% CH ₃ COOH : ACN (60:40)
Stacionární fáze:	C18
Eluce:	isokratická
Průtok MF:	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřík vzorku:	10 μ l
Čas měření:	7 min
Detekce:	Fluorescenční, excitace při 338 nm, emise při 458 nm
Po zastavení reakce se vzorek centrifuguje při 14000 rpm po dobu 10 minut a za teploty 4 °C.	

Tab. 4: Reakční podmínky pro stanovení aktivity enzymu CYP3A4 v mikrosomální frakci myšního homogenátu jater – metody používané pro lidské formy CYP.

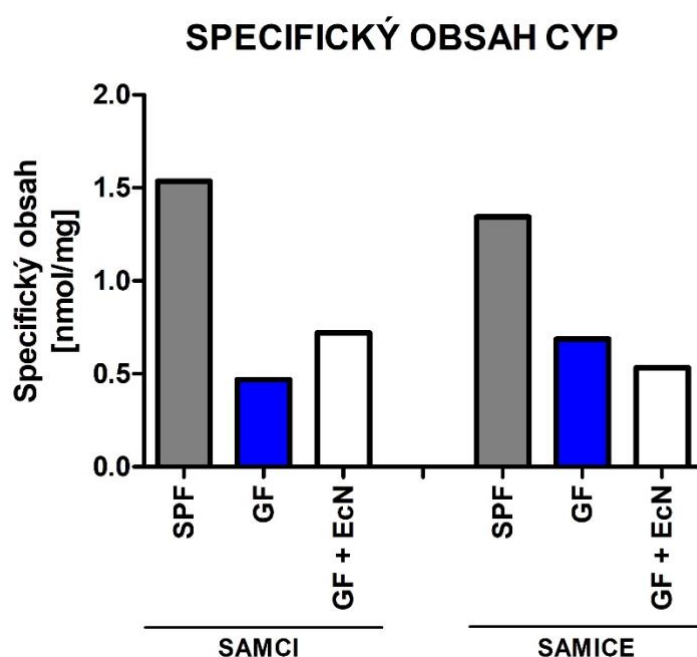
CYP3A4	
Reakce:	 <p style="text-align: center;">midazolam 1-hydroxymidazolam</p>
Typ reakce:	1-hydroxylace
Objem reakční směsi:	110 μl
Pufr:	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
MS – množství CYP:	12,56 pmol
Koncentrace substrátu:	2,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém:	21,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 144,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO ₄ ; IDH (10 units·mg ⁻¹ proteinu)
Inkubace:	8 min; 37 °C; 350 rpm
Zastavení reakce:	100 μl vychlazeného 100% MeOH
Mobilní fáze:	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CH ₃ COONa o pH = 4,7 : ACN (64:36)
Stacionární fáze:	RP-18
Eluce:	isokratická
Průtok MF:	0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku:	50 μl
Čas měření:	14,2 min
Detekce:	UV-VIS; detektor (D2) (λ : 200 – 350 nm); detekce při 240 nm
Po zastavení reakce se vzorek centrifuguje při 14000 rpm po dobu 10 minut a za teploty 4 °C.	

7. Výsledky

7.1. Charakterizace mikrosomální frakce

Nejdříve byla charakterizována jaterní mikrosomální frakce všech skupin myši stanovením specifického obsahu CYP, který je dán poměrem koncentrace CYP a celkové koncentrace proteinu v mikrosomální frakci.

U samců i samic byl pozorován snížený specifický obsah CYP u skupin GF a GF + EcN v porovnání s kontrolními SPF skupinami s normální střevní mikrobiotou (Obr. 8).



Obr. 8: Grafické znázornění specifického obsahu CYP v jaterní mikrosomální frakci jednotlivých skupin myši. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru; GF + EcN, GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917.

7.2. Stanovení aktivit CYP

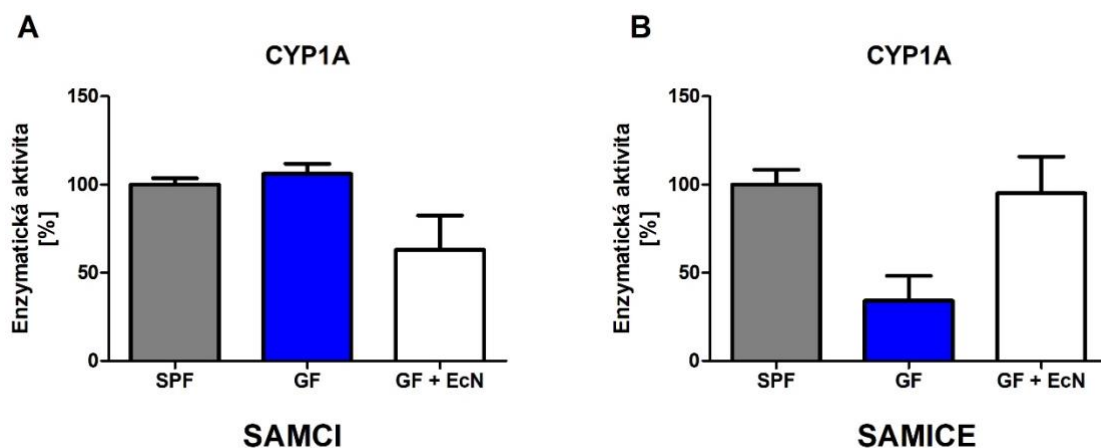
Aktivita vybraných CYP byla měřena v mikrosomálních frakcích získaných z jaterního homogenátu experimentálních zvířat. Myši byly rozděleny podle pohlaví a dále na jednotlivé skupiny SPF, GF a GF osídlené EcN. Pro měření byly vybrány tři významné

rodiny z hlediska metabolismu léčiv u lidí – CYP1A, CYP2A a CYP3A. Výsledky všech naměřených aktivit byly zpracovány do grafů, které jsou uvedeny na Obr. 9–11. Výsledky aktivit jsou vždy vztaženy k příslušné kontrolní skupině (SPF), která odpovídá 100% aktivitě.

7.2.1. Stanovení aktivity CYP1A

U samců nebyl pozorován rozdíl v aktivitě CYP1A mezi SPF a GF skupinou myší. GF myši po kolonizaci EcN vykazovaly nižší aktivitu CYP1A (přibližně o 35%) oproti myším bez osídlení mikroorganismy (GF) (Obr. 9A).

U samic došlo u GF skupiny ke snížení aktivity CYP1A až o 66 %, naopak po kolonizaci EcN byla aktivita CYP1A na úrovni kontrolní SPF skupiny (Obr. 9B).

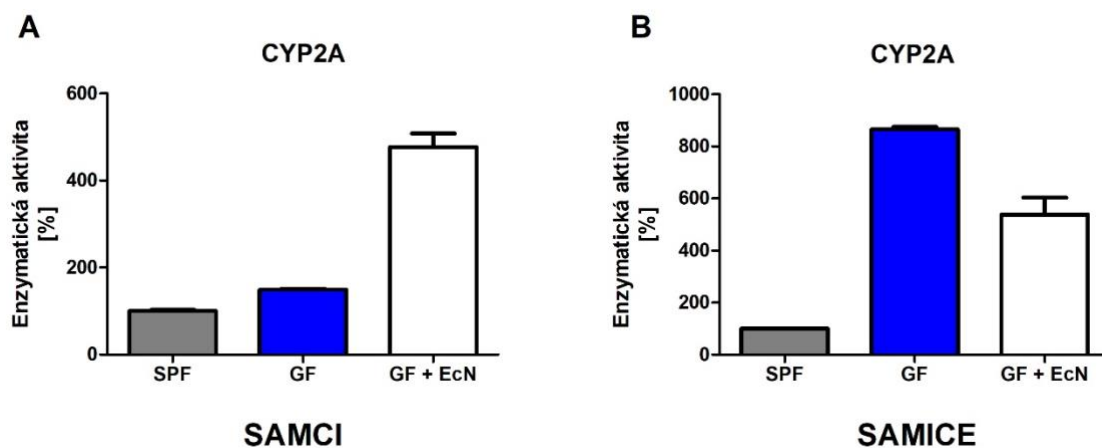


Obr. 9: Enzymatická aktivita CYP1A u SPF, GF a GF + EcN myších (A) samců a (B) samic. Vzorčky byly měřeny v triplicátech v mikrosomální frakci připravené z jater 5 myší z každé skupiny. Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplicátů v jednotlivých měřeních. **SPF**, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; **GF**, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru; **GF + EcN**, GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917.

7.2.2. Stanovení aktivity CYP2A

V případě CYP2A byla u samců pozorována zvýšená aktivita (o 47 %) u GF myší oproti kontrolní SPF skupině. Zajímavé je, že GF myši kolonizované EcN vykazovaly ještě výraznější zvýšení aktivity CYP2A, která byla v této skupině zvýšena téměř 5 \times oproti SPF myším (Obr. 10A).

U samic bylo pozorováno výrazné zvýšení u skupiny GF i GF + EcN v porovnání s SPF skupinou. U GF skupiny byla aktivita CYP2A zvýšena až 8× u GF + EcN skupiny téměř 6× (Obr. 10B).



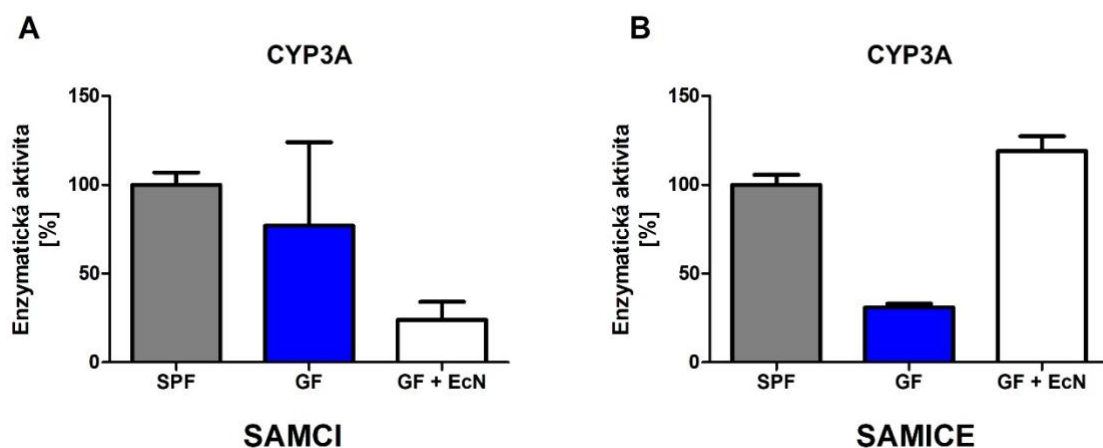
Obr. 10: Enzymatická aktivita CYP2A u SPF, GF a GF + EcN myších (A) samců a (B) samic. Vzorky byly měřeny v triplicátech v mikrosomální frakci připravené z jater 5 myší z každé skupiny. Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplicátů v jednotlivých měřeních. **SPF**, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; **GF**, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru; **GF + EcN**, GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917.

7.2.3. Stanovení aktivity CYP3A

Také nejvýznamnější forma CYP pro metabolismus léčiv u lidí, byla výrazně ovlivněna mikrobiálním osídlením s rozdílným trendem u samců a samic.

U GF skupiny samců nedošlo k výrazné změně aktivity CYP3A v porovnání s SPF skupinou, zatímco po kolonizaci GF myší EcN byla aktivita snížena o více jak 50 % v porovnání s GF skupinou (přibližně o 75 % oproti SPF skupině) (Obr. 11A).

Aktivita CYP3A u samic vykazovala stejný trend u jednotlivých skupin myší, jaký byl pozorován v případě CYP1A. Došlo k výraznému snížení aktivity CYP3A v případě GF skupiny (téměř o 70 %) oproti SPF skupině. Naopak, aktivita CYP3A byla u GF myši po kolonizaci EcN srovnatelná s aktivitou u SPF myší (Obr. 11B).



Obr. 11: Enzymatická aktivita CYP3A u SPF, GF a GF + EcN myších (A) samců a (B) samic. Vzorky byly měřeny v triplikátech v mikrosomální frakci připravené z jater 5 myší z každé skupiny. Stanovení aktivity bylo opakováno třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplikátů v jednotlivých měřeních. **SPF**, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; **GF**, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru; **GF + EcN**, GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917.

Diskuze

Střevní mikrobiom značně ovlivňuje hostitelský organismus a jeho dysbióza má za následek řadu onemocnění a metabolických poruch¹. Střevní mikrobiota a její metabolity způsobují změny v genové expresi hostitele, včetně exprese genů pro jaterní biotransformační enzymy^{3,4}. Cílem předkládané bakalářské práce bylo stanovit, zda má střevní mikrobiom vliv na aktivitu biotransformačních enzymů I. fáze, cytochromů P450 (CYP) v játrech myších samců a samic. Pro posouzení vlivu mikrobiomu byly použity gnotobiotické myši s přesně definovaným složením střevního mikrobiomu, myši bezmikrobní (GF) a GF myši osídlené probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN).

Výsledky experimentální části ukázaly, že enzymová aktivita CYP1A se nelišila u GF samců v porovnání s kontrolní SPF skupinou s normální střevní mikroflórou, zatímco u samic došlo vlivem bezmikrobního stavu k výraznému poklesu aktivity CYP1A (Obr. 9AB). Stejný trend byl pozorován u GF A SPF samců také v případě aktivity CYP3A (Obr. 11AB). Výsledky jsou v souladu s předešlou studií, která potvrdila vliv střevního mikrobiomu spolu s pohlavím na expresi a aktivitu některých CYP v játrech myší⁴.

EcN je nepatogenní probiotický kmen, který vykazuje imunomodulační účinky bez toxického efektu. Jedná se o nejpodrobněji studované a nejlépe dokumentované probiotické léčivo současnosti, které je komerčně dostupné, dobře tolerované a bezpečné. Může být použito například při léčbě kolitidy, chronické zácpy nebo syndromu dráždivého tračníku⁴⁴. Bylo také zjištěno, že souběžně užívané probiotikum EcN může modulovat farmakokinetiku léčiva amiodaronu a zvyšovat jeho biologickou dostupnost⁴⁵. Studie z roku 2017 ukázala, že kolonizace samců GF myši EcN významně ovlivnila mRNA expresi *Cyp1a2* a *Cyp3a11* v játrech v porovnání s GF skupinou⁵. V souladu s těmito výsledky, získaná data předkládané bakalářské práce ukázala vliv EcN kolonizace GF myši na enzymovou aktivitu CYP1A a CYP3A. Vliv EcN kolonizace byl pozorován u samců i samic, avšak s opačným trendem (Obr. 9AB a 11AB).

Vzhledem k tomu, že jsou enzymy podrodiny CYP1A a CYP3A zapojeny do metabolismus široké škály cizorodých látek a léčiv, mohou mít změny v jejich aktivitě klinický dopad.

V případě aktivity CYP2A byl pozorován výrazný nárůst u obou gnotobiotických skupin (GF a GF + EcN) u samců i samic oproti příslušným SPF skupinám (Obr. 10AB). Z výsledků vyplývá, že enzymy podrodiny CYP2A mohou být velmi citlivé na změny ve složení střevního mikrobiomu. Nedávná studie ukázala důležitou roli mikrobiomu v regulaci exprese mRNA Cyp2a5 a enzymové aktivity CYP2A u samic myší při zánětlivých stavech⁴⁶. Za zmínku stojí rozdíl v efektu kolonizace EcN (stejně jako v případě CYP1A a CYP3A) u samců a samic na aktivitu CYP2A (Obr. 10AB), což ukazuje důležitost pohlaví, při zvážení intervencí cílených na mikrobiom během farmakoterapie.

Závěr

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium vlivu střevního mikrobiomu na enzymovou aktivitu vybraných CYP v mikrosomální frakci izolované z jater myších samců a samic. Pro posouzení vlivu mikrobiomu byly použity gnotobiotické myši s přesně definovaným složením střevního mikrobiomu.

Ze získaných dat lze vyvodit následující závěry:

- Aktivita CYP1A a CYP3A byla výrazně snížena u GF samic v porovnání s kontrolní SPF skupinou
- Kolonizace GF myši EcN ovlivnila všechny vybrané aktivity CYP v porovnání s GF skupinou u samců i samic
- Aktivita CYP2A byla výrazně zvýšena u obou gnotobiotických skupin (GF a GF + EcN) u samců i samic oproti příslušným SPF skupinám
- Efekt kolonizace GF myši EcN byl u všech měřených aktivit CYP opačný u samců i samic oproti příslušným GF myším

Literatura

- (1) Lloyd-Price, J.; Abu-Ali, G.; Huttenhower, C. The Healthy Human Microbiome. *Genome Medicine*. BioMed Central Ltd. April 27, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>.
- (2) Gomaa, E. Z. Human Gut Microbiota/Microbiome in Health and Diseases: A Review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH December 1, 2020, pp 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>.
- (3) Selwyn, F. P.; Cui, J. Y.; Klaassen, C. D. Special Section on Drug Metabolism and the Microbiome RNA-Seq Quantification of Hepatic Drug Processing Genes in Germ-Free Mice. *Drug Metabolism and Disposition* **2015**, *43* (10), 1572–1580. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.063545>.
- (4) Jourová, L.; Vavreckova, M.; Zemanova, N.; Anzenbacher, P.; Langova, K.; Hermanova, P.; Hudcovic, T.; Anzenbacherova, E. Gut Microbiome Alters the Activity of Liver Cytochromes P450 in Mice With Sex-Dependent Differences. *Front Pharmacol* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01303>.
- (5) Jourová, L.; Anzenbacher, P.; Lišková, B.; Matušková, Z.; Hermanová, P.; Hudcovic, T.; Kozáková, H.; Hrnová, L.; Anzenbacherová, E. Colonization by Non-Pathogenic Bacteria Alters mRNA Expression of Cytochromes P450 in Originally Germ-Free Mice. *Folia Microbiol (Praha)* **2017**, *62* (6), 463–469. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0517-8>.
- (6) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. *Review Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics*; 2001; Vol. 58.
- (7) Shin, N. R.; Whon, T. W.; Bae, J. W. Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd September 1, 2015, pp 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
- (8) Gebrayel, P.; Nicco, C.; Al Khodor, S.; Bilinski, J.; Caselli, E.; Comelli, E. M.; Egert, M.; Giaroni, C.; Karpinski, T. M.; Loniewski, I.; Mulak, A.; Reygner, J.; Samczuk, P.; Serino, M.; Sikora, M.; Terranegra, A.; Ufnal, M.; Villegier, R.;

- Pichon, C.; Konturek, P.; Edeas, M. Microbiota Medicine: Towards Clinical Revolution. *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd December 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03296-9>.
- (9) Cresci, G. A.; Bawden, E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc. December 1, 2015, pp 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>.
- (10) Cryan, J. F.; O, K. J.; M Cowan, C. S.; Sandhu, K. V; S Bastiaanssen, T. F.; Boehme, M.; Codagnone, M. G.; Cusotto, S.; Fulling, C.; Golubeva, A. V; Guzzetta, K. E.; Jaggar, M.; Long-Smith, C. M.; Lyte, J. M.; Martin, J. A.; Molinero-Perez, A.; Moloney, G.; Morelli, E.; Morillas, E.; Cruz-Pereira, J. S.; Peterson, V. L.; Rea, K.; Ritz, N. L.; Sherwin, E.; Spichak, S.; Teichman, E. M.; van de Wouw, M.; Paula Ventura-Silva, A.; Wallace-Fitzsimons, S. E.; Hyland, N.; Clarke, G.; Dinan, T. G. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* **2019**, *99*, 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.-The.
- (11) Laukens, D.; Brinkman, B. M.; Raes, J.; De Vos, M.; Vandenabeele, P. Heterogeneity of the Gut Microbiome in Mice: Guidelines for Optimizing Experimental Design. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press September 5, 2015, pp 117–132. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv036>.
- (12) Adak, A.; Khan, M. R. An Insight into Gut Microbiota and Its Functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG February 15, 2019, pp 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>.
- (13) Walter, J.; Ley, R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annual Review of Microbiology*. 2011, pp 411–429. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102830>.
- (14) Grigor'eva, I. N. Gallstone Disease, Obesity and the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Possible Biomarker of Gut Dysbiosis. *Journal of Personalized Medicine*. MDPI AG December 1, 2021, pp 1–18. <https://doi.org/10.3390/jpm11010013>.
- (15) Clarke, G.; Sandhu, K. v.; Griffin, B. T.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F.; Hyland, N. P. Gut Reactions: Breaking down Xenobiotic–Microbiome Interactions. *Pharmacol Rev* **2019**, *71* (2), 198–224. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015768>.
- (16) Zmora, N.; Suez, J.; Elinav, E. You Are What You Eat: Diet, Health and the Gut Microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16* (1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>.

- (17) Guan, Z. W.; Yu, E. Z.; Feng, Q. Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota. *Molecules*. MDPI November 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26226802>.
- (18) Biasucci, G.; Rubini, M.; Riboni, S.; Morelli, L.; Bessi, E.; Retetangos, C. Mode of Delivery Affects the Bacterial Community in the Newborn Gut. *Early Hum Dev* **2010**, *86* (SUPPL. 1), 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>.
- (19) Claesson, M. J.; Cusack, S.; O’Sullivan, O.; Greene-Diniz, R.; De Weerd, H.; Flannery, E.; Marchesi, J. R.; Falush, D.; Dinan, T.; Fitzgerald, G.; Stanton, C.; Van Sinderen, D.; O’Connor, M.; Harnedy, N.; O’Connor, K.; Henry, C.; O’Mahony, D.; Fitzgerald, A. P.; Shanahan, F.; Twomey, C.; Hill, C.; Ross, R. P.; O’Toole, P. W. Composition, Variability, and Temporal Stability of the Intestinal Microbiota of the Elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (SUPPL. 1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>.
- (20) Zoetendal, E. G.; Akkermans, A. D. L.; Akkermans-van Vliet, W. M.; De Visser, J. A. G. M.; De Vos, W. M. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microb Ecol Health Dis* **2001**, *13* (3), 129–134. <https://doi.org/10.1080/089106001750462669>.
- (21) Clarke, S. F.; Murphy, E. F.; O’Sullivan, O.; Lucey, A. J.; Humphreys, M.; Hogan, A.; Hayes, P.; O’Reilly, M.; Jeffery, I. B.; Wood-Martin, R.; Kerins, D. M.; Quigley, E.; Ross, R. P.; O’Toole, P. W.; Molloy, M. G.; Falvey, E.; Shanahan, F.; Cotter, P. D. Exercise and Associated Dietary Extremes Impact on Gut Microbial Diversity. *Gut* **2014**, *63* (12), 1913–1920. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541>.
- (22) Ianiro, G.; Tilg, H.; Gasbarrini, A. Antibiotics as Deep Modulators of Gut Microbiota: Between Good and Evil. *Gut* **2016**, *65* (11), 1906–1915. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312297>.
- (23) Sousa, T.; Paterson, R.; Moore, V.; Carlsson, A.; Abrahamsson, B.; Basit, A. W. The Gastrointestinal Microbiota as a Site for the Biotransformation of Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. November 3, 2008, pp 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009>.
- (24) Scheline, R. R. Metabolism of Foreign Compounds by Gastrointestinal Microorganisms. *Pharmacol Rev* **1973**, *25* (4), 451–523.

- (25) Li, H.; Jia, W. Cometabolism of Microbes and Host: Implications for Drug Metabolism and Drug-Induced Toxicity. *Clin Pharmacol Ther* **2013**, *94* (5), 574–581. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.157>.
- (26) Jourova, L.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Human Gut Microbiota Plays a Role in the Metabolism of Drugs. *Biomedical Papers*. PALACKY UNIV 2016, pp 317–326. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.039>.
- (27) Wilson, I. D.; Nicholson, J. K. Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism, Efficacy, and Toxicity. *Translational Research*. Mosby Inc. January 1, 2017, pp 204–222. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>.
- (28) Peppercorn, M. A.; Goldman, P. The Role of Intestinal Bacteria in the Metabolism of Salicylazosulfapyridine. *J Pharmacol Exp Ther* **1972**, *181* (3), 555–562.
- (29) Lindenbaum, J.; Rund, D. G.; Butler, V. P.; Tse-Eng, D.; Saha, J. R. Inactivation of Digoxin by the Gut Flora: Reversal by Antibiotic Therapy. *N Engl J Med* **1981**, *305* (14), 789–794. <https://doi.org/10.1056/NEJM198110013051403>.
- (30) Carmody, R. N.; Turnbaugh, P. J. Host-Microbial Interactions in the Metabolism of Therapeutic and Diet-Derived Xenobiotics. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation October 1, 2014, pp 4173–4181. <https://doi.org/10.1172/JCI72335>.
- (31) Clayton, T. A.; Baker, D.; Lindon, J. C.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K. *Pharmacometabonomic Identification of a Significant Host-Microbiome Metabolic Interaction Affecting Human Drug Metabolism*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904489106.
- (32) Zitvogel, L.; Daillère, R.; Roberti, M. P.; Routy, B.; Kroemer, G. Anticancer Effects of the Microbiome and Its Products. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group August 1, 2017, pp 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.44>.
- (33) Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. *PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES*; 2010; Vol. 154.
- (34) Omufca, T.; Sato, R. *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES*; 1964; Vol. 239.
- (35) Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic

- Variation. *Pharmacology and Therapeutics*. April 2013, pp 103–141.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- (36) Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R.; Gotoh, O.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gunsalus, I. C.; Nebert, D. W. P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, 6 (1), 1–42. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>.
- (37) Klyushova, L. S.; Perepechaeva, M. L.; Grishanova, A. Y. The Role of CYP3A in Health and Disease. *Biomedicines*. MDPI November 1, 2022.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10112686>.
- (38) Basic, M.; Bleich, A. Gnotobiotics: Past, Present and Future. *Lab Anim* **2019**, 53 (3), 232–243. <https://doi.org/10.1177/0023677219836715>.
- (39) Martín, R.; Bermúdez-Humarán, L. G.; Langella, P. Gnotobiotic Rodents: An in Vivo Model for the Study of Microbe-Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. March 31, 2016.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00409>.
- (40) Tlaskalová-Hogenová, H.; Třápková, R.; Kozáková, H.; Hudcovic, T.; Vannucci, L.; Tuková, L.; Rossmann, P.; Hrní, T.; Kverka, M.; Zákostelská, Z.; Klimeová, K.; Pibylková, J.; Bártošová, J.; Sanchez, D.; Fundová, P.; Borovská, D.; Rtková, D.; Zídek, Z.; Schwarzer, M.; Drastich, P.; Funda, D. P. 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. *Cellular and Molecular Immunology*. March 2011, pp 110–120.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67>.
- (41) Zhao, Z.; Xu, S.; Zhang, W.; Wu, D.; Yang, G. Probiotic Escherichia Coli NISSLE 1917 for Inflammatory Bowel Disease Applications. *Food and Function*. Royal Society of Chemistry April 25, 2022, pp 5914–5924.
<https://doi.org/10.1039/d2fo00226d>.
- (42) Phillips I. R.; Shephard E. A.; de Montellano P. R. O. Methods in Molecular Biology. In: Cytochrome P450 Protocols, 3rd Eds. *Humana Press* **1998**.
- (43) Kronbach, T.; Mathys, D.; Umeno, M.; Gonzalez, F. J.; Meyer, U. A. Oxidation of Midazolam and Triazolam by Human Liver Cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol* **1989**, 36 (1), 89–96.

- (44) Sonnenborn, U.; Schulze, J. The Non-Pathogenic *Escherichia Coli* Strain Nissle 1917 – Features of a Versatile Probiotic. *Microb Ecol Health Dis* **2009**, *21* (3–4), 122–158. <https://doi.org/10.3109/08910600903444267>.
- (45) Matuskova, Z.; Anzenbacherova, E.; Vecera, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087150>.
- (46) Satka, S.; Frybortova, V.; Zapletalova, I.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E.; Kozakova, H.; Srutkova, D.; Hudcovic, T.; Jourova, L. Effect of DSS-Induced Ulcerative Colitis and Butyrate on the Cytochrome P450 2A5: Contribution of the Microbiome. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911627>.