

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2025

Bc. Marie Chvátalová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Vliv terapeutické diety na enzymy metabolismu léčiv (u experimentálního modelu
roztroušené sklerózy)**

Diplomová práce

Autor: Bc. Marie Chvátalová

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D

Rok: 2025

Prohlášení:

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

V Olomouci dne: 6. 5. 2025

.....

Bc. Marie Chvátalová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila upřímné poděkování Mgr. Lence Jourové, Ph.D., za její vstřícnost, odborné vedení a cenné rady, které mi poskytla při vypracování této diplomové práce. Velké díky patří také Mgr. Veronice Frýbortové a Mgr. Štefanu Šatkovi za jejich pomoc při laboratorní práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za trpělivost, podporu a povzbuzení během celého mého studia.

Tato práce byla vypracována v rámci řešení projektu Grantové agentury České republiky „Působení ketogenní diety na imunitní odpověď a na schopnost vyrovnat se s cizorodými látkami (xenobiotiky) v experimentálním modelu“ (grant č. 23-05645S) a vnitřních studentských grantů Univerzity Palackého v Olomouci (LF_2024_011 a LF_2025_008).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení: Bc. Marie Chvátalová

Název práce: Vliv terapeutické diety na enzymy metabolismu léčiv (u experimentálního modelu roztroušené sklerózy)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Školitel: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.

Rok obhajoby: 2025

Abstrakt:

Diplomová práce se věnuje vlivu terapeutických diet na aktivitu a expresi enzymů zapojených do metabolismu léčiv u experimentálního myšího modelu roztroušené sklerózy (RS). Cílem bylo prozkoumat, zda specifické dietní režimy, konkrétně ketogenní (KETO) a vysokovlákninová (HFiD) dieta mohou ovlivnit funkci jaterních enzymů cytochromů P450 (CYP), a tím i schopnost organismu metabolizovat současně podávaná léčiva.

K experimentům byl využit model experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) u myši, který napodobuje hlavní patologické rysy RS. Myši byly rozděleny do tří skupin podle dietních režimů: kontrolní dieta, HFiD a KETO dieta. Z jaterní tkáně byla izolována mikrosomální frakce, ve které byla pomocí HPLC stanovena aktivita vybraných enzymů CYP. Dále byla stanovena exprese těchto enzymů na úrovni proteinu (Western blot) a mRNA (RT-qPCR). V buněčné linii HepG2-Lucia AhR byl sledován vliv butyrátu, propionátu a laktátu na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR).

Skupina myši na KETO dietě vykazovala sníženou aktivitu některých jaterních enzymů, konkrétně CYP2B a CYP2C. HFiD naopak vedla k poklesu enzymové aktivity většiny vybraných enzymů, přičemž indukovala pouze izoformu CYP2A, což potvrdil i signifikantní nárůst genové exprese *Cyp2a5/4*. Zajímavým zjištěním byla také schopnost butyrátu a částečně i propionátu aktivovat AhR, který je známý jako transkripční regulátor některých enzymů ze skupiny CYP.

Dietní intervence představují slibný podpůrný přístup v léčbě RS, avšak jejich možný vliv na metabolismus léčiv je třeba důkladně zohlednit. Pro bezpečné zavádění terapeutických diet do klinické praxe je klíčové porozumět jejich interakcím s farmakoterapií, zejména u chronicky léčených pacientů.

Klíčová slova:	Dieta; Metabolismus léčiv; Cytochromy P450; Mikrosomální frakce; Roztroušená skleróza
Počet stran:	74
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Marie Chvátalová

Title: Effects of therapeutic diet on drug-metabolizing enzymes
(in experimental model of multiple sclerosis)

Type of thesis: Master's thesis

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

Advisor: Mgr. Lenka Jourová, Ph.D.

The year of presentation: 2025

Abstract:

This thesis focuses on the impact of therapeutic diets on the activity and expression of enzymes involved in drug metabolism in the experimental model of multiple sclerosis (MS). The aim was to investigate whether specific dietary regimens - namely the ketogenic (KETO) and high-fiber (HFid) diets - may influence the function of hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes and thereby affect the organism's ability to metabolize drugs.

The experiments were conducted using a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which mimics key pathological features of MS. The mice were divided into three dietary groups: control diet, HFid, and KETO diet. Microsomal fractions were isolated from liver tissue, and the activities of selected CYP enzymes were evaluated using HPLC methods. Additionally, the expression of these enzymes was assessed at both the protein level (Western blot) and the mRNA level (RT-qPCR). The effect of butyrate, propionate, and lactate on the transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) was evaluated in the HepG2-Lucia AhR cell line.

The group of mice on the KETO diet showed reduced activity of certain hepatic enzymes, namely CYP2B and CYP2C. In contrast, the HFid resulted in decreased activity of most of the selected enzymes, with the exception of the CYP2A isoform, which was induced, as confirmed by a significant increase in *Cyp2a5/4* gene expression. Notably, butyrate and, to a lesser extent, propionate demonstrated the ability to activate AhR, a transcription factor involved in the regulation of several CYP enzymes.

Dietary interventions represent a promising supportive approach in the treatment of MS; however, their potential impact on drug metabolism must be carefully considered. A thorough

understanding of diet–drug interactions is essential for the safe implementation of therapeutic diets in clinical practice, particularly in chronically treated patients.

Keywords:	Diet; Drug metabolism; Cytochromes P450; Microsomal fraction; Multiple sclerosis
Number of pages:	74
Language:	Czech

Seznam zkratek:

β HB – β -hydroxybutyrát

AhR – aryluhlovodíkový receptor

APC – antigen-prezentující buňka

ARNT – nukleární translokátorový protein aryluhlovodíkového receptoru

ATP – adenosin trifosfát

BBB – hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)

BCA – kyselina bicinechinová

BSA – hovězí sérový albumin

CNS – centrální nervová soustava

CoQ10 – koenzym Q10

CTRL – skupina myši krmená kontrolní dietou

CYP – cytochromy P450

EAE – experimentální autoimunitní encefalomyelitida

EBV – Epstein-Barrové virus

HDAC – histondeacetyláza

HFiD – skupina myši krmená vysokovlákninovou dietou

HP – homogenizační pufr

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IFN- γ – interferon gama

IL-10 – interleukinu-10

IL-17 – interleukin-17

IL-1 β – interleukin-1 beta

IL-6 – interleukin-6

IS – imunitní systém

KD – ketogenní dieta

KETO – skupina myši krmená ketogenní dietou

MHC II – hlavní histokompatibilní komplex II

NF- κ B – nukleární faktor kappa B

P-E homogenizátor – Potter-Elvehjemův homogenizátor

PP – promývací pufr

PPMS – primárně progresivní roztroušená skleróza

PRMS – progresivně-relabující roztroušená skleróza

ROS – reaktivní formy kyslíku

RRMS – relabující-remitující roztroušená skleróza

RS – roztroušená skleróza

RT-qPCR – reverzní transkripce-kvantitativní polymerázová řetězová reakce

S1P – sfingosin-1-fosfátový receptor

SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem

SD – standardní dieta

SPMS – sekundárně progresivní roztroušená skleróza

Th – pomocné T lymfocyty jsou podskupinou T-lymfocytů, které hrají klíčovou roli v buněčné imunitní odpovědi, obsahují CD4 koreceptor, proto se také označují jako CD4⁺ lymfocyty

TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa

UC – ultracentrifugační

XRE – xenobiotické responzivní elementy

Obsah

Seznam zkratk:	9
Obsah	11
Cíle diplomové práce	14
Úvod	15
Teoretická část	16
1. Roztroušená skleróza	16
1.1. Možnosti léčby RS	19
2. Terapeutické diety	21
2.1. Ketogenní dieta	22
2.2. Vysokovlákninová dieta	23
3. Enzymy metabolismu léčiv	24
3.1. Cytochromy P450	24
3.1.1. Nomenklatura	25
3.1.2. Faktory ovlivňující aktivitu CYP	26
4. Dietní intervence/terapeutické strategie cílené na mikrobiom a metabolismus léčiv	27
5. Experimentální model roztroušené sklerózy u myši	28
Experimentální část	30
6. Materiál	30
6.1. Chemikálie	30
6.2. Přístrojové vybavení	31
7. Metody	32
7.1. Navržení experimentu	32

7.2.	Příprava jaterní mikrosomální frakce	33
7.3.	Stanovení koncentrace CYP v jaterní mikrosomální frakci.....	34
7.4.	Stanovení koncentrace proteinů v jaterní mikrosomální frakci	35
7.5.	Stanovení enzymových aktivit vybraných CYP	35
7.6.	Stanovení exprese proteinu vybraných CYP	44
7.7.	Stanovení exprese mRNA kódujících vybrané CYP	45
7.8.	Studium vlivu SCFA na regulaci genové exprese	45
7.9.	Statistická analýza.....	47
8.	Výsledky	47
8.1.	Charakterizace mikrosomální frakce	47
8.2.	Stanovení enzymových aktivit CYP	48
8.2.1.	Stanovení aktivity CYP1A.....	48
8.2.2.	Stanovení aktivity CYP2A a CYP2B	49
8.2.3.	Stanovení aktivity CYP2C.....	50
8.2.4.	Stanovení aktivity CYP2D, CYP2E a CYP3A.....	51
8.3.	Stanovení exprese proteinu u vybraných CYP	52
8.3.1.	Expresa proteinu CYP1A a CYP2A	53
8.3.2.	Expresa proteinu CYP2B a CYP2C.....	54
8.3.3.	Expresa proteinu CYP3A.....	56
8.4.	Stanovení exprese mRNA kódující vybrané CYP	56
8.5.	Stanovení vlivu SCFA na aktivaci AhR	58
8.5.1.	Vliv butyrátu na aktivaci AhR	59
8.5.2.	Vliv propionátu na aktivaci AhR	60
8.5.3.	Vliv laktátu na aktivaci AhR	61
Diskuze		63

Závěr		67
Literatura		68

Cíle diplomové práce

Cílem teoretické části diplomové práce je poskytnout ucelený přehled o autoimunitním onemocněním roztroušené sklerózy (RS), včetně jeho patogeneze a současných možností léčby. Pozornost je věnována rovněž nefarmakologickým přístupům léčby, se zaměřením na roli terapeutických diet. Součástí je také shrnutí klíčových informací o enzymech ze skupiny cytochromů P450 (CYP) a jejich významné roli v metabolismu léčiv.

Cílem experimentální části je studium vlivu terapeutických diet na jaterní CYP u myšího modelu RS – experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE).

Podrobné cíle experimentální části:

- Izolovat mikrosomální frakci z jaterního homogenátu myší u kterých byla vyvolána EAE pomocí diferenciální centrifugace.
- Aplikovat spektrofotometrické metody ke stanovení koncentrace proteinů a CYP v jaterní mikrosomální frakci.
- Stanovit enzymovou aktivitu vybraných CYP s využitím specifických substrátů a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí.
- Stanovit expresi proteinů vybraných enzymů CYP v jaterním homogenátu za využití elektroforézy a Western blottingu.
- Objasnit mechanismus regulace exprese CYP skrze aryluhlovodíkový receptor (AhR) butyrátem, propionátem a laktátem s využitím modelu jaterních buněk HepG2-Lucia AhR.
- Zpracovat získaná data, provést statistickou analýzu a vyhodnotit vliv terapeutických diet na aktivitu a expresi vybraných enzymů CYP s důrazem na rozdíly mezi jednotlivými dietními režimy.

Úvod

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní onemocnění postihující centrální nervovou soustavu (CNS), které se vyznačuje narušením myelinových pochev nervových vláken. Tento patologický proces vede k poruchám nervového přenosu a vyvolává široké spektrum neurologických příznaků, mezi něž patří zhoršená hybnost, narušená koordinace a poruchy zraku. Přesné příčiny RS zůstávají nejasné, nicméně jsou známy rizikové faktory jako jsou genetické predispozice, vliv prostředí, infekční onemocnění nebo stravovací návyky¹.

V poslední době roste zájem o možnosti ovlivnění průběhu RS prostřednictvím terapeutických diet². Výzkumy ukazují, že některé stravovací režimy mohou modulovat imunitní odpověď a tím ovlivňovat progresi onemocnění¹. Například ketogenní dieta (KD), charakterizovaná vysokým obsahem tuků a nízkým příjmem sacharidů, podporuje tvorbu ketolátek, jako je β -hydroxybutyrát (β HB), které mají protizánětlivé a neuroprotektivní účinky³. Podobně vysokovlákninová strava pozitivně ovlivňuje složení střevního mikrobiomu a produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), což může přispět k regulaci imunitní odpovědi a metabolických procesů⁴.

Biotransformace léčiv probíhá převážně v játrech a klíčovou úlohu v ní hrají enzymy cytochromy P450 (CYP). Tyto enzymy se podílejí na oxidaci, redukci a hydrolýze různých léčiv, čímž ovlivňují jejich farmakokinetiku. Variabilita enzymatické aktivity CYP může způsobit rozdíly v terapeutických účincích podávaných léčiv mezi jednotlivými pacienty. Faktory, jako je genetická predispozice, interakce s jinými léčivy a složení stravy, mohou významně ovlivnit metabolismus léčiv a jejich biologickou dostupnost^{5,6}.

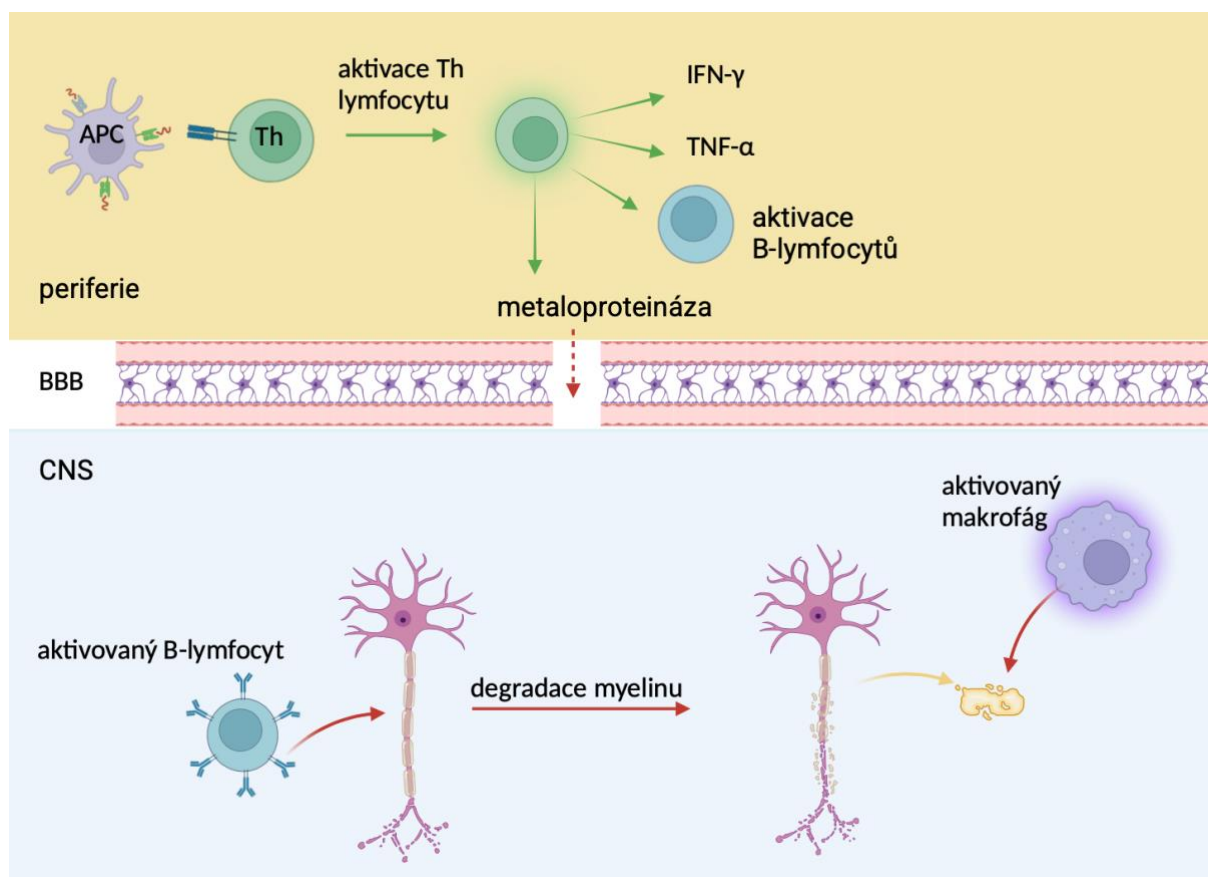
Tato práce se zaměřuje na zkoumání vlivu terapeutických diet na enzymy metabolismu léčiv v souvislosti s RS. Studium interakcí mezi dietními zásahy a aktivitou enzymů CYP může přispět k lepšímu porozumění molekulárních mechanismů regulace CYP a podpořit vývoj personalizovaných přístupů v léčbě RS.

Teoretická část

1. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy (CNS), při kterém dochází k degradaci myelinu a tím k poškození myelinových pochev, které obklopují nervová vlákna. Následkem tohoto poškození je narušení přenosu nervových signálů, což vede k různorodým neurologickým příznakům, jako jsou svalová ztuhlost, ztráta koordinace, poruchy zraku a slabost končetin¹.

Imunitní systém (IS) jedince trpícího RS napadá vlastní CNS, což způsobuje zánět. V periferních tkáních dochází k aktivaci pomocných T-lymfocytů (Th-lymfocytů) prostřednictvím antigen-prezentujících buněk (APC), jako jsou dendritické buňky, makrofágy a B-lymfocyty. APC prezentují myelinové antigeny pomocí hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC II), což aktivuje Th-lymfocyty. Aktivované Th-lymfocyty uvolňují metaloproteinázy, které narušují hematoencefalickou bariéru (BBB), což umožňuje Th-lymfocytům, dalším imunitním buňkám a zánětlivým molekulám vstoupit do CNS. Mezi zánětlivé molekuly se řadí cytokiny, včetně interferonu gama (IFN- γ) a tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α), které jsou produkovány Th-lymfocyty a významně přispívají k rozvoji zánětlivé odpovědi a následné degradaci myelinu v rámci procesu demyelinizace. Aktivované Th-lymfocyty mají schopnost aktivovat B-lymfocyty, které produkují autoprotilátky proti myelinu, ty procházejí přes poškozenou BBB a aktivují komplementovou kaskádu. Tato kaskáda zesiluje destrukci myelinových pochev a podílí se na progresi onemocnění. Degradované myelinové fragmenty jsou fagocytovány makrofágy a mikroglie (Obr. 1)⁷. Opakované poškození myelinových pochev a probíhající zánět postupně vedou ke ztrátě neuronů neboli neurodegeneraci¹.



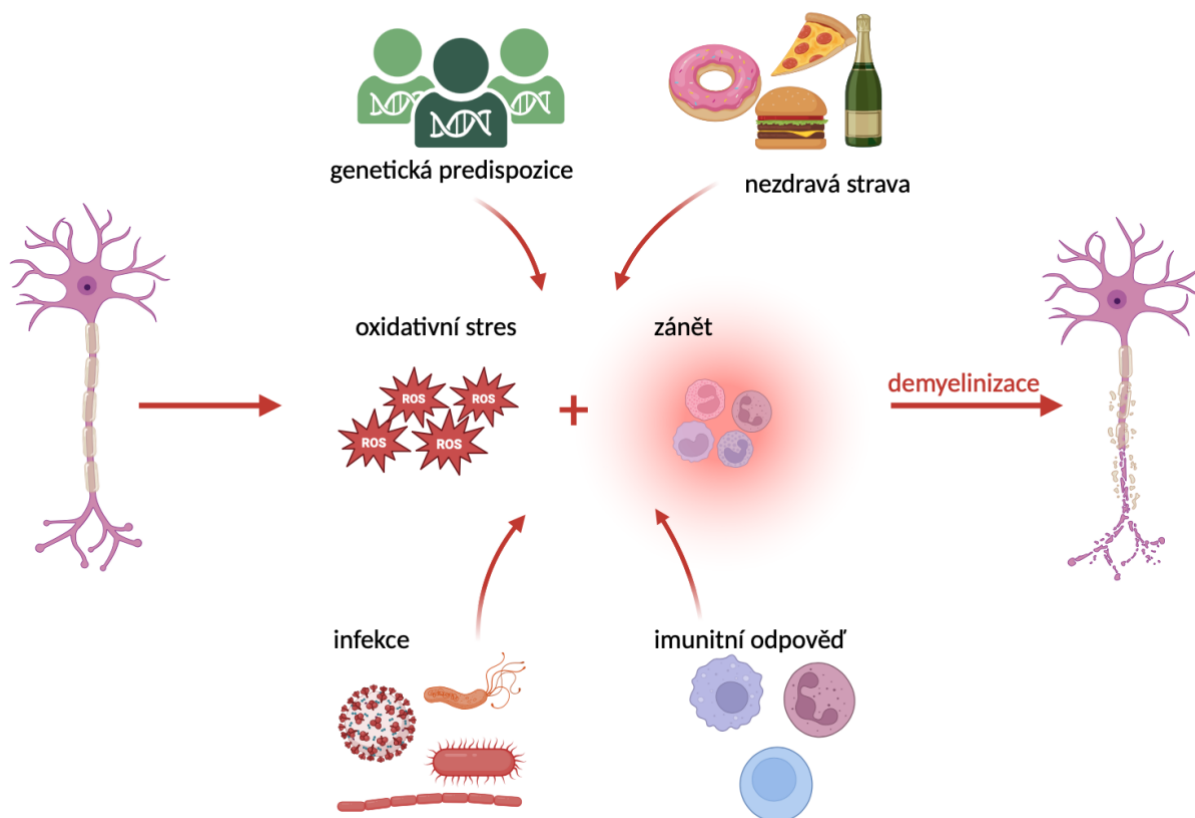
Obr. 1: Obr. 1: Autoimunitní teorie patogeneze roztroušené sklerózy. Antigen-prezentující buňky (APC) předkládají antigeny T-lymfocytům, především Th-lymfocytům. Ty se aktivují, uvolňují prozánětlivé cytokiny a podporují další imunitní reakce. Dochází k aktivaci B-lymfocytů, které se podílejí na zánětlivé odpovědi tvorbou autoprotilátek a produkcí cytokinů přispívajících k poškození centrální nervové soustavy (CNS). Do procesu se zapojují i metaloproteinázy, které narušují hematoencefalickou bariéru (BBB) a podporují infiltraci zánětlivých buněk do CNS. Výsledkem je poškození a demyelinizace nervových vláken, což vede k poruše přenosu nervových vzruchů a vzniku neurologických příznaků (modifikováno podle⁷).

U pacientů s RS dochází k významné poruše mitochondriálního metabolismu, která přispívá k neurodegeneraci a progresi onemocnění. Tento proces je charakterizován zejména zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a narušením homeostázy vápenatých kationtů Ca^{2+} , což vede k poškození mitochondriální struktury a snížení schopnosti produkovat energii ve formě ATP. Porucha mitochondriálního metabolismu u RS se týká především řetězce oxidativní fosforylace, což je klíčový proces zodpovědný za produkci

energie – ATP v mitochondriích. Konkrétně jsou narušeny funkce komplexu I a komplexu IV elektronového transportního řetězce, což vede ke snížené produkci ATP a zvýšené tvorbě ROS⁸.

RS je charakterizována střídáním období akutních záchvatů (relapsů) a období klidu (remise), kdy se příznaky mohou zlepšit. RS se projevuje v několika formách, přičemž nejběžnější je relabující-remitující forma (RRMS), která je charakteristická relapsy a následnou částečnou nebo úplnou obnovou funkcí. Postupem času (10 – 20 let) se může přeměnit na sekundárně progresivní formu RS (SPMS), kdy dochází k postupnému zhoršování stavu bez zjevných relapsů. Méně častou formou je primárně progresivní RS (PPMS), která představuje přibližně 15 % případů RS a vyznačuje se postupným zhoršováním bez výrazných relapsů. Nejvzácnější formou je progresivně-relabující RS (PRMS), která je charakteristická postupným zhoršováním stavu s občasnými relapsy⁷.

Původ onemocnění není zcela jasný, přepokládá se, že vzniká kombinací genetické predispozice a vlivů prostředí. Riziko vzniku onemocnění zvyšuje nedostatek vitamínu D, vystavování organismu cigaretovému kouři, těžkým kovům a toxinům, nevhodné stravovací návyky nebo například infekce virem Epstein-Barrové (EBV) (Obr. 2)¹.



Obr. 2: Schéma zobrazující faktory přispívající k oxidativnímu stresu a zánětu, které vedou k demyelinizaci axonů u roztroušené sklerózy (modifikováno podle¹).

1.1. Možnosti léčby RS

Farmakoterapie RS

V posledních letech došlo k výraznému pokroku v možnostech farmakologické léčby RS, která má za cíl nejen zmírnit akutní ataky, ale především zpomalit progresi onemocnění a minimalizovat vznik nových lézí. Moderní terapeutické přístupy rovněž zohledňují poznatky o klíčové roli B-lymfocytů v patogenezi RS, což vedlo k vývoji léčiv cílených právě na tuto složku imunitního systému.

Léčiva využívaná k terapii RS lze rozdělit podle mechanismu účinku do několika skupin. Mezi vysoce účinné přípravky patří zejména monoklonální protilátky, například ocrelizumab, který se zaměřuje na antigen CD20 na povrchu B-lymfocytů. Ocrelizumab selektivně snižuje počet B-lymfocytů exprimujících antigen CD20, čímž účinně brání jejich

migraci do CNS a omezuje tak antigen-prezentující funkci B-lymfocytů, což vede ke snížené produkci prozánětlivých cytokinů. Tento přípravek se podává intravenózně každých 24 týdnů a v klinických studiích prokázal účinnost jak u RRMS formy, tak u PPMS formy RS, kde zpomalil progresi onemocnění přibližně o jednu čtvrtinu⁹.

Významnou skupinu představují také modulátory sfingosin-1-fosfátového receptoru (S1P). Z této skupiny stojí za zmínku ozanimod, což je selektivní S1P receptorový modulátor, který blokuje uvolňování lymfocytů z lymfatických uzlin a tím snižuje jejich přítomnost v CNS. Ozanimod představuje účinnou a dobře tolerovanou možnost dlouhodobé léčby RS. Klinické studie potvrdily jeho příznivý bezpečnostní profil a výhodou je i pohodlné perorální podávání¹⁰.

Tradičně používanými léky, které však vykazují nižší účinnost, jsou interferony beta a glatiramer acetát. Interferony beta modulují imunitní odpověď snížením exprese MHC II molekul na APC a snižují tak koncentraci prozánětlivých cytokinů. Glatiramer acetát, složený ze syntetických polypeptidů, příznivě ovlivňuje rovnováhu mezi prozánětlivými a regulačními cytokiny, čímž podporuje regulaci imunitní odpovědi.

V léčbě agresivních forem RS nebo při nedostatečné odpovědi na jinou léčbu se využívají přípravky jako mitoxantron, alemtuzumab nebo kladribin. Tyto léky jsou však spojeny s vyšším rizikem závažných nežádoucích účinků, což omezuje jejich použití na vybrané případy¹¹.

Nefarmakologická intervence v léčbě RS

Samotná farmakoterapie nemusí být dostačující pro zvládnutí všech příznaků nemoci, proto v tomto kontextu nabývá na významu i úprava životního stylu, která může podpořit celkovou účinnost léčby a zlepšit kvalitu života pacientů. Zásadní přínos má pravidelný pohyb, ať už jde o chůzi, cvičení nebo lehké posilování, fyzická aktivita zlepšuje nejen fyzickou kondici, ale také náladu, energii a celkové vnímání vlastního zdraví. Pohyb navíc pomáhá zvládat únavu, která patří mezi nejčastější a nejvíce omezující příznaky RS¹².

I když výsledky dietních opatření zatím nejsou jednoznačné, zdravé a vyvážené stravování podporuje celkové zdraví a vitalitu¹³, proto se stále častěji vedle standardní léčby zkoumá i role bioaktivních látek a složek potravy. Ty mohou ovlivnit zánět, oxidativní stres, imunitní odpověď nebo střevní mikrobiom, a tím potenciálně přispět ke zmírnění průběhu onemocnění. Nejde však o náhradu farmakoterapie, spíše o doplňkový přístup. Účinky těchto látek byly zatím převážně popsány v preklinických studiích nebo v menších klinických souborech, a jejich využití v praxi tak zůstává omezené¹.

Mezi bioaktivní látky, které byly zkoumány v souvislosti s RS, patří například koenzym Q10 (CoQ10), který je přirozeně se vyskytující sloučeninou v lidském těle. Nachází se ve vnitřní mitochondriální membráně a podílí se na přenosu elektronů v dýchacím řetězci¹⁴. CoQ10 má silné antioxidační vlastnosti, které chrání buňky před poškozením způsobeným volnými radikály a oxidačním stresem, jenž hraje významnou roli při progresi RS¹⁵. Další sloučeninou, která vykazuje potenciál v terapii RS, je resveratrol. Tento polyfenol, přítomný v některých rostlinách, je známý pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti¹. Resveratrol eliminuje volné radikály, podporuje aktivitu endogenních antioxidantů a snižuje produkci prozánětlivých cytokinů. Kromě toho stimuluje produkci neurotrofických faktorů, které podporují růst a regeneraci neuronů^{16,17}. Kurkumin, hlavní složka kurkumy má protizánětlivé, antioxidační a neuroprotektivní vlastnosti. U RS se ukázalo, že kurkumin inhibuje aktivaci transkripčního faktoru, a to nukleárního faktoru kappa B (NF-κB), což vede k poklesu produkce zánětlivých cytokinů¹⁸. Kromě toho stimuluje růst a diferenciaci oligodendrocytů, což může podpořit proces remyelinizace a zpomalit progresi onemocnění, čímž nabízí potenciál pro zmírnění příznaků RS a ochranu nervových buněk před dalším poškozením¹⁹. Ashwagandha, známá také jako *withanie snodárná*, obsahuje withanolidy, které vykazují protizánětlivé, antioxidační a neuroprotektivní účinky. Ashwagandha je předmětem zájmu pro svůj potenciál příznivě ovlivňovat CNS u pacientů s RS, jelikož dokáže pronikat skrze BBB¹. Klinická studie ukázala, že denní dávka 240 mg extraktu ashwagandhy vedla k výraznému snížení úzkosti a zlepšení symptomů stresu a deprese, přičemž také podpořila regeneraci neuronů a zlepšila funkci nadledvin²⁰.

2. Terapeutické diety

Dietní intervence hrají důležitou roli v léčbě chronických onemocnění a mohou významně podpořit standardní terapeutické postupy i kvalitu života pacientů. Ačkoli nemohou zcela nahradit farmakologickou léčbu RS, mohou zvýšit její účinnost a podpořit terapeutickou odpověď.

Také v souvislosti s RS jsou dietní intervence považovány za jednoduchý a relativně nízkorizikový přístup, který může pomoci zlepšit celkový stav pacientů a zmírnit neurologické příznaky²¹.

Experimentální část práce se zaměřuje na ketogenní a vysokovlákninovou dietu, které jsou vzhledem ke svému potenciálu ovlivňovat imunitní odpověď a zánětlivé procesy považovány za slibné podpůrné přístupy v léčbě RS.

2.1. Ketogenní dieta

Ketogenní dieta (KD) je výživový režim, který se vyznačuje velmi nízkým příjmem sacharidů, zvýšeným příjmem tuků a normálním až lehce zvýšeným příjmem bílkovin. Tento typ diety vede k metabolickému stavu nazývanému ketóza, kdy tělo začne využívat ketolátky jako hlavní zdroj energie místo glukózy. U pacientů s RS může KD přinést několik potenciálních benefitů díky svým protizánětlivým, neuroprotektivním a metabolickým účinkům²².

Hlavní výhodou KD u pacientů s RS je její schopnost snižovat zánět v těle. Ketolátky, zejména β -hydroxybutyrát (β HB), působí protizánětlivě, dokáže proniknout přes BBB, a tak působit přímo v CNS, kde snižuje aktivaci mikroglií. β HB výrazně inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) a interleukin-17 (IL-17) a zvyšuje hladinu protizánětlivého interleukinu-10 (IL-10). Snížení hladiny prozánětlivých cytokinů zmírňuje zánět, a tím další poškození CNS^{3,8}.

Jedním z hlavních faktorů přispívajících k neurodegeneraci u RS je mitochondriální dysfunkce v CNS. KD pomáhá obnovit rovnováhu mitochondriálních funkcí tím, že snižuje hladinu glukózy v krvi a nahrazuje ji ketolátkami jako hlavním zdrojem energie. To je výhodné při mitochondriální dysfunkci, protože mitochondrie dokážou ketolátky efektivně využívat i tehdy, kdy je metabolismus glukózy narušený. Ketolátky mají vyšší účinnost při produkci ATP než glukóza, což zvyšuje dostupnost energie pro buňky a pomáhá kompenzovat deficity v produkci ATP způsobené dysfunkcí mitochondrií. Navíc snižují tvorbu ROS během oxidativní fosforylace, čímž omezují oxidační stres, který je běžně zvýšený při RS. Dále také podporují aktivitu antioxidačních enzymů, což pomáhá chránit neurony a mitochondrie před dalším poškozením^{3,8}.

Zkoumání KD na myším modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), což je zvířecí model RS, přineslo hned několik poznatků. Podávání KD vedlo ke zlepšení kognitivních a motorických schopností, včetně prostorové paměti a schopnosti učení. Ve srovnání s myši na standardní dietě měly myši krmené KD mírnější neurologické příznaky a nižší klinické skóre EAE. Zároveň byl potvrzen její protizánětlivý, antioxidační a neuroprotektivní účinek²³.

2.2. Vysokovlákninová dieta

Vláknina má pro pacienty s RS významný potenciál díky své schopnosti modulovat IS a podporovat zdraví střevního mikrobiomu. Vysoký příjem vlákniny je spojen se snížením zánětlivých reakcí v těle, což může mít přímý vliv na progresi RS. Studie na zvířecích modelech EAE, ukázaly, že určité typy vlákniny, jako je například guarová guma, dokážou zpožďovat nástup zánětu a snižovat poškození nervové soustavy. Zatím malé množství klinických studií naznačuje, že vysokovlákninová dieta by mohla mít pozitivní vliv na kvalitu života pacientů s RS, a to jak omezením počtu relapsů, tak i snížením stupně postižení²⁴.

Vláknina slouží jako zdroj energie pro bakterie ve střevním mikrobiomu, zejména pro bakterie patřící do kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Bakterie vlákninu metabolizují, což vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), jako jsou acetát, propionát a butyrát. Tyto kyseliny hrají klíčovou roli při udržování rovnováhy střevního mikrobiomu a při posílení integrity střevní bariéry. Zvýšení mikrobiální diverzity a produkce SCFA podporuje normální imunitní odpověď a může potlačovat zánětlivé procesy spojené s autoimunitními onemocněními, jako je RS. Naopak, nedostatečný příjem vlákniny může vést ke snížení produkce SCFA, což vede k nerovnováze ve střevním mikrobiomu neboli dysbióze a zvýšenému riziku vzniku zánětlivých onemocnění.

Propionát snižuje aktivitu prozánětlivých Th-lymfocytů a podporuje regulační T-lymfocyty, což tlumí imunitní odpověď. Propionát aktivuje G-proteinově spážené receptory, konkrétně GPR41 a GPR43, které se nacházejí na různých buňkách, včetně imunitních. Aktivace těchto receptorů potlačuje zánětlivé signální dráhy, tím že inhibuje cAMP-dependentní signální dráhy a snižuje aktivitu NF-κB, a zároveň podporuje metabolické a epigenetické změny prostřednictvím inhibice histondeacetyláz (HDAC). Tato inhibice vede ke zvýšení exprese genů s protizánětlivým účinkem a podpoře regenerace neuronů. Dlouhodobé studie ukázaly, že suplementace propionátu u pacientů s RS snižuje počet relapsů, zpomaluje atrofii mozku a stabilizuje neurologické postižení²⁵.

Vysokovlákninová dieta může ovlivňovat aktivitu enzymů CYP prostřednictvím modulace střevního mikrobiomu. Metabolické produkty střevního mikrobiomu mohou zvýšit nebo snížit aktivitu určitých izoenzymů CYP²⁶.

3. Enzymy metabolismu léčiv

Metabolismus léčiv je klíčový proces, který umožňuje přeměnu exogenních látek, včetně léčiv, na formy, které lze z těla snadno eliminovat. Tento proces zajišťuje nejen detoxifikaci organismu, ale rovněž ovlivňuje farmakokinetiku a farmakodynamiku podávaných léčiv. Metabolismus léčiv obecně probíhá ve dvou hlavních fázích: funkcionalizační a konjugální.

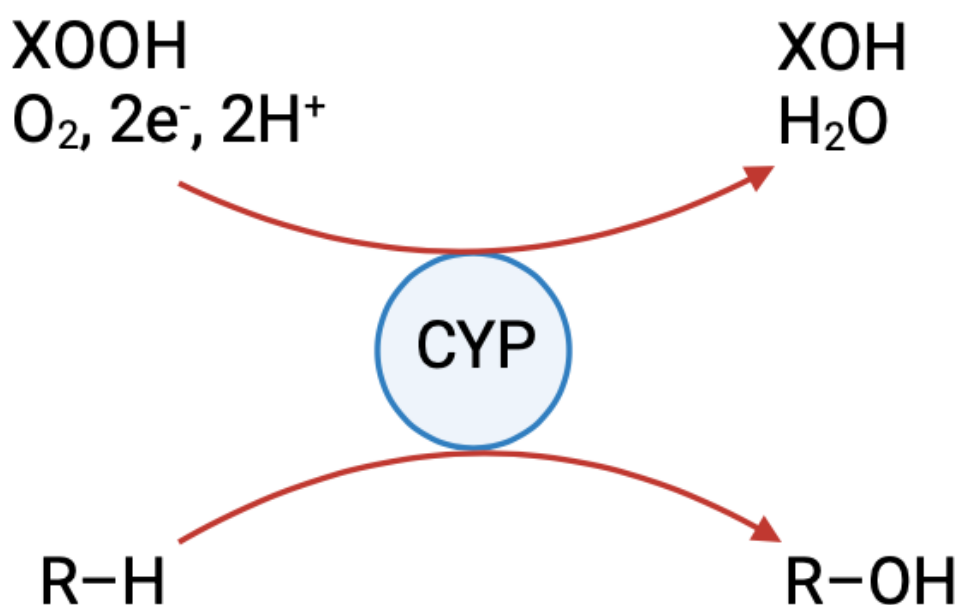
Funkcionalizační fáze neboli fáze I zahrnuje chemické modifikace molekul léčiv, jako jsou oxidace, redukce a hydrolýza. Tyto reakce přidávají nebo odhalují funkční skupiny (např. -OH, -COOH, -NH₂), což připravuje léčivo na následující fázi biotransformace. V této fázi hrají klíčovou roli enzymy cytochromy P450 (CYP), které metabolizují lipofilní léčiva na více polární metabolity, čímž se usnadňuje jejich vylučování^{5,27}.

V konjugální fázi (fáze II) se na molekuly připojují polární skupiny, jako je glukuronová kyselina, sulfát nebo glutathion. Tyto reakce zvyšují polaritu metabolitů, což je činí rozpustnějšími ve vodě a umožňuje jejich eliminaci močí nebo žlučí. Ačkoliv CYP nejsou přímými katalyzátory těchto reakcí, zajišťují tvorbu reaktivních meziproductů, které se stávají substráty pro enzymy druhé fáze biotransformace. V obou těchto fázích může dojít k bioaktivaci, tedy k přeměně metabolitů na toxické nebo biologicky aktivní látky, což může mít zásadní klinické důsledky. V literatuře je také zmiňována III. fáze biotransformace, která zahrnuje aktivní transport metabolitů z buněk pomocí specifických přenašečů, čímž se usnadňuje jejich vylučování z organismu^{5,6}.

3.1. Cytochromy P450

CYP představují jednu z nejvýznamnějších superrodin enzymů v lidském těle. Tyto enzymy, které se nacházejí především v játrech, ale i ve střevech, plicích, kůži a dalších tkáních, se podílejí na metabolismu přibližně 75 % klinicky používaných léčiv. Číslo 450 označuje absorpční maximum v UV-Vis spektru při vlnové délce 450 nm, které vzniká po navázání oxidu uhelnatého na hemovou skupinu enzymu v jeho redukovaném stavu. Z funkčního hlediska je hlavní úlohou CYP oxidace lipofilních látek na více polární metabolity, což je klíčové pro jejich následnou eliminaci z organismu. Struktura CYP je charakteristická přítomností hemové skupiny, která obsahuje železnatý iont ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) v aktivním místě enzymu. Tento iont se podílí na přenosu elektronů během katalýzy. Aktivní místo je tvořeno hydrofobní kapsou, která umožňuje vazbu různorodých substrátů, což zajišťuje široké spektrum reakcí, které CYP katalyzují^{5,27}.

Funkce CYP je závislá na koenzymu NADPH, který poskytuje elektrony potřebné k redukci železa v hemu. Tyto elektrony jsou přenášeny prostřednictvím cytochromu P450 oxidoreduktázy. Enzymový mechanismus zahrnuje několik kroků: vazbu substrátu, redukci železa z Fe^{3+} na Fe^{2+} , vazbu molekuly kyslíku, vznik reaktivního peroxo-komplexu a následnou oxidaci substrátu (Obr. 3). Mezi typické reakce, které CYP katalyzují, patří hydroxylace, dealkylace, epoxidace a další oxidační procesy^{5,6}.

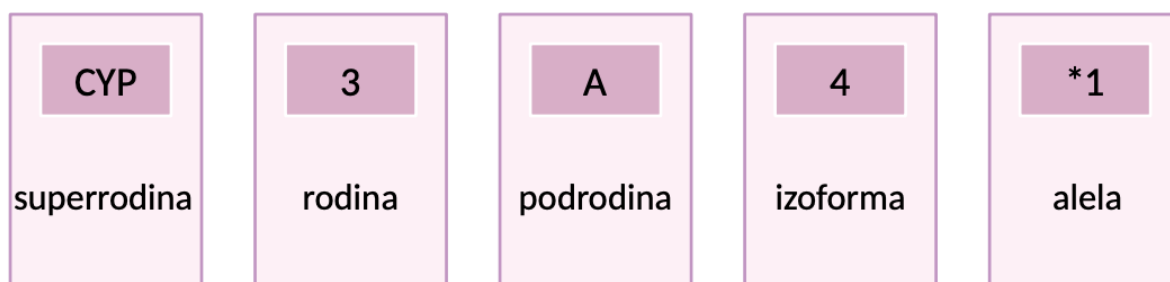


Obr. 3: Schéma reakce katalyzované cytochromem P450 (CYP): R-H – substrát vstupující do reakce. R-OH – hydroxylovaný produkt vznikající oxidací substrátu. XOOH – peroxidový meziprodukt, kde X představuje vodík (H) nebo organický zbytek. XOH – vedlejší produkt vznikající redukcí meziproduktu XOOH . (modifikováno podle²⁸)

3.1.1. Nomenklatura

Nomenklatura CYP reflektuje jejich genetickou příbuznost. Rodiny enzymů (např. CYP1, CYP2) jsou označeny číslem a sdílejí více než 40 % sekvenční homologie. Podrodiny, označené písmenem (např. CYP1A, CYP2D), sdílejí více než 55 % homologie. Každá izoforma je poté identifikována dalším číslem (např. CYP1A2, CYP2D6). Po označení izoformy může ještě následovat označení alelické varianty, nejběžnější nebo referenční varianta genu je značena – *1. Vyšší čísla (*2; *3 atd.) označují specifické polymorfismy nebo změny v sekvenci DNA, které mohou ovlivnit strukturu enzymu, jeho expresi nebo aktivitu. Některé varianty mohou

vést ke zvýšené, snížené nebo zcela chybějící enzymové aktivitě. Například enzym CYP3A4, který se podílí na metabolismu přibližně 50 % léčiv, patří do třetí rodiny, podrodiny A, a jeho název odráží čtvrtou pojmenovanou izoformu této skupiny (Obr. 4)^{5,6}.



Obr. 4: Grafické znázornění nomenklatury cytochromů P450 (CYP) (modifikováno podle⁵).

3.1.2. Faktory ovlivňující aktivitu CYP

V klinické praxi má variabilita aktivity CYP zásadní dopad na terapeutickou účinnost a bezpečnost léčiv. Pomalejší metabolismus může vést k vyšším koncentracím léčiva v krvi a zvýšenému riziku nežádoucích účinků, zatímco rychlejší metabolismus může snížit jeho farmakologickou účinnost. Mezi hlavní faktory ovlivňující aktivitu CYP řadíme genetický polymorfismus, epigenetické vlivy, věk, pohlaví, zdravotní stav, expozici chemickým látkám nebo stravu a celkově životní styl.

Genetický polymorfismus v genech CYP vede k variabilitě jejich enzymové aktivity mezi jednotlivci. Například genetická varianta CYP2D6*4 genu kódujícího enzym CYP2D6 způsobuje sníženou schopnost metabolizovat léčiva, jako je kodein, což může ovlivnit jejich terapeutickou účinnost a toxicitu. Také epigenetické modifikace, jako je metylace DNA nebo regulace mikroRNA, mohou měnit expresi genů CYP. Personalizovaná medicína, která zohledňuje genetické a epigenetické rozdíly mezi pacienty, již dnes umožňuje optimalizaci dávkování léčiv, jako jsou warfarin, antidepresiva nebo opioidy. Pokroky ve farmakogenomice a epigenetice tak slibují ještě cílenější a bezpečnější farmakoterapii^{5,6}.

S věkem dochází k fyziologickým změnám, které mohou ovlivnit expresi a aktivitu CYP. Například bylo popsáno, že u starších jedinců může dojít ke snížení aktivity některých izoenzymů, jako je CYP3A4, což může vést k pomalejšímu metabolismu některých léčiv a zvýšenému riziku jejich akumulace v organismu²⁹. Také hormonální rozdíly mezi muži

a ženami mohou ovlivnit expresi CYP, jako je například CYP3A4, jehož vyšší aktivita u žen může ovlivnit metabolismus a účinek některých léčiv³⁰.

Dnes je známo, že také střevní mikrobiom může významně ovlivnit biodostupnost, farmakokinetiku i toxicitu léčiv. Disponuje totiž značným metabolickým potenciálem, a to ve srovnatelném rozsahu jako jaterní enzymy hostitele. Kromě toho může mikrobiom nepřímo ovlivňovat expresi a aktivitu biotransformačních enzymů, jako jsou CYP, prostřednictvím svých metabolitů^{31–33}. Specifické stravovací přístupy ovlivňují nejen složení střevního mikrobiomu, ale i hladiny metabolitů vznikající činností mikrobiomu nebo lidských enzymů ze stravy. Mezi tyto látky patří například flavonoidy, antokyany nebo SCFA, jako je butyrát. Tyto molekuly mohou působit jako ligandy aktivující jaderné receptory, které regulují expresi enzymů CYP^{32,34}.

4. Dietní intervence/terapeutické strategie cílené na mikrobiom a metabolismus léčiv

V posledních letech roste zájem o využití dietních intervencí jako podpůrného nástroje ve farmakoterapii, a to především u chronických a komplexních onemocnění, kde standardní farmakoterapie často selhává. Důvodem je skutečnost, že složení střevního mikrobiomu a jeho funkce hrají zásadní roli v udržování homeostázy organismu. U celé řady onemocnění, včetně RS, se proto zvažuje využití nutričních strategií zaměřených na ovlivnění mikrobiomu jako doplnění klasické farmakoterapie. Terapeutické diety jsou primárně zaměřeny na podporu léčby a zlepšení celkového zdravotního stavu pacienta, například zmírnění symptomů, snížení zánětu či podporu regenerace. Nicméně úprava stravy v rámci terapeutických diet může vést ke změnám v energetickém metabolismu i dalších metabolických drahách, včetně těch, které se podílejí na metabolismu léčiv.

Strava bohatá na vlákninu podporuje růst prospěšných bakteriálních rodů, jako jsou *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které produkují SCFA, jako je butyrát, propionát a acetát. Tyto metabolity nejen podporují integritu střevní bariéry a vykazují protizánětlivé účinky, ale současně mohou ovlivňovat expresi jaterních enzymů zapojených do metabolismu léčiv, například CYP^{32,35}. Tímto způsobem mohou SCFA nepřímo modifikovat farmakokinetiku i farmakodynamiku léčiv, a tím ovlivnit jejich účinnost.

Z terapeutického hlediska se v současnosti intenzivně zkoumá již zmíněná KD, která díky svému specifickému složení výrazně mění metabolické prostředí organismu. Uvažuje

se o ní jako o možném podpůrném nástroji léčby, zejména u pacientů, u nichž selhávají standardní přístupy. V takových případech může pomáhat tlumit zánět, stabilizovat energetický metabolismus a zmírňovat neurologické symptomy. Vedle těchto přímých účinků ale může KD vést také k nežádoucím farmakokinetickým interakcím například urychlením metabolismu léčiv, a tím snížením jejich plazmatických hladin. Zároveň může zvýšený příjem tuků zlepšit absorpci lipofilních léčiv, což může být klinicky významné například u statinů, antidepresiv nebo antipsychotik³⁶. Tyto efekty sice nejsou primárním cílem diety, ale je třeba je důsledně zohlednit při kombinaci dietních intervencí s farmakoterapií.

Zavádění dietních intervencí do klinické praxe by tak mělo probíhat obezřetně. Například u KD byly popsány vedlejší účinky včetně zácpy, nevolnosti, zvracení, hypoglykémie a přechodného zvýšení hladin cholesterolu či triglyceridů^{3,37}. Pokud by byla taková dieta rutinně doporučována pacientům s autoimunitními onemocněními, kteří zároveň užívají imunosupresiva nebo antidepresiva, bez předchozího vyhodnocení jejího dopadu na metabolismus léčiv, mohlo by dojít k nežádoucím lékovým interakcím.

Tyto poznatky ukazují, že dietní intervence cílené na ovlivnění mikrobiomu představují nadějný doplněk léčby u chronických onemocnění. Jejich přínos spočívá zejména ve zlepšení zdravotního stavu pacienta, nikoli v přímé modulaci farmakokinetiky. Zároveň však přinášejí nové otázky: například jaké složky mikrobiomu jsou zásadní pro odezvu na léčbu, či nakolik jsou změny zprostředkované mikrobiomem stabilní v čase. Navzdory rychlému rozvoji tohoto výzkumu zůstává klinické využití těchto strategií omezené. Chybí rozsáhlé, dlouhodobé intervenční studie, které by přesně popsaly, jak různé typy dietních zásahů ovlivňují výsledky farmakoterapie. Před jejich zařazením do standardních léčebných protokolů je proto nezbytné důkladně zkoumat, zda a jak mění metabolismus léčiv.

5. Experimentální model roztroušené sklerózy u myší

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE) je široce využívaný zvířecí model pro studium RS. Toto zánětlivé demyelinizační onemocnění CNS je indukováno u laboratorních zvířat, nejčastěji hlodavců, a slouží k pochopení patofyziologie RS a testování nových terapeutických přístupů³⁸.

EAE lze indukovat několika způsoby, přičemž nejběžnějšími metodami jsou aktivní imunizace, kdy jsou zvířata imunizována myelinovými antigeny, jako je myelinový

oligodendrocytární glykoprotein, proteolipidový protein nebo myelinový základní protein. Tato imunizace vede k aktivaci autoreaktivních T-buněk, které napadají CNS a způsobují demyelinizaci. Pasivní transfer spočívá v přenosu aktivovaných autoreaktivních T-buněk, izolovaných z dárcovských zvířat s EAE, do zdravých příjemců. Tento přístup umožňuje studium specifických aspektů imunitní odpovědi bez potřeby imunizace antigenem³⁹.

Model EAE poskytuje cenné informace o mechanismech autoimunitních onemocnění CNS, včetně role T-buněk, prozánětlivých cytokinů a dalších imunitních faktorů. Díky své prediktivní hodnotě je EAE využíván k testování nových terapeutických strategií pro RS, jako jsou imunomodulační látky, biologická léčiva a terapeutické diety⁴⁰.

Experimentální část

6. Materiál

6.1. Chemikálie

Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS/T) – **Biorad (ČR)**

Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) – **Fluka (Švýcarsko)**

Buněčná linie HepG2-LuciaTM AhR; QUANTI-LucTM 4 Reagent; FICZ; CH-223191 – **Invivogen (USA)**

2-propanol; dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4); ethanol; hydroxid draselný (KOH); hydroxid sodný (NaOH); chlorid sodný (NaCl); kyselina fosforečná (H_3PO_4); kyselina octová (CH_3COOH); síran hořečnatý (MgSO_4) – **Lach-Ner (ČR)**

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4); uhličitan sodný (Na_2CO_3); dithioničtan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) – **Lachema (ČR)**

Dusík, oxid uhelnatý (CO) – **Linde Technoplyn (ČR)**

Dichlormethan; methanol – **Merck (ČR)**

SOD Assay Kit-WST – **Probior (Německo)**

Tablety s inhibitory proteas (EDTA free Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets) – **Roche (ČR)**

Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) – **Roth (Německo)**

Primární a sekundární protilátky pro CYP1A2; CYP2A6; CYP2B1/2; CYP2C39; CYP2D6; CYP3A4; Calnexin; chemiluminiscenční kit (Western Blotting Luminol Reagent) – **Santa Cruz Biotechnology (USA)**

Hovězí sérový albumin (BSA) – **Serva (Německo)**

Fenacetin; kumarin; warfarin; bufuralol; diazepam; diklofenak; etoxyresorufin (ETRR); chlorzoxazon; pentoxyresorufin; dimethylsulfoxid (DMSO); dodecylsulfát sodný (SDS); glycerol; isocitrát; isocitrátdehydrogenasa (IDH); kyselina DL-isocitronová (ISO); komerční testovací souprava pro stanovení celkových proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA); kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA); kyselina chloristá (HClO_4);

nikotinaminadeninukleotidfosfát (NADP⁺); sacharosa; butyrát; propionát; laktát – **Sigma Aldrich (ČR)**

chlorid draselný (KCl); chlorid vápenatý (CaCl₂); hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄) – **Sigma Aldrich (USA)**

Standard proteinu pro elektroforézu – **Thermo Fisher Scientific (ČR)**

Acetonitril (ACN) – **VWR International (ČR)**

6.2. Přístrojové vybavení

Analytické váhy 4503 MP 6E – Santorius (Německo)

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

Analytické váhy GR-202 – Schoeller Instruments (ČR)

Automatické pipety – Eppendorf (Německo)

Centrifuga BR4i – Jouan (Francie)

Centrifuga Eppendorf mini spin – Eppendorf (Německo)

Centrifuga Labofuge 400 – Heraeus (Německo)

Echo Liquid Handler – Labcyte (Irsko)

Homogenizátor podle Pottera a Elvehjema (P-E homogenizátor) s teflonovým pístem – VWR International (ČR)

Chemiluminiscenční western blot skener G:Box chemi XX6 – Syngene (USA)

Chlazená centrifuga LISA – AFI Group (Francie)

Chlazená centrifuga Mikro 22R – Hettig Zentrifugen (Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 38R – Hettig Zentrifugen (Německo)

Chlazená centrifuga Z 323 K – Hermle LaborTechnik GmbH (Německo)

LightCycler 1536 Instrument – Roche (Švýcarsko)

Magnetická míchačka s ohřevem IKA RH digital – Merci (ČR)

NanoPhotometr® N60 – Implen (Německo)

pH metr HI 2211 – Hanna instruments (ČR)

pH metr XS Instruments pH 50 – Carpi (Italy)

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

RNeasy Mini Kit– Qiagen (Německo)

Spektrofotometr UV-2401PC – Shimadzu (Japonsko)

Spektrofotometr UV-VIS TECAN Infinite M200 – Schoeller Instruments (ČR)

Spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000 – Varian (Austrálie)

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

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

TaqMan Gene Expression Assays – Thermo Fisher Scientific (ČR)

Termomixér Comfort – Eppendorf (Německo)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém – Biorad (ČR)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit – Roche (Švýcarsko)

Třepací inkubátor BIOSAN ES 20 – Merci (ČR)

Třepací vodní lázeň – Grant Instruments (UK)

Ultracentrifuga Optima XPN-90 – Beckman (USA)

Ultracentrifugační zkumavky – Beckman (USA)

Ultrazvuková čistící jednotka Elmasonic S 10 (H) – Elma-Ultrasonic, (Německo)

Ultrazvuková lázeň UCC4 – Notus-Powersonic (Slovensko)

Vortex V-1plus – Biosan (Lotyšsko)

Zařízení pro přípravu ultračisté vody Watrex Ultrapur – Watrex (ČR)

7. Metody

7.1. Navržení experimentu

Pro sledování vlivu terapeutických diet na jaterní cytochromy P450 (CYP) byl použit myší model experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) vzhledem k jeho klinické a patologické podobnosti s roztroušenou sklerózou (RS). C57BL/6 myši ve věku 8 týdnů byly rozděleny do tří skupin podle typu podávané diety: kontrolní dieta (CTRL, $n = 10$), dieta s vysokým obsahem vlákniny (HFID, $n = 7$) a ketogenní dieta (KETO, $n = 10$). Myši byly krmeny příslušnou dietou *ad libitum* po dobu 14 dní před aktivní indukci EAE. Podrobné složení použitých diet je uvedeno na internetových stránkách firmy Altromin (<https://altromin.com/products/specialdiets/controlldiets>).

U všech myši ve všech skupinách byla EAE vyvolána dvěma subkutánními injekcemi aplikovanými na obě slabiny. Každá injekce obsahovala 50 μg peptidu myelinového oligodendrocytárního glykoproteinu (MOG_{35–55}) (ProSpec-Tany Techno Gene, Ness-Ziona, Izrael), smíchaného s 50 μl kompletního Freundova adjuvans doplněného o 5 mg/mL teplem inaktivovaného *Mycobacterium tuberculosis* kmen H37Ra (Sigma-Aldrich). Po 1–2 h myši

rovněž obdržely dvě intraperitoneální dávky pertusového toxinu (300 ng; List Biological Laboratories, Inc., Campbell, CA, USA) v den imunizace a 24 hodin poté⁴¹. Myši zůstaly na příslušných dietních režimech i během následujících tří týdnů, kdy se rozvíjely příznaky EAE, takže celková doba dietní intervence činila pět týdnů. Grafické znázornění rozdělení do jednotlivých skupin je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Rozdělení myši do experimentálních skupin pro studium vlivu diety na aktivitu a expresi vybraných CYP.

Skupina	Dieta	Označení	Katalogové číslo Altromin	Počet myši ve skupině
1.	Kontrolní	CTRL	C1000	10
2.	S vysokým obsahem vlákniny	HFiD	C1014	7
3	Ketogenní	KETO	C1084	10

Experimenty na zvířatech byly prováděny na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. v souladu s etickými standardy stanovenými legislativou EU pro používání pokusných zvířat (2010/63/EU) a zákonem České republiky na ochranu zvířat proti týrání. Protokol byl schválen komisí pro etiku práce se zvířaty Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. (schvalovací čísla: 29/2020 a 1/2021). Studie byla realizována v souladu s platnou legislativou a institucionálními požadavky.

V rámci společného projektu (GAČR, 23-05645S) kolegové z Mikrobiologického ústavu AV ČR sledovali vliv terapeutických diet na klinické skóre EAE a na mukózní a systémovou imunitní odpověď experimentálních zvířat. Tato data však nejsou předmětem předkládané diplomové práce.

7.2. Příprava jaterní mikrosomální frakce

CYP se v buňce nacházejí převážně v mikrosomální frakci, kde dosahují nejvyšší koncentrace. Proto je tato frakce běžně využívána pro jejich studium. Mikrosomy představují membránové váčky vzniklé z endoplazmatického retikula po mechanickém rozrušení buněk

a následné diferenciální centrifugaci jaterní tkáně⁴². Mikrosomální frakce byla připravena na ledu a v chladicím boxu, přičemž všechny nástroje byly předem vychlazeny. Játra byla zvážena, vložena do kádinky a zalita homogenizačním pufrem (HP). Pomocí nůžek byla játra nastříhána a dvakrát promyta HP, který byl slit přes gázu. Promytá játra byla přelita do menších centrifugačních zkumavek, byl přidán HP v množství odpovídajícím trojnásobku váhy jater, a směs byla homogenizována ponorným homogenizátorem. Zhomogenizovaná tkáň byla přelita do větší zkumavky a centrifugována 10 minut při $5290 \times g$ a 4°C , následně byl supernatant slit do nové zkumavky a znovu centrifugován 25 minut při $15151 \times g$ a 4°C . Získaný supernatant byl přelit do ultracentrifugační (UC) zkumavky, doplněn HP a uzavřen tak, aby se uvnitř nevytvořila vzduchová bublina. Centrifugace probíhala po dobu 60 minut při $125000 \times g$ a 4°C , čímž vznikla mikrosomální frakce jako sediment. Supernatant byl slit a sediment přemístěn do promývacího pufru (PP), zhomogenizován s použitím Potter-Elvehjemova (P-E) homogenizátoru, přelit do čisté UC zkumavky, doplněn PP a centrifugován 60 minut při $125000 \times g$, a 4°C . Po odlití supernatantu byl sediment (přečištěná mikrosomální frakce) zhomogenizován opět pomocí P-E homogenizátoru s rehomogenizačním pufrem v množství 0,2 násobku váhy jater. Mikrosomy byly rozpipetovány do 1,5 ml zkumavek a uloženy při -80°C .

Použité pufr:

Homogenizační pufr: $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosa; $1,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; pH 7,4; těsně před použitím přidavek $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF rozpuštěného v isopropanolu.

Promývací pufr: $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS; $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl; pH 7,4; těsně před použitím přidavek $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF rozpuštěného v isopropanolu.

Rehomogenizační pufr: $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; 20% glycerol; pH 7,4.

7.3. Stanovení koncentrace CYP v jaterní mikrosomální frakci

Koncentrace CYP v jaterní mikrosomální frakci byla stanovena spektrofotometricky za využití diferenční spektroskopie podle protokolu⁴³.

Pro stanovení koncentrace CYP bylo třeba naředit mikrosomální frakci 20× fosfátovým pufrem ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; pH 7,4) a zredukovat směs přidáním 2 – 5 mg dithionitnanu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Takto připravená směs byla promíchána na vortexu a rozdělena do dvou spektrofotometrických kyvet. Poté, co byla změřena základní linie v rozmezí 500 až 400 nm, byla jedna kyveta probublána oxidem uhelnatým (CO) po dobu 60 sekund a měření bylo zopakováno.

7.4. Stanovení koncentrace proteinů v jaterní mikrosomální frakci

Ke stanovení koncentrace proteinů byla využita metoda s kyselinou bicinchoninovou (BCA). K měření byl použit komerční kit (Pierce Rockford, USA), kdy byl roztok A a B neředěn 50:1 (roztok A = BCA a vinan sodný v alkalickém roztoku uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného; roztok B = 4% roztok pentahydrátu síranu měďnatého), jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). V přítomnosti proteinu došlo k redukci Cu^{2+} kationtu obsaženého v pentahydrátu síranu měďnatého na Cu^{1+} kation, který následně reagoval s BCA za vzniku fialového komplexu, který absorbuje při 562 nm.

Vzorky jaterní mikrosomální frakce byly naředěny fosfátovým pufrem, ke každému vzorku byla přidána směs roztoku A a B a vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 25 min. Následně byla změřena absorbance při 562 nm a ke stanovení koncentrace proteinů byla využita kalibrační křivka.

U každého vzorku byl vypočítán specifický obsah, který vyjadřuje poměr koncentrace CYP a koncentrace proteinů. Určení specifického obsahu CYP v jednotlivých experimentálních skupinách myší je znázorněno graficky na Obr. 6 v sekci 8. Výsledky.

7.5. Stanovení enzymových aktivit vybraných CYP

Enzymové aktivity jednotlivých CYP byly měřeny v jaterní mikrosomální frakci myší, za použití specifických substrátů. Koncentrace vzniklých produktů byla stanovena pomocí HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí. Aktivita jednotlivých forem CYP byla stanovena podle zavedených protokolů⁴⁴.

V následujících tabulkách (Tab. 2–10) jsou uvedeny studované formy CYP, jejich specifické substráty, vznikající metabolity, schéma přípravy reakční směsi, složení mobilní fáze a podmínky stanovení jejich aktivity pomocí HPLC.

Tab. 2: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP1A v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu etoxyresorufinu.

CYP1A	
Substrát	Etoxyresorufin (ETRR)
Metabolit	Resorufin
Reakce	<i>O</i> -deetylace 7-etoxyresorufinu
Koncentrace CYP	35 pmol
Koncentrace substrátu	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém	8,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 83,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteinu}$)
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	100 μl
Inkubace	15 min; 37°C; 350 rpm
Zastavení reakce	200 μl vychlazeného 100% MeOH
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při $23\,228 \times g$ a 4°C.	
Mobilní fáze	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 ; pH = 7 : 100% MeOH (58:42)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku	50 μl
Teplota kolony	25°C
Čas měření	10 min
Detekce	Fluorescenční, excitace při 535 nm, emise při 585 nm

Tab. 3: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP1A v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu fenacetinu.

CYP1A	
Substrát	Fenacetin
Metabolit	Paracetamol
Reakce	<i>O</i> -deetylace
Koncentrace CYP	75 pmol
Koncentrace substrátu	1,67 mmol·l ⁻¹
NADPH generující systém	8,3 mmol·l ⁻¹ NADP; 83,1 mmol·l ⁻¹ ISO; 100 mmol·l ⁻¹ MgSO ₄ ; IDH (10 units·mg ⁻¹ proteinu)
Pufr	100 mmol·l ⁻¹ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	200 µl
Po smíchání mikrosomální frakce a substrátu preinkubace – 5 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání NADPH generujícího systému a inkubace – 20 min; 37°C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	10 µl vychlazené 70% HClO ₄
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 × g a 4°C.	
Mobilní fáze	MFA: MeOH; pH 2,9 (H ₃ PO ₄) : H ₂ O (20:80) MFB: 100% MeOH
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 µm)
Eluce	Gradientová
Průtok mobilní fáze	1 ml·min ⁻¹
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	40°C
Čas měření	22 min
Detekce	PDA, maximum při 258 nm

Tab. 4: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2A v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu kumarinu.

CYP2A	
Substrát	Kumarin
Metabolit	7-hydroxykumarin
Reakce	7-hydroxylace
Koncentrace CYP	35 pmol
Koncentrace substrátu	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém	8,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 83,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	100 μl
Inkubace	30 min; 37°C; 350 rpm
Zastavení reakce	200 μl vychlazeného 100% MeOH
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 $\times$ g a 4°C.	
Mobilní fáze	0,5% CH ₃ COOH : 100% ACN (60:40)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku	10 μl
Teplota kolony	40°C
Čas měření	7 min
Detekce	Fluorescenční, excitace při 338 nm, emise při 458 nm

Tab. 5: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2B v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu pentoxyresorufinu.

CYP2B	
Substrát	Pentoxyresorufin
Metabolit	Resorufin
Reakce	<i>O</i> -dealkylace
Koncentrace CYP	35 pmol
Koncentrace substrátu	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém	8,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 83,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/ PO_4 ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	100 μl
Inkubace	15 min; 37°C; 350 rpm
Zastavení reakce	200 μl vychlazeného 100% MeOH
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při $23\,228 \times g$ a 4°C.	
Mobilní fáze	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 ; pH = 7 : 100% MeOH (58:42)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku	50 μl
Teplota kolony	25°C
Čas měření	10 min
Detekce	Fluorescenční, excitace při 535 nm, emise při 585 nm

Tab. 6: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2C v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu diklofenaku.

CYP2C	
Substrát	Diklofenak
Metabolit	4'-hydroxydiklofenak
Reakce	4-hydroxylace
Koncentrace CYP	35 pmol
Koncentrace substrátu	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém	5,0 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 50,0 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	200 μl
Po smíchání mikrosomální frakce a NADPH generujícího systému preinkubace – 5 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání substrátu a inkubace – 25 min; 37°C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	50 μl vychlazeného ACN : CH ₃ COOH (94:6)
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 × g a 4°C.	
Mobilní fáze	MFA: 100% ACN : 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HClO ₄ (30:70) MFB: 100% MeOH
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)
Eluce	Gradientová
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku	50 μl
Teplota kolony	40°C
Čas měření	30 min
Detekce	UV (250 – 300 nm)

Tab. 7: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2C v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu warfarinu.

CYP2C	
Substrát	Warfarin
Metabolit	7-hydroxywarfarin
Reakce	7-hydroxylace
Koncentrace CYP	250 pmol
Koncentrace substrátu	2 mmol·l ⁻¹
NADPH generující systém	10,3 mmol·l ⁻¹ NADP; 93,7 mmol·l ⁻¹ ISO; 50 mmol·l ⁻¹ MgSO ₄ ; IDH (9 units·mg ⁻¹ proteinu)
Pufr	100 mmol·l ⁻¹ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	220 µl
Po smíchání mikrosomální frakce a NADPH generujícího systému preinkubace – 30 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání substrátu a inkubace – 20 min; 37 °C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	5 µl vychlazené 70% HClO ₄
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 × g a 4°C.	
Mobilní fáze	15 mmol·l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ : 100% MeOH : 100% ACN (52:32:16)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 µm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	1 ml·min ⁻¹
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	40°C
Čas měření	38 min
Detekce	PDA, detekce při 306 nm; fluorescenční, excitace při 320 nm, emise při 415 nm

Tab. 8: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2D v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu bufuralolu.

CYP2D	
Substrát	Bufuralol
Metabolit	1'-hydroxybufuralol
Reakce	1'-hydroxylace
Koncentrace CYP	63,7 pmol
Koncentrace substrátu	1 mmol·l ⁻¹
NADPH generující systém	5,0 mmol·l ⁻¹ NADP; 50,5 mmol·l ⁻¹ ISO; 50 mmol·l ⁻¹ MgSO ₄ ; IDH (10 units·mg ⁻¹ proteinu)
Pufr	100 mmol·l ⁻¹ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	200 µl
Po smíchání mikrosomální frakce a substrátu preinkubace – 5 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání NADPH generujícího systému a inkubace – 20 min; 37 °C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	20 µl vychlazené 70% HClO ₄
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 × g a 4°C.	
Mobilní fáze	MFA = 100% ACN : 2 mmol·l ⁻¹ HClO ₄ (30:70) MFB = 100% ACN
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 µm)
Eluce	Gradientová
Průtok mobilní fáze	1,5 ml·min ⁻¹
Nástřik vzorku	5 µl
Teplota kolony	45°C
Čas měření	15 min
Detekce	Fluorescenční, excitace při 252 nm, emise při 302 nm

Tab. 9: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP2E v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu chlorzoxazonu.

CYP2E	
Substrát	Chlorzoxazon
Metabolit	6-hydroxychlorzoxazon
Reakce	6-hydroxylace
Koncentrace CYP	160 pmol
Koncentrace substrátu	2,5 mmol·l ⁻¹
NADPH generující systém	5,0 mmol·l ⁻¹ NADP; 47,4 mmol·l ⁻¹ ISO; 50 mmol·l ⁻¹ MgSO ₄ ; IDH (10 units·mg ⁻¹ proteinu)
Pufr	100 mmol·l ⁻¹ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	1000 µl
Po smíchání mikrosomální frakce a NADPH generujícího systému preinkubace – 30 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání substrátu a inkubace – 20 min; 37 °C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	50 µl 42,5% H ₃ PO ₄
Vzorky byly extrahovány do 2 ml směsi isopropanolu a chloroformu v poměru 18:85. Po přidání extrakční směsi byly vzorky homogenizovány vířivou extrakcí po dobu 20 sekund na vortexu. Následně byly centrifugovány při 717 × g po dobu 10 minut za účelem oddělení fází. Získaná spodní organická fáze byla pečlivě odpipetována, vysušena proudem dusíku a suchý zbytek byl rozpuštěn v 200 µl mobilní fáze. Z rozpuštěného extraktu bylo následně odpipetováno 150 µl do vialek pro další analytické zpracování.	
Mobilní fáze	0,5% CH ₃ COOH : ACN (3:1)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 µm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	1 ml·min ⁻¹
Nástřik vzorku	50 µl
Teplota kolony	40°C
Čas měření	22 min
Detekce	UV při 287 nm

Tab. 10: Schéma reakčních podmínek pro stanovení aktivity enzymu CYP3A v jaterní mikrosomální frakci pomocí substrátu diazepam.

CYP3A	
Substrát	Diazepam
Metabolit	Temazepam
Reakce	<i>N</i> -demethylace
Koncentrace CYP	70 pmol
Koncentrace substrátu	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
NADPH generující systém	5,0 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP; 50,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ISO; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (9 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K/PO ₄ ; pH = 7,4
Celkový objem reakční směsi	200 μl
Po smíchání mikrosomální frakce a NADPH generujícího systému preinkubace – 5 min; 37°C; 350 rpm, následně přidání substrátu a inkubace – 20 min; 37 °C; 350 rpm.	
Zastavení reakce	100 μl vychlazeného 100% ACN
Po zastavení reakce se vzorky centrifugují 10 minut při 23 228 $\times$ g a 4°C.	
Mobilní fáze	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 ; pH = 2,4 : 100% ACN (55:45)
Stacionární fáze	C18
Kolona	LiChrospher® RP-18, 250-4 (5 μm)
Eluce	Isokratická
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Nástřik vzorku	50 μl
Teplota kolony	30°C
Čas měření	14 min
Detekce	PDA (200 – 250 nm), maximum při 229 nm

7.6. Stanovení exprese proteinu vybraných CYP

Pro detekci a částečnou kvantifikaci proteinů vybraných CYP v mikrosomální frakci byla použita metoda Western blot. Proteiny byly nejdříve separovány pomocí elektroforézy. Vzorky byly zpracovány tak, aby v každé jamce bylo 20 μg proteinu, s celkovým objemem 60 μl . Ke vzorkům bylo přidáno vizualizační barvivo a směs byla inkubována při 95°C po dobu

5 minut pro denaturaci. Vzorky byly následně nanесeny na 12% polyakrylamidový gel obsahující dodecylsulfát sodný (SDS-PAGE) a elektroforéza probíhala při konstantním proudu 30 mA po dobu 10 minut, následně 40 mA po dobu 65 minut. Po separaci byly proteiny z gelu přeneseny na PVDF membránu pomocí semi-dry blotting systému (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém) při 25 V po dobu 30 minut. Po přenosu byla membrána propláchnuta v TBS/T pufru a pro blokování nespecifických vazeb byla umístěna do roztoku 5% mléka v TBS/T na 1 hodinu. Po blokování byla membrána opět promyta v TBS/T a inkubována s primární protilátkou pro ortologní lidské formy CYP: CYP1A2; CYP2A6; CYP2B1/2; CYP2C39; CYP2D6 a CYP3A4 přes noc při 4°C. Po promytí membrány byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou a inkubována při pokojové teplotě. Detekce proteinu byla provedena pomocí chemiluminiscenčního reagentu (Santa Cruz, CA, USA) a signály byly snímány pomocí přístroje G:BOX Chemi XX6. Intenzita proteinových bandů byla kvantifikována v programu ImageJ.

7.7. Stanovení exprese mRNA kódujících vybrané CYP

Pro stanovení množství exprimované mRNA kódující příslušné formy CYP byla nejdříve izolována celková RNA z jaterní tkáně pomocí RNeasy Mini Kitu. Postup izolace byl proveden podle protokolu od výrobce. Po izolaci byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota izolované RNA.

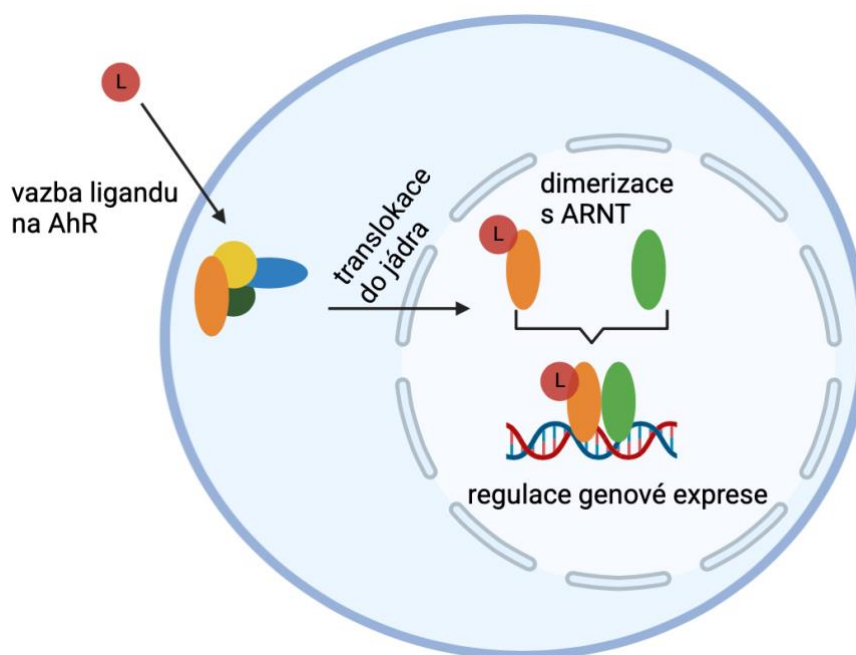
Pro syntézu prvního vlákna cDNA z celkové RNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Kvantifikace exprese genů kódujících enzymy CYP byla následně provedena metodou real-time PCR s využitím přístroje LightCycler 1536 Instrument s využitím specifické eseje TaqMan Gene Expression Assays. Vzorky byly napipetovány do 1536-jamkové destičky pomocí automatického přístroje Echo Liquid Handler. Vyhodnocení výsledků bylo založeno na metodice – Delta-Delta Ct⁴⁵, přičemž data byla vyjádřena jako relativní změna exprese v experimentálních skupinách ve srovnání s kontrolní CTRL skupinou. Jako referenční (vnitřní) kontroly exprese byly zvoleny geny HPRT1 a 18S.

7.8. Studium vlivu SCFA na regulaci genové exprese

Pro hodnocení vlivu mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) (butyrátu, propionátu a laktátu) na regulaci exprese genů zapojených do metabolismu léčiv byla využita lidská

buněčná linie hepatocelulárního karcinomu HepG2, která je běžně používána ve studiích jaterního metabolismu, toxicity a genové exprese.

Varianta HepG2-Lucia™ AhR je geneticky modifikována tak, aby exprimovala luciferázový reportér pod kontrolou aryluhlovodíkového receptoru (AhR), což umožňuje monitorování aktivity tohoto receptoru v reálném čase⁴⁶. AhR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v regulaci odpovědi na xenobiotika a endogenní ligandy. V neaktivním stavu se AhR nachází v cytoplazmě v komplexu s chaperonovými proteiny. Po navázání ligandu dochází k disociaci tohoto komplexu, translokaci AhR do jádra a dimerizaci s aryluhlovodíkovým receptorovým jaderným translokátorem (ARNT). Tento komplex následně váže specifické sekvence DNA, známé jako xenobiotické responzivní elementy (XRE), a reguluje expresi cílových genů, včetně těch zapojených do metabolismu léčiv, jako je CYP1A (Obr. 5)^{47,48}.



Obr. 5: Schéma znázorňující regulaci genové exprese pomocí aryluhlovodíkového receptoru (AhR) (modifikováno podle)⁴⁷.

Buňky byly kultivovány v souladu s doporučeným protokolem výrobce⁴⁶ a následně inkubovány po dobu 24 hodin za přítomnosti testovaných látek. Butyrát byl aplikován v koncentracích 1 mM, 3 mM a 5 mM, zatímco laktát a propionát byly testovány v koncentracích 1 mM, 5 mM a 10 mM. Jako pozitivní kontrola byl použit známý agonista AhR receptoru 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ), negativní kontrolu představoval selektivní

inhibitor AhR receptoru CH-223191 (2-methyl-N-[4-(2-methylfenyl)fenylazo]-3-oxo-2,3-dihydropyrazol-4-karboxamid). Po inkubaci bylo 20 μ l média smícháno s 50 μ l reakčního roztoku QUANTI-LucTM 4 Reagent v bílé 96jamkové desce a byla změřena luminiscence. Pro vyhodnocení experimentu byly naměřené hodnoty luminiscence vztaženy ke kontrolní skupině buněk kultivovaných pouze v růstovém médiu bez přidání testovaných látek. Výsledky tak vyjadřují relativní změnu transkripční aktivity AhR receptoru po inkubaci s testovanými látkami. Naměřená luminiscence přímo odráží úroveň exprese luciferázového reportérového genu, který je pod kontrolou AhR-dependentního promotoru, a tedy představuje kvantitativní ukazatel transkripční aktivity AhR v buňkách HepG2-LuciaTM AhR.

7.9. Statistická analýza

Pro statistické zhodnocení byl použit jednofaktorový rozptylový test (one-way ANOVA) následovaný vícenásobnými porovnáními pomocí Dunnettova, Šidákova nebo Tukeyho *post-hoc* testu. Analýza byla provedena v softwaru GraphPad Prism, verze 10.4.2 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA). Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hodnotě $p < 0,05$. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SD.

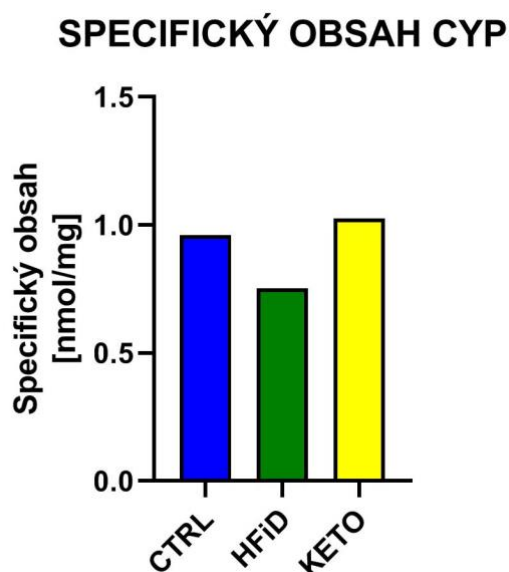
Vzhledem k nízké hmotnosti myších jater bylo nutné vzorky jednotlivých zvířat spojit v rámci skupin, a proto nebylo možné provést statistickou analýzu enzymových aktivit a exprese proteinu.

8. Výsledky

8.1. Charakterizace mikrosomální frakce

Jako první byla provedena charakterizace jaterní mikrosomální frakce u všech skupin myší prostřednictvím stanovení specifického obsahu CYP, jenž je definován jako poměr koncentrace CYP k celkové koncentraci proteinů v mikrosomální frakci.

Na základě získaných dat (Obr. 6), lze pozorovat, že u skupiny HFiD došlo ke snížení specifického obsahu ve srovnání s CTRL skupinou. Naopak u skupiny KETO byl zaznamenán mírný nárůst specifického obsahu oproti CTRL skupině. Tyto rozdíly naznačují, že dietní režimy mohou ovlivnit hladiny enzymů v mikrosomální frakci, a zdůvodňují další analýzu aktivity a exprese jednotlivých forem CYP.



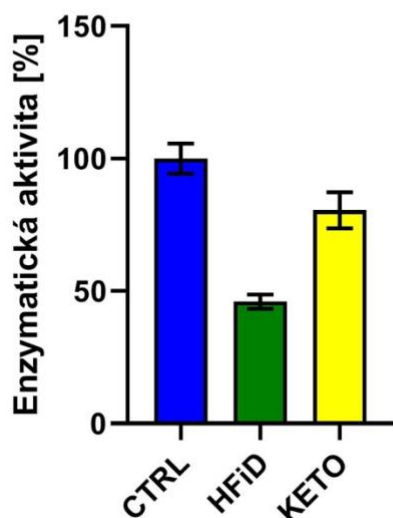
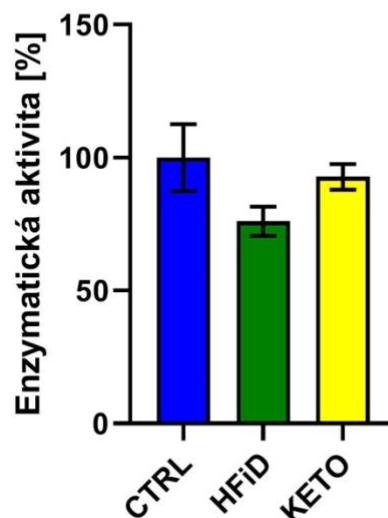
Obr. 6: Grafické vyjádření hodnot specifického obsahu CYP v jaterní mikrosomální frakci napříč jednotlivými skupinami myší. CTRL – skupina myší krmena kontrolní dietou; HFID – skupina myší krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myší krmena ketogenní dietou.

8.2. Stanovení enzymových aktivit CYP

Aktivita vybraných CYP byla stanovena v mikrosomálních frakcích připravených z jaterního homogenátu experimentálních zvířat. Naměřené hodnoty byly zpracovány do přehledných grafů uvedených na Obr. 7–13. Veškeré výsledky jsou vyjádřeny relativně vůči příslušné kontrolní skupině (CTRL), jejíž aktivita je stanovena jako 100 %. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jak dietní režimy ovlivňují enzymatickou aktivitu vybraných forem CYP u experimentálních zvířat.

8.2.1. Stanovení aktivity CYP1A

Ke stanovení aktivity CYP1A byly využity dva substráty, a to etoxyresorufin (ETRR) a fenacetin. Při stanovení aktivity pomocí substrátu ETRR vykazovala HFID skupina snížení aktivity CYP1A oproti CTRL skupině o 50 %. U KETO skupiny došlo k nepatrnému snížení aktivity CYP1A v porovnání s CTRL skupinou (Obr. 7A). Stejný trend změn byl pozorován i u stanovení aktivity pomocí fenacetinu, ale změny nebyly významné (Obr. 7B).

A CYP1A - substrát ETRR**B CYP1A - substrát fenacetin**

Obr. 7: Enzymatická aktivity CYP1A u skupin CTRL, HFID a KETO stanovená pomocí substrátu ETRR (A) a fenacetinu (B). Aktivita CYP1A stanovená pomocí substrátu ETRR byla měřena dvakrát a pomocí substrátu fenacetinu třikrát. Vzorky byly měřeny v triplikátech.

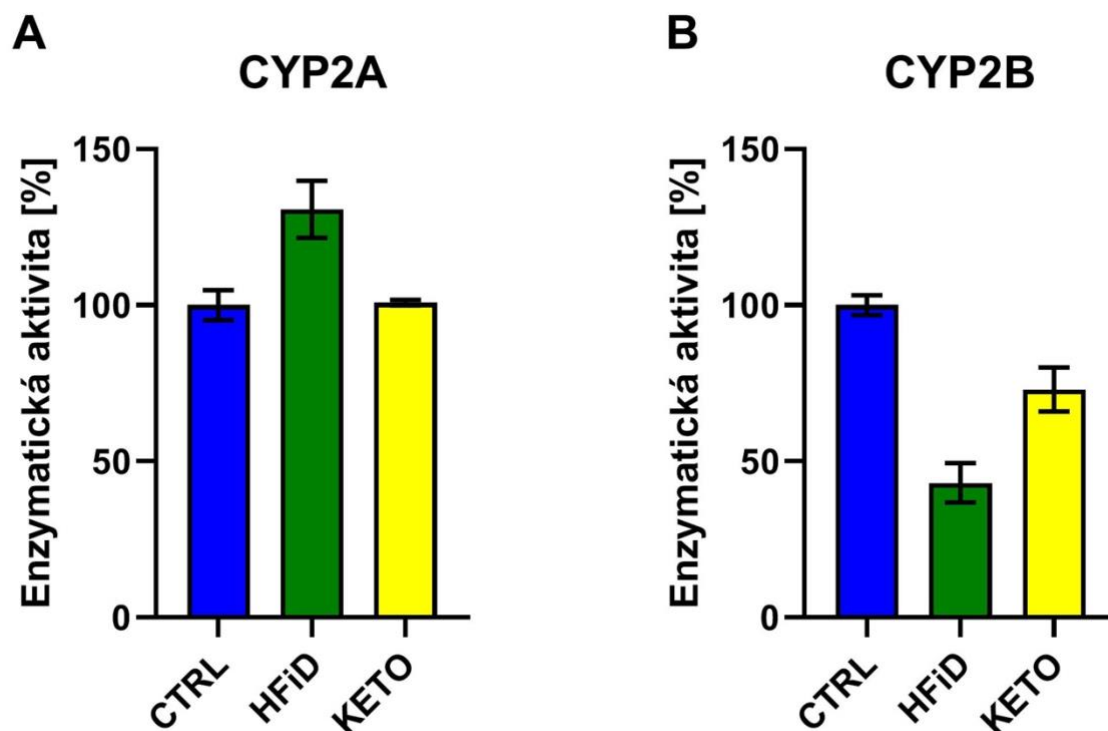
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD z triplikátů v jednotlivých měřeních.

CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou; HFID – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou.

8.2.2. Stanovení aktivity CYP2A a CYP2B

U HFID skupiny došlo ke zvýšení aktivity CYP2A o 30 % oproti CTRL skupině, zatímco u KETO skupiny se aktivita CYP2A nezměnila (Obr. 8A).

Aktivita CYP2B byla ve skupině HFID významně snížena o 50 % ve srovnání s CTRL skupinou, stejně tak u KETO skupiny byl pozorován pokles aktivity CYP2B oproti CTRL skupině přibližně o 25 % (Obr. 8B).

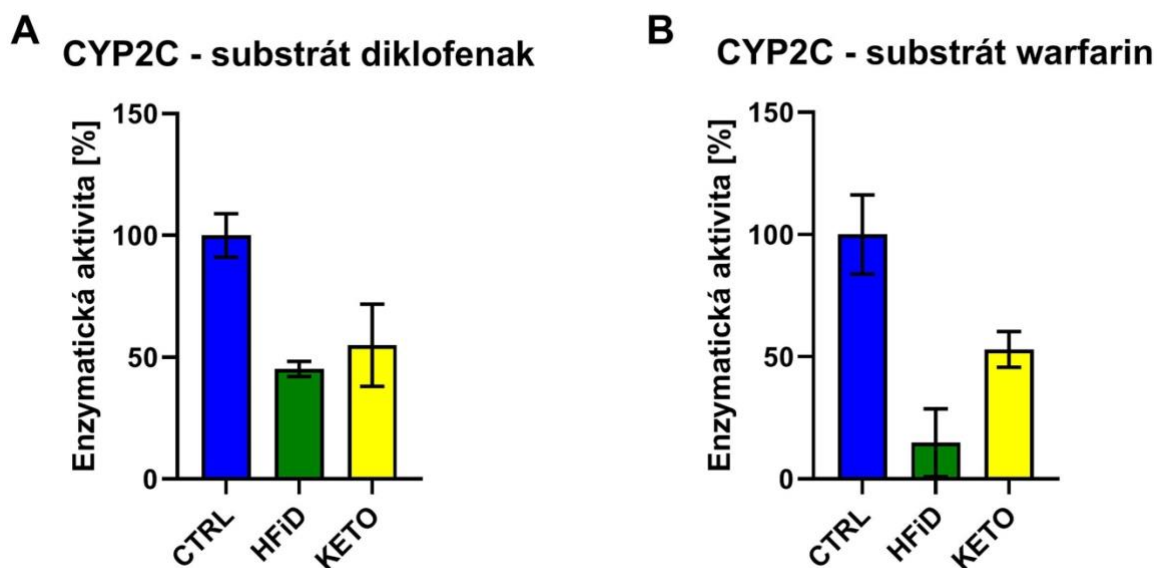


Obr. 8: Enzymatická aktivita CYP2A (A) a CYP2B (B) u skupin CTRL, HFid a KETO. Aktivita CYP2A a CYP2B byly stanoveny ve dvou nezávislých opakováních. Vzorky byly měřeny v triplicátech. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD z triplicátů v jednotlivých měřeních. CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou; HFid – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou.

8.2.3. Stanovení aktivity CYP2C

Aktivita CYP2C byla stanovena pomocí dvou substrátů – diklofenaku a warfarinu. Skupina HFid vykazovala výrazné snížení aktivity CYP2C o 50 % ve srovnání s CTRL skupinou při využití substrátu diklofenaku (Obr. 9A) a ještě výraznější snížení aktivity o 85 % oproti CTRL skupině při využití substrátu warfarinu (Obr. 9B).

U skupiny KETO došlo ke snížení aktivity CYP2C o 50 % proti CTRL skupině, jak při stanovení aktivity využívají substrát diklofenak (Obr. 9A), tak u stanovení aktivity využívající substrát warfarin (Obr. 9B).



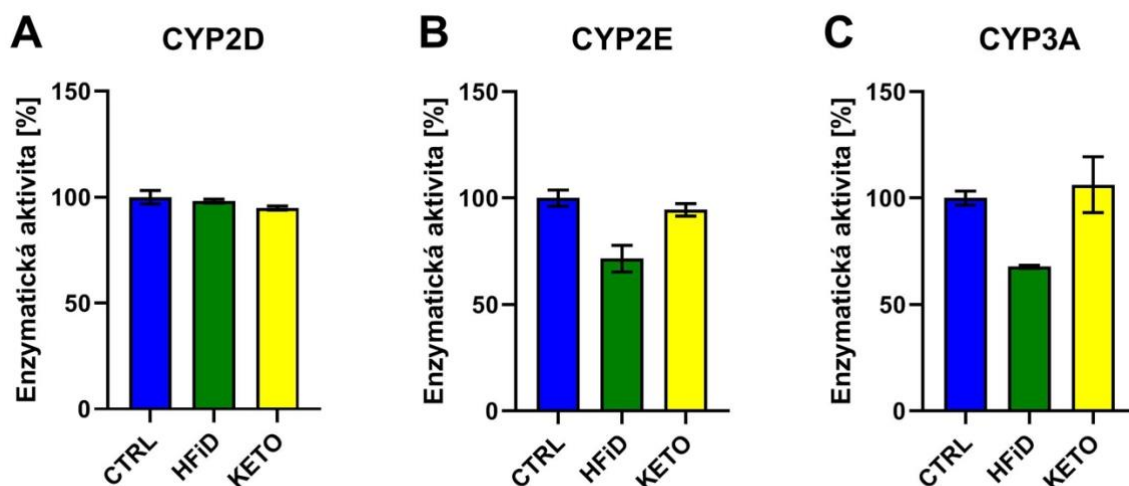
Obr. 9: Enzymatická aktivity CYP2C u skupin CTRL, HFiD a KETO stanovená pomocí substrátu diklofenaku (A) a warfarinu (B). U obou substrátů byla aktivity stanovena ve dvou nezávislých opakov. Vzorky byly měřeny v triplikátech. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD z triplikátů v jednotlivých měřeních. CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou; HFiD – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou.

8.2.4. Stanovení aktivity CYP2D, CYP2E a CYP3A

V případě aktivity CYP2D nebyla pozorována změna aktivity oproti CTRL skupině u HFiD skupiny, ani u KETO skupiny (Obr. 10A).

U enzymu CYP2E došlo v HFiD skupině k mírnému snížení aktivity přibližně o 25 % v porovnání s CTRL skupinou. KETO skupina nevykazovala změny v aktivitě CYP2E oproti CTRL skupině (Obr. 10B).

U klíčového enzymu CYP3A bylo ve skupině HFiD pozorováno snížení enzymové aktivity proti CTRL skupině o 30 %. Zatímco enzymová aktivita u KETO skupiny nevykazovala významné změny oproti CTRL skupině (Obr. 10C).



Obr. 10: Enzymatická aktivita CYP2D (A), CYP2E (B) a CYP3A (C) u skupin CTRL, HFID a KETO. Aktivita CYP2D a CYP2E byly stanoveny ve dvou nezávislých opakováních, aktivita CYP3A byla stanovena v jednom měření. Vzorke byly měřeny v triplicátech. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD z triplicátů v jednotlivých měřeních. CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou; HFID – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou.

Pozorované rozdíly potvrzují, že složení stravy může ovlivnit aktivitu jaterních CYP, proto je nutné při nasazování terapeutických diet (například v souvislosti s RS) pečlivě zvažovat možné dopady na farmakoterapii. Následující odstavce se zaměří na to, jak zvolené dietní režimy ovlivňují expresi těchto enzymů na úrovni mRNA a proteinu a jakými molekulárními mechanismy je tato regulace řízena.

8.3. Stanovení exprese proteinu u vybraných CYP

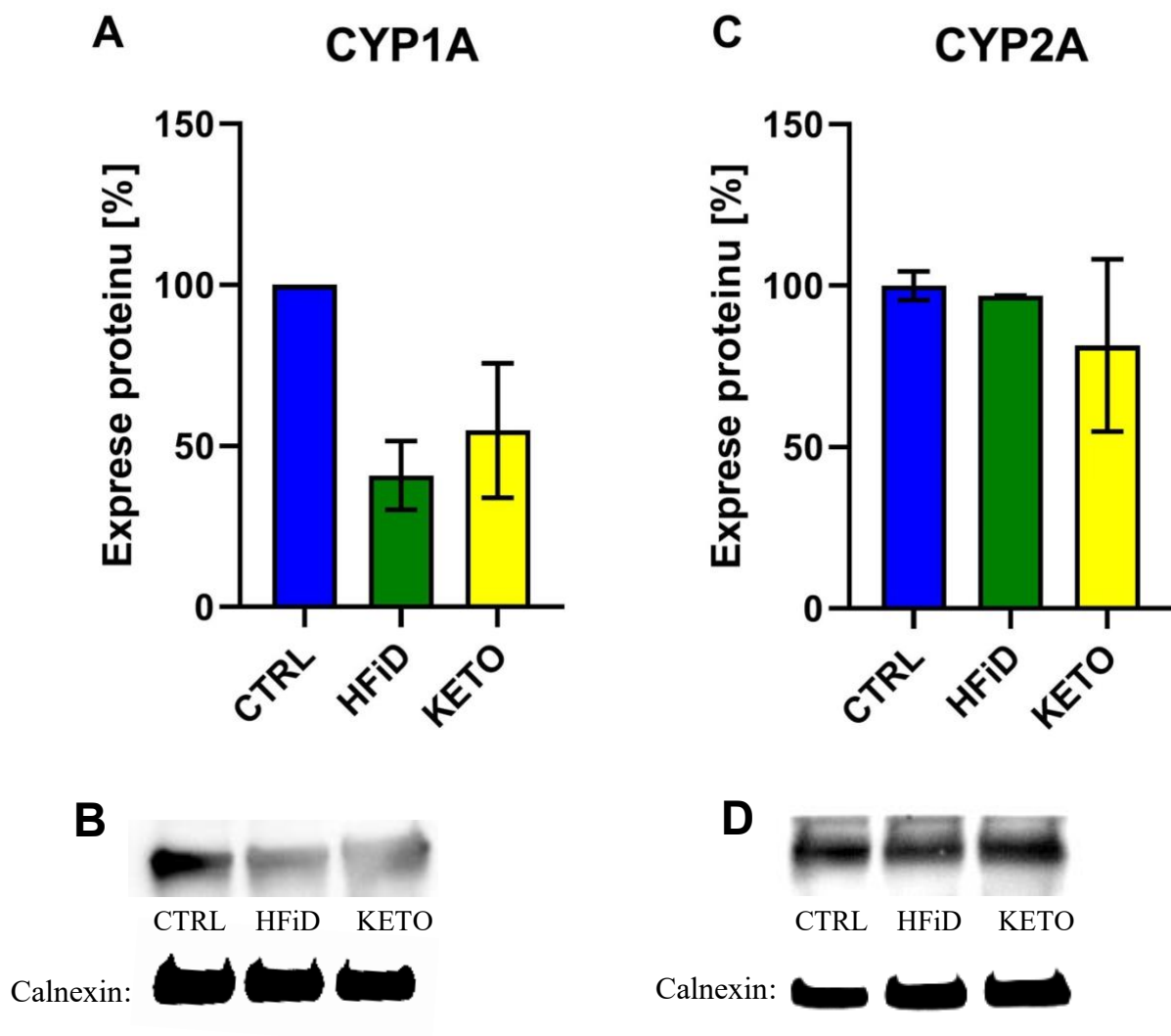
Vzhledem k pozorovaným změnám v enzymové aktivitě byly provedeny i analýzy proteinové exprese jednotlivých forem CYP metodou Western blotting, a to pro ověření, zda tyto změny souvisejí s expresí enzymů. Kvantifikace byla provedena na základě intenzity signálu odpovídajícího jednotlivým formám CYP proteinů a výsledky byly vyjádřeny relativně vůči kontrolní skupině (CTRL). Jako kontrolní protein byl zvolen calnexin, jehož exprese zůstává stabilní napříč experimentálními podmínkami v mikrosomální frakci.

V horní části grafů je znázorněno vždy relativní množství jednotlivých CYP proteinů ve skupinách HFiD a KETO vůči CTRL na základě kvantifikace intenzity signálu (Obr. 11 – 13A, C). Pod grafy jsou přiloženy reprezentativní záznamy Western blot analýzy zachycující detekci příslušných proteinů (Obr. 11 – 13B, D).

8.3.1. Exprese proteinu CYP1A a CYP2A

U skupiny HFiD byla exprese proteinu CYP1A snížena ve srovnání s CTRL skupinou (Obr. 11A), což je v souladu s poklesem aktivity pozorovaným u této formy CYP (Obr. 7). Stejně tak u KETO skupiny byl pozorován pokles exprese proteinu CYP1A (Obr. 11A).

V případě exprese proteinu CYP2A nedošlo u HFiD ani KETO skupiny k výrazným změnám ve srovnání s CTRL skupinou (Obr. 11C).



Obr. 11: Expres proteinu CYP1A (A, B) a CYP2A (C, D) u skupin CTRL, HFiD a KETO.

Expres proteinu CYP1A a CYP2B byla stanovena ve dvou měřeních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze dvou hodnot $\pm$ SD. CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou;

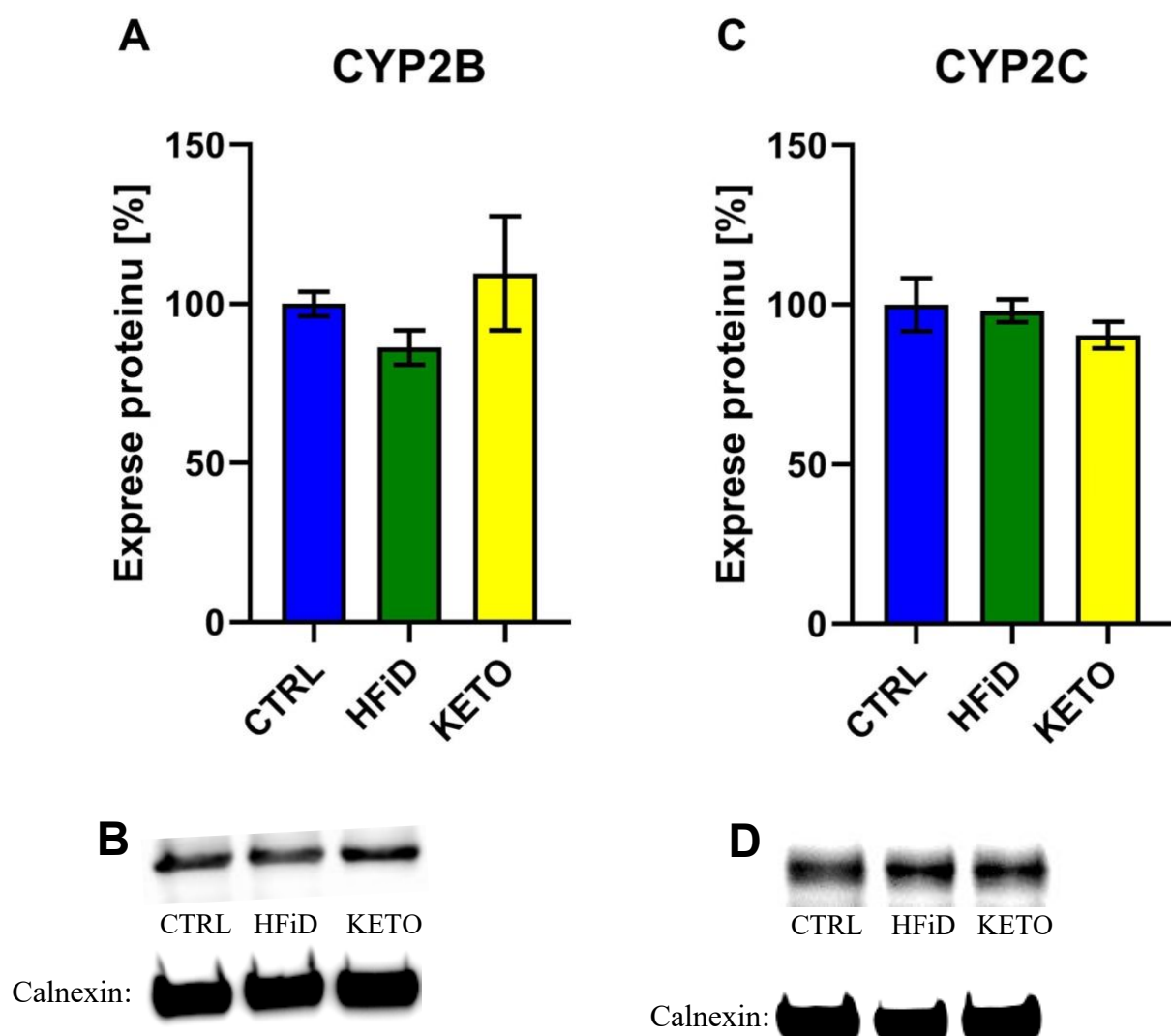
HFiD – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou; calnexin – kontrolní protein.

8.3.2. Expres proteinu CYP2B a CYP2C

Expres proteinu CYP2B byla u HFiD skupiny mírně snížena oproti CTRL skupině (Obr. 12A), což odpovídá poklesu aktivity CYP2B u této skupiny (Obr. 8B).

Stanovení exprese proteinu CYP2C nevykazuje žádné výrazné změny u HFiD ani KETO skupiny vůči CTRL skupině (Obr. 12C). U obou experimentálních skupin však byla

zaznamenána snížená enzymatická aktivita (Obr. 9), což naznačuje regulace CYP2C neprobíhá na úrovni proteinové exprese, ale je výsledkem jiných mechanismů jako jsou posttranslační úpravy, změna dostupnosti kofaktorů, alosterická inhibice nebo omezený transport.

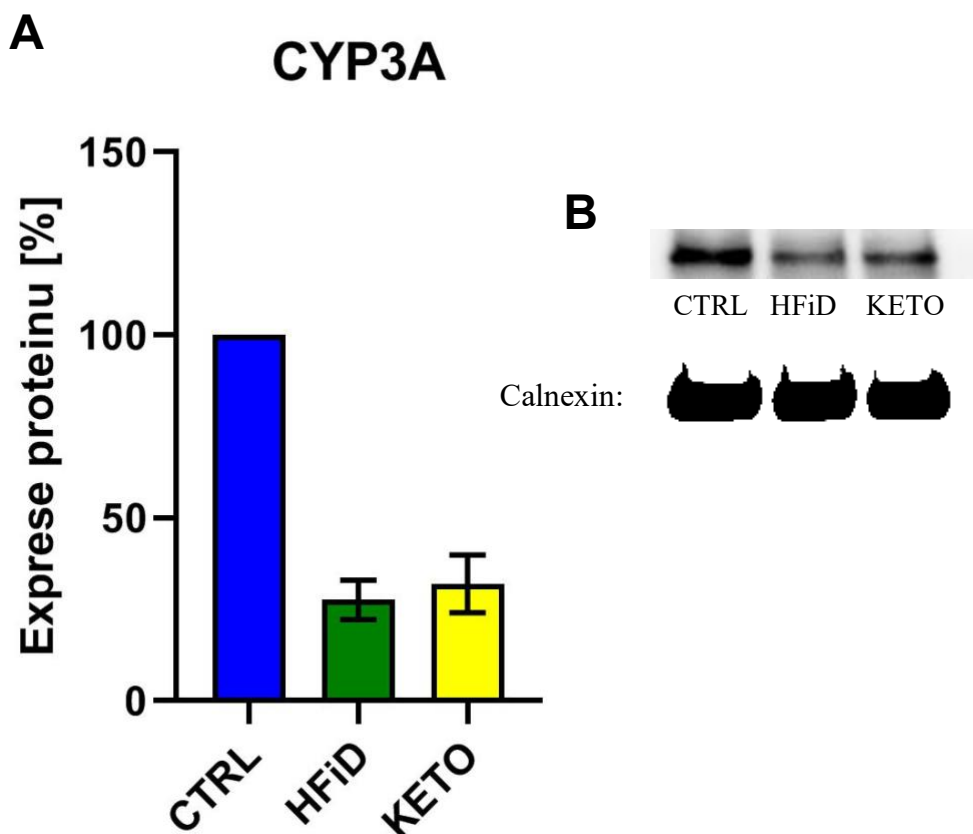


Obr. 12: Expres proteinu CYP2B (A, B) a CYP2C (C, D) u skupin CTRL, HFid a KETO.

Expres proteinu CYP2B a CYP2C byla stanovena ve dvou měřeních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze dvou hodnot $\pm$ SD. CTRL – skupina myší krmena kontrolní dietou; HFid – skupina myší krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myší krmena ketogenní dietou, calnexin – kontrolní protein.

8.3.3. Expresa proteinu CYP3A

V případě exprese proteinu CYP3A bylo u obou skupiny pozorováno velmi výrazné snížení proti CTRL skupině, a to více než 70 % (Obr. 13A). Ve skupině HFiD byla snížená exprese CYP3A v souladu s poklesem jeho enzymatické aktivity (Obr. 10C).



Obr. 13: Expresa proteinu CYP3A u skupin CTRL, HFiD a KETO. Expresa proteinu CYP3A byla stanovena ve dvou měřeních. Výsledky pro CYP3A jsou vyjádřeny jako průměr ze dvou hodnot $\pm$ SD. CTRL – skupina myši krmena kontrolní dietou; HFiD – skupina myši krmena dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myši krmena ketogenní dietou; calnexin – kontrolní protein.

8.4. Stanovení exprese mRNA kódující vybrané CYP

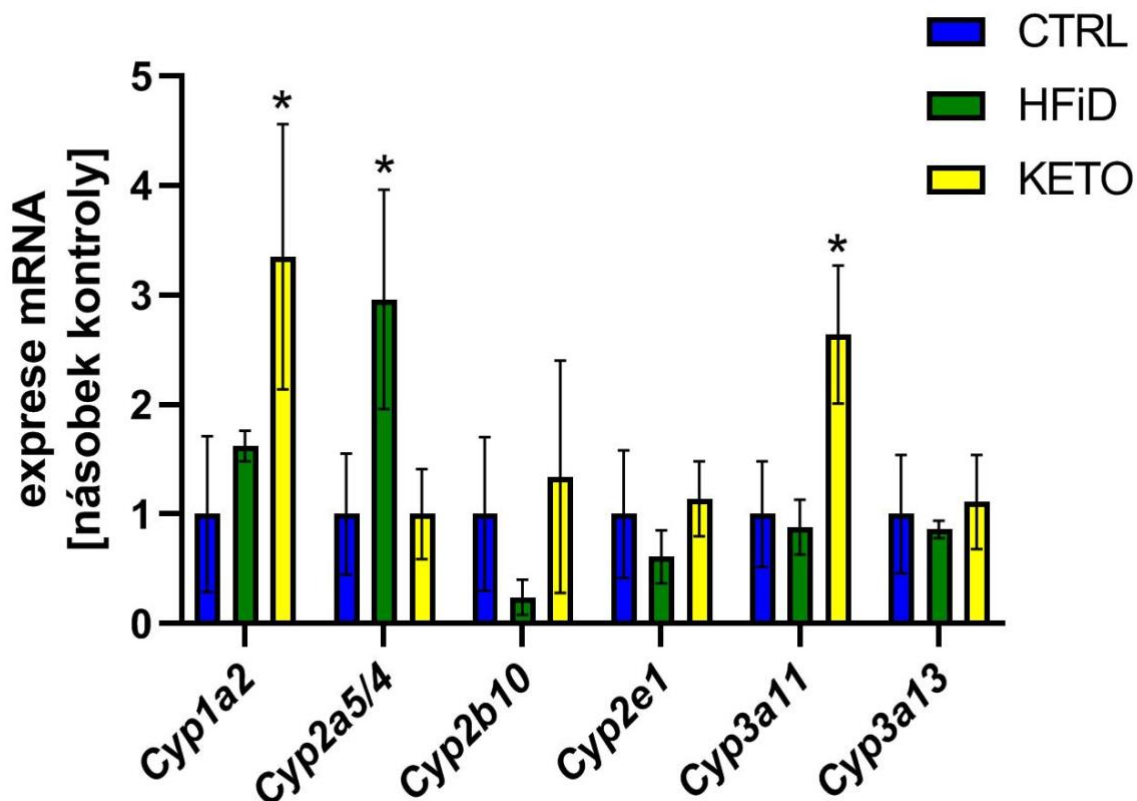
Terapeutické dietní režimy mohou významně zasahovat do regulačních mechanismů jaterního metabolismu, mimo jiné i prostřednictvím ovlivnění exprese enzymů zodpovědných za biotransformaci léčiv. Vzhledem k tomu, že konkrétní molekulární dráhy, jimiž strava tento

proces ovlivňuje, nejsou dosud plně objasněny, zaměřil se náš experiment na sledování změn exprese genů kódujících Cyp. Kvantitativní PCR v reálném čase byla použita k měření hladin mRNA těchto enzymů s cílem odhalit, jak rozdílné dietní přístupy ovlivňují jejich expresi a tím i potenciální schopnost organismu metabolizovat léčiva.

Na Obr. 14 pozorujeme porovnání exprese mRNA genů Cyp mezi CTRL, HFiD a KETO skupinou. Osa x zobrazuje jednotlivé formy genů Cyp, osa y pak relativní úroveň exprese mRNA vůči kontrolní (CTRL) skupině.

U HFiD skupiny byl pozorován signifikantní nárůst exprese mRNA genu *Cyp2a5/4* ve srovnání s CTRL skupinou. Dále byl pozorován výrazný pokles exprese mRNA genu *Cyp2b10* oproti CTRL skupině.

U KETO skupiny byl pozorován signifikantní nárůst exprese mRNA genů *Cyp1a2* a *Cyp3a11* oproti CTRL skupině. U ostatních genů jednotlivých Cyp nebyl pozorován výraznější nárůst nebo pokles vůči CTRL skupině.



Obr. 14: Stanovení exprese mRNA genů Cyp u skupin CTRL, HFiD a KETO. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD ze 7–10 myší. Osa x zobrazuje jednotlivé formy genů Cyp, osa y pak relativní expresi mRNA vůči CTRL skupině. Statisticky signifikantní rozdíly oproti CTRL skupině jsou označeny hvězdičkou (* $P < 0,0001$). CTRL – skupina myší krmená kontrolní dietou; HFiD – skupina myší krmená dietou s vysokým obsahem vlákniny; KETO – skupina myší krmená ketogenní dietou.

8.5. Stanovení vlivu SCFA na aktivaci AhR

V závěrečné části experimentální práce byl hodnocen vliv SCFA – butyrátu, propionátu a laktátu na aktivaci AhR v buněčné linii HepG2-Lucia AhR. Aktivace byla sledována pomocí luciferázového reportérového testu, přičemž byly porovnávány účinky jednotlivých SCFA v různých koncentracích s kontrolní skupinou (UT). Experimentální design zahrnoval rovněž pozitivní kontrolu (FICZ) a negativní kontrolu (CH-223191), jak bylo popsáno v metodice. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní aktivita receptoru AhR.

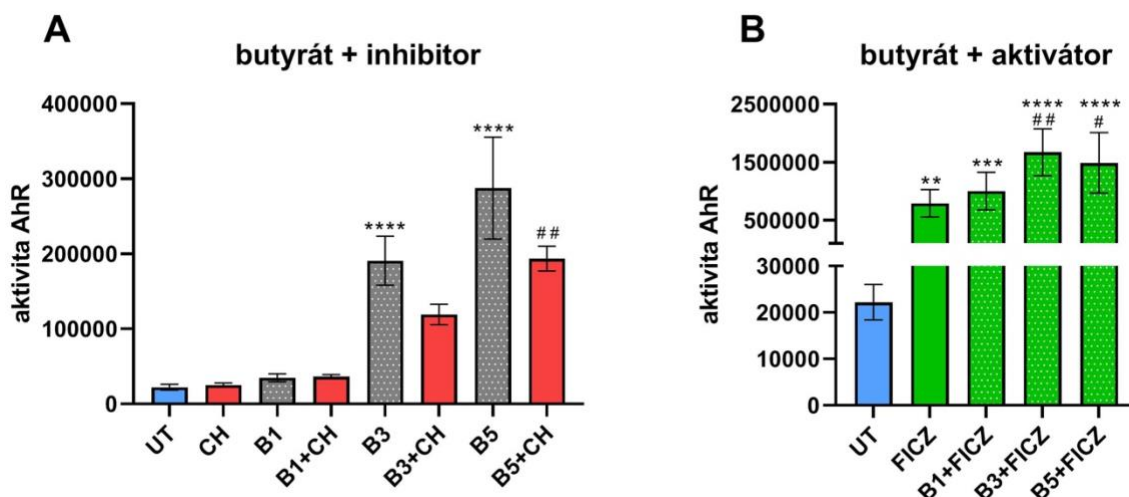
8.5.1. Vliv butyrátu na aktivaci AhR

Výsledky ukazují, že butyrát indukuje aktivaci AhR receptoru v závislosti na koncentraci. Při koncentraci 1 mM nebyla zaznamenána výraznější změna oproti kontrolní skupině, nicméně při vyšších koncentracích (3 mM a 5 mM) došlo ke signifikantnímu nárůstu luciferázové aktivity oproti kontrolní (UT) skupině, tudíž k aktivaci AhR (Obr 15A). Tyto výsledky naplňují předpoklad, že butyrát působí jako slabý agonista AhR receptoru a jeho účinek se projevuje především při vyšších koncentracích.

Použití inhibitoru CH-223191 v kombinaci s butyrátem vedlo k inhibici aktivity AhR receptoru ve srovnání se samotným butyrátem. Kombinace butyrátu (5 mM) s CH-223191 (B5+CH) vykazovala signifikantní pokles aktivity AhR vůči samotnému butyrátu o koncentraci 5 mM (B5). Tento výsledek ukazuje, že aktivace pozorovaná u butyrátu je alespoň částečně zprostředkována přes AhR receptor, protože inhibitor tuto aktivaci potlačil (Obr. 15A).

Na grafu (Obr. 15B) pozorujeme signifikantní nárůst aktivity AhR vůči UT skupině jak u samotného FICZ agonisty, tak v kombinaci FICZ s butyrátem. Při kombinaci butyrátu o koncentraci 3 a 5 mM s pozitivní kontrolou FICZ pozorujeme signifikantní nárůst aktivity AhR vůči samotnému aktivátoru FICZ. Aktivita AhR receptoru byla v kombinaci butyrátu s FICZ vyšší, než by odpovídala součtu účinků obou látek aplikovaných samostatně, toto zjištění poukazuje na synergický efekt. Tento výsledek podporuje hypotézu, že butyrát může zvyšovat účinnost silných agonistů AhR, pravděpodobně prostřednictvím zvýšení dostupnosti receptoru nebo ovlivněním epigenetických regulačních mechanismů.

Tyto výsledky jsou v souladu s literárními údaji, které popisují butyrát jako slabého aktivátora AhR s možným epigenetickým vlivem na regulaci exprese³².



Obr. 15: (A) – HepG2-Lucia AhR buňky inkubovány s butyrátem o koncentraci 1; 3 a 5 mM (B1; B3; B5) a dále v kombinaci s inhibitorem CH-223191 (+CH) po dobu 24 h. (B) – inkubace buněk HepG2-Lucia AhR s aktivátorem FICZ a dále v kombinaci s butyrátem o koncentraci 1; 3 a 5 mM po dobu 24 h. UT – buňky inkubovány bez studovaných látek. Výsledky jsou výjádřeny jako průměr $\pm$ SD ze 4–6 hodnot. Statisticky signifikantní rozdíly oproti UT skupině jsou označeny hvězdičkou (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Statisticky signifikantní rozdíly oproti samotnému butyrátu o příslušné koncentraci (A) nebo oproti samotnému FICZ (B) jsou označeny křížkem (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$).

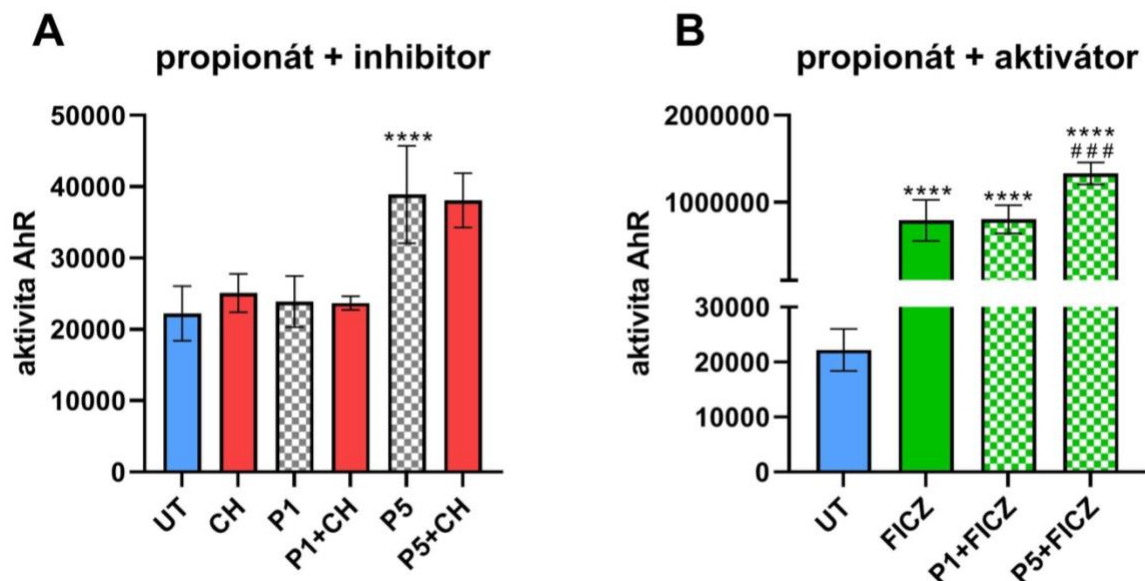
8.5.2. Vliv propionátu na aktivaci AhR

U propionátu nebyla při nejnižší testované koncentraci (1 mM) zaznamenána změna v aktivitě AhR receptoru. Při koncentraci 5 mM však došlo ke signifikantnímu zvýšení aktivity receptoru ve srovnání s UT skupinou (Obr. 16A). I když tento účinek nebyl tak výrazný jako u butyrátu, naznačuje, že propionát může mít potenciál k modulaci aktivity AhR, zejména při vyšších koncentracích. U propionátu o koncentraci 10 mM byla sice pozorována výrazná aktivace luciferázového reportéru, avšak takto vysoká koncentrace není fyziologicky relevantní. Za běžných podmínek nedochází k dosažení této koncentrace propionátu v játrech, jelikož absorpce SCFA ze střeva je limitována.

Při kombinaci propionátu s inhibitorem CH-223191 (P5+CH) nebyla aktivita AhR receptoru výrazně snížena ve srovnání se samotným propionátem (Obr. 16A).

. U kombinace propionátu (5 mM) s FICZ došlo ke signifikantnímu nárůstu oproti samotnému FICZ (Obr. 16B). Tento výsledek podtrhuje schopnost propionátu výrazně

indukovat účinek silného agonisty AhR a naznačuje, že propionát může hrát důležitou roli v modulaci aktivity tohoto receptoru při současné přítomnosti silnějšího aktivátoru.

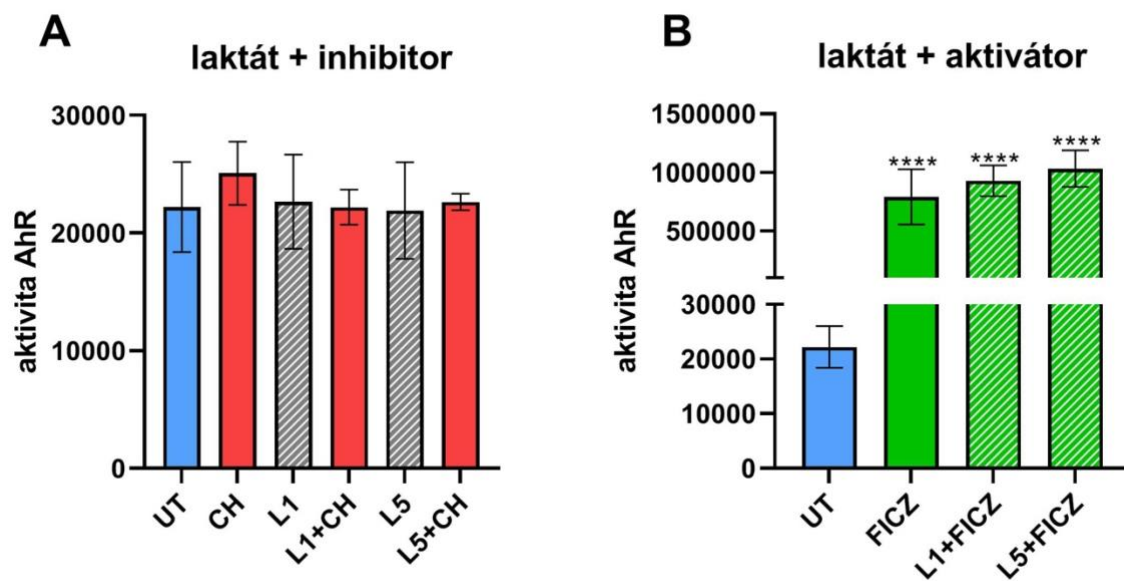


Obr. 16: (A) – HepG2-Lucia AhR buňky inkubovány s propionátem o koncentraci 1 a 5 mM (P1; P5) a dále v kombinaci s inhibitorem CH-223191 (+CH) po dobu 24 h. (B) – inkubace buněk HepG2-Lucia AhR s aktivátorem FICZ a dále v kombinaci s propionátem o koncentraci 1 a 5 mM po dobu 24 h. UT – buňky inkubovány bez studovaných látek. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SD ze 4–6 hodnot. Statisticky signifikantní rozdíly oproti UT skupině jsou označeny hvězdičkou (**** $P < 0,0001$). Statisticky signifikantní rozdíly oproti samotnému FICZ (B) jsou označeny křížkem (### $P < 0,001$).

8.5.3. Vliv laktátu na aktivaci AhR

Samotný laktát v žádné z testovaných koncentrací (1 mM a 5 mM) nevyvolal aktivaci AhR receptoru. Aktivita luciferázy zůstávala prakticky na úrovni kontrolní skupiny, což naznačuje, že laktát nemá schopnost aktivovat AhR ani při vyšších koncentracích (Obr. 17A).

Při kombinaci laktátu s aktivátorem FICZ došlo k velmi nepatrnému, téměř zanedbatelnému nárůstu aktivity AhR oproti samotnému FICZ (Obr. 17B). To znamená, že laktát nemá schopnost potencovat ani ovlivnit účinek silného agonisty AhR, a nelze jej tak považovat za modulátor aktivity tohoto receptoru v daných experimentálních podmínkách.



Obr. 17: (A) – HepG2-Lucia AhR buňky inkubovány s laktátem o koncentraci 1 a 5 mM (L1; L5) a dále v kombinaci s inhibitorem CH-223191 (+CH) po dobu 24 h. (B) – inkubace buněk HepG2-Lucia AhR s aktivátorem FICZ a dále v kombinaci s laktátem o koncentraci 1 a 5 mM po dobu 24 h. UT – buňky inkubovány bez studovaných látek. Výsledky jsou výjádřeny jako průměr $\pm$ SD ze 4–6 hodnot. Statisticky signifikantní rozdíly oproti UT skupině jsou označeny hvězdičkou (**** $P < 0,0001$).

Diskuze

Cílené ovlivnění střevního mikrobiomu, vedoucí k obnovení rovnováhy mezi mikrobiotou a imunitním systémem, představuje slibný přístup k prevenci a podpoře účinnosti léčby zánětlivých autoimunitních onemocnění. Mezi hlavní faktory ovlivňující složení a funkci střevního mikrobiomu patří strava, která tak představuje klíčový nástroj pro jeho cílenou modulaci⁴⁹. Právě z tohoto důvodu se terapeutické diety stávají stále častěji předmětem zájmu jako možná podpůrná nebo doplňující strategie v léčbě onemocnění, jako je roztroušená skleróza (RS). Jak bylo detailně popsáno v úvodu, RS patří mezi nejrozšířenější chronická zánětlivá onemocnění centrálního nervového systému, která se vyskytují zejména u mladých dospělých¹. Současná léčba RS se opírá zejména o farmaka, která snižují četnost relapsů a zpomalují zhoršování neurologických funkcí. Farmakoterapie je ovšem často spojena s řadou nežádoucích účinků souvisejících s jejich imunosupresivním působením, jako je vyšší riziko infekcí, poškození jater, a dokonce riziko malignit⁵⁰. Vzhledem k těmto rizikům se stále více pozornosti obrací k podpůrným nefarmakologickým přístupům, jako jsou dietní intervence, které by mohly přispět ke zmírnění příznaků a zlepšení kvality života pacientů. Omezené klinické důkazy naznačují, že ketogenní dieta (KETO) a dieta s vysokým obsahem vlákniny (HFid) mohou být spojeny se zlepšením symptomů u pacientů s RS. Je však nezbytné vzít v úvahu, že tyto intervence mohou mít i širší dopady na schopnost organismu metabolizovat léčiva, a tím potenciálně měnit výsledný účinek farmakoterapie. Znalost těchto souvislostí je zásadní pro bezpečné zavádění dietních intervencí do klinické praxe, zejména v kontextu chronických onemocnění, kde jsou pacienti často dlouhodobě léčeni farmaky s úzkým terapeutickým rozmezím.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jak zvolené dietní režimy (KETO a HFid) ovlivňují metabolismus léčiv. Pozornost byla zaměřena zejména na změny exprese a aktivity jaterních enzymů cytochromů P450 (CYP) v myším modelu roztroušené sklerózy – experimentální autoimunitní encefalomyelitidě (EAE).

Výsledky této diplomové práce ukázaly, že zvolené dietní režimy způsobují výrazné změny v profilu jaterních enzymů CYP. Při charakterizaci mikrosomální frakce bylo ve skupině HFiD pozorováno snížení specifického obsahu CYP, zatímco ve skupině KETO došlo k velmi mírnému nárůstu ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 6). Pozorované rozdíly naznačují, že složení stravy může v kontextu RS ovlivnit biosyntézu jaterních enzymů, včetně CYP, jak ukazuje model EAE použitý v tomto experimentu (všem třem skupinám myši byla vyvolána EAE).

Lze považovat za zásadní, že dietní zásahy neovlivnily pouze množství CYP enzymů, ale projevíly se také změny na úrovni jejich enzymové aktivity. U myši krmených HFiD dietou došlo ke snížení enzymatické aktivity CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2E a CYP3A ve srovnání s kontrolní skupinou; u CYP1A (substrát ETRR), CYP2B a CYP2C byla aktivita snížena o více než polovinu. Pouze aktivita CYP2A byla zvýšena oproti kontrolní skupině (Obr. 7 – 10). U myši, kterým byla podávána KETO dieta, došlo ke snížení enzymatické aktivity CYP2B a CYP2C ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr. 8 a 9). Změny v enzymatické aktivitě CYP vyvolané terapeutickou dietou mohou mít důsledky pro farmakokinetiku současně podávaných léčiv, zejména u léčiv s úzkým terapeutickým oknem. To je zvláště důležité u pacientů s RS, kteří často podstupují dlouhodobou farmakoterapii, jejíž účinnost a bezpečnost může být dietními zásahy modulována. Například léčivo ozanimod (Zeposia®) je schválený pro léčbu dospělých pacientů s relabující formou RS, u nichž je indikována dlouhodobá imunomodulační terapie. Jeho metabolismus zahrnuje více enzymatických drah, do nichž jsou zapojeny mimo jiné také enzymy CYP, zejména CYP3A4 a CYP2C8⁵¹. Změny v aktivitě těchto enzymů mohou významně ovlivnit farmakokinetiku ozanimodu a tím i jeho terapeutickou účinnost a bezpečnost. Vzhledem k tomu, že jak KETO dieta, tak i HFiD vykazují určitý klinický potenciál v terapii RS, je při jejich zavádění do klinické praxe nezbytné zohlednit jejich možný vliv na farmakokinetiku současně podávaných léčiv, jako je ozanimod.

Pro účinné a bezpečné zavádění dietních zásahů do klinické praxe je kromě výsledků klinických studií zásadní také porozumění molekulárním mechanismům, které tyto efekty zprostředkovávají. V našem *in vivo* experimentu změnám v aktivitě některých CYP enzymů odpovídaly také změny na úrovni jejich mRNA exprese, což naznačuje, že dietní intervence zasahují do regulace těchto enzymů na transkripční úrovni. Například u HFiD diety pozorujeme signifikantní nárůst exprese mRNA genu *Cyp2a5/4* a velmi výrazný pokles u *Cyp2b10* (Obr. 14), odpovídající změnám v enzymových aktivitách

(Obr. 8A, B). V případě KETO diety došlo k signifikantnímu nárůstu exprese mRNA genů *Cyp1a2* a *Cyp3a11* (Obr. 14), tyto změny se však neprojevily na úrovni enzymatické aktivity. Signifikantní nárůst exprese mRNA genu *Cyp3a11* u diety s vysokým obsahem tuku oproti kontrolní skupině byl již dříve publikován⁵².

Zejména rozdílná dostupnost energetických substrátů a mikrobiálních metabolitů, která je podmíněna složením stravy, může hrát roli v regulaci exprese CYP enzymů. Studie například ukazují, že mikrobiální metabolity, mohou být ligandy aryl uhlovodíkového receptoru (AhR), jehož aktivace je spojována jak s regulací imunitní odpovědi a střevní homeostázy, tak s metabolismem xenobiotik^{53,54}. Konkrétně u butyrátu, který vzniká fermentací vlákniny střevním mikrobiomem v tlustém střevě, byla prokázána schopnost interagovat s AhR receptorem jak ve střevních, tak v jaterních buňkách^{32,55}.

Také v našem experimentu za využití jaterní HepG2-Lucia AhR buněčné linie byla prokázána aktivace AhR receptoru butyrátem v závislosti na koncentraci. Zároveň bylo při současném působení butyrátu a FICZ, známého agonisty AhR, pozorováno výrazné zvýšení aktivity receptoru nad úroveň indukovanou samotným FICZ, což ukazuje na synergický efekt (Obr. 15). V souladu s předešlou studií³² jsme zjistili, že zvýšená produkce butyrátu způsobená dietním režimem (HFiD) může vést ke změnám v metabolismu léčiv skrze modulaci AhR receptoru. Studie naznačují také epigenetické působení butyrátu na AhR pravděpodobně prostřednictvím mechanismů založených na inhibici histondeacetyláz (HDAC) v játrech^{32,56}.

Propionát, další mastná kyselina s krátkým řetězcem (SCFA), na rozdíl od butyrátu zvýšil aktivitu AhR jen při koncentraci 5 mM. Dále byl pozorován signifikantní nárůst při kombinaci propionátu o koncentraci 5 mM s FICZ oproti samotnému FICZ (Obr. 16). Tento pozorovaný efekt naznačuje možný synergismus, který může být způsoben interakcí na úrovni receptorové aktivace nebo epigenetické modulace, podobně jako bylo popsáno u butyrátu. Propionát sice není v literatuře běžně zmiňován jako aktivátor AhR, nicméně jeho schopnost potencovat účinek endogenních nebo mikrobiálních ligandů byla naznačena např. v práci⁵⁶, kde bylo diskutováno, že SCFA mohou zvyšovat expresi AhR nebo ovlivňovat jeho lokalizaci v buňce.

Kromě typických SCFA, jako jsou butyrát a propionát, byl do experimentu zařazen také laktát, který rovněž vzniká jako produkt fermentace vlákniny střevní mikrobiotou. Oproti butyrátu a propionátu však laktát neprokázal schopnost aktivovat AhR receptor. Ani při nejvyšší testované koncentraci (10 mM) nedošlo k významnému

zvýšení aktivace AhR. Stejně tak nebyl pozorován synergický efekt v kombinaci s FICZ (Obr. 17).

Výsledky této práce rozšiřují poznání o tom, jak stravovací návyky a specifické dietní režimy modulují expresi a funkci enzymů zodpovědných za metabolismus léčiv. Zároveň poukazují na nutnost zohlednění těchto vlivů v klinické praxi. Například pacienti s RS, kteří dodržují specifickou dietu s cílem zmírnění zánětu nebo úpravy mikrobiomu, mohou mít změněnou metabolickou kapacitu, což může ovlivnit účinnost nebo toxicitu podávaných léčiv. Při nastavování dávkování by tedy měly být tyto faktory zohledněny.

Závěr

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na studium vlivu terapeutických diet, konkrétně vysokovlákninové (HFiD) a ketogenní (KETO) diety, na aktivitu a expresi jaterních biotransformačních enzymů CYP u myši s indukovaným modelem roztroušené sklerózy (EAE). Součástí práce bylo rovněž studium efektu butyrátu, propionátu a laktátu na aktivaci AhR v buněčné linii HepG2-Lucia AhR.

Na základě dosažených výsledků lze formulovat následující závěry:

- KETO dieta snížila enzymatickou aktivitu enzymů CYP2B a CYP2C.
- HFiD dieta způsobila snížení enzymatické aktivity většiny sledovaných izoform CYP (CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2E a CYP3A), přičemž indukovala pouze izoformu CYP2A, což potvrdil i signifikantní nárůst genové exprese *Cyp2a5/4*.
- Dále bylo prokázáno, že butyrát, a v menší míře i propionát, mohou aktivovat AhR v buňkách HepG2-Lucia AhR a potencovat účinek endogenních ligandů AhR. Naproti tomu laktát schopnost aktivovat AhR neprokázal.

Vzhledem k limitacím experimentálního modelu a použitým metodám je žádoucí, aby byly tyto poznatky v budoucnu dále ověřovány, a to zejména v kontextu klinických studií a za použití rozšířených modelů metabolických drah zahrnujících komplexní interakce mezi dietou, mikrobiomem a metabolismem léčiv.

Literatura

- (1) Tancreda, G.; Ravera, S.; Panfoli, I. Exploring the Therapeutic Potential: Bioactive Molecules and Dietary Interventions in Multiple Sclerosis Management. *Current Issues in Molecular Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) June 1, **2024**, pp 5595–5613.
<https://doi.org/10.3390/cimb46060335>.
- (2) Stoiloudis, P.; Kesidou, E.; Bakirtzis, C.; Sintila, S.-A.; Konstantinidou, N.; Boziki, M.; Grigoriadis, N. The Role of Diet and Interventions on Multiple Sclerosis: A Review. *Nutrients* **2022**, *14* (6), 1150.
<https://doi.org/10.3390/nu14061150>.
- (3) Ortí, J. E. de la R.; Cuerda-Ballester, M.; Sanchis-Sanchis, C. E.; Lajara Romance, J. M.; Navarro-Illana, E.; García Pardo, M. P. Exploring the Impact of Ketogenic Diet on Multiple Sclerosis: Obesity, Anxiety, Depression, and the Glutamate System. *Front Nutr* **2023**, *10*.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1227431>.
- (4) Xiao, Y.-L.; Gong, Y.; Qi, Y.-J.; Shao, Z.-M.; Jiang, Y.-Z. Effects of Dietary Intervention on Human Diseases: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Signal Transduct Target Ther* **2024**, *9* (1), 59.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01771-x>.
- (5) Esteves, F.; Rueff, J.; Kranendonk, M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—a Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *Journal of Xenobiotics*. MDPI September 1, **2021**, pp 94–114.
<https://doi.org/10.3390/jox11030007>.
- (6) 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>.
- (7) Haki, M.; Al-Biati, H. A.; Al-Tameemi, Z. S.; Ali, I. S.; Al-Hussaniy, H. A. Review of Multiple Sclerosis: Epidemiology, Etiology, Pathophysiology, and

- Treatment. *Medicine (United States)* **2024**, *103* (8), E37297.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000037297>.
- (8) Su, K.; Bourdette, D.; Forte, M. Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Front Physiol* **2013**, *4*.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00169>.
 - (9) Montalban, X.; Matthews, P. M.; Simpson, A.; Petrie, J. L.; Sammon, C.; Ramagopalan, S.; Disanto, G.; Kuhle, J. Real-world Evaluation of Ocrelizumab in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Ann Clin Transl Neurol* **2023**, *10* (3), 302–311. <https://doi.org/10.1002/acn3.51732>.
 - (10) Cree, B. A.; Selmaj, K. W.; Steinman, L.; Comi, G.; Bar-Or, A.; Arnold, D. L.; Hartung, H.-P.; Montalbán, X.; Havrdová, E. K.; Sheffield, J. K.; Minton, N.; Cheng, C.-Y.; Silva, D.; Kappos, L.; Cohen, J. A. Long-Term Safety and Efficacy of Ozanimod in Relapsing Multiple Sclerosis: Up to 5 Years of Follow-up in the DAYBREAK Open-Label Extension Trial. *Multiple Sclerosis Journal* **2022**, *28* (12), 1944–1962. <https://doi.org/10.1177/13524585221102584>.
 - (11) Hauser, S. L.; Cree, B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc. December 1, **2020**, pp 1380-1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>.
 - (12) Petajan, J. H.; White, A. T. Recommendations for Physical Activity in Patients with Multiple Sclerosis. *Sports Medicine* **1999**, *27* (3), 179–191.
<https://doi.org/10.2165/00007256-199927030-00004>.
 - (13) Wills, O. C.; Probst, Y. C. Understanding Lifestyle Self-Management Regimens That Improve the Life Quality of People Living with Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Health and Quality of Life Outcomes*. BioMed Central Ltd December 1, **2022**. <https://doi.org/10.1186/s12955-022-02046-1>.
 - (14) Rauchová, H. Coenzyme Q10 Effects in Neurological Diseases. *Physiol Res* **2021**, No. S4, S683–S714. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934712>.
 - (15) Arenas-Jal, M.; Suñé-Negre, J. M.; García-Montoya, E. Coenzyme Q10 Supplementation: Efficacy, Safety, and Formulation Challenges. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2020**, *19* (2), 574–594. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12539>.
 - (16) Fonseca-Kelly, Z.; Nassrallah, M.; Uribe, J.; Khan, R. S.; Dine, K.; Dutt, M.; Shindler, K. S. Resveratrol Neuroprotection in a Chronic Mouse Model of

- Multiple Sclerosis. *Front Neurol* **2012**, *3*.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00084>.
- (17) Meng, T.; Xiao, D.; Muhammed, A.; Deng, J.; Chen, L.; He, J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules* **2021**, *26* (1), 229. <https://doi.org/10.3390/molecules26010229>.
 - (18) Gachpazan, M.; Habbibirad, S.; Kashani, H.; Jamialahmadi, T.; Rahimi, H. R.; Sahebkar, A. Targeting Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway by Curcumin: Implications for the Treatment of Multiple Sclerosis; **2021**; pp 41–53. https://doi.org/10.1007/978-3-030-56153-6_3.
 - (19) Bernardo, A.; Plumitallo, C.; De Nuccio, C.; Visentin, S.; Minghetti, L. Curcumin Promotes Oligodendrocyte Differentiation and Their Protection against TNF- α through the Activation of the Nuclear Receptor PPAR- γ . *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 4952. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83938-y>.
 - (20) Lopresti, A. L.; Smith, S. J.; Malvi, H.; Kodgule, R. An Investigation into the Stress-Relieving and Pharmacological Actions of an Ashwagandha (*Withania Somnifera*) Extract. *Medicine* **2019**, *98* (37), e17186. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017186>.
 - (21) Penesová, A.; Dean, Z.; Kollár, B.; Havranová, A.; Imrich, R.; Vlček, M.; Rádiková. Nutritional Intervention as an Essential Part of Multiple Sclerosis Treatment? *Physiological Research. Czech Academy of Sciences* **2018**, pp 521–533. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933694>.
 - (22) Di Majo, D.; Cacciabauda, F.; Accardi, G.; Gambino, G.; Giglia, G.; Ferraro, G.; Candore, G.; Sardo, P. Ketogenic and Modified Mediterranean Diet as a Tool to Counteract Neuroinflammation in Multiple Sclerosis: Nutritional Suggestions. *Nutrients* **2022**, *14* (12), 2384. <https://doi.org/10.3390/nu14122384>.
 - (23) Kim, D. Y.; Hao, J.; Liu, R.; Turner, G.; Shi, F.-D.; Rho, J. M. Inflammation-Mediated Memory Dysfunction and Effects of a Ketogenic Diet in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *PLoS One* **2012**, *7* (5), e35476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035476>.
 - (24) Fetting, N. M.; Robinson, H. G.; Allanach, J. R.; Davis, K. M.; Simister, R. L.; Wang, E. J.; Sharon, A. J.; Ye, J.; Popple, S. J.; Seo, J. H.; Gibson, D. L.; Crowe, S. A.; Horwitz, M. S.; Osborne, L. C. Inhibition of Th1 Activation and Differentiation by Dietary Guar Gum Ameliorates Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis. *Cell Rep* **2022**, *40* (11), 111328.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111328>.
- (25) Lorefice, L.; Zoledziwska, M. Propionic Acid Impact on Multiple Sclerosis: Evidence and Challenges. *Nutrients* **2024**, *16* (22), 3887.
<https://doi.org/10.3390/nu16223887>.
- (26) Walsh, J.; Gheorghe, C. E.; Lyte, J. M.; van de Wouw, M.; Boehme, M.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F.; Griffin, B. T.; Clarke, G.; Hyland, N. P. Gut Microbiome-Mediated Modulation of Hepatic Cytochrome P450 and P-Glycoprotein: Impact of Butyrate and Fructo-Oligosaccharide-Inulin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2020**, *72* (8), 1072–1081. <https://doi.org/10.1111/jphp.13276>.
- (27) Zhao, M.; Ma, J.; Li, M.; Zhang, Y.; Jiang, B.; Zhao, X.; Huai, C.; Shen, L.; Zhang, N.; He, L.; Qin, S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI December 1, **2021**.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312808>.
- (28) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2001**, *58* (5), 737–747.
<https://doi.org/10.1007/PL00000897>.
- (29) Hunt, C. M.; Westerkam, W. R.; Stave, G. M. Effect of Age and Gender on the Activity of Human Hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* **1992**, *44* (2), 275–283.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90010-G](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90010-G).
- (30) Wolbold, R. Sex Is a Major Determinant of CYP3A4 Expression in Human Liver. *Hepatology* **2003**, *38* (4), 978–988.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50393>.
- (31) Jourova, L.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Human Gut Microbiota Plays a Role in the Metabolism of Drugs. *Biomedical Papers* **2016**, *160* (3), 317–326.
<https://doi.org/10.5507/bp.2016.039>.
- (32) Jourova, L.; Anzenbacherova, E.; Dostal, Z.; Anzenbacher, P.; Briolotti, P.; Rigal, E.; Daujat-Chavanieu, M.; Gerbal-Chaloin, S. Butyrate, a Typical Product of Gut Microbiome, Affects Function of the AhR Gene, Being a Possible Agent of Crosstalk between Gut Microbiome, and Hepatic Drug Metabolism. *J Nutr Biochem* **2022**, *107*, 109042. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109042>.
- (33) Zemanová, N.; Lněničková, K.; Vavrečková, M.; Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Hermanová, P.; Hudcovic, T.; Kozáková, H.; Jourová, L. Gut Microbiome Affects the Metabolism of Metronidazole in Mice

- through Regulation of Hepatic Cytochromes P450 Expression. *PLoS One* **2021**, *16* (11), e0259643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259643>.
- (34) Srovnalova, A.; Svecarova, M.; Kopecna Zapletalova, M.; Anzenbacher, P.; Bachleda, P.; Anzenbacherova, E.; Dvorak, Z. Effects of Anthocyanidins and Anthocyanins on the Expression and Catalytic Activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in Primary Human Hepatocytes and Human Liver Microsomes. *J Agric Food Chem* **2014**, *62* (3), 789–797. <https://doi.org/10.1021/jf404643w>.
- (35) Jourova, L.; Satka, S.; Frybortova, V.; Zapletalova, I.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E.; Hermanova, P. P.; Drabonova, B.; Srutkova, D.; Kozakova, H.; Hudcovic, T. Butyrate Treatment of DSS-Induced Ulcerative Colitis Affects the Hepatic Drug Metabolism in Mice. *Front Pharmacol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.936013>.
- (36) Marinescu, S. C. (Nicolescu); Apetroaei, M.-M.; Nedea, M. I. (Ilie); Arsene, A. L.; Velescu, B. Ștefan; Hîncu, S.; Stancu, E.; Pop, A. L.; Drăgănescu, D.; Udeanu, D. I. Dietary Influence on Drug Efficacy: A Comprehensive Review of Ketogenic Diet–Pharmacotherapy Interactions. *Nutrients* **2024**, *16* (8), 1213. <https://doi.org/10.3390/nu16081213>.
- (37) McDonald, T. J. W.; Cervenka, M. C. Ketogenic Diets for Adult Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* **2018**, *15* (4), 1018–1031. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0666-8>.
- (38) Smith, P. Animal Models of Multiple Sclerosis. *Curr Protoc* **2021**, *1* (6). <https://doi.org/10.1002/cpz1.185>.
- (39) Procaccini, C.; De Rosa, V.; Pucino, V.; Formisano, L.; Matarese, G. Animal Models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol* **2015**, *759*, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.042>.
- (40) Glatigny, S.; Bettelli, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med* **2018**, *8* (11), a028977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028977>.
- (41) Jiraskova Zakostelska, Z.; Kraus, M.; Coufal, S.; Prochazkova, P.; Slavickova, Z.; Thon, T.; Hrnecir, T.; Kreisinger, J.; Kostovcikova, K.; Kleinova, P.; Lizrova Preiningerova, J.; Pavelcova, M.; Ticha, V.; Kovarova, I.; Kubala Havrdova, E.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Kverka, M. Lysate of Parabacteroides Distasonis Prevents Severe Forms of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by

- Modulating the Priming of T Cell Response. *Front Immunol* **2024**, *15*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1475126>.
- (42) Lake, B. G. Preparation and Characterization of Microsomal Fractions for Studies on Xenobiotic Metabolism. In *Biochemical Toxicology*; Oxford, **1987**; pp 183–215.
 - (43) Schenkman, J. B.; Jansson, Ingela. Spectral Analyses of Cytochromes P450. In *Cytochrome P450 Protocols*; Humana Press: New Jersey; pp 25–34.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-519-0:25>.
 - (44) Phillips I. R.; Shephard E. A.; de Montellano P. R. O. Methods in Molecular Biology. In: Cytochrome P450 Protocols, 3rd Eds. *Humana Press* **1998**.
 - (45) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
 - (46) InvivoGen. *HepG2-LuciaTM AhR Cells | Data Sheet | InvivoGen*.
<https://www.invivogen.com/hepg2-lucia-ahr>.
 - (47) Céspedes, M. A.; Galindo, M. I.; Couso, J. P. Dioxin Toxicity In Vivo Results from an Increase in the Dioxin-Independent Transcriptional Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15382.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015382>.
 - (48) Kudo, I.; Hosaka, M.; Haga, A.; Tsuji, N.; Nagata, Y.; Okada, H.; Fukuda, K.; Kakizaki, Y.; Okamoto, T.; Grave, E.; Itoh, H. The Regulation Mechanisms of AhR by Molecular Chaperone Complex. *The Journal of Biochemistry* **2018**, *163* (3), 223–232. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx074>.
 - (49) Ross, F. C.; Patangia, D.; Grimaud, G.; Lavelle, A.; Dempsey, E. M.; Ross, R. P.; Stanton, C. The Interplay between Diet and the Gut Microbiome: Implications for Health and Disease. *Nat Rev Microbiol* **2024**, *22* (11), 671–686.
<https://doi.org/10.1038/s41579-024-01068-4>.
 - (50) Klotz, L.; Havla, J.; Schwab, N.; Hohlfeld, R.; Barnett, M.; Reddel, S.; Wiendl, H. Risks and Risk Management in Modern Multiple Sclerosis Immunotherapeutic Treatment. *Ther Adv Neurol Disord* **2019**, *12*.
<https://doi.org/10.1177/1756286419836571>.
 - (51) Surapaneni, S.; Yerramilli, U.; Bai, A.; Dalvie, D.; Brooks, J.; Wang, X.; Selkirk, J. V.; Yan, Y. G.; Zhang, P.; Hargreaves, R.; Kumar, G.; Palmisano, M.; Tran, J. Q. Absorption, Metabolism, and Excretion, In Vitro Pharmacology, and

- Clinical Pharmacokinetics of Ozanimod, a Novel Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator. *Drug Metabolism and Disposition* **2021**, 49 (5), 405–419. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000220>.
- (52) Ning, M.; Jeong, H. High-Fat Diet Feeding Alters Expression of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* **2017**, 45 (7), 707–711. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.075655>.
- (53) Zelante, T.; Iannitti, R. G.; Cunha, C.; De Luca, A.; Giovannini, G.; Pieraccini, G.; Zecchi, R.; D'Angelo, C.; Massi-Benedetti, C.; Fallarino, F.; Carvalho, A.; Puccetti, P.; Romani, L. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity* **2013**, 39 (2), 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>.
- (54) Korecka, A.; Dona, A.; Lahiri, S.; Tett, A. J.; Al-Asmakh, M.; Braniste, V.; D'Arienzo, R.; Abbaspour, A.; Reichardt, N.; Fujii-Kuriyama, Y.; Rafter, J.; Narbad, A.; Holmes, E.; Nicholson, J.; Arulampalam, V.; Pettersson, S. Bidirectional Communication between the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and the Microbiome Tunes Host Metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2016**, 2 (1), 16014. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.14>.
- (55) Marinelli, L.; Martin-Gallausiaux, C.; Bourhis, J.-M.; Béguet-Crespel, F.; Blottière, H. M.; Lapaque, N. Identification of the Novel Role of Butyrate as AhR Ligand in Human Intestinal Epithelial Cells. *Sci Rep* **2019**, 9 (1), 643. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37019-2>.
- (56) Modoux, M.; Rolhion, N.; Lefevre, J. H.; Oeuvray, C.; Nádvorník, P.; Illes, P.; Emond, P.; Parc, Y.; Mani, S.; Dvorak, Z.; Sokol, H. Butyrate Acts through HDAC Inhibition to Enhance Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by Gut Microbiota-Derived Ligands. *Gut Microbes* **2022**, 14 (1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2105637>.