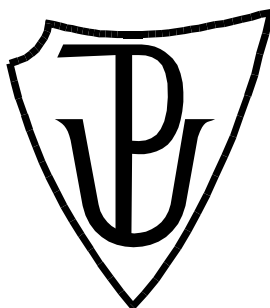


Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv změny složení mikrobiomu na expresi a aktivitu
cytochromů P450**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Vavrečková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Bc. Markéta Vavrečková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce paní doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za cenné rady, připomínky, konzultace, trpělivost, a především laskavý přístup při odborném vedení a sepsání této diplomové práce.

Poděkování patří také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, za možnost vypracovat experimentální část na tomto pracovišti, za poskytnutí všech potřebných pomůcek a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také Mgr. Lence Jourové, Ph.D a Mgr. Nině Zemanové za jejich velkou pomoc, praktické rady, předané zkušenosti při experimentálním měření a milý přístup při sepsování této diplomové práce, která by bez jejich pomoci nemohla vzniknout. A děkuji také dalším zaměstnancům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, kteří mi poskytli rady a pomoc při zpracování experimentální části diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat své rodině a přátelům za lásku, trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

Tato práce byla podpořena vnitřním grantem IGA UPOL (LF_2019_015) a Grantovou agenturou České republiky (projekt 19-08294S).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Vavrečková
Název práce	Vliv změny složení mikrobiomu na expresi a aktivitu cytochromů P450
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Střevní mikrobiom hraje důležitou roli v mnoha biochemických procesech nejen v gastrointestinálním traktu, ale má vliv také například na činnost mozku, plic nebo srdce. Funkce střevní mikroflóry je ovlivněna např. stravou, prodělanými nebo aktuálními nemocemi, fyzickou kondicí, psychickým stavem, věkem a v neposlední řadě farmakoterapií, např. antibiotiky. Významnou roli hraje v metabolismu xenobiotik a může nepřímo působit na metabolismus léčiv změnou regulace a exprese jaterních biotransformačních enzymů. Klíčovými enzymy první fáze biotransformace léčiv u člověka jsou cytochromy P450 (zkráceně CYP).

Cílem diplomové práce bylo v první řadě studium vlivu střevního mikrobiomu, spolu s rozdíly mezi samci a samicemi, na expresi jaterních cytochromů P450 s využitím bezmikrobních myší. Další experimentální skupinou byly myši s uměle vytvořeným zánětem gastrointestinálního traktu, při jehož vzniku hraje mikrobiom klíčovou, ale zatím ne zcela objasněnou roli. V posledním experimentu byl sledován efekt modelového léčiva – metronidazolu – na expresi cytochromů P450 v játrech myší v čase, ovlivnění těchto změn přítomností i absencí střevních bakterií.

Z výsledků diplomové práce je zřejmé, že střevní mikrobiom ovlivňuje expresi a aktivity cytochromů P450, a může mít tak vliv na odpověď jednotlivých pacientů na terapii.

Klíčová slova	střevní mikrobiom, metabolismus xenobiotik, biotransformační enzymy, cytochromy P450, metronidazol
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Markéta Vavrečková
Title	Effect of altered microbiome on expression and activity of cytochrome P450
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
The year of presentation	2020

Abstract

Intestinal microbiome plays an important role in many biochemical processes not only in the gastrointestinal tract but also in the brain, lungs or heart, for example. Proper function of the intestinal microflora is affected by diet, illnesses, physical condition, mental condition, age or pharmacotherapy, e.g. by antibiotics. It plays an important role in the metabolism of xenobiotics and can affect indirectly drug metabolism by altering the regulation and expression of liver biotransformation enzymes. The key enzymes of the first phase of drug biotransformation in humans are cytochromes P450 (abbrev. CYP).

The aim of this diploma thesis was to study the effect of intestinal microbiome, together with sex differences, on the expression of hepatic cytochrome P450 using germ-free mice. Another experimental group was mice with artificial inflammation of the gastrointestinal tract, in which microbiome plays an important but not yet fully understood role. In the last experiment, the effect of the model drug - metronidazole - on the expression of cytochrome P450 in the liver of mice was studied and how these changes are influenced by the presence of intestinal bacteria. From the results of this thesis it is clear that intestinal microbiome affects the expression and activities of cytochromes P450 and thus may influence the response of individual patients to therapy.

Keywords	gut microbiome, metabolism of xenobiotics, biotransformation enzymes, cytochrome P450, metronidazole
Number of pages	73
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	8
2 Současný stav problematiky	9
2.1 Lidský mikrobiom	9
2.1.1 Význam střevního mikrobiomu	10
2.1.2. Klasifikace bakterií osídlující lidské tělo	12
2.2 Metabolismus xenobiotik	13
2.2.1 Cytochromy P450	14
2.2.1.1 Vlastnosti a mechanismus působení	14
2.2.1.2 Názvosloví a dělení	16
2.2.1.2.1 Podrodina CYP1A, CYP1B	18
2.2.1.2.2 Podrodiny CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E	19
2.2.1.2.3 Podrodina CYP3A4	22
2.3 Metabolismus xenobiotik střevními bakteriemi	23
2.3.1 Hydrolytické reakce	24
2.3.2 Redukční transformace	25
2.3.3 Vliv metabolismu střevních bakterií na účinnost léčiva	26
2.4 Modely pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem xenobiotik	26
3 Experimentální část	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Chemikálie	28
3.1.2 Přístroj a vybavení	29
3.2 Metody	30
3.2.1 Navržení experimentu	30
3.2.2 Příprava biologického materiálu	31
3.2.3 Stanovení koncentrace cytochromů P450	32
3.2.4 Stanovení koncentrace proteinů	32
3.2.5 Izolace RNA z jater	34
3.2.6 Reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	34
3.2.7 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem cytochromů P450	35
3.2.8 Stanovení metronidazolu v plazmě	42
3.2.9 Western blot	42
3.2.10 Statistická analýza	43
4 Výsledky	44
4.1 Změny aktivity a exprese vybraných jaterních cytochromů P450 u myší s pozměněným mikrobiomem	44
4.1.1 Efekt absence mikrobioty na aktivitu a expresi cytochromů P450	45
4.1.2. Efekt pohlavních rozdílů na aktivitu a expresi cytochromů P450	47
4.1.3. Efekt kolitidy na aktivitu a expresi cytochromů P450	49
4.2 Změny aktivity a exprese vybraných jaterních cytochromů P450 po jednorázové aplikaci metronidazolu u myší	50
4.2.1. Sledování hladiny metronidazolu v plazmě myší	52
4.2.2 Stanovení exprese cytochromů P450 po podání metronidazolu	52
4.2.3 Detekce proteinů cytochromů P450 po podání metronidazolu	55
4.2.4 Stanovení aktivity cytochromů P450 po podání metronidazolu	56
5 Diskuze	58
6 Závěr	64
7 Literatura	65
8 Seznam použitých zkratk	73

Cíle práce

Teoretická část

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracování literární rešerše shrnující poznatky o funkci a složení střevního mikrobiomu a jeho vlivu na metabolismus xenobiotik. Velká pozornost je věnována enzymům cytochromům P450, biotransformačním enzymům odpovědným za metabolické přeměny cizorodých látek u experimentálních zvířat a lidí. Dále byla diplomová práce směřována k popisu metabolismu léčiv střevními bakteriemi.

Experimentální část

V rámci experimentální části bylo cílem práce provést a vyhodnotit níže uvedené experimenty:

1. Sledování možného vlivu střevní mikrobioty na expresi mRNA a enzymatickou aktivitu jaterních CYP s využitím bezmikrobních (germ free, GF) a kontrolních (specific pathogen free, SPF) myší.
2. Zjištění vlivu pohlaví na expresi mRNA a enzymatickou aktivitu CYP u GF i SPF myší.
3. Sledování působení vyvolané kolitidy na expresi mRNA a enzymatickou aktivitu jaterních CYP u myší.
4. Studium změn exprese mRNA, exprese proteinů a enzymatické aktivity jaterních CYP u GF a SPF myší po jednorázovém podání antibiotika metronidazolu.

Výsledky experimentů přinesly další informace k vysvětlení komplexního mechanismu interakcí mezi střevním mikrobiomem a metabolismem léčiv.

1 Úvod

Mikrobiom zahrnuje obrovské množství mikroorganismů, které osídlují celé lidské tělo a zejména gastrointestinální trakt. Tento komplexní ekosystém se vyznačuje významným metabolickým potenciálem a podílí se na mnoha biologických procesech prospěšných pro zdraví jedince. Jako příklad je možné uvést syntézu některých vitamínů nebo vývoj a modulace imunitního systému. Změny ve struktuře a složení střevního mikrobiomu, tzv. střevní dysbióza, jsou spojeny s celou řadou onemocnění. Během posledních několika let se lidskému střevnímu mikrobiomu dostalo rostoucí pozornosti také díky jeho roli při metabolismu xenobiotik, zejména léčiv (Jourová *et al.*, 2016). Xenobiotika jsou pro organismus látky cizího původu, které jsou obsaženy např. v různých složkách potravy, zahrnují průmyslové chemikálie, látky znečišťující životní prostředí nebo léčiva. Většina xenobiotik se do těla dostávají prostřednictvím stravy, pitné vody, dýcháním nebo v případě léčiv různými druhy aplikace a v organismu podléhají biotransformačním procesům (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Lepší porozumění vzájemného vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem léčiv v důsledku modulace exprese biotransformačních enzymů může pomoci snížit riziko toxicity a nežádoucích účinků spojených s působením léčiva na organismus.

2 Současný stav problematiky

2.1 Lidský mikrobiom

Lidský organismus je spojen s obrovským množstvím mikroorganismů, které vytvářejí společenství a osídlují různé části lidského těla. Genom těchto 10 - 100 bilionů mikroorganismů je definován pojmem mikrobiom. Podle odhadů se lidská mikrobiota (dříve nazývaná jako mikroflóra) skládá z 10^{14} bakteriálních buněk, což je pro orientaci zhruba 10x více než činí celkový počet lidských buněk (Savage, 1977). Ovšem náš – lidský mikrobiom - zahrnuje kromě bakterií také viry, prvoky a houby (Backhed *et al.*, 2012). Dalo by se říci, že tyto osídlující mikroorganismy tvoří spolu s lidskými buňkami vzájemně spojený fungující ekosystém, který je jako celek zodpovědný za rozmanité interakce ovlivňující biologické procesy v lidském těle (Dethlefsen *et al.*, 2007).

V současné době byly po celém světě zahájeny projekty výzkumu s cílem popsat a přiblížit podstatu a funkci mikrobiomu. Pozornost je věnována zejména bakteriím, které se vyskytují v mikrobiomu v největším zastoupení, se snahou definovat dopady jejich působení na lidské zdraví (Turnbaugh *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2009). Prvotní studie o rozmanitosti mikrobiomu se pojí se jménem Antoni van Leewenhoek, který jako první pozoroval fekální a ústní mikrobiotu a určil mezi těmito dvěma zdroji velké rozdíly (Dobell, 1920). V dnešní době není smyslem zkoumat rozdíly mezi jednotlivými místy výskytu bakterií, ale snažit se porozumět, proč tyto rozdíly existují, a to pomocí nejnovějších molekulárních technologií. Jedním ze základních průlomů v tomto směru výzkumu byl objev metody sekvenování DNA a zejména snížení nákladů na tuto techniku, které nastalo v posledních několika letech. Sekvenování umožnilo identifikovat specifické mikrobiální taxony, které bylo dříve velice obtížné kultivovat nebo to vůbec nebylo možné (Kuczynski *et al.*, 2011).

Jak již bylo zmíněno, mikroorganismy osídlují různé části těla, a to zejména s ohledem na hodnotu pH nebo redoxní potenciál prostředí (McConnell *et al.*, 2008). Místa kolonizace jsou nejčastěji genitálie, ústa, nos, trávicí trakt a kůže (Trivedi, 2012). Nejvíce osídlený je však trávicí trakt, jehož plocha díky výběžkům (tzv. klkům) činí 200 – 300 m² a stává se tak povrchově větším než samotný povrch těla (Hao a Lee, 2004; Kato a Owen, 2005).

Podle výsledků studie Mackie *et al.* (1999) je člověk po narození ideálním novým prostředím, vhodným pro osídlení bakterií. Zhruba dvacet minut po narození se mikrobiota kojence, narozeného přirozeným porodem – tedy vaginálně, podobá

mikrobiomu vaginální tkáně matky. Zatímco dítě narozené císařským řezem je vybaveno mikroorganismy, které se u matky nacházejí na povrchu kůže. Poté se již fylogenetická diverzita mikroorganismů rozvíjí a mění s časem a s dietní změnou dítěte (Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Koenig *et al.*, 2011).

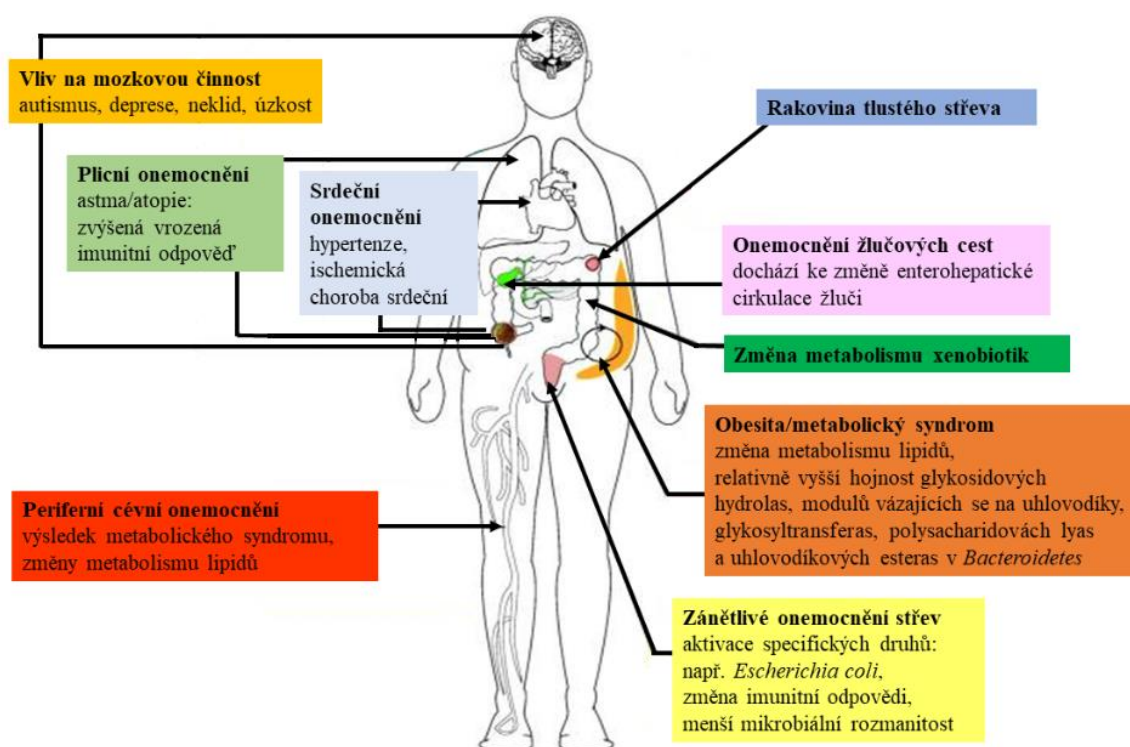
2.1.1 Význam střevního mikrobiomu

Jak již bylo zmíněno, díky rozvoji nových molekulárních technologií vzrostly možnosti studia střevního mikrobiomu a byl prokázán jeho vliv na řadu biochemických procesů a popsána jeho úloha při rozvoji celé řady onemocnění. Velký význam se připisuje jeho roli v patogenezi onemocnění, jako je obezita, kardiovaskulární choroby, zánětlivé onemocnění střev, ale také onemocnění týkající se například nervové tkáně, plicní tkáně či metabolismu lipidů (Kinross *et al.*, 2011). Podrobný přehled onemocnění spojených se střevním mikrobiomem je znázorněn na Obr. 1.

O střevním mikrobiomu se dá hovořit jako o endokrinním orgánu, a to zejména z důvodu jeho schopnosti produkovat sloučeniny, které se dostanou do krevního oběhu, a tak mohou ovlivňovat funkci distálních orgánů. Například při metabolismu polysacharidů za účasti bakterií dochází k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako je butyrát, propionát nebo acetát, které poskytují důležitý zdroj živin, ale také regulační kontrolu trávicího systému hostitele. Důležitou molekulou, jejíž metabolická přeměna probíhá za účasti bakterií v gastrointestinálním traktu, je aminokyselina tryptofan. Tato esenciální aminokyselina je prekurzorem serotoninu, což je klíčový neurotransmitter v enterální i centrální nervové soustavě. Výzkumy ukazují, že mikrobiota vykonává nepřímo a prostřednictvím dosud ne zcela objasněných mechanismů kontrolu nad osou hypothalamus-hypofýza-nadledviny. To je zřejmé ze studií na bezmikrobních zvířatech, které vykazují přehnané reakce na psychický stres, který se normalizuje po monokolonizaci některými bakteriálními druhy, včetně *Bifidobacterium infantis*. Z dosud získaných výsledků vyplývá, že střevní mikrobiota může být terapeutickým cílem při léčbě poruch souvisejících se stresem nebo při metabolických chorobách (Clarke *et al.*, 2014)

Qin *et al.* (2010) potvrzují, že existují rozdíly ve složení mikrobiomu v lidské populaci, a proto je snaha definovat tzv. „jádrový“ mikrobiom, který by poskytl důležité informace v pochopení jeho úlohy v patogenezi onemocnění napříč geograficky odlišnými populacemi. Avšak dle různých studií se i zdraví jedinci liší zastoupením jednotlivých druhů mikroorganismů, které osídlují stanoviště, jako je střevo, kůže

či vagína. I ve srovnatelném životním prostředí, podobné stravě či genetice zůstává tato diverzita mnohdy nevysvětlená (Huttenhower *et al.*, 2012).



Obr. 1 Příklady nemocí a biochemických procesů ovlivněných střevním mikrobiomem. Na obrázku je znázorněno, že střevní mikroflóra ovlivňuje činnost mozku, srdce, plic, cévní soustavy, žlučových cest a zejména pochody v tenkém a tlustém střevě. Upraveno podle Kinross *et al.* (2011).

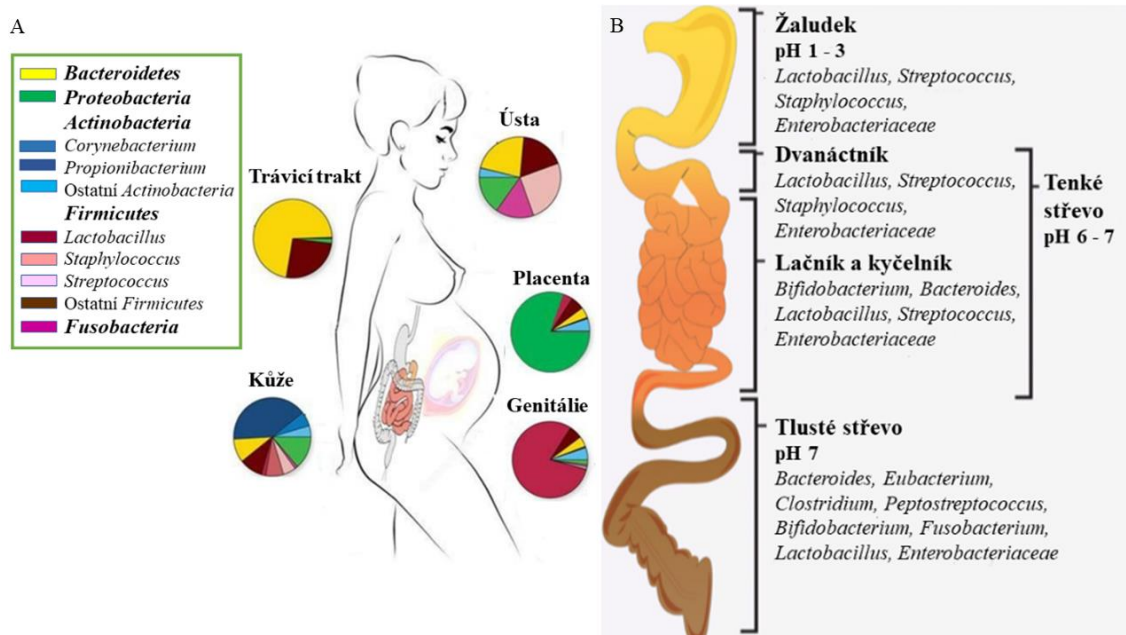
2.1.2 Klasifikace bakterií osídlující lidské tělo

Lidský mikrobiom je složen z kompletního komensálního, symbiotického a patogenního genomu mikroorganismů, které osídlují svého hostitele. Toto mikrobiální společenství zahrnuje bakterie, archea, kvasinky nebo vláknité houby. Bakterie přitom tvoří hlavní skupinu a jsou považovány za doménu života (Woese *et al.*, 1990; Backhed *et al.*, 2012).

Dle databáze z HMP (angl. Human microbiome project) bylo z 690 lidských mikrobiomů vyhodnoceno, že většina bakteriálních buněk se řadí do čtyř kmenů – *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Ještě do nedávné doby bylo velmi malé procento identifikovaných mikrobů kultivováno a tisíce druhů nebylo ani plně sekvenováno (Qin *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2010; Abubucker *et al.*, 2012; Flintoft, 2012; Zhou *et al.*, 2013).

Podle Obr. 2A střevní mikroflóru tvoří především kmen *Bacteroidetes*, z něhož 80 % bakteriálních druhů ve vzorku stolice tvoří druhy *Bacteroides* a *Prevotella*. Pro lepší definici a klasifikaci každého jedince vznikl koncept „enterotypových shluků“. Ty se vyhodnocují podle relativního množství každého specifického taxonu ve vzorcích výkalů a jejich metabolických drah (Arumugam *et al.*, 2011; Backhed *et al.*, 2012; Koren *et al.*, 2013). Výsledky metagenomického sekvenování potvrdily dominanci druhů *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) a *Ruminococcus* (enterotyp 3), a to u evropských, amerických i japonských subjektů. Tyto druhy se poté charakterizují příslušným taxonomickým složením a specifitou metabolické dráhy (Arumugam *et al.*, 2011).

Na Obr. 2A vidíme také hojně zastoupený kmen *Actinobacteria* na kůži a z něj především druhy *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a další nespecifické *Actinobacteria*. Kmen *Firmicutes* osídluje především vagínu a *Proteobacteria* placentu. Toto rozdělení souvisí s již zmíněným odlišným zastoupením mikroorganismů u dětí narozených přirozenou vaginální cestou a dětí narozených císařským řezem (Clarke *et al.*, 2019). Na Obr. 2B jsou zaznamenány kmeny bakterií, které nejvíce osídlují žaludek, tenké střevo a tlusté střevo.

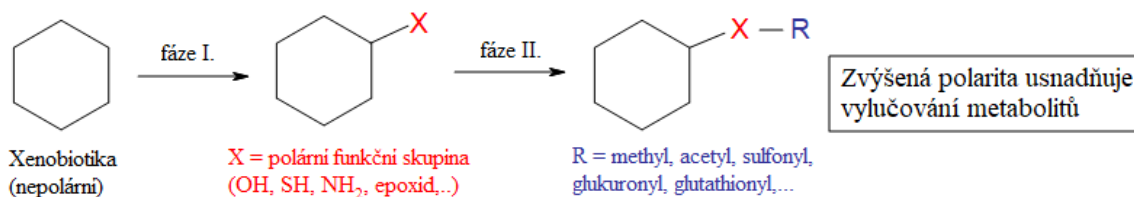


Obr. 2A Celkový přehled kmenů a druhů bakterií osídlujících lidské tělo. Pozornost je věnována trávicímu traktu, ústům, placentě, kůži a genitáliím. Převzato z Clarke *et al.* (2019). Na Obr. 2B je podrobněji znázorněn trávicí trakt, jsou zde popsány druhy bakterií osídlující žaludek, tenké střevo (dvanáctník, lačnick, kyčelník) a tlusté střevo. Převzato z Belizario a Napolitano (2015).

2.2 Metabolismus xenobiotik

Jako cizorodé látky neboli xenobiotika jsou označovány látky pro organismus cizí. Jsou to zejména různé složky výživy, doplňky stravy, ale i látky znečišťující životní prostředí a především léčiva. Principem metabolismu xenobiotik je přeměna nepolárních látek na látky polární, které se díky vyšší hydrofilitě snadněji vylučují z organismu. Proces probíhá obvykle ve dvou krocích: v I. fázi dochází k vnesení nebo odhalení polární funkční skupiny v molekule xenobiotika, v II. fázi polární metabolit vstupuje do konjugačních reakcí, kdy se na tento metabolit naváže endogenní látka, nejčastěji UDP-glukuronová kyselina, a dojde ke vzniku polárních konjugátů, které jsou pak vyloučeny z organismu močí nebo žlučí (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2012). Obecné schéma procesu metabolismu xenobiotik je popsáno na Obr. 3.

Mezi enzymy I. fáze patří především cytochromy P450, které jsou podrobně rozebírány v další kapitole, dále peroxidasy, karboxylesterasy, flavin monooxygenasy (FMO) a reduktasy (Wang *et al.*, 2016). Do II. fáze se řadí zejména transferasy, které přenášejí glukuronylové, methylové, acetylové nebo sulfátové a glutathionylové skupiny na metabolity I. fáze nebo přímo na polární xenobiotika (Jančová *et al.*, 2010).



Obr. 3 Obecné schéma metabolismu xenobiotik u člověka. Převzato z Koppel *et al.* (2017).

2.2.1 Cytochromy P450

2.2.1.1 Vlastnosti a mechanismus působení

Cytochromy P450 (označovány také jako CYP) jsou hemové enzymy vyskytující se v rostlinné i živočišné říši, od bakterií až po lidské buňky (Nelson *et al.*, 1996).

Pojem „cytochrom“ je běžné označení pro proteiny, které ve své struktuře obsahují hemové skupiny a účastní se transportu elektronů. Termín „P450“ byl poprvé použit v roce 1958 a charakterizoval pigment nacházející se v mikrosomální frakci potkaních jater. Ačkoli běžné hemoproteiny (např. peroxidasy či katalasy) jsou schopné absorbovat elektromagnetické záření s maximem při 420 nm, CYP v redukované formě (po vazbě oxidu uhelnatého) absorbuje záření s absorpčním maximem při 450 nm. Název P450 byl tedy vytvořen pro „pigment – 450“ (Klingenberg, 1958; Omura a Sato, 1964).

Struktura enzymu zahrnuje porfyrinový makrocyklus (protoporfyrin IX), který je vázán jednak hydrofobními silami, ale také prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu nacházející se přímo v aktivním centru enzymu. Jedná se o pátý ligand železa protoporfyrinu IX, šestým ligandem je atom kyslíku. Kyslíkový atom v základním stavu pochází z molekuly vody, v průběhu enzymové reakce je ale navázán substrát a místo kyslíkového atomu z molekuly vody se naváže molekulový kyslík. Ten se aktivuje a rozdělí, přičemž jeden jeho atom vstupuje do molekuly substrátu, druhý atom tvoří molekulu vody. Specifickou strukturou se tyto hemoproteiny odlišují od jiných hemoproteinů a získávají tak výjimečné vlastnosti (Anzenbacher *et al.*, 1989; Anzenbacher *et al.*, 1992; Hudeček *et al.*, 1998).

Evoluční vývoj těchto proteinů probíhal tzv. divergentní cestou, což znamená, že se za více než 1,5 miliardy let do současnosti z jediného genu cytochromu P450 archebakterií vyvinulo velké množství jednotlivých genů, které kódují odlišné vlastnosti cytochromů prokaryotních i eukaryotních organismů. Jedná se tedy historicky o velmi staré hemoproteiny, které se objevily dříve než např. hemoglobin (Nelson *et al.*, 1996).

Cytochromy P450 se účastní až 80 % reakcí I. fáze biotransformace xenobiotik a přibližně 65 - 70 % klinicky užívaných léčiv je metabolizováno tímto enzymatickým systémem (Zanger a Schwab, 2013). Lidské CYP se vyskytují v mnoha tkáních. Kromě kůže, ledvin, mozku, plic, srdce a gastrointestinálního traktu je to zejména v játrech, kde se soustřeďuje až 300 pmol·mg⁻¹ proteinu. Zde probíhá metabolismus největšího množství cizorodých látek. Na buněčné úrovni jsou cytochromy P450 u savců membránově vázané, obvykle v membráně endoplasmatického retikula a mitochondrií (Martignoni *et al.*, 2006).

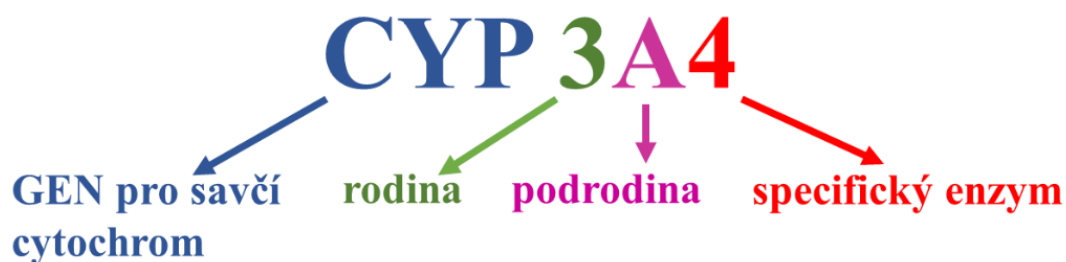
Enzymová aktivita cytochromů P450 v lidském organismu je ovlivněna celou řadou faktorů, kterými jsou např. věk, pohlaví a zdravotní stav jedince. Mnoho studií ukazuje, že pokud jsou játra porušena např. jaterní cirhózou, dochází ke sníženému průtoku krve játry, s tím spojené ztrátě funkce hepatocytů a snížené expresi enzymů CYP. Dále je prokázáno, že ženy metabolizují určitá léčiva rychleji než muži, zejména léčiva metabolizována enzymem CYP3A4 (tato podrodina je popsána v kapitole 2.2.1.2.3). Věk je také jedním z faktorů, které expresi a aktivitu těchto enzymů ovlivňují. Většina cytochromů P450 se vyvíjí během 1. roku dítěte, během života jedince dochází k mírnému zvýšení exprese a aktivity, ale v pozdějším věku jejich funkce naopak klesá (Zanger a Schwab, 2013).

Z medicínského hlediska je důležitá problematika lékových interakcí na úrovni metabolismu léčiv. Pokud je aplikováno dvě nebo více léčiv, které jsou metabolizovány stejnou formou CYP, může dojít ke kompetitivní inhibici příslušného enzymu s následkem zvýšení koncentrace daných léčiv v organismu a následně k toxickému efektu. Z lékařské praxe je známo, že nemusí docházet jen ke kompetitivním inhibicím, ale jsou popsány i další typy inhibice těchto enzymů. Jsou to např. ireverzibilní inhibice nazývané „mechanism based“, kdy je substrát (tzv. „sebevražedný substrát“) přeměňován daným enzymem na metabolit, který sám způsobí nevratnou enzymovou inhibici daného enzymu. Klinicky důležité inhibitory CYP3A4, působící jako sebevražedné substráty založené na tomto mechanismu, jsou např. látky s antibakteriálním působením (klaritromycin, erytromycin a isoniazid), nebo protinádorová léčiva (tamoxifen a irinotekan) (Zhou *et al.*, 2005). Další situací, která může změnit ustálenou hladinu léčiva, je změna exprese daného enzymu. Hladiny CYP se zvyšují (jsou indukovány) po podání řady látek. Patří mezi ně např. barbituráty, některé steroidy (dexametazon), rifampicin, ale také přírodní látky, např. extrakt z třezalky tečkované (Guengerich, 1997).

Dalším důležitým faktorem, který přispívá k rozdílné schopnosti jedinců metabolizovat cizorodé látky, zejména léčiva, je genetický polymorfismus. Obecně je polymorfismus definován jako odchylka v sekvenci DNA, která je přítomna nejméně v 1 % populace, často však bývá rozšířena u mnohem větší části jedinců. Pro genetický polymorfismus CYP jsou podstatné genové mutace. Jejich původem může být záměna, absence, vložení jednoho nebo více nukleotidů, duplikace nebo amplifikace genu. Vrozené vady DNA způsobují absenci, nemožnost indukce nebo tvorbu různých forem cytochromů P450 s pozměněnou katalytickou aktivitou. Jedinci v populaci jsou na základně metabolické aktivity CYP rozdělováni obvykle do tří kategorií. Populace homozygotů pro normální gen s dobrou metabolickou funkcí je označována jako tzv. rychlí metabolizátoři. Do skupiny tzv. ultrarychlých metabolizátorů řadíme jedince s duplikací či obecně amplifikací funkčního genu, což klinicky vede k zrychlenému metabolismu. Poslední skupina je charakterizována nízkou nebo žádnou enzymatickou aktivitou a tyto jedince označujeme jako pomalé metabolizátory (Weide a Steijns, 1999).

2.2.1.2 Názvosloví a dělení

Počet různých forem cytochromů P450 objevených ve všech organismech neustále narůstá. V roce 1996 Nelson *et al.* (1996) vytvořili první otevřený systematický seznam 481 genů P450 a 22 pseudogenů, objevených a nahlášených k 18. říjnu 1995 a přiřadili k nim příslušné přístupové číslo. Stejní autoři vytvořili názvosloví, které je používáno až doposud a je založeno na shodnosti aminokyselinové sekvence apoproteinu (pořadí aminokyselin). Obecně všechny cytochromy P450 tvoří nadrodinu neboli superrodinu označovanou jako CYP (Cytochrome P450), což je znázorněno na Obr. 4. Nadrodina se dělí na rodiny, kterým v označení připadá první arabské číslo za zkratkou CYP (CYP1A2). Aby mohly být cytochromy P450 zařazeny do stejné rodiny, musí podle autorů Spatzenegger a Jaeger (1995) vykazovat nejméně 40% homologii v sekvenci aminokyselin. Dále je v názvu vyznačena podrodina, a to velkým tiskacím písmenem za první arabskou číslicí (CYP1A2). Podle stejných autorů musí cytochromy P450 splňovat alespoň 60% homologii, aby byly zařazeny do stejné podrodiny. Na závěr se opět píše číslice, která značí individuální formu CYP neboli identifikuje konkrétní gen (CYP1A2).



Obr. 4 Schéma, podle kterého jsou označovány a zapisovány jednotlivé formy cytochromů P450.

Lidský genom obsahuje 57 genů pro cytochromy P450 a konkrétně metabolismu xenobiotik se účastní 15 forem CYP. V játrech jsou nejvíce exprimované formy CYP3A4, 2C9, 2C8, 2E1 a 1A2. V menší míře se zde vyskytují formy CYP2D6, 2B6, 2C19 a 3A5 a extrahepaticky jsou exprimovány především formy CYP2J2, 1A1 a 1B1. Společnou a velmi významnou vlastností těchto enzymů je široká a překrývající se substrátová specifita (Zanger a Schwab, 2013).

Přehled typických lidských cytochromů P450 metabolizujících xenobiotika je znázorněn v Tab. 1. K příslušnému CYP je přiřazena tkáňová lokalizace, typický substrát a induktor. Převzato z Cytochrome P450 Database; Guengerich (1995); Raunio *et al.* (1995).

Tab. 1 Lidské cytochromy P450 metabolizující xenobiotika a léčiva. V tabulce jsou zapsány jednotlivé CYP, jejich lokalizace v těle a příslušné typické substráty a typické induktory.

CYP	Lokalizace v těle	Typický substrát	Typický induktor
1A1	plicce, játra, mozek, GIT*, lymfocyty, srdce	PAH**	PAH, dioxiny
1A2	játra	aromatické aminy, PAH, kofein	PAH, β-naftoflavon, kouř
1B1	kůže, mozek, srdce, plicce, placenta, játra, ledviny, GIT, slezina	PAH	dioxin
2A6	játra	kumarin, steroidy	barbituráty, dexamethason
2B1/2	mozek	morfin	nikotin
2B6	játra, srdce	nikotin	barbituráty
2C8	játra, ledviny	retinoidy, taxol	?
2C9/10	játra	diklofenak, tolbutamid	barbituráty, rifampicin
2C19	játra, srdce	(S)-mefenitoin, omeprazol, diazepam	barbituráty, rifampicin
2D6	játra, mozek, srdce	antidepresiva, β-blokátory	-
2E1	játra, plicce, mozek, endotel, srdce, kostní dřeň	ethanol, nitrosaminy, acetaminofen	ethanol, hladovění
2F	plicce	kumarin	?
3A4/5	játra, GIT, ledviny, plicce, mozek, endotel, placenta, lymfocyty	blokátory vápenatých kanálků, cyklosporiny, acetaminofen, taxol, steroidy	steroidy, barbituráty
3A7	plod, placenta, (játra)	různé, podobně CYP3A4	steroidy, barbituráty
4A9/11	ledviny	masné kyseliny	klofibrát
4B1	plicce, placenta	?	?
4F2/3	ledviny	deriváty kyseliny arachidonové	?

*GIT – gastrointestinální trakt, **PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky

2.2.1.2.1 Podrodina CYP1A, CYP1B

Rodina CYP1 zahrnuje u člověka CYP1A1, 1A2 a 1B1. CYP1A1 a 1B1 jsou důležité enzymy podílející se na metabolismu xenobiotik, ale při metabolismu léčiv je jejich úloha poměrně malá. Oba dva tyto enzymy jsou významně indukované ligandy, které se vážou na aryl uhlovodíkový receptor (AhR). Příkladem takových ligandů je dioxin nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. Tyto látky jsou zároveň substráty těchto enzymů.

Všechny enzymy rodiny CYP1 jsou si velmi podobné, katalyzují podobné reakce, ale liší se lokalizací ve tkáních. CYP1A2 se u lidí ve vyšších hladinách exprimuje

v játrech, kde se jeho koncentrace odhaduje pomocí hmotnostní spektrometrie zhruba od 18 do 25 pmol·mg⁻¹ mikrosomálního proteinu (Kawakami *et al.*, 2011; Ohtsuki *et al.*, 2012). Naopak CYP1A1 a CYP1B1 se u lidí exprimují v játrech v mizivých koncentracích a jejich vysoké zastoupení je v jiných tkáních (Guengerich a Shimada, 1993).

Krystalová struktura CYP1A2 vykazuje dle autorů Sansen *et al.* (2007) poměrně objemné aktivní místo, díky čemuž preferuje planární aromatické uhlovodíky jako potenciální substráty (kavita aktivního místa je však mnohem menší ve srovnání s CYP3A4). Příkladem typických substrátů těchto enzymů jsou prokarcinogeny, jako jsou arylareny, nitroareny, arylaminy a zejména benzo(a)pyren. CYP1A2 metabolizuje přibližně 10 % léčiv, např. analgetika a antipyretika (acetaminofen, fenacetin nebo lidokain), antipsychotika (clozapin) a antidepressiva (duloxetin) (Lobo *et al.*, 2008).

2.2.1.2.2 Podrodiny CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E

Do rodiny CYP2 patří několik důležitých cytochromů P450 podílejících se na metabolismu xenobiotik. Vyskytují se v játrech, ale i v dalších orgánech.

CYP2A

U člověka je typickým představitelem podrodiny CYP2A enzym CYP2A6. Je lokalizován zejména v játrech (zde tvoří až 4 % z přítomných cytochromů P450). Substráty tohoto enzymu jsou mnohdy endogenní látky důležité pro lidské zdraví, například bilirubin (Abu-Bakar *et al.*, 2012). CYP2A6 se významně účastní metabolismu nikotinu. V prvním kroku přeměny nikotinu na kotinin se podílí asi z 90 % (společně s CYP2B6). Při dalším metabolickém kroku, kdy je kotinin hydroxylován na 3'-hydroxykotinin, je popsána 100% účast CYP2A6 (Raunio a Rahnasto-Rilla, 2012; Tanner a Tyndale, 2017).

Z léčiv CYP2A6 metabolizuje např. efavirenz, antiretrovirální léčivo používané k prevenci a k léčbě AIDS. Jiným příkladem léčiva metabolizovaného za účasti CYP2A6 je tegafur. Jedná se o proléčivo používané při léčbě různých druhů rakoviny, které je primárně metabolizováno CYP2A6 na aktivní metabolit 5-fluorouracil. Vzhledem k tomu, že tegafur má úzké terapeutické okno, je pro zajištění účinnosti léčby a pro zabránění toxicitě důležité vždy vyhodnotit změny metabolismu tegafuru, které

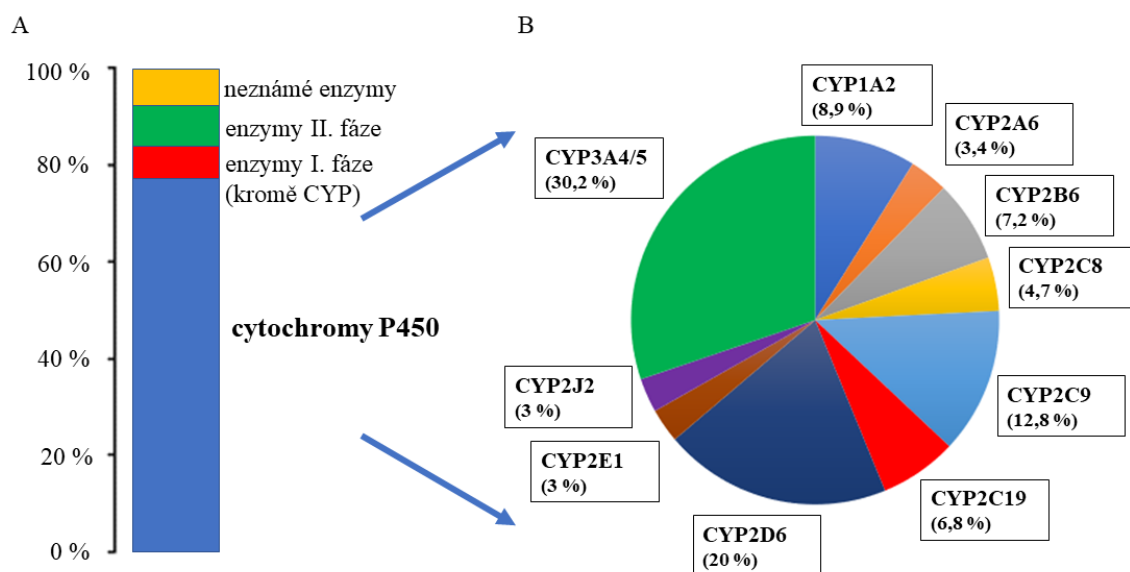
mohou být důsledkem změny aktivity enzymu CYP2A6, aby bylo zajištěno, že bude produkováno dostatečné množství aktivního 5-fluoruracilu (Komatsu *et al.*, 2000).

CYP2B6

CYP2B6 se vyskytuje v játrech v menším množství než CYP2A6, ale mezi jeho substráty patří celá řada klinicky důležitých léčiv, chemických látek znečišťujících životní prostředí, pesticidy a mnoho dalších. Jako příklady substrátů tohoto enzymu je možné uvést protinádorové léčivo cyklofosfamid, antimalariální artemisinin nebo anestetika propofol a ketamin (Zanger *et al.*, 2007; Turpeinen a Zanger, 2012). Autoři Kreth *et al.* (2000) popisují účast CYP2B6 (kromě CYP1A2 a 2C19) v metabolismu uměle připravované drogy „extáze“ (MDMA - 3,4-methylenedioxyamfetamin), jejíž biotransformací mohou vznikat neurotoxické metabolity.

CYP2C

Významné zastoupení v lidských tkáních představují cytochromy P450 z podrodiny CYP2C. U lidí byly identifikovány čtyři členové této podrodiny: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. CYP2C9 je důležitý v metabolismu některých terapeuticky používaných léčiv, zejména antikoagulačního léčiva warfarinu a řady nesteroidních protizánětlivých léčiv (Lee *et al.*, 2002). Mezi substráty podrodiny CYP2C19 patří řada běžně předepisovaných léků - včetně antiepileptik, jako je S-mefenytin a diazepam, inhibitorů protonové pumpy, jako je omeprazol, a dalších léků, jako jsou antidepresiva první a druhé generace, progesteron či melatonin (Brosen, 2004). Typickým znakem této podrodiny je výrazný genetický polymorfismus, který komplikuje využití určitých léčiv (Guengerich, 1995).



Obr. 5 Znárodnění procentuálního zastoupení jaterních enzymů. A Jaterní enzymy zahrnují enzymy I. fáze biotransformace xenobiotik (peroxidasy, karboxylesterasy, (FMO) flavin monooxygenasy, reduktasy), z nichž velkou část tvoří cytochromy P450, na obrázku označeny samostatně (modrá část), dále enzymy II. fáze biotransformace xenobiotik (transferasy) a neznámé enzymy. Upraveno podle Zanger *et al.* (2008). B Procentuální zastoupení jednotlivých isoform CYP v játrech. V játrech se vyskytují zejména CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2 a CYP3A4/5. Upraveno podle Zanger a Schwab (2013).

CYP2D

Nejdůležitějším lidským cytochromem P450 z rodiny CYP2D je CYP2D6, jehož aktivita se u různých jedinců liší, zejména z důvodu genetického polymorfismu (Zanger *et al.*, 2001). V lidských játrech se CYP2D6 vyskytuje v menším množství, nachází se však také v plicích nebo centrální nervové soustavě. Mezi molekuly, které jsou substráty tohoto enzymu, se řadí mnoho klinicky používaných léčiv, jako jsou například antiarytmika (např. propafenon), antidepresiva druhé generace (např. amitriptylin), beta-blokátory (např. bufuralol), opioidní analgetika nebo protirakovinná léčiva (Zanger *et al.*, 2008; Stingl *et al.*, 2013).

CYP2E1

Poslední podrodinou je CYP2E1. Tento cytochrom P450 je u člověka indukován v mnoha tkáních za různých patologických stavů, včetně diabetu, alkoholismu, nealkoholického onemocnění jater nebo obezity (Caro a Cederbaum, 2004; Aubert *et al.*, 2011). Dle publikace Vieira *et al.* (1996) je jeho obsah nezjistitelný v játrech plodu, protože se jeho exprese a aktivita zvyšují až během několika hodin

po narození. Mezi typické substráty CYP2E1 patří molekuly s nízkou molekulovou hmotností, zejména organická rozpouštědla, kterými jsou například ethanol a aceton. Mezi další substráty patří chlorzoxazon, paracetamol, průmyslové chemické látky a prokarcinogeny (Bolt *et al.*, 2003; Lu a Cederbaum, 2008). Zajímavostí je, že se ethanol prostřednictvím CYP2E1 může přeměňovat na reaktivní formy kyslíku (ROS), které se v konečném důsledku mohou podílet na poškozování jaterních buněk (Caro a Cederbaum, 2004).

2.2.1.2.3 Podrodina CYP3A4

Mezi nejdůležitější lidské cytochromy P450 patří CYP3A4. Důvodem jeho významné role v metabolismu cizorodých látek je vysoký obsah ve tkáních (zhruba 30 % celkového obsahu CYP). Největší množství CYP3A4 je lokalizováno v játrech, významné množství se nachází také ve střevě a v dalších orgánech. Význam CYP3A4 je dán také díky početnému množství substrátů, které přeměňuje. Odhaduje se, že se podílí na metabolických přeměnách více než poloviny léčiv (zhruba 52 %), které probíhají prostřednictvím cytochromů P450. Předpokládá se, že jeho prvotní úloha spočívala ve zprostředkování metabolismu a přeměně endogenních steroidů v játrech a dalších orgánech, jako je mozek, střeva apod. (Thummel a Wilkinson, 1998).

Podrodina CYP3A4 se nachází na chromozomu 7q22.1 a má velikost 221 kb. Patří do rodiny CYP3, která u člověka obsahuje čtyři geny – CYP3A4, 3A5, 3A7 a 3A43. Na rozdíl od lidských forem například myší rodina CYP3 obsahuje 7 genů plné délky. Lidské a myší geny mezi sebou netvoří žádné ortologní páry, což poukazuje na myšlenku, že ve společném předkovi existoval pouze jediný gen CYP3A4, který během předešlých 75 miliónů let expandoval zcela nezávisle (Nelson *et al.*, 2004).

Jak již bylo zmíněno, podrodina 3A4 se podílí zejména na metabolismu léčiv. Aktivní místo CYP3A4 je poměrně velké a flexibilní, díky čemuž dokáže metabolizovat malé i velké molekuly, převážně lipofilní povahy (Scott a Halpert, 2005; Hendrychová *et al.*, 2011). Z řady menších molekul, které jsou substráty tohoto enzymu, můžeme uvést např. ifosfamid, tamoxifen, statiny, opiáty či antidepressiva. Příkladem molekul o velké molekulové hmotnosti jsou imunosupresiva, konkrétně cyklosporin A a takrolimus, dále makrolidová antibiotika (například erytromycin) a v neposlední řadě protinádorová léčiva zahrnující taxol. Tento cytochrom P450 se podílí také na metabolismu (převážně hydroxylačních reakcích) endogenních steroidů –

testosteronu, progesteronu, kortizolu, žlučových kyselin a dalších. I pro měření aktivity tohoto enzymu *in vitro* (a v některých případech *in vivo*) se používají specifické substráty léčiva, např. midazolam, erytromycin, alprazolam či dextrometorfan (Fuhr *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2007). Procentuální zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v játrech je znázorněno na Obr. 5.

2.3 Metabolismus xenobiotik střevními bakteriemi

Střevní bakterie mají velký metabolický potenciál. Každá úvaha o metabolismu xenobiotik střevními bakteriemi musí být chápána v kontextu se souběžným a často konkurenčním metabolismem xenobiotik probíhajícím v lidském organismu, probraným v kapitole 2.2.

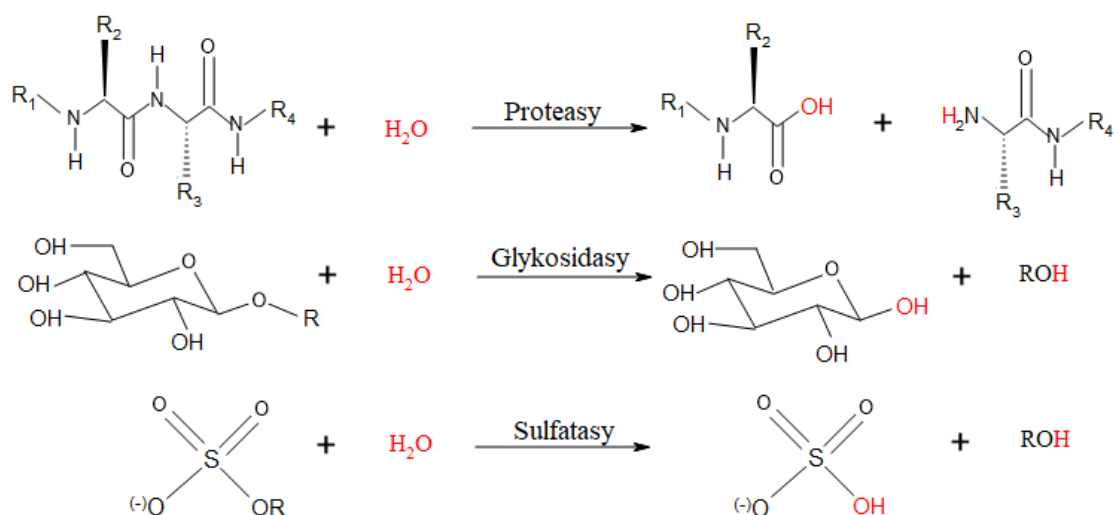
Sloučeniny aplikované perorálně vstupují přes horní gastrointestinální trakt (GIT) do tenkého střeva, kde mohou být modifikovány trávicími enzymy a absorbovány hostitelskými buňkami (Wang *et al.*, 2016). Snadno absorbovaná xenobiotika procházejí přes střevní epitelové buňky, kde mohou být biotransformovány hostitelskými enzymy před vstupem do jater portální žilou. V játrech dochází k dalším metabolickým procesům za účasti jaterních enzymů a vzniklé metabolity vstupují přes oběhový systém do tkání a ovlivňují distální orgány.

Xenobiotika, která nebyla při průchodu předcházejícími oddíly gastrointestinálního traktu absorbována, procházejí z tenkého do tlustého střeva, kde podléhají metabolismu za účasti střevních bakterií. V rámci rozmanitého střevního mikrobiomu bakterie modifikují přijímané substráty širokou škálou enzymových reakcí. Zatímco enzymy hostitele využívají především reakce první a druhé fáze metabolismu xenobiotik (tj. funkcionalizační a konjugační chemické reakce, jako hydroxylace, oxygenace, dealkylace, glukoronidace, sulfatace atd., viz kap. 2.2), střevní mikroorganismy primárně využívají hydrolytické a redukční reakce. Rozdíly jsou dány částečně fyziologickými a částečně evolučními aspekty (Sousa *et al.*, 2008).

2.3.1 Hydrolytické reakce

Střevní mikrobiom využívá hydrolytické reakce ke štěpení velkých molekul substrátů na malé produkty, které mohou být dále metabolizovány. Hydrolasy katalyzují rozštěpení vazby v molekule substrátu za účasti vody. Nejvýznamnějšími a nejčetnějšími hydrolasami v GIT traktu jsou proteasy, glykosidasy a sulfatasy.

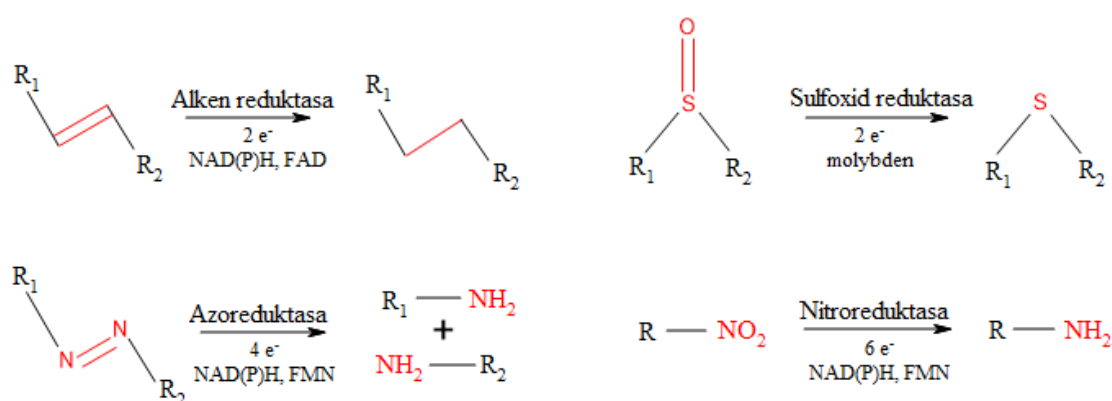
Proteasy se podílejí na štěpení peptidové vazby spojující aminokyseliny v polypeptidovém řetězci. Glykosidasy hydrolyzují glykosidové vazby za vzniku volných sacharidů a sulfatasy štěpí sulfátové estery tvořené např. hostitelským metabolismem II. fáze. Produkty hydrolytických reakcí (např. sacharidy, aminokyseliny) značně přispívají k mikrobiálnímu růstu ve střevech (Wang *et al.*, 2015). Obecné schéma hydrolytických reakcí je znázorněno na Obr. 6.



Obr. 6 Obecné schéma hydrolytických reakcí pomocí proteas, glykosidas a sulfatas. Převzato z Koppel *et al.* (2017).

2.3.2 Redukční transformace

Střevní mikroorganismy dokážou za účasti enzymů redukovat celou řadu funkčních skupin, mezi které patří například alkeny, α,β -nenasyčené karboxylové kyseliny, nitrosloučeniny, N-oxidy, azoskupiny či sulfoxidové skupiny. Reduktasy využívají různé kofaktory (např. $\text{NADH}+\text{H}^+$, NADPH , klastry Fe-S, hem, molybden) k přenosu elektronů či protonů k substrátům. Redukcí se obvykle mění náboj, elektrofilita a polarita sloučenin, což v konečném důsledku ovlivňuje životnost a aktivitu metabolitů (Lavrijsen *et al.*, 1995). Obecné schéma redukčních transformací je znázorněno na Obr. 7.



Obr. 7 Znázornění reakcí redukční transformace. V rovnici jsou znázorněny také kofaktory, využívané k přenosu elektronů či protonů k substrátům. Převzato z Koppel *et al.* (2017).

2.3.3 Vliv metabolismu střevních bakterií na účinnost léčiva

Metabolismus zprostředkovaný střevními bakteriemi může ovlivnit účinnost podávaných léčiv mnoha způsoby. V prvním případě je léčivo tzv. proléčivem (angl. prodrug), které je farmakologicky neúčinné a teprve prostřednictvím enzymů střevních mikroorganismů je biotransformováno na farmakologicky aktivní léčivo. Klasickým příkladem je antibakteriální léčivo protosil, které bylo prvním příkladem tvorby aktivního species, sulfonamidu (sulfanilamidu) redukcí azoskupiny v gastrointestinálním traktu (Gingell a Bridges, 1973) nebo podobně lék sulfasalazin, modifikovaný na aktivní protizánětlivou kyselinu 5-aminosalicylovou (Houston *et al.*, 1982).

V druhém případě může metabolismus zprostředkovaný střevními bakteriemi způsobit degradaci léčiva nebo změnu vlastností hostitelských enzymů, které později léčivo metabolizují. Příkladem je lék digoxin, ze skupiny srdečních glykosidů, který hraje nezastupitelnou roli v léčbě srdečního selhání. Prostřednictvím enzymů střevní mikroflóry se může přeměnit na neaktivní metabolit dihydrodigoxin (Vick *et al.*, 1957).

Některé studie potvrzují hypotézu, že naopak samotné působení léků může mít vliv na složení a funkci střevní mikroflóry, a tím i na průběh určitých onemocnění. Jedním z případů je protinádorové chemoterapeutikum cyklofosfamid. Léčivo vyvolává translokaci několika druhů gram-pozitivních bakterií do sekundárních lymfoidních orgánů, kde stimulují tvorbu specifických pomocných a paměťových T-buněk, hrající důležitou roli v imunitním systému (Viaud *et al.*, 2013).

I přes to, že se během několika uplynulých let, díky pokročilé technologické inovaci, dosáhlo velikého pokroku v odhalení složitého vztahu mezi hostitelským a střevním metabolismem léčiv, dosavadní úroveň znalostí zatím neumožňuje využít tyto znalosti pro racionální design terapie a tzv. personalizaci medicíny, která se soustředí na pacienta jako jednotlivce a mohla by zajistit splnění základního cíle personalizované farmakoterapie, tj. požadavek, aby „správné léčivo bylo podáno správnému pacientovi ve správné dávce“ (Dapito *et al.*, 2012).

2.4 Modely pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem xenobiotik

Pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem xenobiotik *in vivo* se využívají (ke srovnání s konvenčními modely) připravená laboratorní zvířata

s žádnou, pozměněnou, resp. definovanou střevní mikroflórou – tzv. gnotobiologické modely.

V oblasti gnotobiologie se tedy pro experimenty využívají zvířata bezmikrobní (GF – z angličtiny „germ-free“), která kompletně postrádají mikroorganismy uvnitř těla i na pokožce, a dále GF zvířata po inokulaci specifickým známým mikroorganismem (jedním nebo i více druhů). Tyto modely se poté porovnávají s kontrolními zvířaty, u nichž nedošlo ke změně střevního mikrobiomu.

Přesnost GF technologie spočívá ve schopnosti kontrolovat prostředí, ve kterém se organismus vyvíjí. K výchově GF zvířat je nutné mláďata chirurgicky oddělit od matčiny dělohy císařským řezem nebo hysterektomií, čímž se zabrání kontaktu s mikroorganismy přítomnými na kůži či ve vagíně matky. Poté mláďata vyrůstají v kontrolovaném sterilním prostředí. Alternativní možností je proces přenosu očištěných embryí do GF samice za dobře kontrolovaných podmínek. GF samice přijme embrya, poté přirozeně porodí mláďata do sterilního prostředí a stará se o ně, čímž se zajistí míra jejich přežití. Procesem křížení se může kolonie rozšířit a noví jedinci se rodí a vyrůstají ve zcela sterilních podmínkách jako jejich předci (Falk *et al.*, 1998).

Výchova ve sterilním prostředí umožňuje GF jedince inokulovat jedním, dvěma nebo více mikroorganismy, které jsou v zájmu příslušného studia. Kromě toho je možné přenést zjednodušený nebo kompletní lidský mikrobiom do GF hostitele s cílem vytvořit model podobný lidskému mikrobiomu (Goodman *et al.*, 2011).

Ačkoli tyto metody nabízejí vhodnější a realističtější prostředí než *in vitro* metody, je správné použít kombinaci různých metod, protože ideální model pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem xenobiotik neexistuje.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Abcam (Velká Británie): 1'-hydroxymidazolam; midazolam

Acris (Německo): primární a sekundární protilátka pro CYP2C

BD Genstest (Massachusetts, USA): 1'-hydroxybufuralol

BioRad (Kalifornie, USA): standard proteinu pro elektroforézu

Cerrilant Corporation (Texas, USA): 4'-hydroxydiklofenak

Fluka (Švýcarsko): fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Lachema (Česká republika): dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4); uhličitan sodný (Na_2CO_3); dithioničitan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Lach-Ner (Česká republika): 2-propanol; dihydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4); ethanol; hydroxid draselný (KOH); hydroxid sodný (NaOH); chlorid sodný (NaCl); kyselina fosforečná (H_3PO_4); kyselina octová (CH_3COOH); síran hořečnatý (MgSO_4)

Linde Technoplyn (Česká republika): dusík, oxid uhelnatý (CO)

Merck (Česká republika): dichlormethan; methanol

Probior (Německo): SOD Assay Kit-WST

Roche (Česká republika): tablety s inhibitory proteas (EDTA free Complete Protease Inhibitor Cocktails Tablets)

Roth (Německo): Tris (trishydroxymethylaminomethan)

Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA): primární a sekundární protilátky pro formy CYP1A, CYP2B, CYP2D a CYP3A; β -aktin

Santa Cruz Biotechnology (Kalifornie, USA): chemiluminiscenční kit pro detekci protilátek

Sigma Aldrich (Česká republika): 2-hydroxymetronidazol; 7-hydroxykumarin; 2-merkptoethanol; bufuralol; desmethyl diazepam; diazepam; diklofenak; dimethylsulfoxid (DMSO); dodecylsulfát sodný (SDS); ethoxyresorufin; glycerol; isocitrát; isocitrátdehydrogenasa (IDH); komerční testovací souprava pro stanovení celkových proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA); kumarin; kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA); kyselina chloristá (HClO_4); metronidazol; nikotinaminadenindinukleotidfosfát (NADP^+); paracetamol; resorufin; sacharosa

Sigma Aldrich (Missouri, USA): chlorid draselný (KCl); chlorid vápenatý (CaCl_2); hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)

Serva (Německo): hovězí sérový albumin (BSA)

VWR International (Česká republika): acetonitril (ACN)

3.1.2 Přístroj a vybavení

Analytické váhy AX 105 Delta-Range (Mettler-Toledo, Švýcarsko); analytické váhy GR-202 (Schoeller Instruments, Česká republika); analytické váhy 4503 MP 6E (Santorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); centrifuga BR4i (Jouan, Francie); centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Německo); centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Německo); chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle LaborTechnik GmbH, Německo); chlazená centrifuga Mikro 22R (Hettig Zentrifugen, Německo); chlazená centrifuga Rotina 38R (Hettig Zentrifugen, Německo); Echo Liquid Handler (Labcyte, Irsko); LightCycler 1536 Instrument (Roche, Švýcarsko); magnetická míchačka s ohřevem IKA RH digital (Merci, Česká republika); NanoPhotometr® N60 (Implen, Německo); pH metr HI 2211 (Hanna instruments, Česká republika); Precellys Evolution (Bertin Technologies, Maryland, USA); RNAsa Mini Kit (Qiagen, Německo); SNAP i.d.® Protein Detection System (Merck Millipore, Česká republika); spektrofotometr UV-VIS TECAN Infinite M200 (Schoeller Instruments, Česká republika); spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko); spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000 (Varian, Austrálie); systém HPLC s UV a fluorescenční detekcí, Shimadzu LC-10A Prominence, software CLASS-VP (Shimadzu, Japonsko); system HPLC s UV a fluorescenční detekcí, Shimadzu LC-20A Prominence, software LC-Solution (Shimadzu, Japonsko), TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Česká republika); termomixér Comfort (Eppendorf, Německo); Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Švýcarsko); Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systém (Biorad, Česká republika); třepací inkubátor BIOSAN ES 20 (Merci, Česká republika); třepací vodní lázeň (Grant Instruments, Velká Británie); ultracentrifuga Beckman Optima™ LE-80K (Beckman, Minnesota, USA); ultrazvuková čisticí jednotka Elmasonic S 10 (H) (Elma-Ultrasonic, Německo); ultrazvuková UP 200S (Hielscher, Německo); ultrazvuková lázeň UCC4 (Notus-Powersonic, Slovensko); Vortex Reax top (Heidolph Instruments, Německo); zařízení pro přípravu ultračisté vody Watrex Ultrapur (Watrex, Česká republika).

3.2 Metody

3.2.1 Navržení experimentu

Pro experimenty byly použity vzorky jaterní tkáně a mikrosomální frakce izolované z homogenátu myších jater.

Jako zvířecí model byly použity laboratorní myši, které byly pro první experiment rozděleny do tří skupin. Do první skupiny, SPF myši (specific pathogen free), byly zahrnuty myši s normálním nezměněným mikrobiomem. Do druhé skupiny, GF myši (germ-free), byly zahrnuty myši, u kterých byly zcela postrádány mikroorganismy. Poslední skupinou byly myši SPF IL-10-KO + kolitida, u kterých bylo metodou Knock-out dosaženo inaktivace tvorby interleukinu 10 (IL-10) a spontánního vytvoření zánětu. IL-10 je protizánětlivý cytokin, který dokáže regulovat a inhibovat procesy podporující zánět (Fiorentino *et al.*, 1989) a je produkován širokou škálou imunitních buněk, jako jsou regulační T- a B-lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, eosinofily, neutrofilové a epitelální buňky (Al-Robaee *et al.*, 2008; Keubler *et al.*, 2015). Knock-out metodou dochází k inaktivaci určitého genu v genomu studovaného organismu, a pokud je tedy inaktivovaný IL-10, může u experimentálních zvířat dojít ke spontánnímu vytvoření zánětu. Podle autorů Sellon *et al.* (1998) jsou běžné střevní bakterie v organismu nezbytné pro vytvoření spontánního zánětu u myši s deficitem IL-10. Tento experiment byl navržen také pro porovnání rozdílu mezi pohlavími, a proto byly všechny tři skupiny rozděleny zvlášť na samce a samice.

V druhém experimentu bylo cílem pozorovat změny enzymové aktivity a exprese vybraných jaterních cytochromů P450 v časových intervalech po jednorázové aplikaci léčiva metronidazolu. Odběr vzorků byl proveden po intragastrickém podání metronidazolu v časech 0h, 2h, 6h a 24h. Experimentální zvířata byla rozdělena do dvou skupin. Jako kontrolní skupina byli zvoleni SPF samci (tělesná váha 21,85 – 29,65 g; váha jater 0,8128 – 1,342 g). Pro porovnání byli zvoleni GF samci (tělesná váha 20,86 – 25,42 g; váha jater 0,7894 – 1,0546 g).

Klinicky používané antibakteriální léčivo metronidazol, patřící do skupiny nitroimidazolových antibiotik, se běžně využívá k léčbě anaerobních protozoálních infekcí, infekcí způsobené *Helicobacter pylori*, a zejména k léčbě infekcí spojené s *Clostridium difficile* (Edwards, 1980). Modelovým zvířatům bylo podáváno 300 μ l infuzního roztoku o koncentraci 5 mg·kg⁻¹ zvířete.

3.2.2 Příprava biologického materiálu

Mikrosomy, váčkovité útvary, se získávají *in vitro* při rozbití endoplasmatického retikula. Ačkoli se za fyziologických podmínek v živých buňkách nevyskytují, je nutné provést jejich izolaci pro následné stanovení proteinové exprese a enzymové aktivity jednotlivých cytochromů P450. Právě v mikrosomální frakci jsou totiž CYP přítomny v nejvyšší koncentraci s ohledem na celou buňku.

Izolace mikrosomální frakce z homogenátu myších jater byla prováděna podle stanoveného protokolu (Lake, 1987).

Játra byla v kádince s homogenizačním pufrem rozstříhána pomocí nůžek. Pufr byl následně slit přes gázu a tímto způsobem byla játra promyta ještě dvakrát. Část promytých jater byla pomocí pinzety vložena do 15ti ml zkumavky, bylo přidáno zhruba 7 ml homogenizačního pufru a pomocí ponorného homogenizátoru byla játra homogenizována 3 x 10 s a poté byl homogenát přelit do 50ti ml centrifugační zkumavky. Stejným postupem byla homogenizována zbylá část jater a byla přidána do stejné 50ti ml zkumavky. Poté byl homogenát centrifugován (10 min, 5290x g, 4 °C). Supernatant byl následně slit do čisté 50ti ml centrifugační zkumavky a byl centrifugován (15 min, 15150x g; 4 °C). Dále byl opět supernatant slit do UC (ultracentrifugační) zkumavky, zkumavka byla doplněna až po okraj homogenizačním pufrem a byla uzavřena víčkem tak, aby uvnitř nedošlo ke vzniku vzduchové bubliny. UC zkumavky byly umístěny do ultracentrifugy a byly centrifugovány (60 min, 125 000x g, 4 °C). Po odlití supernatantu byl následně k sedimentu, čili k mikrosomální frakci, přidán promývací pufr, sediment byl setřen skleněnou tyčinkou a byl homogenizován s použitím Potter-Elvehjemova homogenizátoru (P-E). Po homogenizaci byl obsah přemístěn do čisté UC zkumavky, ta byla doplněna promývacím pufrem a uzavřena tak, aby uvnitř nedošlo ke vzniku vzduchové bubliny a v ultracentrifuze byla tkáň centrifugována (60 min, 125000x g, 4 °C). Na závěr byl sediment homogenizován pomocí P-E homogenizátoru s rehomogenizačním pufrem tak, aby byl celkový objem rehomogenizačního pufru 0,2násobkem váhy jater. Zhomogenizované mikrosomy byly rozpipetovány do mikrozkuvek a zmrazeny na -80 °C.

Použité roztoky:

Homogenizační pufr: 250 mmol·l⁻¹ sacharosa; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; úprava pH na hodnotu 7,4 pomocí NaOH.

Promývací pufr: 50 mmol·l⁻¹ Tris; 150 mmol·l⁻¹ KCl; úprava pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl.

Rehomogenizační pufr: 20 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 mmol·l⁻¹ EDTA, úprava pH na hodnotu 7,4 pomocí NaOH; 20% glycerol (v/v).

PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid): 0,2 mmol·l⁻¹ PMSF; rozpuštěno v isopropanolu; přidáno do homogenizačního a promývacího pufru před použitím.

3.2.3 Stanovení koncentrace cytochromů P450

Koncentrace cytochromů P450 v jaterní mikrosomální frakci byla měřena pomocí diferenční spektroskopie na spektrofotometru UV/VIS Cary 4000 a softwaru CaryWin podle protokolu autorů Schenkman a Jansson (1998).

Do zkumavky bylo napipetováno 1900 µl fosfátového pufru (K/PO₄ pH 7,4), 100 µl mikrosomů a bylo přidáno zhruba 2 – 5 mg dithioničitanu sodného (Na₂S₂O₄). Vše bylo na vortexu promícháno a rozděleno do dvou kyvet pro spektrofotometrické měření. Po tom, co byla zaznamenána základní linie (s redukováným vzorkem v obou kyvetách), byla mikrosomální frakce v první kyvetě 60 sekund probublána oxidem uhelnatým (CO) a bylo změřeno diferenční spektrum redukováného enzymu v komplexu s CO.

Použité roztoky:

Fosfátový pufr K/PO₄: 100 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; úprava pH na hodnotu 7,4 pomocí roztoku KOH.

3.2.4 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomální frakci bylo provedeno pomocí bicinchoninové metody (BCA). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA), pro měření byl použit roztok BCA (BCA Protein Assay kit A:B; 50:1; A = kyselina bicinchoninová; B = sulfát měďnatý). V přítomnosti proteinů v bazickém prostředí vzniká fialově zbarvený komplex, což je způsobeno chelatací měďného iontu molekulou BCA. Tento komplex absorbuje při 562 nm.

Podle Tab. 2 byla připravena kalibrační řada použitého standardu. Vzorky byly naředěny 100x ve fosfátovém pufru. Do 96-jamkové destičky bylo napipetováno 12,5 μ l roztoků kalibrační řady i vzorků mikrosomální frakce, do všech jamek bylo přidáno 100 μ l roztoku BCA a poté byla destička v termoboxu inkubována 30 min při 37 °C. Po inkubaci byla měřena absorbance vzorků na spektrofotometru UV-VIS, TECAN Infinite M200 při 562 nm.

Podle kalibrační řady byla vypočítána koncentrace proteinů v mikrosomální frakci.

Tab. 2 Kalibrační řada hovězího sérového albuminu.

Koncentrace kalibrační řady (mg·ml⁻¹)	BSA standart (μl)	fosfátový pufr (μl)
0	-	100
0,2	20	80
0,4	40	60
0,6	60	40
0,8	80	20
1	100	-

3.2.5 Izolace RNA z jater

Celková RNA byla izolována z myších střev nebo jater uložených v RNAlateru za použití kitu RNeasy Plus mini podle instrukcí výrobce.

Nejdříve byla připravena směs RLT plus pufru a 2-merkaptoethanolu (v poměru 1 ml : 10 μ l). 600 μ l této směsi bylo napipetováno do homogenizačních zkumavek Precellys a bylo k ní přidáno zhruba 30 mg zamražené tkáně. Vše bylo homogenizováno na přístroji Precellys (2 ml, 7200 rpm, cyklus 2 x 15 s, pauza 10 s). Aby bylo dosaženo odstředění vzniklé pěny, byl homogenát centrifugován na centrifuze Eppendorf mini spin (1 min, 11337x g) a lyzát byl přemístěn do mikrozkušavky s RNA-vazebnou kolonkou. Opět byla směs centrifugována na centrifuze Eppendorf mini spin (75 s, 11337x g), aby bylo dosaženo průchodu celého lyzátu přes kolonku. Poté byla kolonka odstraněna, k lyzátu bylo přidáno 600 μ l 70% (v/v) ethanolu, zhruba 600 μ l bylo přepipetováno do nové mikrozkušavky s RNA-vazebnou kolonkou a směs byla opět centrifugována na centrifuze Eppendorf mini spin (15 s, 6708x g). Tento krok byl opakován ještě jednou a poté byla RNA navázaná na kolonku promyta. Na kolonku bylo napipetováno 600 μ l RW1 pufru, byla provedena centrifugace (15 s, 6708x g), odpad na dně mikrozkušavky byl vylit. Následně bylo na kolonku dvakrát po sobě napipetováno 500 μ l RPE pufru a směs byla po každé centrifugována (po první 15 s, 6708x g, po druhé 2 min, 6708x g). Dále byla kolonka vložena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a byla provedena centrifugace (1 min, 14104x g). Na závěr byla kolonka opět vložena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, bylo na ni napipetováno 25 μ l RNase free water a byla provedena centrifugace (1 min, 6708x g). Poté byla kolonka vyhozena a vzorek v mikrozkušavce s celkovou RNA byl použit k dalším krokům.

Pomocí přístroje Nano Drop 1000 byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota izolované RNA při 260, 280 a 230 nm.

3.2.6 Reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Tab. 3 Složení a objem reakční směsi pro reverzní transkripci.

Reagencie	Objem [μ l]
Water, PCR Grade	14 - x
Reaction Buffer, 5x koncentrovaný	4,0
Template RNA	x
Celkový objem	18

Tab. 4 Protokol inkubace reverzní transkripce.

Teplota	Čas
42 °C	15 min
85 °C	5 min
65 °C	15 min
4 °C	
-15 až -25 °C	uchovat

Podle Tab. 3 byly smíchány látky o určitém objemu. X bylo vypočítáno z koncentrace RNA tak, aby byl použit 1 µg RNA. Směs byla zcentrifugována a byla ponechána inkubaci 5 min na ledu. Po inkubaci byly ke směsi přidány 2 µl Enzyme Mix (10x koncentrovaný) a pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis byla provedena reverzní transkripce RNA. Protokol inkubace je znázorněn v Tab. 4. Celkový objem směsi byl 20 µl.

Pro kvantifikaci enzymů CYP byla provedena analýza PCR v reálném čase. Měření vzorků bylo provedeno na přístroji LightCycler 1536 Instrument s použitím specifického testu TaqMan Gene Expression. Vzorky byly pipetovány pomocí automatického přístroje Labcyte Echo do 1536-jamkových destiček. Data byla vyhodnocena na základě metody „Delta-Delta Ct“ podle studie Livak a Schmittgen (2001) a byla vyjádřena jako násobek změny jednotlivých experimentálních skupin vůči kontrole. Jako vnitřní kontrola byly použity geny HPRT1 a 18S podle studie Matouskova *et al.* (2014).

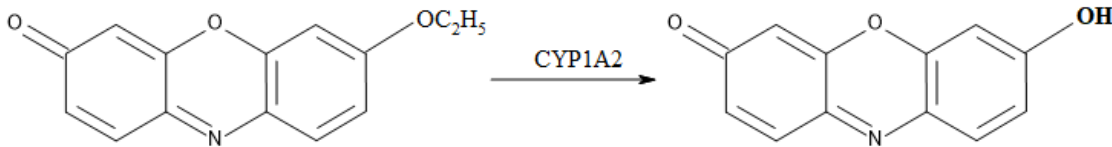
3.2.7 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem cytochromů P450

Enzymové aktivity jednotlivých cytochromů P450 byly měřeny v mikrosomální frakci biologického materiálu za použití specifických substrátů. Koncentrace produktů byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Aktivita jednotlivých forem CYP byla stanovena podle zavedených protokolů z publikace Phillips *et al.* (1998) a publikace Kronbach *et al.* (1989).

Reakční směs byla inkubována za určitých podmínek. Reakce byla zastavena příslušným činidlem, směs byla centrifugována a supernatant byl odebrán na stanovení produktu reakce pomocí HPLC.

V následujících tabulkách jsou zaznamenány studované CYP, specifické substráty pro jednotlivé formy CYP, vznikající metabolity, schéma přípravy reakční směsi a podmínky mobilní fáze.

Tab. 5 Schéma reakcí a reakčních směsí pro stanovení aktivity cytochromů P450 v mikrosomální frakci myšího homogenátu jater – metody používané pro lidské formy.

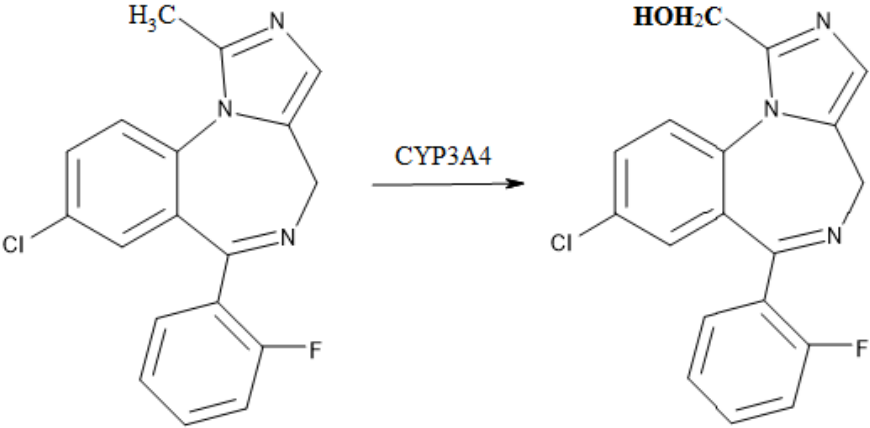
CYP1A2	
Substrát	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ethoxyresorufin
Metabolit	resorufin
Typ reakce	dealkylace
	
Mikrosomy	35 pmol P450
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 7,4)
NADPH generující systém	7,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP^+ ; 84,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ isocitrát; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	25 μl
Mikrosomy/pufr	20 μl
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ethoxyresorufin	26 μl
Preinkubace (3 min, 37 °C, 350 rpm)	
NADPH g. s.	29 μl
Inkubace (15 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	200 μl 100% methanol (v/v)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 (pH = 7) : 100% methanol (v/v) (58:42)
Průtok mobilní fáze	0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Eluce	izokratická
Nástřík vzorku	50 μl
Detekce	fluorescenční, Ex/Em 535/585 nm

CYP2B10	
Substrát	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pentoxyresorufin
Metabolit	resorufin
Typ reakce	dealkylace
Mikrosomy	35 pmol P450
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 7,4)
NADPH generující systém	7,9 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP^+ ; 84,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ isocitrát; 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	25 μl
Mikrosomy/pufr	20 μl
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pentoxyresorufin	26 μl
Preinkubace (3 min, 37 °C, 350 rpm)	
NADPH g. s.	29 μl
Inkubace (15 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	200 μl 100% methanol (v/v)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 (pH = 7) : 100% methanol (v/v) (58:42)
Průtok mobilní fáze	0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Eluce	izokratická
Nástřík vzorku	50 μl
Detekce	fluorescenční, Ex/Em 535/585 nm

CYP2C9	
Substrát	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diklofenak
Metabolit	4' - hydroxydiklofenak
Typ reakce	4' - hydroxylace
Mikrosomy	35 pmol P450
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 7,4)
NADPH generující systém	4,7 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP^+ ; 50,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ isocitrát; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	60 μl
Mikrosomy/pufr	54,5 μl
NADPH g. s.	77,5 μl
Preinkubace (5 min, 37 °C, 350 rpm)	
400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diklofenak	8 μl
Inkubace (25 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	50 μl 100% ACN (v/v) : CH_3COOH (94:6)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	MFA = 100% ACN (v/v) : 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HClO_4 (70% (v/v)) (30:70) MFB = 100% methanol (v/v)
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Eluce	gradientová
Nástřík vzorku	50 μl
Detekce	UV, 280 nm

CYP2C19	
Substrát	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diazepam
Metabolit	desmethyl diazepam
Typ reakce	demethylace
Mikrosomy	70 pmol P450
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 7,4)
NADPH generující systém	4,7 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP^+ ; 51,3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ isocitrát; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	65 μl
Mikrosomy/pufr	20 μl
NADPH g. s.	65 μl
Preinkubace (5 min, 37 °C, 350 rpm)	
400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ diazepam	50 μl
Inkubace (25 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	100 μl 100% ACN (v/v)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 2,9) : 100% ACN (v/v) (55:45)
Průtok mobilní fáze	1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Eluce	izokratická
Nástřík vzorku	50 μl
Detekce	UV, 229 nm

CYP2D6	
Substrát	1 mmol·l ⁻¹ bufuralol
Metabolit	1'-hydroxybufuralol
Typ reakce	1'-hydroxylace
Mikrosomy	67,3 pmol P450
Pufr	100 mmol·l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
NADPH generující systém	4,7 mmol·l ⁻¹ NADP ⁺ ; 51,3 mmol·l ⁻¹ isocitrát; 50 mmol·l ⁻¹ MgSO ₄ ; IDH (10 units·mg ⁻¹ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	30 µl
Mikrosomy/pufr	100 µl
1 mmol·l⁻¹ bufuralol	5 µl
Preinkubace (5 min, 37 °C, 350 rpm)	
NADPH g. s.	65 µl
Inkubace (25 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	20 µl 70% HClO ₄ (v/v)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	MFA = 100% ACN (v/v) : 2 mmol·l ⁻¹ HClO ₄ (70% (v/v)) (30:70) MFB = 100% ACN (v/v)
Průtok mobilní fáze	1,5 ml·min ⁻¹
Eluce	gradientová
Nástřík vzorku	5 µl
Detekce	fluorescenční, Ex/Em 252/302 nm

CYP3A4	
Substrát	28 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ midazolam
Metabolit	1'-hydroxymidazolam
Typ reakce	1'-hydroxylace
	
Mikrosomy	12,6 pmol P450
Pufr	100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 (pH 7,4)
NADPH generující systém	22,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NADP^+ ; 156,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ isocitrát; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4 ; IDH (10 $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu)
Schéma reakce	
Pufr	50 μl
Mikrosomy/pufr	20 μl
NADPH g. s.	20 μl
Preinkubace (5 min, 37 °C, 350 rpm)	
28 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ midazolam	10 μl
Inkubace (25 min, 37 °C, 350 rpm)	
Zastavení reakce	100 μl 100% methanol (v/v)
Centrifugace (10 min, 21255x g, 4 °C)	
Mobilní fáze	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CH_3COONa : 100% ACN (v/v) (64:36)
Průtok mobilní fáze	0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Eluce	izokratická
Nástřík vzorku	50 μl
Detekce	UV, 240 nm

3.2.8 Stanovení metronidazolu v plazmě

Koncentrace metronidazolu v plazmě biologického materiálu byla měřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Jako vnitřní standard byl použit 10 mmol·l⁻¹ paracetamol, kdy bylo 10 µl přidáno ke 130 µl plazmy (13:1). Poté byla plazma sražena 390 µl 100% methanolu (v/v) a směs byla centrifugována na centrifuze Eppendorf mini spin (10 min, 14104x g, 25 °C). 440 µl supernatantu bylo odebráno do skleněné zkumavky a pomocí dusíku bylo dosaženo odpaření organického rozpouštědla. Odparek byl rozpuštěn ve 130 µl mobilní fáze, opět byla směs centrifugována na centrifuze Eppendorf mini spin (10 min, 14104x g, 25 °C) a supernatant byl použit pro měření koncentrace metronidazolu.

Podmínky měření na HPLC:

Přístroj: HPLC Prominence systém; kolona HPLC RP-18.

Mobilní fáze: 10 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄ (pH = 4,65) : 100% ACN (v/v) (90:10).

Eluce: izokratická.

Doba analýzy: 9 min.

Retenční čas metronidazolu: 6,3 min (při vlnové délce 320 nm).

Detekce: UV 320 nm.

3.2.9 Western blot

Metoda Western blot byla použita pro detekci a částečnou kvantifikaci proteinů vybraných cytochromů P450.

Podle vypočtené koncentrace proteinů v kapitole 3.2.4 byly pro metodu Western blot vzorky přepočteny a naředěny na hodnotu koncentrace 2 µg·µl⁻¹ do objemu 250 µl. Ke vzorkům bylo přidáno 50 µl detekčního pufru a pro denaturaci byly zahřáty na teplotu 96 °C po dobu 5 minut. Potřebné TBS a TBS/T pufrы byly 10x naředěny do objemu 1l.

Separace proteinů byla provedena pomocí elektroforézy na 12% polyakrylamidovém gelu (v/v) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Vzorky byly po 20 µl napipetovány do jednotlivých jamek gelu a pro porovnání velikosti proteinů byly vedle vzorků napipetovány 2 µl standardu. Po proběhnutí elektroforézy v RUNNING pufru (30 mV 20 minut a dále 60 mV 30 minut) byl gel oříznut a opláchnut v promývacím TBS pufru. Poté byl umístěn do blotovací kazety a bylo provedeno přenesení proteinů na nitrocelulóзовou membránu. Po proběhnutí Western blotu byla membrána 3x5 min

opláchnuta v promývacím TBS/T pufru a pro blokování nespecifických vazeb byla umístěna do 5% sušeného mléka (w/v) na 1 hod (25 ml na každou membránu) a opět byla promyta 3x5 min v TBS/T pufru. Po promytí byla na membránu aplikována primární protilátka a membrána byla inkubována přes noc na třepacím inkubátoru při 4 °C.

Druhý den byla membrána 3x5 min promyta v TBS/T pufru a byl aplikován 1 µl sekundární protilátky společně s 0,5 g sušeného mléka a 10 ml TBS/T pufru. Následně byla membrána inkubována na třepacím inkubátoru 1 hod při laboratorní teplotě a poté byla promyta 3x5 min TBS/T pufrům. Na závěr byl smíchán detekční roztok A a B (Imunocruz:Santa cruz) v poměru 1:1 a 1 ml byl aplikován na 1 minutu na membránu. Detekce byla provedena pomocí světlocitlivého filmu v temné komoře.

Dle potřeby byly membrány přestripovány. Po promytí bylo na membránu aplikováno 200 ml 12% roztoku SDS (w/v) a byla inkubována 45 – 60 min. Poté byla membrána omyta v TBS/T pufru, byla blokována opět v 5% sušeném mléku (w/v) a následně byla přeblokována jinou primární a sekundární protilátkou.

Bloty byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ.

Použité roztoky:

RUNNING pufr: 1,5 mol·l⁻¹ Tris (pH 8,8).

TBS pufr (Tris-buffered saline): 100 mmol·l⁻¹ Tris, 0,9% NaCl (w/v).

TBST pufru (Tris-buffered saline/tween): 10 mmol·l⁻¹ TBS, 20 mol·l⁻¹ tween.

3.2.10 Statistická analýza

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD nebo průměr ± SEM. Statistická významnost genové exprese byla stanovena pomocí nepárového Studentova t-testu a softwaru Statistica 12 (Statsoft, Česká republika). Rozdíly byly považovány za statisticky významné při p<0,05. Kvůli nedostatku materiálu nebylo možné vyhodnotit statistickou významnost u enzymových aktivit.

4 Výsledky

4.1 Změny aktivity a exprese vybraných jaterních cytochromů P450 u myši s pozměněným mikrobiomem

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, střevní mikrobiom ovlivňuje řadu biochemických procesů a hraje důležitou roli v průběhu mnoha lidských onemocnění. I přesto nejsou v současné době zcela objasněny molekulární mechanismy působení bakterií na lidský organismus a metabolismus xenobiotik, zejména léčiv. V této diplomové práci je proto největší pozornost věnována cytochromům P450 (dále jen CYP), hlavním enzymům I. fáze biotransformace xenobiotik.

Expresi mRNA byla stanovena v jaterní tkáni, enzymová aktivita a exprese proteinu jednotlivých CYP byla stanovena v jaterní mikrosomální frakci. V následujících grafech jsou vždy na ose x popsány jednotlivé formy CYP. V grafech exprese mRNA jsou popsány geny, které byly identifikovány v myši jaterní tkáni. V grafech enzymatické aktivity jsou popsány podrodiny jednotlivých CYP u myši, které odpovídají lidským formám CYP, což prezentuje tabulka v publikaci autorů Burkina *et al.* (2017). V případě podrodiny CYP2C jsou v grafu enzymových aktivit popsány použité substráty. Diklofenak (Dikl.), který podle zmíněné tabulky odpovídá lidské formě CYP2C9 a diazepam (Diaz.), který odpovídá lidské formě CYP2C19.

V následujícím experimentu byly sledovány tři skupiny myši u obou pohlaví, znázorněny v tabulce 6.

Tab. 6 Sledované skupiny myši v experimentech studia efektu mikrobioty na aktivitu a expresi vybraných jaterních CYP u myši.

	Skupina	Pohlaví
1.	SPF	♂ + ♀
2.	GF	♂ + ♀
3.	SPF IL-10-KO + kolitida	♂ + ♀

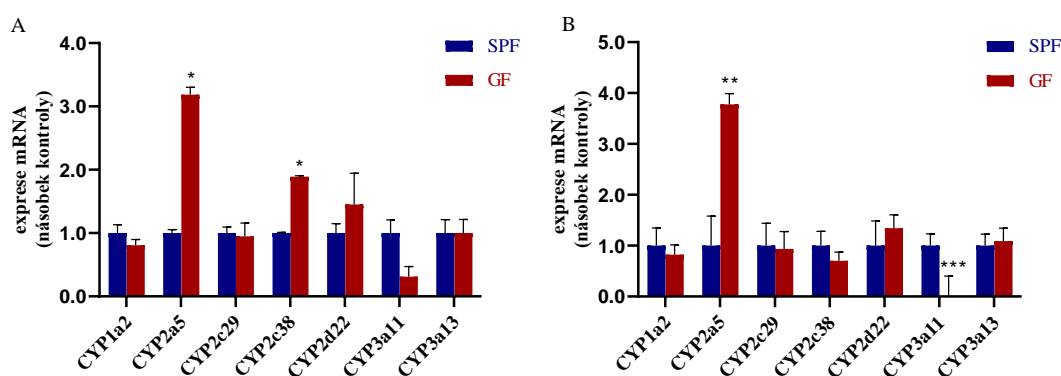
4.1.1 Efekt absence mikrobioty na aktivitu a expresi cytochromů P450

Vzhledem k tomu, že molekulární mechanismus působení střevních mikroorganismů na hostitelský organismus je zatím z velké části nepochopený a zůstává stále mnoho nezodpovězených otázek, byl nejdříve náš experiment směřován ke srovnání exprese mRNA genů jednotlivých CYP v přítomnosti a při absenci mikrobioty. Právě změna exprese jaterních biotransformačních enzymů může být jednou z příčin ovlivnění metabolismu léčiv střevním mikrobiomem. Expresse mRNA genů CYP byla měřena v jaterní tkáni pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

Na Obr. 8 je porovnávána exprese mRNA genů CYP mezi SPF a GF myšmi u (A) samců a (B) samic. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužily SPF myši, vyjádřeny na ose x číslem 1.

U GF samců byl pozorován signifikantní nárůst exprese mRNA genů *CYP2c38* a *CYP2a5* proti SPF samcům (Obr. 8A). Naopak zde byl pozorován pokles exprese mRNA genu *CYP3a11*. U ostatních genů jednotlivých CYP nebyly pozorovány významnější změny v expresi mRNA (Obr. 8A).

U GF samic byl zaznamenán signifikantní pokles exprese mRNA genu *CYP3a11* proti SPF samicím. Na druhou stranu byl zde pozorován nárůst exprese mRNA genu *CYP2a5* u GF samic na rozdíl od SPF samic. U ostatních genů jednotlivých CYP nebyly pozorovány významnější změny v expresi mRNA (Obr. 8B)



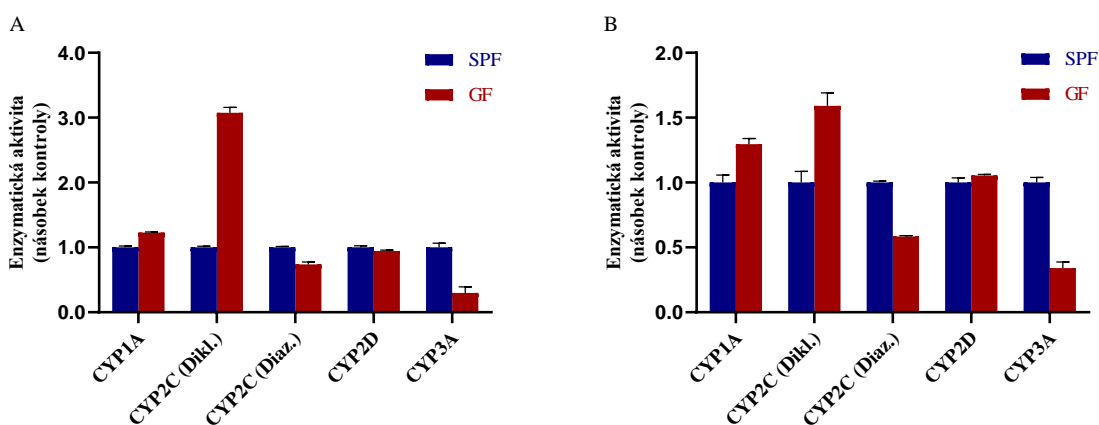
Obr. 8 Stanovení exprese mRNA genů CYP u SPF a GF (A) samců a (B) samic. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 4-5 zvířat. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose Y je znázorněna exprese mRNA v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží SPF myši. Expresse mRNA genů CYP byla měřena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Statisticky signifikantní změny oproti kontrole jsou označeny hvězdičkou (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

S ohledem na změny v expresi mRNA CYP vlivem absence střevní mikroflóry, byla dále sledována enzymatická aktivita u SPF a GF myši (Obr. 9). Enzymatická aktivita CYP byla měřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí.

Na Obr. 9 je znázorněn rozdíl mezi SPF a GF (A) samci a (B) samicemi. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužily SPF myši, vyjádřeny na ose x číslem 1.

U GF samců můžeme pozorovat trojnásobný nárůst aktivity CYP2C (s využitím diklofenaku jako substrátu, dále jen Dikl.) na rozdíl od SPF samců (Obr. 9A), což je v souladu se zvýšením exprese mRNA genu *CYP2c38* (Obr. 8A). Mírný nárůst aktivity byl pozorován také u CYP1A. Naopak aktivita CYP3A u GF samců klesá o více než polovinu proti SPF samcům. Mírný pokles aktivity byl zaznamenán také u CYP2C (s využitím diazepamů jako substrátu, dále jen Diaz.). U CYP2D nebyly shledány významnější rozdíly aktivit mezi experimentálními skupinami myši (Obr. 9A).

U GF samic byl zaznamenán nárůst aktivity CYP1A a CYP2C (Dikl.) v porovnání s SPF samicemi (Obr. 9B). Naopak zde byl pozorován pokles aktivity CYP2C (Diaz.) a zejména CYP3A u GF samic oproti SPF samicím, což odpovídá poklesu exprese mRNA genu *CYP3a11* (Obr. 8B). U CYP2D nebyly shledány významnější rozdíly aktivit (Obr. 9B).



Obr. 9 Srovnání enzymatických aktivit CYP u SPF a GF (A) samců a (B) samic. Vzorky byly měřeny v triplicátech v mikrosomální frakci připravené z jater 4-5 myši z každé skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplicátů. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose Y je znázorněna enzymatická aktivita v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží SPF myši. Enzymatické aktivity jaterních CYP byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí za použití specifických substrátů. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

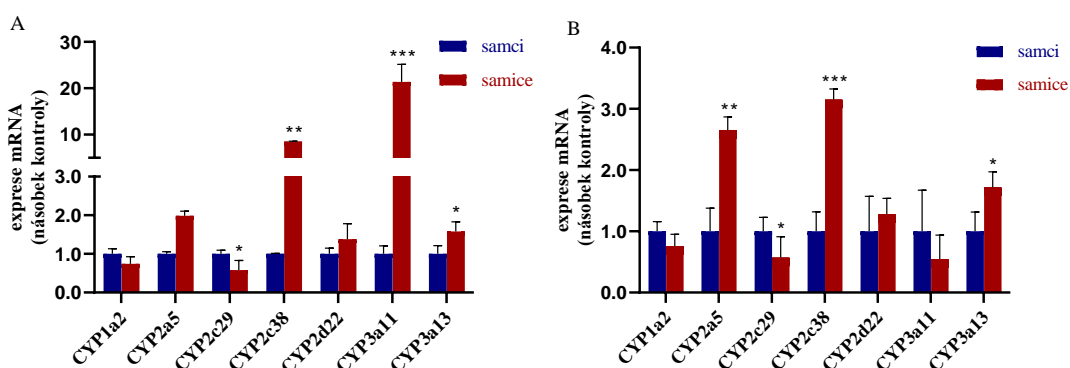
4.1.2. Efekt pohlavních rozdílů na aktivitu a expresi cytochromů P450

Protože lze očekávat rozdíly v expresi mRNA a enzymatických aktivitách CYP také mezi samci a samicemi, například s ohledem na působení hormonální soustavy, byla pozornost v diplomové práci věnována také rozdílu mezi oběma pohlavími.

Nejdříve jsme se zaměřili na srovnání exprese mRNA genů CYP mezi samci a samicemi u (A) SPF a (B) GF myši (Obr. 10). Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužili samci, vyjádření na ose x číslem 1.

U SPF samic byl zaznamenán velký nárůst exprese mRNA genu *CYP2c38* a *CYP3a11* na rozdíl od SPF samců. U ostatních genů nebyly pozorovány významnější změny v expresi mRNA (Obr. 10A).

U GF samic byl zaznamenán signifikantní nárůst exprese mRNA genů *CYP2c38*, *CYP2a5* a *CYP3a13* v porovnání s GF samci (Obr. 10B). Naopak zde byl pozorován mírný, ale signifikantní pokles exprese mRNA genu *CYP2c29*. U ostatních genů nebyly pozorovány významnější změny v expresi mRNA (Obr. 10B).



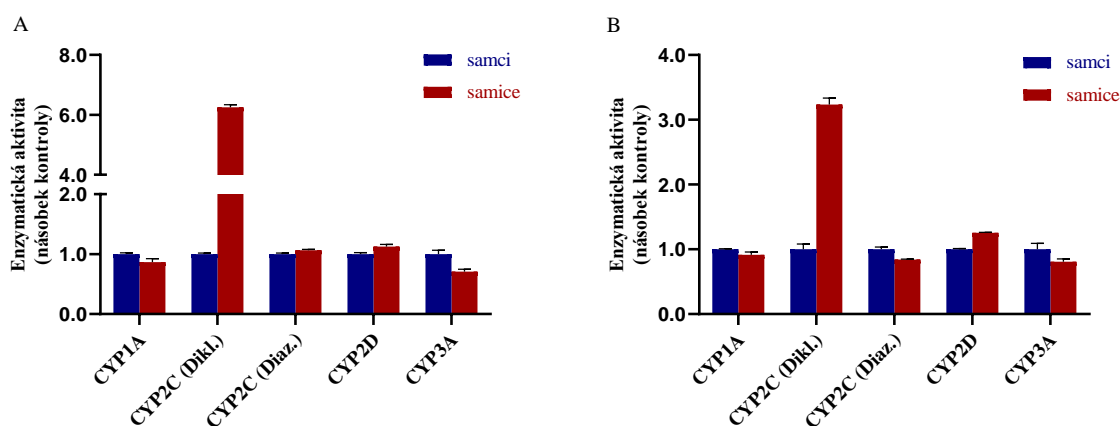
Obr. 10 Stanovení exprese mRNA genů CYP mezi samci a samicemi u (A) SPF a (B) GF myši. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 4-5 zvířat. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží samci. Expresce mRNA genů CYP byla měřena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Statisticky signifikantní změny oproti kontrole jsou označeny hvězdičkou (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

Dále bylo sledováno, jestli se rozdíly mezi pohlavími na hladině mRNA potvrdily také změnou množství funkčních enzymů stanovením jejich enzymatické aktivity.

Na Obr. 11 je znázorněn rozdíl mezi samci a samicemi u (A) SPF a (B) GF myši. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose Y je znázorněna enzymatická aktivita, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužili samci, vyjádření na ose x číslem 1.

U SPF samic byl pozorován šesti-násobný nárůst aktivity CYP2C (Dikl.) oproti samcům. Naopak u CYP3A byl zaznamenán mírný pokles. U CYP1A, CYP2C (Diaz.) a CYP2D nebyly pozorovány významnější změny (Obr. 11A).

U GF samic byl pozorován stejný trend jako u SPF skupiny: trojnásobný nárůst aktivity CYP2C (Dikl.) a mírný pokles aktivity CYP3A na rozdíl od GF samců. U aktivity CYP1A, CYP2C (Diaz.) a CYP2D nebyly pozorovány významnější změny (Obr. 11B).



Obr. 11 Srovnání enzymatických aktivit CYP mezi samci a samicemi u (A) SPF a (B) GF myši. Vzorky byly měřeny v triplikátech v mikrosomální frakci připravené z jater 4-5 myši z každé skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplikátů. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží samci. Enzymatické aktivity jaterních CYP byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí za použití specifických substrátů. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

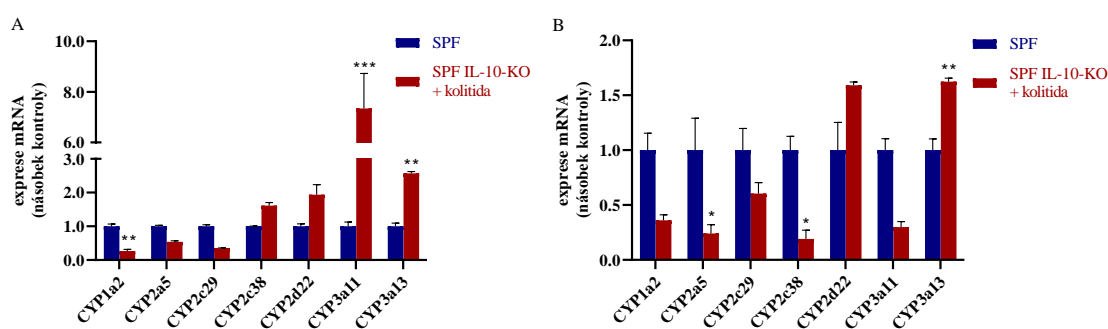
4.1.3. Efekt kolitidy na aktivitu a expresi cytochromů P450

Je známo, že zánět, vytvořený v organismu, je schopen ovlivňovat biochemické pochody, včetně enzymatické aktivity a exprese biotransformačních enzymů. Proto byla diplomová práce dále směřována na vliv spontánně vytvořené kolitidy inaktivací interleukinu 10 (IL-10) u SPF myší. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2.1, podle autorů Sellon *et al.* (1998) jsou mikroorganismy, kolonizující tělo hostitele, nezbytné k tomu, aby se inaktivací IL-10 (IL-10-KO) vytvořila spontánní kolitida. Kolitida u myší s inaktivovaným IL-10 je charakterizována histologickými nálezy, které jsou podobné jako u lidské IBD, což je chronické zánětlivé onemocnění gastrointestinálního traktu (Kuhn *et al.*, 1993; Bleich *et al.*, 2004; Loftus, 2004).

Nejdříve byla stanovena exprese mRNA vybraných CYP v jaterní tkáni SPF myší s kolitidou v porovnání s kontrolní SPF skupinou. Na Obr. 12 je pozorován vliv kolitidy na expresi mRNA genů CYP u SPF (A) samců a (B) samic. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužily SPF myši, vyjádřené na ose x číslem 1.

U SPF samců byl zaznamenán až sedmi násobný nárůst exprese mRNA genu *CYP3a11* vlivem kolitidy v porovnání s kontrolní skupinou bez zánětu. Naopak pokles exprese mRNA vlivem kolitidy byl pozorován u genů *CYP1a2*, *CYP2a5* a *CYP2c29* (Obr. 12A).

U SPF samic byl vlivem kolitidy pozorován pokles exprese mRNA genů *CYP1a2*, *CYP2a5*, *CYP2c29*, *CYP2c38* a *CYP3a11* (Obr. 12B).



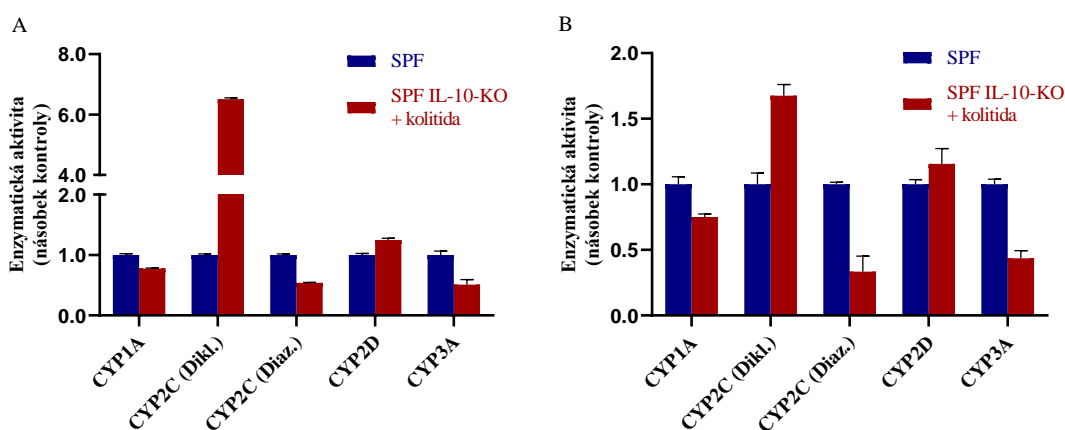
Obr. 12 Stanovení vlivu kolitidy na expresi mRNA genů CYP u SPF (A) samců a (B) samic. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 4-5 zvířat. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy genů CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží SPF myši. Exprese mRNA genů CYP byla měřena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; SPF IL-10-KO + kolitida, specific pathogenfree myši s inaktivovaným interleukinem 10 a s vyvinutým zánětem.

Dále byla stanovena enzymatická aktivita vybraných jaterních CYP u samců a samic myši s kolitidou a kontrolních skupin bez kolitidy.

Na obr. 13 je znázorněn vliv kolitidy u SPF (A) samců a (B) samic. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužily SPF myši, vyjádřeny na ose x číslem 1.

U SPF samců byl pozorován šesti-násobný nárůst enzymatické aktivity CYP2C (Dikl.) vlivem kolitidy. Naopak byl zaznamenán pokles enzymatické aktivity zhruba o polovinu u CYP2C (Diaz.) a CYP3A u SPF samců s kolitidou. U CYP1A a CYP2D nebyly pozorovány významnější změny (Obr. 13A).

U SPF samic byl zaznamenán stejný trend jako u SPF samců. Nárůst aktivity vlivem kolitidy byl pozorován u CYP2C (Dikl.). Na druhou stranu pokles aktivity byl shledán u CYP1A, CYP2C (Diaz.) a CYP3A ve skupině samic s kolitidou (Obr. 13B). Tyto poklesy enzymatické aktivity mohou souviset s velkým poklesem mRNA genů *CYP1a2*, *CYP2c29*, *CYP2c38* a *CYP3a11* (Obr. 12B).



Obr. 13 Znázornění vlivu kolitidy na enzymatickou aktivitu CYP u SPF (A) samců a (B) samic. Vzorky byly měřeny v triplicátech v mikrosomální frakci připravené z jater 4-5 myši z každé skupiny. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z triplicátů. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží SPF myši. Enzymatické aktivity jaterních CYP byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí za použití specifických substrátů. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; SPF IL-10-KO + kolitida, specific pathogenfree myši s inaktivovaným interleukinem 10 a s vyvinutým zánětem.

4.2 Změny aktivity a exprese vybraných jaterních cytochromů P450 po jednorázové aplikaci metronidazolu u myši

V následujícím experimentu byly sledovány změny enzymatické aktivity a exprese vybraných jaterních CYP po jednorázové aplikaci zvoleného modelového léčiva

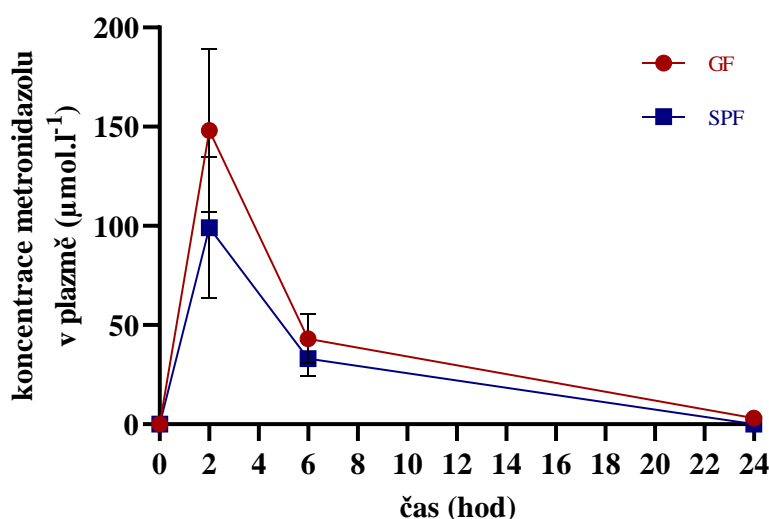
metronidazolu v přítomnosti/absenci střevního mikrobiomu. Změny byly pozorovány po jednorázové aplikaci léčiva v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Expres mRNA byla stanovena v jaterní tkáni, enzymová aktivita jednotlivých CYP a exprese proteinu byla stanovena v mikrosomální frakci. V následujících grafech jsou vždy na ose x popsány jednotlivé formy CYP. V grafech exprese mRNA jsou popsány geny, které byly identifikovány v myší jaterní tkáni. V grafech enzymatické aktivity jsou popsány podrodiny jednotlivých CYP u myší, které odpovídají lidským formám CYP, což prezentuje tabulka v publikaci autorů Burkina *et al.* (2017). V případě podrodiny CYP2C jsou v grafu popsány použité substráty. Diklofenak (Dikl.), který podle zmíněné tabulky odpovídá lidské formě CYP2C9 a diazepam (Diaz.), který odpovídá lidské formě CYP2C19. V experimentu byly sledovány dvě skupiny myší znázorněné v Tab. 7.

Tab. 7 Sledované skupiny myší v experimentu studia změn aktivit a exprese vybraných jaterních CYP po jednorázovém podání metronidazolu u myší.

	Skupina	Pohlaví	Čas
1.	SPF	♂	0h, 2h, 6h, 24h
2.	GF	♂	0h, 2h, 6h, 24h

4.2.1. Sledování hladiny metronidazolu v plazmě myší

Pro porovnání hladiny léčiva metronidazolu v plazmě po jeho aplikaci byla sledována koncentrace podávaného léčiva metronidazolu v závislosti na čase u SPF a GF samců. Časový průběh plazmatické koncentrace metronidazolu je znázorněn na Obr. 14, kde je porovnávána skupina GF myší proti kontrolní skupině SPF myší. Na ose x je znázorněn čas (v hod), na ose y je znázorněna koncentrace metronidazolu v plazmě (v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Nejvyšší plazmatická koncentrace metronidazolu byla u obou skupin naměřena v čase 2h po podání léčiva, přičemž u GF myší byla stanovena koncentrace téměř o 50 % vyšší (Obr. 14). Po 2h je metronidazol v organismu metabolizován a jeho koncentrace v 6h rychle klesá. U SPF myší ve 24h od aplikace nebyla koncentrace detekovatelná. Maximální koncentrace metronidazolu v plazmě byla u GF myší $148,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 41,27$ a u SPF myší $99,08 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 35,74$.



Obr. 14 Stanovení koncentrace léčiva metronidazolu v plazmě ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v závislosti na čase u SPF a GF myší. Hladina koncentrace klinicky používaného antibiotika metronidazolu v modelových organismech byla sledována po jednorázovém podání léčiva v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze 4 – 5 zvířat. Na ose x je popsán čas (v hod), na ose y je znázorněna koncentrace metronidazolu v plazmě ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

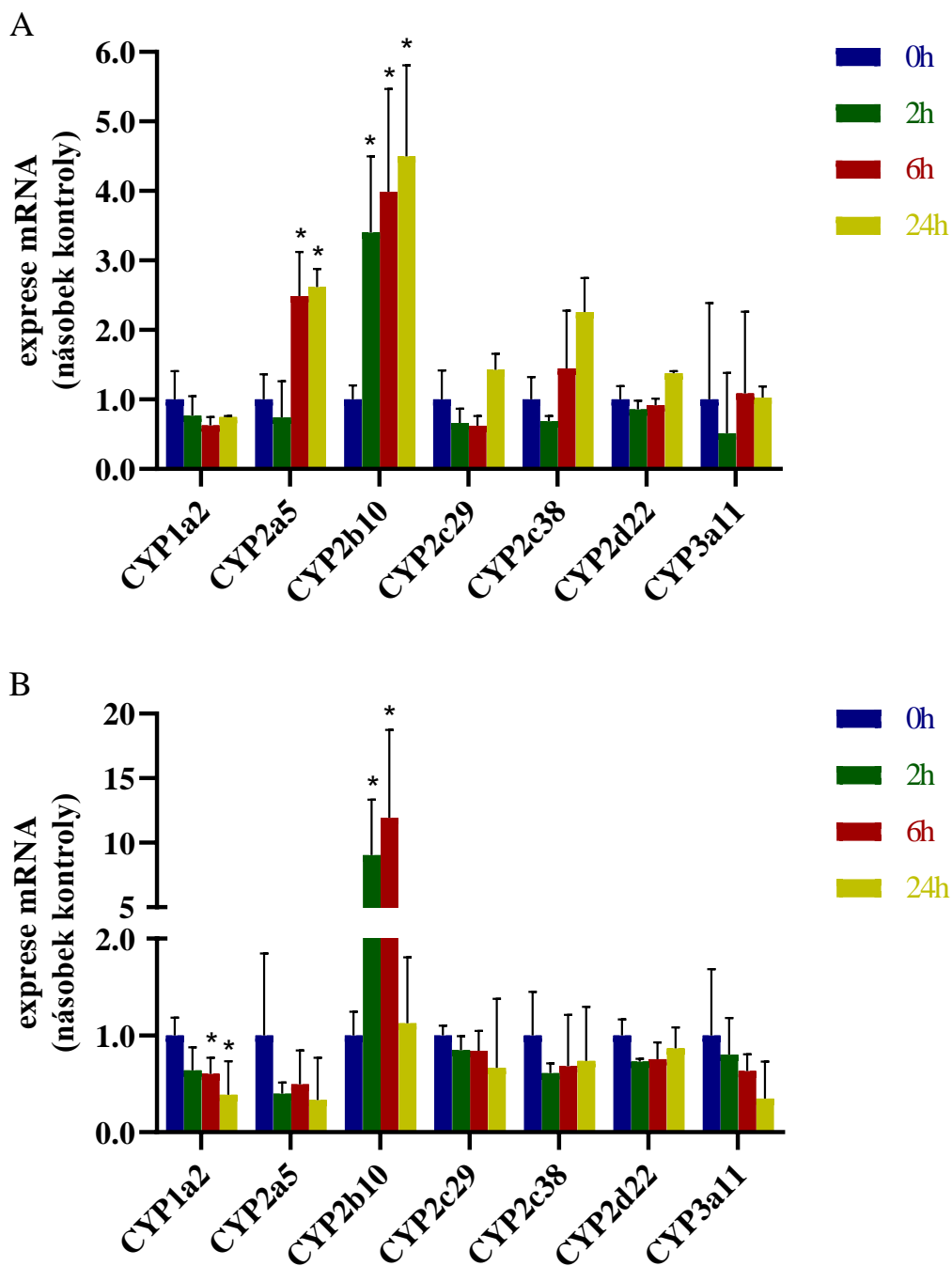
4.2.2 Stanovení exprese cytochromů P450 po podání metronidazolu

Dále jsme studovali efekt jednorázového podání metronidazolu na expresi CYP v játrech myší v čase a jak jsou tyto změny ovlivněny přítomností střevních bakterií s využitím GF a SPF myší.

Na Obr. 15 je stanovena exprese mRNA vybraných genů CYP u (A) SPF samců a (B) GF samců po jednorázové aplikaci metronidazolu v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna exprese mRNA, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužil záznam exprese mRNA v čase 0h, který odpovídá nulové hladině metronidazolu v organismu a je v grafu vyjádřen na ose x číslem 1.

U SPF myši byl vlivem podaného léčiva zaznamenán nárůst exprese mRNA genů *CYP2a5*, *CYP2b10*, *CYP2c38* v čase 6h a 24h, a také mírnější nárůst exprese mRNA genů *CYP2c29* a *CYP2d22* v čase 24h (Obr. 15A). Naopak mírný pokles exprese mRNA byl pozorován u genu *CYP1a2*. V případě exprese mRNA genu *CYP3a11* došlo po poklesu v čase 2h k vyrovnání hladiny exprese mRNA na počáteční hodnotu (Obr. 15A).

U GF myši byl vlivem podaného léčiva pozorován nárůst exprese mRNA pouze u genu *CYP2b10* v čase 2h a 6h, ale při 24h exprese mRNA poklesla téměř na počáteční hodnotu (Obr. 15B). Na druhou stranu v čase klesala exprese mRNA genů *CYP1a2*, *CYP2a5*, *CYP2c29* a *CYP3a11*. V případě exprese mRNA genů *CYP2c38* a *CYP3a11* došlo v čase 2h k poklesu exprese mRNA a poté v čase 6h a 24h k mírnějšímu nárůstu (Obr. 15B).



Obr. 15 Stanovení exprese mRNA CYP po jednorázovém podání léčiva metronidazolu (A) u SPF a (B) GF samců. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze 4-5 zvířat. Exprese mRNA byla stanovována po jednorázovém podání léčiva v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží záznam enzymatické aktivity v čase 0h, který odpovídá nulové hladině metronidazolu v organismu. Exprese mRNA genů CYP byla měřena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

4.2.3 Detekce proteinů cytochromů P450 po podání metronidazolu

Metodou Western blot byla s využitím protilátek ortologních k lidským formám CYP v následujícím experimentu detekována proteinová exprese jaterních forem CYP u SPF a GF myši po jednorázovém podání metronidazolu. Hodnoty byly odečteny v čase 2h, 6h a 24h a byly kvantifikovány v programu Image J. Výsledky jsou ukázány v Tab. 8, kde jsou znázorněny hodnoty detekovaných proteinů v poměru ke standardu (protein/standard).

V případě CYP2C (Dikl.) jsou hodnoty detekovaných proteinů u SPF myši vyšší než u GF myši ve všech třech časech. U SPF myši hodnota stoupá v závislosti na čase od podání léčiva, naopak u GF myši hodnota klesá v závislosti na čase od podání léčiva. Na druhou stranu pouze v případě CYP1A jsou hodnoty detekovaných proteinů nižší u SPF myši než u GF myši ve všech třech časech. U SPF myši hodnota klesá v závislosti na čase od podání léčiva, u GF myši hodnota mírně stoupá v čase 6h a poté klesá téměř na původní hodnotu. Co se týče CYP2B jsou hodnoty detekovaných proteinů u SPF myši nižší v čase 2h a 6h oproti GF myši, ale v čase 24h jsou o 80 % vyšší. U CYP3A jsou hodnoty detekce proteinů naopak nižší u SPF myši v čase 2h, ale poté v čase 6h a 24h jsou vyšší než u GF myši. V případě CYP2B i CYP3A došlo u SPF myši k nárůstu proteinů v závislosti na čase od podání léčiva, u GF myši naopak k poklesu hodnoty. U CYP2D nebyly zaznamenány výrazné rozdíly detekovaných proteinů mezi SPF a GF myšmi (Tab. 8).

Tab. 8 Stanovení exprese proteinů CYP po jednorázové aplikaci metronidazolu v čase 2h, 6h a 24h. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty detekovaných proteinů CYP v poměru ke standardu (protein/standard). Proteiny byly detekovány metodou Western blot. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

	sk. myši	2h	6h	24h
CYP1A	SPF	0,83	0,78	0,75
	GF	1,05	1,18	1,01
CYP2B	SPF	0,92	1,03	1,84
	GF	1,25	1,24	1,01
CYP2C (Dikl.)	SPF	1,03	1,27	1,34
	GF	0,98	0,89	0,83
CYP2D	SPF	0,92	0,77	0,94
	GF	0,92	0,82	0,99
CYP3A	SPF	0,90	0,95	0,95
	GF	1,09	0,88	0,81

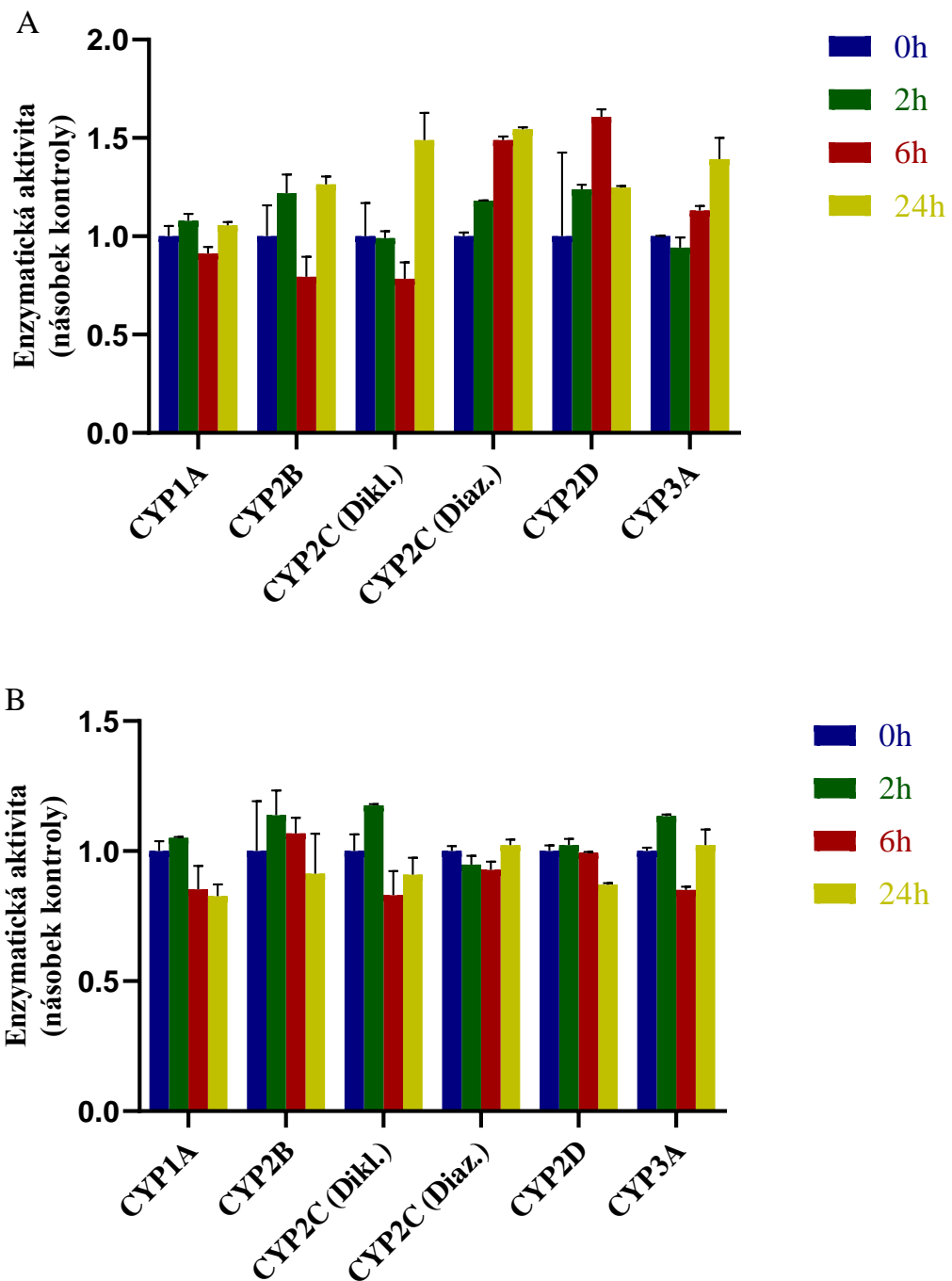
4.2.4 Stanovení aktivity cytochromů P450 po podání metronidazolu

Vzhledem k rozdílným vlivům metronidazolu na expresi mRNA určitých CYP byla diplomová práce zaměřena na stanovení enzymatické aktivity těchto CYP.

Na Obr. 16 jsou znázorněny grafy časové závislosti podávaného léčiva metronidazolu na aktivitu CYP u (A) SPF samců a (B) GF samců. Aktivita byla měřena po jednorázovém podání léčiva v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita, vždy násobek kontroly. Jako kontrola zde sloužil záznam enzymatické aktivity v čase 0h, který odpovídá nulové hladině metronidazolu v organismu a je v grafu vyjádřen na ose x číslem 1.

U SPF myši byl na Obr. 16A pozorován nárůst aktivity CYP2C (Diaz.) a CYP3A v čase 6h a 24h. U CYP2B a CYP2C (Dikl.) byl zaznamenán mírný pokles v čase 6h, naopak poté velký nárůst aktivity v čase 24h, téměř o poloviční hodnotu proti 6h. Na druhou stranu u CYP2D byl pozorován nárůst aktivity v čase 6h, ale v čase 24h se aktivita snížila na hodnotu 2h. U CYP1A nebyly pozorovány významnější změny enzymatické aktivity v časové závislosti podávaného léčiva (Obr. 16A).

U GF myši (Obr. 16B) nepozorujeme vlivem podaného léčiva velké rozdíly v enzymatické aktivitě jednotlivých CYP jako u SPF myši. U CYP1A, CYP2B a CYP2D byl pozorován pokles enzymatické aktivity v čase 6h i 24h. U CYP2C (Dikl.) a CYP3A byl po poklesu enzymatické aktivity v čase 6h pozorován nárůst v čase 24 h. U CYP2C (Diaz.) nebyly pozorovány významnější změny enzymatické aktivity v časové závislosti podávaného léčiva (Obr. 16B).



Obr. 16 Stanovení enzymatické aktivity CYP po jednorázovém podání léčiva metronidazolu (A) u SPF a (B) GF samců. Vzorčky byly měřeny v triplikátech v mikrosomální frakci připravené z jater 4-5 myši z každé skupiny. Enzymatická aktivita byla stanovována po jednorázovém podání léčiva v čase 0h, 2h, 6h a 24h. Na ose x jsou popsány jednotlivé formy CYP, na ose y je znázorněna enzymatická aktivita v násobku proti kontrole. Jako kontrola zde slouží záznam enzymatické aktivity v čase 0h, který odpovídá nulové hladině metronidazolu v organismu. Enzymatické aktivity jaterních CYP byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí za použití specifických substrátů. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

5 Diskuze

Je známo, že změny ve složení střevního mikrobiomu mohou vést k chronickým chorobám spojeným nejen s gastrointestinálním traktem. Navíc bylo prokázáno, že střevní mikroorganismy mohou přímo i nepřímo ovlivňovat metabolismus xenobiotik, včetně léčiv používaných v terapii těchto onemocnění. Nedávné studie ukazují, že až 70 % z 200 nejužívanějších léčiv je metabolizováno v játrech (Di, 2014) a že střevní bakterie působí na metabolismus léčiv v játrech tím, že ovlivňují expresi jaterních biotransformačních enzymů CYP (Kang *et al.*, 2013). I přes to jsou molekulární mechanismy vlivu střevních mikroorganismů na hostitele dosud z velké části neznámé, a proto představují v dnešní době intenzivně studovanou problematiku.

První z možných přístupů pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus xenobiotik v hostitelském organismu je sledování změny exprese mRNA genů určitých CYP u myši s přesně definovaným složením střevního mikrobiomu. GF myši (Germ-free) jsou vhodným zvířecím modelem pro studium interakce mikroorganismů a hostitele, protože zcela postrádají střevní mikroflóru a pro interpretaci výsledků se mohou porovnávat s běžnými SPF myši (Stecher *et al.*, 2013).

Snížená exprese a aktivita enzymu CYP3A u GF samců myši byla již dříve publikována (Toda *et al.*, 2009; Selwyn *et al.*, 2016; Jourová *et al.*, 2017). Ve shodě s těmito studii byl v našem experimentu pozorován stejný vliv absence střevního mikrobiomu na expresi *Cyp3a11* (myšího ortologu lidského CYP3A4) a aktivitu CYP3A v játrech samců myši (Obr. 8A, 9A). V naší studii byly stejné změny zjištěny také u GF samic (Obr. 8B, 9B). Získaná data naznačují, že střevní mikrobiom hraje rozhodující roli při regulaci syntézy CYP3A u obou pohlaví a má vliv na jeho enzymatickou aktivitu. CYP3A4 je nejhojněji zastoupený CYP v lidských játrech a podílí se na metabolismu až 50 % klinicky užívaných léčiv, což jen zdůrazňuje významnost studia vlivu mikrobiomu na metabolismus léčiv i z klinického hlediska.

Protože doposud nebyly publikovány práce zabývající se touto problematikou, v předložené diplomové práci jsme se zaměřili na pohlavní rozdíly v přítomnosti/absenci střevních bakterií, tedy u SPF a GF myši. Pohlavní rozdíly v metabolismu léčiv u hlodavců jsou jedinečným fenoménem (Corton *et al.*, 2012). Již dříve bylo prokázáno, že samice myši mají vyšší expresi většiny genů CYP (Renaud *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013). Například byly publikovány výsledky studií ukazujících vyšší expresi *CYP3a11* u samic myši v porovnání se samci (Hernandez *et al.*, 2009;

Renaud *et al.*, 2011). U lidí jsou rozdíly v pohlaví menší, nicméně je známo, že aktivita CYP3A4 vykazuje výrazný sexuální dimorfismus s vyšší aktivitou u žen v důsledku rozdílů v působení růstových hormonů (Waxman a O'Connor, 2006). V souladu s těmito daty jsme pozorovali signifikantní zvýšení exprese *CYP3a11* (více jak 20x) u samic SPF myši ve srovnání se skupinou samců (Obr. 10A). Zajímavé je, že u GF myši tento výrazný rozdíl pozorován nebyl a exprese *CYP3a11* byla přibližně stejná u obou pohlaví (Obr. 10B). Nedávno zveřejněná data poskytují možné vysvětlení, které ukazuje, že myši mikrobiom (a jeho metabolity) hraje klíčovou roli při udržování pohlavních rozdílů v genové expresi a metabolismu zajištěním sexuálního dospívání a sekrece růstového hormonu (Weger *et al.*, 2019). V případě genu *CYP2c38* byl pozorován nárůst exprese u obou skupin samic (SPF i GF) v porovnání s SPF a GF samci (Obr. 10). Navíc byly tyto změny potvrzeny na úrovni enzymatické aktivity (za použití diklofenaku jako substrátu), kdy samice myši vykazovaly vyšší hladiny funkčního CYP2C než samci v obou skupinách myši. Zajímavé je, že i zde byl pozorován stejný trend jako u genu *CYP3a11*, tedy nižší rozdíly mezi pohlavími u GF myši, jak v expresi genu *CYP2c38*, tak enzymatické aktivitě CYP2C (Dikl.). Enzymy CYP2C a CYP3A jsou hojně zastoupeny v lidských játrech a metabolizují přibližně polovinu léčiv (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Presentovaná data tak upozorňují na možnou modulaci odpovědi na široké spektrum klinicky užívaných léků interakcí střevní mikrobioty a hladiny pohlavních hormonů.

V několika studiích již bylo publikováno, že zánět, vznikající určitým způsobem v organismu, zprostředkovává snížení exprese CYP (Slaviero *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2006; Morgan, 2009). Kolitida je autoimunitní typ chronického zánětu GIT a patří mezi onemocnění, jehož etiologie není zcela známá a střevní mikrobiom zde může hrát významnou roli (Guo *et al.*, 2020). Vznik kolitidy byl v tomto experimentu indukován inaktivací IL-10, což bylo popsáno již v práci autorů Kuhn *et al.* (1993), kteří se zmiňují o spontánním vyvinutí enterokolitidy u běžných myši s nedostatkem IL-10. U myši s deficitem IL-10 je kolitida charakterizována histologickými nálezy, které jsou podobné jako u lidské IBD, chronického zánětlivého onemocnění GIT (Kuhn *et al.*, 1993; Bleich *et al.*, 2004). Předpoklad, že indukovaný zánět GIT vede ke snížení exprese biotransformačních enzymů a k ovlivnění farmakokinetiky některých léčiv, byl zkoumán v mnoha studiích (Chaluvadi *et al.*, 2009; Kawauchi *et al.*, 2014; Kusunoki *et al.*, 2014). Myším samcům byl k vyvolání zánětu podáván za různých podmínek

syntetický dextransulfát sodný (DSS), který není absorbován při průchodu gastrointestinálním traktem, ale kumuluje se až v tlustém střevě, kde iniciuje vznik kolitidy (Solomon *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že kolitida působí na expresi širokého spektra genů, včetně CYP, a ovlivňuje jejich enzymatickou aktivitu. Ve výše uvedených publikacích byl pozorován pokles exprese jaterních CYP vlivem kolitidy indukované DSS, a také v nedávné studii Fan *et al.* (2020) byl zaznamenán pokles exprese genů *CYP1a2*, *CYP2c29* a *CYP3a11* v játrech myších samců. Důležité je si uvědomit, že ve zmíněných publikacích byli zkoumáni pouze samci myši a k vyvolání zánětu sloužil DSS, kdežto v naší studii jsme studovali obě pohlaví a k vyvolání zánětu došlo inaktivací IL-10. Naše studie tudíž přispěla k pochopení efektu zánětu na funkci biotransformačních enzymů a soulad s těmito publikacemi byl zaznamenán v poklesu exprese mRNA genů *CYP1a2* a *CYP2c29* u SPF samců (Obr. 12A), i když byl použit jiný model. Naopak v rozporu s publikací Fan *et al.* (2020) byl výrazný nárůst exprese mRNA *CYP3a11* (Obr. 12A).

V diplomové práci jsme se zaměřili především na enzymatickou aktivitu CYP. Vlivem kolitidy byl zaznamenán pokles enzymatické aktivity většiny vybraných CYP a především CYP3A, což je v souladu s výsledky publikace Fan *et al.* (2020). V naší studii jsme navíc měřili vliv kolitidy u SPF samic myši, protože jak prezentují naše předešlé výsledky, byl prokázán efekt pohlaví na aktivitu a expresi CYP.

Zajímavým byl shledán výrazný nárůst aktivity CYP2C (Dikl.) vlivem kolitidy u SPF samců i samic (Obr. 13), protože CYP2C a CYP3A se nejvíce vyskytují v játrech a metabolizují významnou část klinicky užívaných léčiv (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

V naší studii jsme navíc zkoumali vliv inaktivace IL-10 u GF myši. Podle studie autorů Sellon *et al.* (1998) nebylo pozorováno vytvoření zánětu u GF myši s deficitem IL-10, protože pro vytvoření spontánního zánětu u myši s deficitem IL-10 jsou nezbytné střevní bakterie v organismu. Tuto skutečnost podporuje fakt, že zavedení specifických bakterií do GF myši vyvolalo ochranný účinek nebo tvorbu zánětu v závislosti na druhu bakterií (Bleich a Mahler, 2005). Je možné, že GF myši jsou kvůli absenci střevních mikroorganismů více citlivé a náchylné na jakékoli změny v organismu, zejména když mají inaktivovaný IL-10. Tuto hypotézu by mohla potvrdit studie Martinez-Augustin *et al.* (2009), která popisuje, že IL-10 velmi dobře působí na funkci slizniční bariéry nebo studie Hernández-Chirlaque *et al.* (2016), kde se uvádí, že za určitých podmínek

jsou GF myši vlivem větší ztráty krve náchylnější než běžné SPF myši, což bylo objasněno také v publikaci Maslowski *et al.* (2009).

I když se u GF myši zánět nevytvořil, byly pozorovány rozdíly v expresi mRNA a enzymatické aktivitě CYP. Velký rozdíl byl pozorován zejména v enzymatické aktivitě CYP2C (Dikl.), kdy u SPF myši s vytvořeným zánětem byl zaznamenán významný nárůst aktivity v porovnání s kontrolní SPF skupinou, ale u GF myši s inaktivovaným IL-10 byl naopak pozorován pokles v porovnání s kontrolní GF skupinou.

Výsledky ukazují, že při léčbě pacientů s IBD je důležité brát v úvahu možný vliv kolitidy na metabolismus xenobiotik. Efekt zánětu na funkci biotransformačních enzymů byl v této diplomové práci jen zahajovací studií, ale vzhledem k rozdílné regulaci jednotlivých CYP by se další výzkum měl zabývat mechanismem působení zánětu na CYP, a především roli mikrobiomu v těchto procesech.

Je známo, že přijímána léčiva se před absorpcí do krve přes střevní sliznici dostávají do kontaktu se střevními mikroorganismy, které mohou ovlivňovat jejich biodostupnost a toxicitu (Al-Hilal *et al.*, 2013; Jourová *et al.*, 2016). V naší studii bylo použito antibakteriální a antiprotozoální léčivo metronidazol, antibiotikum využívané např. k léčbě infekcí způsobených *Helicobacter pylori* nebo infekcí bakterií *Clostridium difficile* (Edwards, 1980). I přes to, že se jedná o léčivo hojně klinicky využívané od šedesátých let 20. století, nebyly dosud u lidí dobře charakterizované enzymy podílející se na jeho biotransformaci. Pouze *in vitro* studie autorů Loft *et al.* (1991) se pokusila v mikrosomální frakci stanovit enzymy zodpovědné za biotransformaci metronidazolu, ale nepodařilo se identifikovat enzymy podílejících se na tvorbě hlavního metabolitu 2-hydroxymetronidazolu. Na tyto poznatky navázala studie autorů Pearce *et al.* (2013), která naznačuje, že za biotransformaci metronidazolu a tvorbu 2-hydroxymetronidazolu je zodpovědný u člověka CYP2A6. Protože další informace popisující vliv metronidazolu na průběh specifických metabolických drah jsou zatím značně omezené, byla pozornost v této diplomové práci věnována jeho účinkům na funkci jaterních biotransformačních enzymů CYP.

V první řadě byla stanovena koncentrace metronidazolu v plazmě u SPF a GF myších samečů. Metronidazol podléhá biotransformaci v játrech a je aktivován hydroxylací 2-methyl skupiny na 2-hydroxymethylmetronidazol, oxidací 1-ethyl

skupiny na 1-metronidazol octovou kyselinu a konjugací glukuronidu na metronidazol glukuronid. Metronidazol společně s jeho metabolity je poté vylučován močí (Pearce *et al.*, 2013). Podle výsledků na Obr. 14 bylo patrné, že v 2. hodině po podání léčiva dosáhla koncentrace metronidazolu maximální hodnoty v obou skupinách, ale u GF myši byla koncentrace zhruba o 50 % vyšší. Podobný efekt změněné střevní mikroflóry se prokázal také ve studii s nabumetonem (Jourová *et al.*, 2019) a lovastatinem (Yoo *et al.* 2014. Výsledky naznačují, že bez přítomnosti bakterií je koncentrace metronidazolu v plazmě vyšší.

V publikaci autorů Zhang *et al.* (2014) bylo zjištěno, že antibiotikum metronidazol má u myších samců tendenci zvyšovat počet bakterií kmene *Firmicutes*, ale naopak snižovat množství bakterií kmene *Bacteroidetes*. Ačkoli měl pouze omezenou schopnost potlačovat střevní mikroorganismy, jako je tomu u některých ostatních antibiotik, přispěl významně ke změně poměru *Firmicutes/Bacteroidetes*.

Tato skutečnost by mohla vysvětlit výsledky této diplomové práce, kdy byl v expresi mRNA genů *CYP2a5*, *CYP2c29* a *CYP2c38* zaznamenán v případě SPF myši nárůst exprese v závislosti na čase podaného metronidazolu (Obr. 15A), ale naopak u GF myši byl zaznamenán pokles v závislosti na čase od podání metronidazolu (Obr. 15B). Výsledky tudíž naznačují, že po přijetí léčiva mohou střevní mikroorganismy indukovat expresi CYP, a tím ovlivnit jeho metabolismus. Při měření enzymatické aktivity bylo zjištěno, že u SPF myši došlo k nárůstu enzymatické aktivity CYP2C (Dikl.) (Obr. 16A), což může odpovídat nárůstu exprese mRNA genů *CYP2c29* nebo *CYP2c38* (Obr. 15A). I když zde byla aktivita měřena pomocí substrátu diklofenaku, podporuje hypotézu několika dostupných informací, které naznačují účast metronidazolu v metabolismu CYP2C. Metronidazol měl vliv např. na metabolismus S-warfarinu (O'Reilly, 1976) a fenytoinu (Blyden *et al.*, 1988), což jsou substráty CYP2C. U GF myši byl pozorován mírný pokles aktivity CYP2C (Dikl.) v čase 24h (Obr. 16B), čemuž by mohl odpovídat pokles exprese mRNA genů *CYP2c29* nebo *CYP2c38* (Obr. 15B).

Dostupné informace neustále varují před možnými interakcemi mezi metronidazolem a substráty CYP3A4 (Preissner *et al.*, 2010). Tyto hypotézy potvrdily studie autorů Wang *et al.* (2000); Haas *et al.* (2001); Roedler *et al.* (2007), které podaly důkazy o tom, že metronidazol není inhibítoem CYP3A4, naopak může enzymatickou aktivitu CYP3A4 v lidských játrech do jisté míry indukovat. I když byl v předložené diplomové práci použit místo lidské mikrosomální frakce model myši mikrosomální frakce, byly výsledky v souladu se zmíněnými publikacemi, protože na Obr. 16A byl u SPF myši

zaznamenán nárůst enzymatické aktivity CYP3A4 v závislosti na čase od podání léčiva, i přes to, že exprese mRNA genu *CYP3a11* zůstala nezměněna (Obr. 15A). Několik studií potvrdilo, že se podáním antibiotika ciprofloxacinu po dobu 5 dnů snížila exprese mRNA členů podrodiny CYP3a u GF myší na rozdíl od SPF myší (Toda *et al.*, 2009a; Toda *et al.*, 2009b). Nedávná studie autorů Kuno *et al.* (2016) také prokázala snížení exprese mRNA genu *CYP3a11* u GF myší působením antibiotik vankomycinu + polymyxinu B, které se využívají k léčbě infekcí způsobených gram-pozitivními a gram-negativními bakteriemi. Tyto publikace doplnil i experiment této diplomové práce, kdy byl u GF myší zaznamenán pokles exprese mRNA genu *CYP3a11* po podání antibiotika metronidazolu (Obr. 15B), i když v enzymatické aktivitě nebyly pozorovány významnější změny (Obr. 16B).

Zajímavý výsledek byl pozorován v případě podrodiny CYP2B. U SPF myší došlo k nárůstu exprese mRNA genu *CYP2b10* v závislosti na čase od podání léčiva (Obr. 15A), exprese detekovaného proteinu vzrostla v čase od podání léčiva (Tab. 8) a enzymatická aktivita v konečném důsledku také narostla při 24h (Obr. 16A). Ale u GF myší byl zaznamenán nárůst exprese mRNA genu *CYP2b10* v čase 2h a 6h, v čase 24h ovšem opět pokles téměř na původní hodnotu (Obr. 15B), nicméně hodnota detekce proteinů klesala v čase od podání léčiva (Tab. 8), čemuž odpovídal i pokles enzymatické aktivity CYP2B (Obr. 16B). Práce vysvětlující tak velkou indukci exprese mRNA genu *CYP2b10* vlivem použitého antibiotika zatím nebyly publikovány, ale bylo prokázáno, že silná exprese genu *CYP2B* je u lidí i hlodavců indukována například léčivem fenobarbitalem (PB), používaným v léčbě epileptických záchvatů nebo protizánětlivým syntetickým glukokortikoidem dexamethasonem (DEX) (Wang a Negishi, 2003; Wang a Tompkins, 2008). Dokonce v nedávné publikaci autorů Liu *et al.* (2015) docházelo u transgenních myší těmito léky k indukci *CYP2b* na úrovni mRNA i na úrovni proteinu. Tyto studie doplnila publikace autorů Murray *et al.* (2003), kde byl u potkanů prokázán jako silný induktor CYP2B lék orfenadrin, používaný například při léčbě Parkinsonovy nemoci. Předmětem dalšího výzkumu by měla být otázka působení metronidazolu na expresi mRNA genu *CYP2b10*, protože jak je známo, podrodina CYP2B se podílí na metabolismu až 8 % klinicky užívaných léčiv, nikotinu, kokainu či endogenních substrátů serotoninu nebo testosteronu (Turpeinen *et al.*, 2006). Navíc bylo prokázáno, že indukce jaterního CYP2B vede u hlodavců k vyvolání nádorů v játrech (Holsapple *et al.*, 2006, Deguchi *et al.*, 2009), a proto je důležité studium induktorů CYP2B a mechanismu jeho působení.

6 Závěr

Cílem práce bylo studium jaterních CYP u SPF a GF myší. Byla stanovována exprese mRNA genů CYP pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, exprese proteinů CYP metodou Western blot a enzymatická aktivita CYP pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/fluorescenční detekcí za použití specifických substrátů. Z výsledků provedených experimentů vyplývají následující závěry.

1. Výrazné rozdíly v expresi mRNA a enzymatické aktivitě u jednotlivých CYP mezi GF a SPF skupinou ukazují na důležitou roli střevního mikrobiomu při regulaci a expresi CYP. Vzhledem ke změnám i v enzymatické aktivitě některých CYP je zřejmé, že získané výsledky mohou mít klinickou významnost.
2. Porovnání výsledků mezi samci a samice ukázalo, že střevní mikrobiom hraje důležitou roli při udržování sexuálního dimorfismu exprese genů jaterních CYP, především u podrodin CYP2C a CYP3A.
3. Kolitida u myší vyvolala změny v expresi mRNA a enzymatické aktivitě CYP oproti kontrolní SPF skupině. Změny v expresi a aktivitě CYP byly pozorovány také u GF myší s inaktivací IL-10. Tyto rozdíly zdůrazňují, že se vytvořený zánět v těle podílí na procesech spojených s metabolismem xenobiotik a střevní mikrobiom zde hraje důležitou, avšak dosud zcela neobjasněnou roli.
4. Metronidazol způsobil rozdíly v expresi mRNA, expresi proteinů a enzymatické aktivitě v závislosti na čase od aplikace u SPF i GF myší, ale rozdílně u obou skupin. Lze předpokládat, že se střevní mikroorganismy podílejí na absorpci, distribuci a biotransformaci léčiva metronidazolu, který indukuje či inhibuje CYP, a tím ovlivňuje metabolismus xenobiotik.

7 Literatura

- Abu-Bakar A., Arthur D. M., Wikman A. S., Rahnasto M., Juvonen R. O., Vepsalainen J., Raunio H., Ng J. C., Lang M. A. (2012): Metabolism of bilirubin by human cytochrome P450 2A6. *Toxicology and Applied Pharmacology* **261**, 50-58.
- Abubucker S., Segata N., Goll J., Schubert A. M., Izard J., Cantarel B. L., Rodriguez-Mueller B., Zucker J., Thiagarajan M., Henrissat B., White O., Kelley S. T., Methe B., Schloss P. D., Gevers D., Mitreva M., Huttenhower C. (2012): Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Computational Biology* **8**, 6.
- Aitken A. E., Richardson T. A., Morgan E. T. (2006): Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **46**, 123-149.
- Al-Hilal T. A., Alam F., Byun Y. (2013): Oral drug delivery systems using chemical conjugates or physical complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 845-864.
- Al-Robaee A. A., Al-Zolibani A. A., Al-Shobili H. A., Kazamel A., Settin A. (2008): IL-10 implications in psoriasis. *International Journal of Health Sciences* **2**, 53-58.
- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2012): Drug-Metabolizing Enzymes-An Overview. In: *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. (Anzenbacher P., Zanger U. M., Eds.), Wiley-Vch, Weinheim, Německo, 3-26.
- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 737-747.
- Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T. (1989): Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand. *Journal of molecular structure* **214**, 149-158.
- Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P. (1992): Biochemistry and Biophysics. In: *Cytochrome P-450*. (Archakov A. I., Bachmanova G. I. eds.) INCO-TNC, Moskva, Rusko, 1.
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D. R., Fernandes G. R., Tap J., Bruls T., Batto J. M., Bertalan M., Borrueal N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H. B., Nielsen T., Pons N., Poulain J., Qin J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E. G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W. M., Brunak S., Dore J., Antolin M., Artiguenave F., Blottiere H. M., Almeida M., Brechot C., Cara C., Chervaux C., Cultrone A., Delorme C., Denariáz G., Dervyn R., Foerstner K. U., Friss C., van de Guchte M., Guedon E., Haimet F., Huber W., van Hylckama-Vlieg J., Jamet A., Juste C., Kaci G., Knol J., Lakhdari O., Layec S., Le Roux K., Maguin E., Merieux A., Melo Minardi R., M'Rini C., Muller J., Oozeer R., Parkhill J., Renault P., Rescigno M., Sanchez N., Sunagawa S., Torrejon A., Turner K., Vandemeulebrouck G., Varela E., Winogradsky Y., Zeller G., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Bork P. (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174-180.
- Aubert J., Begriche K., Knockaert L., Robin M. A., Fromenty B. (2011): Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **35**, 630-637.
- Backhed F., Fraser C. M., Ringel Y., Sanders M. E., Sartor R. B., Sherman P. M., Versalovic J., Young V., Finlay B. B. (2012): Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe* **12**, 611-622.
- Belizario J. E., Napolitano M. (2015): Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1050.
- Bleich A., Mahler M. (2005): Environment as a critical factor for the pathogenesis and outcome of gastrointestinal disease: experimental and human inflammatory bowel disease and helicobacter-induced gastritis. *Pathobiology* **72**, 293-307.
- Bleich A., Mähler M., Most C., Leiter E. H., Liebler-Tenorio E., Elson C. O., Hedrich H. J., Schlegelberger B., Sundberg J. P. (2004): Refined histopathologic scoring system improves power to detect colitis QTL in mice. *Mammalian Genome* **15**, 865-871.

- Blyden G. T., Scavone J. M., Greenblatt D. J. (1988): Metronidazole impairs clearance of phenytoin but not of alprazolam or lorazepam. *The Journal of Clinical Pharmacology* **28**, 240-245.
- Bolt H. M., Roos P. H., Thier R. (2003): The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **76**, 174-185.
- Brosen K. (2004): Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapies* **59**, 5-12.
- Burkina V., Rasmussen M. K., Pilipenko N., Zamaratskaia G. (2017): Comparison of xenobiotic-metabolising human, porcine, rodent, and piscine cytochrome P450. *Toxicology* **375**, 10-27.
- Caro A. A., Cederbaum A. I. (2004): Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **44**, 27-42.
- Clarke G., Sandhu K. V., Griffin B. T., Dinan T. G., Cryan J. F., Hyland N. P. (2019): Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic-Microbiome Interactions. *Pharmacological Reviews* **71**, 198-224.
- Clarke G., Stilling R. M., Kennedy P. J., Stanton C., Cryan J. F., Dinan T. G. (2014): Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology* **28**, 1221-1238.
- Corton J. C., Bushel P. R., Fostel J., O'Lone R. B. (2012): Sources of variance in baseline gene expression in the rodent liver. *Mutation research* **746**, 104-112.
- Cytochrome P450 database: <http://cpd.ibmh.msk.su> (1. 12. 2019).
- Dapito D. H., Mencin A., Gwak G. Y., Pradere J. P., Jang M. K., Mederacke I., Caviglia J. M., Khiabanian H., Adeyemi A., Battaller R., Lefkowitz J. H., Bower M., Friedman R., Sartor R. B., Rabadan R., Schwabe R. F. (2012): Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* **21**, 504-516.
- Deguchi, Y., Yamada, T., Hirose, Y., Nagahori, H., Kushida, M., Sumida, K., Sukata T., Tomigahara Y., Nishioka K., Uwagawa S., Okuno Y., Kawamura, S. (2009): Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. *Toxicological sciences* **108**, 69-80.
- Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D. A. (2007): An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* **449**, 811-818.
- Di L. (2014): The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **10**, 379-393.
- Dobell C. (1920): The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **13**, 1-15.
- Dominguez-Bello M. G., Costello E. K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R. (2010): Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **107**, 11971-11975.
- Edwards D. I. (1980): Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *The British Journal of Venereal Diseases* **56**, 285-290.
- Falk P. G., Hooper L. V., Midtvedt T., Gordon J. I. (1998): Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1157-1170.
- Fan X., Ding X., Zhang Q. Y. (2020): Hepatic and intestinal biotransformation gene expression and drug disposition in a dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10**, 123-135.
- Fiorentino D. F., Bond M. W., Mosmann T. R. (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine* **170**, 2081-2095.
- Flintoft L. (2012): Disease genomics: Associations go metagenome-wide. *Nature Reviews Genetics* **13**, 756.

- Fuhr U., Jetter A., Kirchheiner J. (2007): Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **81**, 270-283.
- Gingell R., Bridges J. W. (1973): Intestinal azo-reduction and glucuronide conjugation of prontosil. *Xenobiotica* **3**, 599-604.
- Goodman A. L., Kallstrom G., Faith J. J., Reyes A., Moore A., Dantas G., Gordon J. I. (2011): Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **108**, 6252-6257.
- Guengerich F. P. (1995): Human cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450*. Springer, Massachusetts, USA, 473-535.
- Guengerich F. P. (1997): Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Advances in Pharmacology* **43**, 7-35.
- Guengerich F., Shimada T. (1993): Human cytochrome P450 enzymes and chemical carcinogenesis. In: *Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man*. (Jeffrey E. H., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 5-12.
- Guo X. Y., Liu X. J., Hao J. Y. (2020): Gut Microbiota in Ulcerative Colitis: Insights on Pathogenesis and Treatment. *Journal of Digestive Diseases*.
- Haas C. E., Kaufman D. C., DiCenzo R. C. (2001): Effects of metronidazole on hepatic CYP3A4 activity. *Pharmacotherapy* **21**, 1192-1195.
- Hao W. L., Lee Y. K. (2004): Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology* **268**, 491-502.
- Hendrychová T., Anzenbacherová E., Hudeček J., Skopalík J., Lange R., Hildebrandt P., Otyepka M., Anzenbacher P. (2011): Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1814**, 58-68.
- Hernandez J. P., Mota L. C., Huang W., Moore D. D., Baldwin W. S. (2009): Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology* **256**, 53-64.
- Hernández-Chirlaque C., Aranda C. J., Ocón B., Capitán-Cañadas F., Ortega-González M., Carrero J. J., Suárez M. D., Zarzuelo A., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin O. (2016): Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* **10**, 1324-1335.
- Holsapple M. P., Pitot H. C., Cohen S. H., Boobis A. R., Klaunig J. E., Pastoor T., Dellarco V. L., Dragan Y. P. (2006): Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicological Sciences* **1**, 51-56.
- Houston J. B., Day J., Walker J. (1982): Azo reduction of sulphasalazine in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* **14**, 395-398.
- Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W. (1998): Catalytically self-sufficient P450 CYP102 (cytochrome P450 BM-3): resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**, 811-815.
- Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J. H., Chinwalla A. T., Giglio M. G. et al. (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214.
- Chaluvadi M. R., Nyagode B. A., Kinloch R. D., Morgan E. T. (2009): TLR4-dependent and-independent regulation of hepatic cytochrome P450 in mice with chemically induced inflammatory bowel disease. *Biochemical pharmacology* **77**, 464-471.
- Jančová P., Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University of Palacky Olomouc Czech Republic* **154**, 103-116.
- Jourová L., Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2016): Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University of Palacky Olomouc Czech Republic* **160**, 317-326.

- Jourová L., Anzenbacher P., Lisková B., Matušková Z., Hermanová P., Hudcovic T., Kozaková H., Hrnčirová L., Anzenbacherová E. (2017): Colonization by non-pathogenic bacteria alters mRNA expression of cytochromes P450 in originally germ-free mice. *Folia Microbiologica* **62**, 463-469.
- Jourová L., Anzenbacher P., Matušková Z., Večera R., Strojil J., Kolar M., Nobilis M., Hermanová P., Hudcovic T., Kozaková H., Kverka M., Anzenbacherová E. (2019): Gut microbiota metabolizes nabumetone in vitro: Consequences for its bioavailability in vivo in the rodents with altered gut microbiome. *Xenobiotica* **49**, 1296-1302.
- Kang M. J., Kim H. G., Kim J. S., Oh D. G., Um Y. J., Seo C. S., Han J. W., Cho H. J., Kim G. H., Jeong T. C., Jeong H. G. (2013): The effect of gut microbiota on drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **9**, 1295-1308.
- Kato T., Owen R. L. (2005): Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: *Mucosal Immunology*. (Mestecky J., Lamm M. E., Strober W. eds.), Academic press, Massachusetts, USA, 131-151.
- Kawakami H., Ohtsuki S., Kamiie J., Suzuki T., Abe T., Terasaki T. (2011): Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 341-352.
- Kawauchi S., Nakamura T., Miki I., Inoue J., Hamaguchi T., Tanahashi T., Mizuno S. (2014): Downregulation of CYP3A and P-glycoprotein in the secondary inflammatory response of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis and its contribution to cyclosporine A blood concentrations. *Journal of Pharmacological Sciences* **124**, 180-191.
- Keubler L. M., Buettner M., Hager C., Bleich A. (2015): A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 1967-1975.
- Kinross J. M., Darzi A. W., Nicholson J. K. (2011): Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine* **3**, 14.
- Klingenberg M. (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **75**, 376-386.
- Koenig J. E., Spor A., Scalfone N., Fricker A. D., Stombaugh J., Knight R., Angenent L. T., Ley R. E. (2011): Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **108**, 4578-4585.
- Komatsu T., Yamazaki H., Shimada N., Nakajima M., Yokoi T. (2000): Roles of cytochromes P450 1A2, 2A6, and 2C8 in 5-fluorouracil formation from tegafur, an anticancer prodrug, in human liver microsomes. *Drug Metabolism & Disposition* **28**, 1457-1463.
- Koppel N., Maini Rekdal V., Balskus E. P. (2017): Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science* **356**, 6344.
- Koren O., Knights D., Gonzalez A., Waldron L., Segata N., Knight R., Huttenhower C., Ley R. E. (2013): A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Computational Biology* **9**, 1.
- Kreth K., Kovar K., Schwab M., Zanger U. M. (2000): Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs. *Biochemical Pharmacology* **59**, 1563-1571.
- Kronbach T., Mathys D., Umeno M., Gonzalez F. J., Meyer U. A. (1989): Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Molecular Pharmacology* **36**, 89-96.
- Kuczynski J., Lauber C. L., Walters W. A., Parfrey L. W., Clemente J. C., Gevers D., Knight R. (2011): Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics* **13**, 47-58.
- Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W. (1993): Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274.
- Kuno T., Hirayama-Kurogi M., Ito S., Ohtsuki S. (2016): Effect of intestinal flora on protein expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in the liver and kidney of germ-free and antibiotics-treated mice. *Molecular pharmaceutics* **13**, 2691-2701.

- Kusunoki Y., Ikarashi N., Hayakawa Y., Ishii M., Kon R., Ochiai W., Machida Y., Sugiyama K. (2014): Hepatic early inflammation induces downregulation of hepatic cytochrome P450 expression and metabolic activity in the dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **54**, 17-27.
- Lake B. G. (1987): Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: *Biochemical toxicology - a practical approach*. (Snell K. Mullock B. Eds.). IRL PRESS, Oxford 183-215.
- Lavrijsen K., van Dyck D., van Houdt J., Hendrickx J., Monbaliu J., Woestenborghs R., Meuldermans W., Heykants J. (1995): Reduction of the prodrug loperamide oxide to its active drug loperamide in the gut of rats, dogs, and humans. *Drug Metabolism & Disposition* **23**, 354-362.
- Lee C. R., Goldstein J. A., Pieper J. A. (2002): Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* **12**, 251-263.
- Liu Y.-T., Hao H.-P., Liu C.-X., Wang G.-J., Xie H.-G. (2007): Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug metabolism reviews* **39**, 699-721.
- Liu Z., Li L., Wu H., Hu J., Ma J., Zhang Q. Y., Ding X. (2015): Characterization of CYP2B6 in a CYP2B6-humanized mouse model: inducibility in the liver by phenobarbital and dexamethasone and role in nicotine metabolism in vivo. *Drug Metabolism and Disposition* **43**, 208-216.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lobo E. D., Bergstrom R. F., Reddy S., Quinlan T., Chappell J., Hong Q., Ring B. aKnadler M. P. (2008): In vitro and in vivo evaluations of cytochrome P450 1A2 interactions with duloxetine. *Clinical Pharmacokinetics* **47**, 191-202.
- Loft S., Otton S. V., Lennard M. S., Tucker G. T., Poulsen H. E. (1991): Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **41**, 1127-1134.
- Loftus Jr, E. V. (2004): Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504-1517.
- Lu Y. F., Jin T., Xu Y., Zhang D., Wu Q., Zhang Y. K., Liu J. (2013): Sex differences in the circadian variation of 295 cytochrome p450 genes and corresponding nuclear receptors in mouse liver. *Chronobiology international* **30**, 1135-1143.
- Lu Y., Cederbaum A. I. (2008): CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* **44**, 723-738.
- Mackie R. I., Sghir A., Gaskins H. R. (1999): Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 1035-1045.
- Martignoni M., Groothuis G. M., de Kanter R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2**, 875-894.
- Martinez-Augustin O., Romero-Calvo I., Suarez M. D., Zarzuelo A., de Medina F. S. (2009): Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 114-127.
- Maslowski K. M., Vieira A. T., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H. C., Rolph M. S., Mackay F., Artis D., Xavier R. J., Teixeira M. M., Mackay C. R. (2009): Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282-1286.
- Matouskova P., Bartikova H., Bousova I., Hanusova V., Szotakova B., Skalova L. (2014): Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. *PLoS One* **9**, 1.
- McConnell E. L., Fadda H. M., Basit A. W. (2008): Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **364**, 213-226.
- Morgan E. T. (2009): Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **85**, 434-438.

- Murray M., Fiala-Ber E., Sutton D. (2003): Upregulation of cytochromes P450 2B in rat liver by orphenadrine. *British Journal of Pharmacology* **139**, 787–796.
- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- Nelson D. R., Zeldin D. C., Hoffman S. M., Maltais L. J., Wain H. M., Nebert D. W. (2004): Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics* **14**, 1-18.
- Ohtsuki S., Schaefer O., Kawakami H., Inoue T., Liehner S., Saito A., Ishiguro N., Kishimoto W., Ludwig-Schwelling E., Ebner T., Terasaki T. (2012): Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metabolism & Disposition* **40**, 83-92.
- Omura T., Sato R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.i. evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 2370-2378.
- O'Reilly R. A. (1976): The stereoselective interaction of warfarin and metronidazole in man. *The New England Journal of Medicine* **295**, 354-357.
- Pearce R. E., Cohen-Wolkowicz M., Sampson M. R., Kearns G. L. (2013): The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxymetronidazole: CYP2A6 is the high affinity (low Km) catalyst. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 1686-1694.
- Peterson J., Garges S., Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss J. A., Bonazzi V., McEwen J. E., Wetterstrand K. A., Deal C., Baker C. C., Di Francesco V., Howcroft T. K., Karp R. W., Lunsford R. D., Wellington C. R., Belachew T., Wright M., Giblin C., David H., Mills M., Salomon R., Mullins C., Akolkar B., Begg L., Davis C., Grandison L., Humble M., Khalsa J., Little A. R., Peavy H., Pontzer C., Portnoy M., Sayre M. H., Starke-Reed P., Zakhari S., Read J., Watson B., Guyer M. (2009): The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* **19**, 2317-2323.
- Phillips I. R., Ian R., Shephard E. A., de Montellano P. R. O. (1998): Methods in Molecular Biology. In: *Cytochrome P450 protocols*. 107, (3rd eds), Humana Press, Totowa, USA.
- Preissner S., Kroll K., Dunkel M., Senger C., Goldsobel G., Kuzman D., Guenther S., Winnenburg R., Schroeder M., Preissner R. (2010): SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Research* **38**, 237-243.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D. R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J. M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H. B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S. D., Wang J. (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65.
- Raunio H., Pasanen M., Mäenpää J., Hakkola J., Pelkonen O. (1995): Expression of extrahepatic cytochrome P450 in humans. *Advances in drug metabolism in man*, 234-287.
- Raunio H., Rahnasto-Rilla M. (2012): CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabolism and Drug Interaction* **27**, 73-88.
- Renaud H. J., Cui J. Y., Khan M., Klaassen C. D. (2011): Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **124**, 261-277.
- Robinson C. J., Bohannon B. J., Young V. B. (2010): From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**, 453-476.

- Roedler R., Neuhauser M. M., Penzak S. R. (2007): Does metronidazole interact with CYP3A substrates by inhibiting their metabolism through this metabolic pathway? Or should other mechanisms be considered? *Annals of Pharmacotherapy* **41**, 653-658.
- Sansen S., Yano J. K., Reynald R. L., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F. (2007): Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 14348-14355.
- Savage D. C. (1977): Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology* **31**, 107-133.
- Scott E. E., Halpert J. R. (2005): Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 5-7.
- Sellon R. K., Tonkonogy S., Schultz M., Dieleman L. A., Grenther W., Balish E., Rennick D. M., Sartor R. B. (1998): Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity* **66**, 5224-5231.
- Selwyn F. P., Cheng S. L., Klaassen C. D., Cui J. Y. (2016): Regulation of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Germ-Free Mice by Conventionalization and Probiotics. *Drug Metabolism & Disposition* **44**, 262-274.
- Schenkman J. B., Jansson I. (1998): Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods in Molecular Biology* **107**, 25-33.
- Slaviero K. A., Clarke S. J., Rivory L. P. (2003): Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *The Lancet Oncology* **4**, 224-232.
- Solomon L., Mansor S., Mallon P., Donnelly E., Hoper M., Loughrey M., Kirk S., Gardiner K. (2010): The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative clinical pathology* **19**, 235-239.
- Sousa T., Paterson R., Moore V., Carlsson A., Abrahamsson B., Basit A. W. (2008): The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **363**, 1-25.
- Spatzenegger M., Jaeger W. (1995): Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews* **27**, 397-417.
- Stecher B., Berry D., Loy A. (2013): Colonization resistance and microbial ecophysiology: using gnotobiotic mouse models and single-cell technology to explore the intestinal jungle. *FEMS Microbiology Rev* **37**, 793-829.
- Stingl J. C., Brockmoller J., Viviani R. (2013): Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Molecular Psychiatry* **18**, 273-287.
- Tanner J. A., Tyndale R. F. (2017): Variation in CYP2A6 Activity and Personalized Medicine. *Journal of Personalized Medicine* **7**, 18.
- Thummel K. E., Wilkinson G. R. (1998): In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **38**, 389-430.
- Toda T., Ohi K., Kudo T., Yoshida T., Ikarashi N., Ito K., Sugiyama K. (2009): Ciprofloxacin suppresses Cyp3a in mouse liver by reducing lithocholic acid-producing intestinal flora. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **24**, 201-208.
- Toda T., Saito N., Ikarashi N., Ito K., Yamamoto M., Ishige A., Watanabe K., Sugiyama K. (2009): Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver. *Xenobiotica* **39**, 323-334.
- Trivedi B. (2012): Microbiome: The surface brigade. *Nature* **492**, 60-61.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R., Gordon J. I. (2007): The human microbiome project. *Nature* **449**, 804-810.
- Turpeinen M., Raunio H., Pelkonen O. (2006): The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Current drug metabolism* **7**, 705-714.
- Turpeinen M., Zanger U. M. (2012): Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabolism and Drug Interaction* **27**, 185-197.

- Viaud S., Saccheri F., Mignot G., Yamazaki T., Daillere R., Hannani D., Enot D. P., Pfirschke C., Engblom C., Pittet M. J., Schlitzer A., Ginhoux F., Apetoh L., Chachaty E., Woerther P. L., Eberl G., Berard M., Ecobichon C., Clermont D., Bizet C., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., Opolon P., Yessaad N., Vivier E., Ryffel B., Elson C. O., Dore J., Kroemer G., Lepage P., Boneca I. G., Ghiringhelli F., Zitvogel L. (2013): The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* **342**, 971-976.
- Vick R. L., Kahn J. B., Jr., Acheson G. H. (1957): Effects of dihydro-ouabain, dihydrodigoxin and dihydrodigitoxin on the heart-lung preparation of the dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* **121**, 330-339.
- Vieira I., Sonnier M., Cresteil T. (1996): Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *European Journal of Biochemistry* **238**, 476-483.
- Wang B., Hu L., Siahaan T. J. (2016): *Drug delivery: principles and applications*. 2 ed., John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 720 stran.
- Wang H., Negishi M. (2003): Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors. *Current drug metabolism* **4**, 515-525.
- Wang H., Tompkins L. M. (2008): CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Current drug metabolism* **9**, 598-610.
- Wang J. S., Backman J. T., Kivistö K. T., Neuvonen P. J. (2000): Effects of metronidazole on midazolam metabolism in vitro and in vivo. *European Journal of Clinical Pharmacology* **56**, 555-559.
- Wang J., Yadav V., Smart A. L., Tajiri S., Basit A. W. (2015): Stability of peptide drugs in the colon. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **78**, 31-36.
- Waxman D. J., O'Connor C. (2006): Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Molecular endocrinology* **20**, 2613-2629.
- Weger B. D., Gobet C., Yeung J., Martin E., Jimenez S., Betrisey B., Foata F., Berger B., Balvay A., Foussier A., Charpagne A., Boizet-Bonhoure B., Chou C. J., Naef F., Gachon F. (2019): The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism. *Cell metabolism* **29**, 362-382.
- Weide J., Steijns L. (1999): Cytochrome P450 Enzyme System: Genetic Polymorphisms and Impact on Clinical Pharmacology. *Annals of clinical biochemistry* **36**, 722-729.
- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **87**, 4576-4579.
- Yoo D. H., Kim I. S., Van Le T. K., Jung I. H., Yoo H. H., Kim D. H. (2014): Gut microbiota-mediated drug interactions between lovastatin and antibiotics. *Drug Metabolism and Disposition* **42**, 1508-1513.
- Zanger U. M., Fischer J., Raimundo S., Stuken T., Evert B. O., Schwab M., Eichelbaum M. (2001): Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* **11**, 573-585.
- Zanger U. M., Klein K., Saussele T., Blievernicht J., Hofmann M. H., Schwab M. (2007): Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* **8**, 743-759.
- Zanger U. M., Schwab M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **138**, 103-141.
- Zanger U. M., Turpeinen M., Klein K., Schwab M. (2008): Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**, 1093-1108.
- Zhang Y., Limaye P. B., Renaud H. J., Klaassen C. D. (2014): Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice. *Toxicology and applied pharmacology* **277**, 138-145.
- Zhou S., Yung Chan S., Cher Goh B., Chan E., Duan W., Huang M., McLeod H. L. (2005): Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clinical Pharmacokinetics* **44**, 279-304.

Zhou Y., Gao H., Mihindukulasuriya K. A., La Rosa P. S., Wylie K. M., Vishnivetskaya T., Podar M., Warner B., Tarr P. I., Nelson D. E., Fortenberry J. D., Holland M. J., Burr S. E., Shannon W. D., Sodergren E., Weinstock G. M. (2013): Biogeography of the ecosystems of the healthy human body. *Genome Biology* **14**, 1.

8 Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
Ahr	aryl uhlovodíkový receptor
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
CYP	cytochromy P450
DEX	dexamethason
DMSO	dimethylsulfoxid
Ex/Em	excitace/emise
FMO	flavinmonooxygenasy
GF	germ-free = bezmikrobní
GIT	gastrointestinální trakt
HMP	Human microbiome project
IBD	zánětlivé střevní onemocnění (z angl: inflammatory bowel disease)
IDH	isocitrát dehydrogenasa
IL-10	interleukin 10
IL-10-KO	knockoutovaný interleukin 10
MDMA	3,4-methylenedioxyamfetamin = extáze
MF	mobilní fáze
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
P-E	Potter-Elvehjemův homogenizátor
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPF	specific pathogen free
TBS	Tris-buffer saline