UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚLOHA LIDSKÉHO MIKROBIOMU PŘI METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2017 **Lenka Jourová**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Lenka Jourová

ÚLOHA LIDSKÉHO MIKROBIOMU PŘI METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2012 – únor 2017.

Bibliografické identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Lenka Jourová
Název disertační práce:	Úloha lidského mikrobiomu při metabolismu cizorodých látek
Název disertační práce anglicky:	The Role of the Human Microbiome in the Metabolism of Xenobiotics
Studijní program:	Lékařská chemie a klinická biochemie
Školitel:	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Rok obhajoby:	2017
Klíčová slova v češtině:	střevní mikrobiom, biotransformace xenobiotik, cytochromy P450, biodostupnost léčiv, butyrát, probiotika
Klíčová slova v angličtině:	gut microbiome, biotransformation of xenobiotics, cytochrome P450, bioavailability of drugs, butyrate, probiotics

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (LF_2013_008; LF_2014_014; LF_2015_007), a Grantovou agenturou České republiky (projekty 303/12/G163 a P303/12/0535).

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne

……

Mgr. Lenka Jourová

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za její odborné vedení, za praktické rady, připomínky, trpělivost a podporu během mého postgraduálního studia a při sepsání této disertační práce, která by bez její pomoci nemohla vzniknout. Děkuji také prof. RNDr. Pavlovi Anzenbacherovi, DrSc. za jeho cenné rady, připomínky, předané zkušenosti a pomoc při sepisování této disertační práce.

Mé poděkování patří také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za možnost vypracovat svou disertační práci na tomto pracovišti a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také Mgr. Veronice Tománkové z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, Mgr. Zuzaně Matuškové, Ph.D z Ústavu farmakologie LF UP a Mgr. Barboře Liškové Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP za jejich pomoc při experimentálním měření, získávání dat a také za jejich podporu. Dále děkuji prof. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. a Ing. Evě Gabrielové, Ph.D. za izolaci lidských hepatocytů.

V neposlední řadě velmi děkuji svým rodičům a přátelům za podporu, důvěru, lásku a trpělivost.

SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem vlivu střevních bakterií na metabolismus léčiv. První část předkládané práce je zaměřena na stanovení možného zapojení komenzálních a probiotických bakterií do metabolismu protizánětlivého léčiva nabumetonu *in vitro* a následně stanovení farmakokinetiky jeho aktivního metabolitu (kyselina 6-metoxy-2-naftyl octová, 6-MNA) na *in vivo* modelu potkana se změněnou střevní mikroflórou aplikací antibiotika imipenemu. Výsledky in vitro experimentů ukázaly, že komenzální i probiotické bakterie mohou být zapojeny do metabolismu nabumetonu tvorbou farmakologicky neaktivního metabolitu, který byl tvořen všemi vybranými bakteriemi *in vitro* za aerobních i anaerobních podmínek. Farmakokinetika 6-MNA se u potkanů stresovaných podáváním antibiotika imipenemu sice signifikantně nelišila od kontrolních zvířat, nicméně došlo k nárůstu plochy pod křivkou $AUC_{0\text{-}24}$ u hlavního metabolitu o 20 %.

V další části práce byl sledován vliv střevních bakterií na expresi a enzymovou aktivitu jaterních cytochromů P450 (CYP) – nejdůležitějších biotransformačních enzymů I. fáze. Pro tyto experimenty byly použity gnotobiotické myší modely s přesně definovanou střevní mikroflórou. U bezmikrobních; GF myší zcela postrádajících střevní mikroflóru došlo ke zvýšení exprese mRNA *Cyp1a2* a *Cyp2e1* a naopak k výraznému snížení exprese mRNA *Cyp3a11* oproti kontrolním (SPF) myším. Monokolonizace GF myší nepatogenní bakterií *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} a probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 měla také signifikantní vliv na expresi mRNA *Cyp1a2* a *Cyp2e1*.

Poslední část práce byla zaměřena na studium produktů bakteriálního metabolismu, které mohou být zodpovědné za změny v regulaci jaterních biotransformačních enzymů. Jedním z kandidátů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) – butyrát a propionát – produkované komenzálními bakteriemi v lidském tlustém střevě ve vysoké koncentraci. Aplikace butyrátu sodného na primární kultury lidských hepatocytů vedla ke zvýšení enzymové aktivity CYP1A2. Také exprese proteinu CYP1A2 byla zvýšená po aplikaci butyrátu sodného v porovnání s kontrolními vzorky. U nejvyšší koncentrace butyrátu (500 $\mu mol \cdot l^{-1}$) došlo také ke zvýšení enzymové aktivity CYP2A6.

Klíčová slova: střevní mikrobiom, biotransformace xenobiotik, cytochromy P450, biodostupnost léčiv, butyrát, probiotika

SUMMARY

The aim of this work was to study influence of the gut bacteria on the metabolism of drug. The first part of the presented work is focused on involvement of commensal and probiotic bacteria in the metabolism of anti-inflammatory drug nabumeton *in vitro*. Then, the pharmacokinetics of its pharmacologicaly active metabolite (6-methoxy-2-naphthylacetic acid, 6-MNA) using *in vivo* rat model with changed gut microflora by aplication of antibiotic imipenem was examined. From the results of in vitro experiments it follows that both, the probiotic and commensal bacteria are involved in the metabolism of nabumetone by forming reduced inactive metabolite under aerobic and anearobic conditions. Pharmacokinetics of 6-MNA in stressed rats by administration of the antibiotic imipenem was not significantly different from control animals, however, the area under the curve (AUC_{0-24}) of the main metabolite was increased by 20 %.

In the next part of this work, the influence of intestinal bacteria on expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 (CYP) - the most important biotransformation enzymes I. phase – was studied. The gnotobiotic mice models with exactly defined gut microflora were used for these experiments. The mRNA expression of *Cyp1a2* and *Cyp2e1* was significantly increased, while the expression of *Cyp3a11* mRNA was significantly decreased in germ- free; GF mice, lacking the intestinal flora compared to the control (SPF) mice. The mRNA expression of *Cyp1a2* and *Cyp2e1* was also significantly influenced by monocolonization of GF mice with non-pathogenic bacteria *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} or probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917.

The last part of this work was focused on the study of products of bacterial metabolism, which may be responsible for the changes in the regulation of the liver biotranformation enzymes. Short chain fatty acids (SCFA) – butyrate and propionate – produced in the colon in high concentration are one of the candidates. Application of sodium butyrate in the primary cultures of human hepatocytes led to an increase in the enzymatic activity of CYP1A2. Also, the protein expression of CYP1A2 was increased after administration of sodium butyrate in comparison with

controls. The highest concentration of butyrate (500 μM) caused also an increase in the enzymatic activity of CYP2A6.

Key words: gut microbiome, biotransformation of xenobiotics, cytochrome P450, bioavailability of drugs, butyrate, probiotics

OBSAH

1 ÚVOD 1
2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY 2
2.1 Střevní mikrobiom 2
2.1.1 Složení střevního mikrobiomu 3
2.1.2 Faktory ovlivňující složení a funkci střevního mikrobiomu 4
2.1.2.1 Antibiotika 5
2.1.2.2 Probiotika 6
2.1.3 Mikrobiom jako endokrinní orgán 8
2.1.3.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem 9
2.1.4 Mikrobiom a metabolismus léčiv 15
2.1.4.1 Mechanismy působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv 17
2.1.4.2 Léčiva metabolizovaná bakteriemi v gastrointestinálním traktu 21
2.2 Metabolismus xenobiotik 24
2.2.1 Cytochromy P450 26
2.3 Modely pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem léčiv 31
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE 32
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 33
4.1 Materiál a chemikálie 33
4.1.1 Chemikálie pro stanovení enzymových aktivit 33
4.1.2 Chemikálie pro stanovení množství proteinů 33
4.1.3 Chemikálie pro stanovení hladiny mRNA 33
4.1.4 Další chemikálie 34
4.1.5 Přístrojové vybavení 35
4.1.5.1 HPLC systém 36
4.2 Enzymové systémy 36
4.2.1 Lidské hepatocyty 36
4.2.1.1 Roztoky pro izolaci a kultivaci lidských hepatocytů 37
4.2.2 Mikrosomální frakce 38

4.2.2.1 Roztoky pro izolaci jaterní mikrosomální frakce *38*
4.3 Inkubace nabumetonu s bakteriemi *in vitro* za aerobních a anaerobních podmínek 39
4.4 Stanovení farmakokinetiky 6-MNA u potkanů po aplikaci imipenemu 40
4.4.1 Navržení experimentu a zpracování vzorků 40
4.4.2 Stanovení metabolitů pomocí HPLC 40
4.4.2.1 Podmínky HPLC *40*
4.4.2.2 Příprava vzorků *41*
4.4.3 Statistická analýza dat 42
4.5 Vliv monokolonizace nepatogenními bakteriemi na expresi mRNA, proteinu a enzymovou aktivitu CYP u bezmikrobních myší 42
4.5.1 Bakteriální kmeny 42
4.5.2 Navržení experimentu 42
4.5.3 Izolace RNA a kvantitativní Real-Time PCR (qPCR) 43
4.5.4 Stanovení exprese proteinu CYP3A 44
4.5.5 Stanovení enzymové aktivity CYP3A 44
4.5.6 Statistická analýza 45
4.6 Vliv butyrátu a propionátu sodného na expresi a enzymovou aktivitu CYP v játrech 45
4.6.1 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP 46
4.6.2 Stanovení exprese proteinů vybraných forem CYP 48
4.6.3 Izolace RNA a kvantitavní PCR v reálném čase (qPCR) 48
5 VÝSLEDKY 49
5.1 Metabolismus protizánětlivého léčiva nabumetonu komenzálními a probiotickými bakteriemi *in vitro* za aerobních a anaerobních podmínek 49
5.2 Vliv změněné střevní mikroflóry aplikací antibiotika imipenemu na farmakokinetiku nabumetonu u potkanů 56
5.3 Vliv střevního mikrobiomu na expresi jaterních cytochromů P450 59
5.3.1 Vliv monokolonizace bezmikrobních myší bakteriemi *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} nebo *Escherichia coli Nissle* 1917 na expresi mRNA vybraných cytochromů P450. 62
5.4 Vliv butyrátu a propionátu na expresi mRNA, proteinu a enzymatickou aktivitu cytochromů P450 v primárních kulturách lidských hepatocytů 64

6 DISKUZE 70
7 ZÁVĚRY 77
8 SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI 79
9 LITERATURA 83

SEZNAM ZKRATEK

3-HO-nabumeton	4-(6-metoxy-2-naftyl)-3-hydroxybutan-2-on
6-HO-nb-OH	4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-ol
6-HO-nb=O	4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-on
6-HNA	6-hydroxy-2-naftyloctová kyselina
6-MNA	6-metoxy-2-naftyloctová kyselina
18S rRNA	srovnávací gen eucaryotic 18S ribosomal RNA
ACN	acetonitril
AhR	aryluhlovodíkový receptor
BCA	kyselina bicinchoninová
BS	butyrát sodný
COX-2	cyklooxygenasa 2
CYP	cytochromy P450
DMEM/F12	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem s přídavkem F12
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
G^+	gram-pozitivní bakterie
G^-	gram-negativní bakterie
GF	germ-free, postrádající střevní mikroflóru
GIT	gastrointestinální trakt
HEPES	kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N´-ethansulfonová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HMG-CoA reduktáza	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPRT1	srovnávací gen hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1

IL-1β	interleukin 1 *beta*
IL-6	interleukin 6
ISOM	Isomovo médium pro kultivaci hepatocytů
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin, levodopa
***O*-desmetyl 3-OH-nabumeton**	4-(6-hydroxy-2-naftyl)-3-hydroxybutan-2-on
PBS	fosfátový pufr
PenStrep	roztok penicilinu se streptomycinem
PS	propionát sodný
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
redukovaný 3-HO-nabumeton	4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2,3-diol
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SPF	specific pathogen-free , *in vivo* modely s normální střevní mikroflórou, bez přítomnosti patogenních bakterií
TNF-α	tumor necrosis factor α
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	uridindifosfát
WME	Williamsovo médium E

1 ÚVOD

Lidské tělo je osídleno biliony mikroorganismů, jejichž genom má obrovský metabolický potenciál a je obecně definován jako mikrobiom [1]. Největší množství těchto mikroorganismů se nachází v gastrointestinálním traktu a jsou označovány jako střevní mikrobiota (mikroflóra). Nedávné studie ukazují, že komenzální střevní mikroflóra má výrazný vliv na zdraví hostitelského organismu, pro který zajišťuje celou řadu biologických funkcí jako syntézu vitamínů [2], vývoj a modulaci imunitního systému [3], funkci přirozené bariéry proti patogenním bakteriím [4] anebo metabolismus živin [5]. Změny ve struktuře a zastoupení mikrobiomu jsou spojovány s různými patologickými stavy, jako jsou zánětlivá onemocnění střev [6], metabolické poruchy jako je obezita a diabetes [7], ateroskleróza a kardiovaskulární onemocnění [8]. Střevní mikrobiom je relativně stabilní, ale jeho složení a/nebo funkce může být ovlivněna řadou faktorů, např. dietou [9], probiotiky [10] a léky (především antibiotiky [11]).

Bylo také prokázáno, že střevní bakterie jsou zapojeny do metabolismu léčiv. Mikrobiota disponuje rozmanitým spektrem bakteriálních enzymů, které mají schopnost metabolizovat léky ve srovnatelné míře jako jakákoliv jiná část lidského těla [12] [13]. Orálně podávaná léčiva procházejí gastroitestinálním traktem a před jejich absorpcí přes epiteliální membránu do krve dochází k interakci se střevními bakteriemi, které mohou ovlivňovat jejich biodostupnost, účinnost či toxicitu. V tomto ohledu dlouho přehlížené střevní bakterie mohou významně ovlivňovat farmakokinetiku orálně podávaných léčiv a být zodpovědné za interindividuální variabilitu v odpovědi na předepsanou léčbu [14]. I když znalosti v této problematice značně pokročily, mnoho otázek zůstává stále nezodpovězeno nebo je zodpovězeno jen částečně - např. jaká je stabilita léčiv v střevním lumen, jaký je molekulární mechanismus interakce bakterií s léčivy a hostitelským organismem, a které bakteriální kmeny jsou do vzájemné interakce zapojeny.

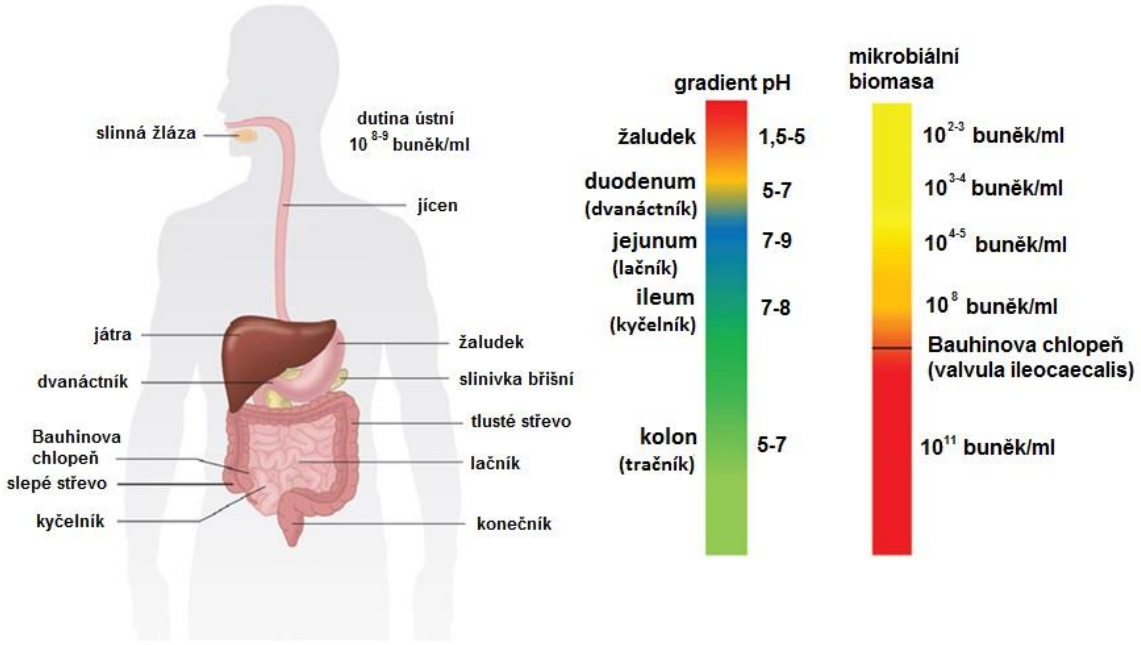
Svou dizertační práci jsem zaměřila na studium vlivu mikrobiomu na metabolismus léčiv, především na jejich farmakokinetiku, biodostupnost a snažila jsem se nalézt odpovědi alespoň na některé z výše zmíněných otázek.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 Střevní mikrobiom

Termín mikrobiota zahrnuje všechny mikroorganismy osídlující lidský organismus, a to nejen jeho povrch. Hlavním místem výskytu je gastrointestinální trakt (GIT), který je domovem 100 biliónů mikroorganismů zastupujících přibližně 500 různých bakteriálních kmenů. Množství bakteriálních buněk přítomných v GIT desetkrát převyšuje počet našich vlastních lidských buněk, jinými slovy pouze 10 % všech buněk lidského organismu je eukaryotních. Zbylých 90 % náleží prokaryotickým bakteriálním buňkám, které kódují stokrát více genů než lidský genom. Souhrn genů všech mikroorganismů v daném prostředí je označován jako mikrobiom, v případě GIT tedy hovoříme o střevním mikrobiomu [15].

Kolonizace bakteriemi je odlišná v různých částech GIT v závislosti na změně pH a redoxního potenciálu (Obr. 1) [16]. Z Obrázku 1 je zřejmé, že podél GIT směrem od žaludku k Bauhinově chlopni (*valvula ileocaecalis*) dochází k výraznému zvýšení počtu bakteriálních buněk s optimálním prostředím pro jejich růst v tlustém střevě. Velmi nízké pH zabraňuje růstu mikrobiot, což je důvodem nízkého počtu bakteriálních buněk v žaludku.



Obrázek 1. Hlavní části gastrointestinálního traktu a hodnota pH a množství bakteriálních buněk od žaludku po tlusté střevo (modifikováno podle [17]). Části GIT: dvanáctník (duodenum), jejunum (lačník, střední část tenkého střeva), ileum (kyčelník, spodní část tenkého střeva), kolon (tračník, největší část tlustého střeva).

2.1.1 Složení střevního mikrobiomu

Přesné objasnění složení a funkce lidského mikrobiomu je velmi důležité pro posouzení jeho metabolického potenciálu a vlivu na celkový zdravotní stav člověka. Za poslední dvě desetiletí znalosti v této oblasti značně pokročily, a to především díky novým metodám molekulární biologie – sekvenčním metodám nové generace a metabolickému profilování. Jak už bylo zmíněno výše, většina mikroorganismů osidlující lidské tělo se nachází v GIT, kde dochází k interakcím s hostitelským organismem. Kromě bakterií patří mezi střevní mikrobiota také archaea, kvasinky a vláknité houby [18]. Výsledky nedávných studií ukazují také na důležitost virů, včetně bakteriofágů [19]. Střevní mikrobiota tvoří extrémně rozmanitou bakteriální komunitu (přibližně 500 bakteriálních kmenů), nicméně GIT zdravých dospělých jedinců je převážně zastoupen pouze dvěma bakteriálnimi kmeny, gram-pozitivními (G^+) *Firmicutes* a gram-negativními (G^-) *Bacteroidetes*

spolu s méně se vyskytujícími *Actinobacteria, Proteobacteria* a *Verrucomicrobia* [20]. *Bacteroides* je nejhojněji zastoupeným a zároveň nejvariabilnějším bakteriálním rodem [21].

Lidský GIT je v prenatálním období zcela sterilní. Ihned při porodu dochází k počáteční expozici mikroorganismům. Zatímco u přirozeně narozených dětí dochází nejprve ke kolonizaci vaginálnimi a fekálními bakteriemi, hlavně rodu *Lactobacillus* a bakteriemi rodu *Prevotella* nebo *Sneathia spp*., u dětí narozených císařským řezem dochází nejdříve ke kolonizaci mikroby osídlujících kůži, jako je *Staphylococcus, Corynebacterium* a *Propionibacterium spp.* a bakteriemi z nemocničního prostředí [22]. Rod *Bifidobacterium*, který patří do kmene *Actinobacteria*, je dominantí skupinou u zdravých kojených dětí [23]. I přes enormní variabilitu mezi jedinci, je střevní mikrobiom u dospělých lidí považován za relativně stabilní. Podle autorů *Arumugam et al.* [24] lze lidskou populaci rozdělit do tří takzvaných enterotypů identifikovatelných podle různého kvantitativního zastoupení tří bakteriálních rodů: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) a *Ruminococcus* (enterotyp 3). Ke změnám ve složení střevního mikrobiomu dochází také v průběhu stárnutí. *Claesson et al.* [25] zjistili, že starší lidé mají rozdílné zastoupení bakteriálních kmenů v porovnání s mladšími lidmi, s větším podílem *Bacteroides spp.* a odlišné zastoupení bakterií ve skupině *Clostridium*.

Nicméně přesný popis složení „normální“ gastrointestinální mikroflóry u zdravého člověka je stále velkou výzvou pro vědce, protože většina bakterií žijících v našich útrobách je anaerobní a nekultivovatelná, a dalším problémem jsou také značné interindividuální rozdíly.

2.1.2 Faktory ovlivňující složení a funkci střevního mikrobiomu

Lidská střevní mikroflóra je jedním z nejsložitějších ekosystémů na naší planetě a mnoho prací se zaměřuje na zkoumání jejího složení a funkce, její interakce s hostitelským organismem a faktory, které toto vzájemné působení ovlivňují [26]. Nerovnováha ve složení mikrobiomu může vést k přechodné

dysfunkci střev a různým patologickým stavům [27]. V posledních letech vzrostl počet studií zabývajících se vlivem celé řady léků, xenobiotik a také rostlinných látek v potravě na složení střevní mikroflóry [28]. Na složení a funkci střevních bakterií mají nepříznivý vliv hlavně antibiotika [29]. Vztah mezi složením mikrobiomu a hostitelským organismem je však velice komplexní a hlavně vzájemný. K dnešnímu dni bylo publikováno nesčetné množství studií poukazujících na souvislost mezi aktivitou střevního mikrobiomu a obezitou [30], diabetem [7, 31], astmatem a alergií [32], stárnutím [33] a dokonce vývojem a funkcí centrální nervové soustavy [34], autismem a depresemi [35]. Na některé z hlavních faktorů ovlivňujích složení střevního mikrobiomu a důsledky změn v zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů se soustředíme v dalších odstavcích.

2.1.2.1 Antibiotika

Objev antibiotik je bezesporu jeden z nejdůležitějších objevů v oblati medicíny, jejich užívání však přináší i celou řadu problémů. Nedávné studie ukazují, že podávání antibiotik, zvláště těch širokospektrých, silně ovlivňuje strukturu a rozmanitost bakteriálních kmenů v GIT a tím výrazně působí na celkový zdravotní stav organismu. Tyto studie se zaměřují na vliv jednotlivých antibiotik na individuální kultivovatelné bakteriální kmeny nebo na specifické bakteriální kmeny kultivované z hostitelského organismu vystaveného antibiotikům. Většina těchto prací se zabývala patogenními bakteriálními kmeny, přitom byly použity vysoké koncentrace antibiotik v porovnání s běžně užívanými dávkami. Detailní mechanismus účinku antibiotik na komenzální střevní mikrobiom a jeho důsledky na jeho strukturu a funkci nejsou zatím známy [36].

Podle některých studií antibiotika způsobují značné změny a narušení střevní mikroflóry, které mohou vést k částečnému snížení diverzity mikrobiomu a to, jak z krátkodobého, tak dlohodobého hlediska [37]. Na druhou stranu další práce poukazují na plastičnost střevního mikrobiomu a jeho schopnost obnovení původního zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů po vysazení antibiotik [29,

38, 39]. Do jaké míry je složení střevního mikrobiomu stabilní a odolné vůči působení vnějších vlivů není zatím přesně objasněno.

Změnou složení střevního mikrobiomu mohou antibiotika ovlivňovat také farmakokinetiku orálně podávaných léčiv a tak měnit jejich stabilitu v lumen střev a biodostupnost. Například bylo prokázáno, že současné podávání lovastatinu, statinu inhibujícího HMG-CoA reduktázu a antibiotik může vést ke snížení bakteriálního metabolismu tohoto léčiva ve střevě a tím ke snížení biodostupnosti jeho farmakologicky aktivního metabolitu [40]. Stejní autoři publikovali také práci ukazující, že podávání antibiotik může zvyšovat biodostupnost antihypertenziva amlodipinu potlačováním metabolické aktivity střevního mikrobiomu [41]. Na druhou stranu farmakokinetika protizánětlivého léčiva nabumetonu u potkanů, kterým bylo podáváno širokospektré antibiotikum imipenem, nebyla signifikantně ovlivněna v porovnání s kontrolní skupinou zvířat, kterým imipenem podáván nebyl [42]. Tyto výsledky jen reprezentují komplexnost problému interakce mezi antibiotiky, změněnou střevní mikroflórou a metabolismem orálně podávaných léčiv. Možný efekt střevního mikrobiomu na farmakokinetiku léčiv je ovlivněn celou řadou faktorů v závislosti na použitém antibiotiku, studovaném léčivu, modelovém organismu a stavu intestinální mikroflóry. Dosud známé potenciální interakce mezi orálně podávanými léčivy a antibiotiky jsou shrnuty v přehledné práci [43].

2.1.2.2 Probiotika

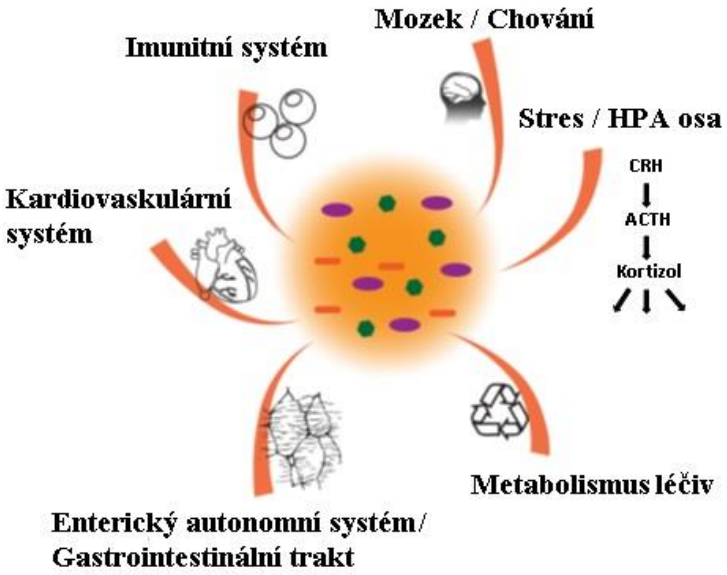
Spolu s antibiotiky mohou modifikovat střevní mikroflóru také probiotika a mít tak pozitivní nebo negativní vliv na celkový stav hostitelského organismu. Nadměrné užívání antibiotik vyvolalo obavy ohledně jejich možných nepříznivých účinků na lidské zdraví, o bezpečnosti probiotik je toho známo ještě méně. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které mohou zlepšením rovnováhy intestinální flóry příznivě ovlivnit zdraví hostitelského organismu, pokud jsou podávána v adekvátním množství [44]. Podávání probiotik je spojováno s mnoha benefity pro lidské zdraví, jako je prevence nekrotizující enterokolitidy

u předčasně narozených dětí i u dětí s kojeneckou kolikou, zkrácení doby akutního průjmu u dětí, zmírnění příznaků u syndromu dráždivého tračníku a prevence průjmů spojených s užíváním antibiotik [45]. Předpokládá se, že tyto prospěšné efekty probiotik jsou způsobené jejich schopností pozitivně ovlivňovat složení střevního mikrobiomu, nicméně jestli, a do jaké míry, jsou probiotika schopná složení mikrobiomu měnit, ani detailní mechanismus jejich účinku na molekulární úrovni, nejsou zatím známy. Probiotika mohou přímo ovlivňovat mikroby sídlící v GIT produkcí bakteriocinů, mastných kyselin s krátkým řetězcem (modulátorů regulačních dějů v buňce), tvorbou substrátů, které mohou podporovat růst komenzálních bakterií (polysacharidy, vitamíny, mastné kyseliny) a posílením imunitní odpovědi proti specifickým mikrobům. Nepřímo mohou probiotika ovlivnit střevní mikroflóru inhibicí vazby bakterií na střevní stěnu stimulací produkce mucinu, posílením střevní bariéry, zmírněním zánětu střev, a tím podporou růstu mikrobů spojených se zdravým fyziologickým stavem střev [46]. Některé studie naopak předpokládají, že změna ve složení mikrobiomu není primárním mechanismem působení probiotik vzhledem k tomu, že nebyly pozorovány žádné signifikantní účinky na složení lidské fekální mikroflóry v porovnání s kontrolní skupinou, které bylo podáváno pouze placebo [47].

Některé studie naznačují, že stejně jako antibiotika, také probiotika mohou do určité míry ovlivňovat biodostupnost orálně podávaných léčiv. Matušková et al. zjistili, že probiotická bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917 (*E. coli* Nissle 1917) mění farmakokinetiku antiarytmika amiodaronu (došlo k významnému zvýšení biologické dostupnosti tohoto léčiva) [48]. Zajímavé je, že jiná probiotická bakterie *Lactobacillus casei* (*L. casei*) vyzkazovala jiný efekt na farmakokinetiku amiodaronu: biologická dostupnost zůstala stejná, ale došlo k prodloužení času dosažení maximální plazmatické koncentrace o 2 hodiny [49]. Další *in vivo* studie na myších uvádějí, že podáváním probiotik dochází ke změně exprese enzymů metabolizujících léčiva v játrech [50, 51]. Tyto výsledky mohou být velmi důležité s ohledem na možné interakce bakterií s metabolismem léčiv, které mohou vést k nežádoucím účinkům u léčených pacientů.

2.1.3 Mikrobiom jako endokrinní orgán

Bakteriální metabolismus v GIT vysoce převyšuje pouze přímé lokální působení na střevní mukózu a enterickou nervovou soustavu. Střevní mikrobiom produkuje velké množství metabolitů hormonální povahy, které jsou uvolňovány do krevního řečiště a působí v celé řadě orgánů (Obr. 2). Nepřímo je také mikrobiota produkcí velkého množství aktivních metabolitů a prekurzorových molekul zapojena do regulace endokrinního systému. Na druhou stranu mohou některé druhy bakterií reagovat na hormony produkované hostitelským organismem. Tato schopnost ovlivňovat funkce distálních orgánů v mnoha aspektech činí ze střevního mikrobiomu komplexní systém podobný endokrinním orgánům [52]. Oproti jiným endokrinním orgánům, které sekretují pouze jeden nebo nanejvýše malé množství aktivních látek, střevní mikrobiota produkuje stovky metabolitů. Z morfologického a biochemického pohledu je střevní mikrobiom mnohem větší a biochemicky více heterogenní než jakýkoli jiný endokrinní orgán v lidském těle včetně mozku [53]. Jak bylo popsáno dříve, tento enormní biochemický potenciál plyne z obrovského množství bakteriálních buněk (10^{14}) a širokého spektra bakteriálních kmenů přítomných v GIT schopných produkovat širokou škálu metabolitů.



Obrázek 2. Vliv endokrinní produkce střevní mikroflóry na lidské zdraví a vznik onemocnění (modifikováno podle [52]).

Mezi produkty vznikajícími činností mikrobiomu patří neurotransmitery, např. kyselina γ-aminomáselná (GABA), serotonin, dopamin nebo noradrenalin, gastrointestinální hormony jako je ghrelin, leptin nebo hormon kortizol. GABA je nejdůležitější inhibiční neurotransmiter v mozku a je produkována některými komenzálními bakteriemi z rodu *Lactobacillus* [54]. Serotonin je klíčovým neurotransmiterem osy GIT – mozek jak na úrovni enterického nervového systému [55], tak centrální nervové soustavy [56]. Prekurzorem pro tuto signální molekulu je aminokyselina tryptofan, jejíž koncentrace v krvi je ovlivňována také střevním mikrobiomem [57]. Ukazuje se, že střevní mikrobiota by tak mohla být vhodným terapeutickým cílem pro léčbu onemocnění centrální nervové soustavy spojených s hladinou serotoninu [58].

2.1.3.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

Dalšími molekulami produkovanými střevní mikrobiotou jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), hlavní produkty bakteriální fermentace sacharidů a proteinů ve střevě. V mnoha ohledech se SCFA chovají jako hormony střevních mikrobiot a mohou tak zprostředkovávat celou řadu funkcí spojovaných s mikrobiomem pomocí klasické endokrinní signalizace. Například jsou schopny modulovat sekreci serotoninu [59] a uvolňování peptidu YY, důležitého neuropeptidu produkovaného neuroendokrinními buňkami ilea a tlustého střeva [52]. Receptory a transportéry pro SCFA jsou exprimovány v GIT [60]. Celková koncentrace SCFA produkovaných v lidském tlustém střevě je v rozmezí 50 – 200 $mmol \cdot l^{-1}$. Následně jsou velmi rychle absorbovány střevní sliznicí a mají významný dopad na fyziologii hostitelského organismu jako zdroj energie, při regulaci genové exprese a jako signální molekuly rozpoznávané specifickými receptory [61]. Nedávno byly publikovány studie ukazující na nové mechanismy, kterými SCFA mohou regulovat rozvoj imunitních buněk a potlačovat tak zánět [61, 62].

Hlavními SCFA jsou acetát, propionát a butyrát vznikající především v tlustém střevě činností bakterií rodu *Bacteroides, Bifidobacterium, Propionibacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Clostridium, Roseburia,*

Prevotella, ale i dalších v poměru přibližně 60:20:20 [63]. Je však známo, že tyto tři sloučeniny se značně liší ve svých potenciálních účincích na fyziologii hostitelského organismu. Zaprvé se liší svým osudem v organismu a tkáňovou distribucí, kdy butyrát je preferovaným zdrojem energie pro kolonocyty, propionát je zapojen do glukoneogeneze v játrech a acetát dosahuje nejvyšších koncentrací v cirkulaci [61]. Za druhé se jednotlivé SCFA rozdílně vážou na proteiny (např. inhibice histonových deacetyláz u butyrátu a propionátu) a receptory [64]. Dosud známé fyziologické účinky SCFA na lidské zdraví jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled fyziologických funkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) acetátu, propionátu a butyrátu produkovanými bakteriemi v tlustém střevě (modifikováno podle [65]).

SCFA	Fyziologický efekt
Acetát	Prochází portální žilou a je metabolizován v mnoha tkáních **Vliv na střevo** Minoritní zdroj enegie pro epiteliální buňky tlustého střeva Snižuje pH v tlustém střevě (což zvyšuje rozpustnost solí žlučových kyselin, zvyšuje absorpci minerálů, snižuje absorpci amoniaku a inhibuje růst patogenů) Má protizánětlivé účinky Zvyšuje průtok krve tlustým střevem a vstřebávání kyslíku Může být substrátem pro produkci butyrátu **Další vlivy** Je substrátem pro biosyntézu cholesterolu a mastných kyselin v játrech Energetický zdroj pro svaly a mozek
Propionát	Prochází portální žilou a následně je absorbován do jater **Vliv na střevo** Minoritní zdroj enegie pro epiteliální buňky tlustého střeva Snižuje pH v tlustém střevě (což zvyšuje rozpustnost solí žlučových kyselin, zvyšuje absorpci minerálů, snižuje absorpci amoniaku a inhibuje růst patogenů) Brání proliferaci a indukují apoptózu u kolorektálního karcinomu Interagují s imunitním systémem Má protizánětlivé účinky **Další vlivy** Podporuje pocit sytosti Snižuje hladinu cholesterolu v krvi Snižuje lipogenezi v játrech Zvyšuje citlivost na inzulin
Butyrát	Je absorbován především epiteliálními buňkami tlustého střeva, jen malé množství se dostane do cirkulace. **Vliv na střevo** Je hlavním zdrojem energie pro epiteliální buňky tlustého střeva Snižuje pH v tlustém střevě (což zvyšuje rozpustnost solí žlučových kyselin, zvyšuje absorpci minerálů, snižuje absorpci amoniaku a inhibuje růst patogenů) Stimuluje proliferaci epiteliálních buněk tlustého střeva Brání proliferaci a indukují apoptózu u kolorektálního karcinomu Ovlivňují genovou expresi epiteliálních buněk tlustého střeva Mají protektivní účinek proti rakovině tlustého střeva a kolitidě Posilují střevní buněčnou bariéru stimulací produkce mucinu a antimikrobiálních peptidů Interagují s imunitním systémem Má protizánětlivé účinky Stimuluje absorpci vody a sodíku Redukuje oxidační stres v tlustém střevě **Další vlivy** Podporuje pocit sytosti **Změna exprese jaterních enzymů metabolizujících léčiva?**

Především butyrát a propionát jsou studovány pro jejich potenciální pozitivní účinky na lidské zdraví, jakými je prevence proti rakovině tlustého střeva v případě butyrátu a snížení hladiny cholesterolu u propionátu [61]. Narozdíl od acetátu, který je produkován většinou komenzálních bakterií v střevním lumen, butyrát a propionát je produkován pouze určitými skupinami střevních bakterií. V Tabulce 2 jsou shrnuty některé komenzální bakterie nejhojněji zastoupené v lidské stolici, které jsou schopné produkovat butyrát a propionát. Nejvýznamnějšími producenty butyrátu jsou dva bakteriální rody z kmene *Firmicutes*, *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*, nicméně, z Tabulky 2 je zřejmé, že celá řada dominantních bakterií z kmene *Firmicutes* přítomných v tlustém střevě (*Blautia spp., Eubacterium eligens, Ruminococcus spp.* a další) schopnost produkovat butyrát postrádá. Jeden z hlavních faktorů, který ovlivňuje zapojení jednotlivých bakteriálních druhů do produkce butyrátu nebo propionátu je hodnota pH ve střevě [66].

Nejvýraznější bioaktivní účinky z SCFA prokazuje butyrát, jako je například vliv na funkci střevní sliznice inhibicí zánětu a karcinogeneze, posílení komponent pro obrannou bariéru střevní stěny a snížení oxidačního stresu. Mezi dva hlavní molekulární mechanismy působení butyrátu na fyziologii člověka patří inhibice aktivace nukleárního faktoru kappa B a inhibice histonových deacetyláz. Pozorované efekty butyrátu v jednotlivých studiích z velké míry závisejí na jeho použitých koncentracích a modelových organismech. Problémem je také nedostatek klinických studií pro potvrzení prospěšného účinku butyrátu na lidské zdraví [67].

Některé studie ukázaly, že množství butyrátu produkovaného bakteriemi jako je *Butyricicoccus pullicaecorum, Eubacterium rectale, Faecalibacterium prausnitzii*, a/nebo *Roseburia intestinalis* je výrazně sníženo u pacientů se zánětlivým onemocněním střev [68, 69] a důsledkem toho byl nález nižších koncentrací butyrátu ve stolici těchto pacientů v porovnání se zdravými jedinci [70]. Nižší zastoupení bakteriálních producentů butyrátu bylo zjištěno také u pacientů s rakovinou tlustého střeva [71]. Z těchto důvodů se vědci snaží nalézt metody pro stimulaci bakteriální produkce butyrátu v tlustém střevě podáváním speciální diety (prebiotika, např. těžko stravitelné nebo nestravitelné oligosacharidy) nebo aplikací

těchto bakterií orálně (probiotika). V klinické praxi je již používán butyrát v podobě tablet nebo rektálních čípků pro léčbu pacientů se zánětlivým onemocněním střev [72].

Bylo také zjištěno, že butyrát indukuje expresi AhR včetně jeho cílových genů *Cyp1a1*, *Cyp1a2* a *Cyp1b1* v játrech bezmikrobních myší [73]. Cytochromy P450 (CYP) 1A1, 1A2 a 1B1, o kterých bude pojednáno dále, patří mezi biotranformační enzymy první fáze metabolizující xenobiotika včetně některých klinicky užívaných léčiv [74]. Butyrát by tedy, kromě již zmiňovaných fyziologických účinků, mohl ovlivňovat také metabolismus léčiv v játrech.

Tabulka 2. Schopnost dominantních bakteriálních druhů nalezených v lidské stolici produkovat butyrát a propionát (modifikováno podle [65]).

Bakteriální kmen	***Bakteriální druh***	***Butyrát***	***Propionát***
Bacteroidetes (Bacteroidaceae)	*Bacteroides uniformis*	-	+
	Bacteroides vulgatus	-	+
Bacteroidetes (Prevotellaceae)	*Prevotella copri*	-	+
Bacteroidetes (Rikenellaceae)	*Alistipes putredinis*	-	+
Firmicutes (Lachnospiraceae)	*Eubacterium rectale*	+	-
	Roseburia inulinivorans	+	+
	Roseburia intestinalis	+	-
	Dorea longicatena	-	-
	Eubacterium hallii	+	+
	Anaerostipes hadrus	+	-
	Ruminococcus torques	-	-
	Coprococcus eutactus	+	-
	Blautia obeum	-	+
	Dorea formicigenerans	-	-
	Coprococcus catus	+	+
Firmicutes (Ruminococcaceae)	*Faecalibacterium prausnitzii*	+	-
	Subdoligranulum variabile	+	-
	Ruminococcus bromii	-	-
	Eubacterium siraeum	-	-
Firmicutes (Veillonellaceae)	*Dialister invisus*	-	+
Firmicutes (Acidaminococcaceae)	*Phascolarctobacterium succinatutens*	-	+
Firmicutes (Erysipelotrichaceae)	*Eubacterium biforme*	+	-
Actinobacteria (Bifidobacteriaceae)	*Bifidobacterium adolescentis*	-	-
	Bifidobacterium longum	-	-
Actinobacteria (Coriobacteriaceae)	*Collinsella aerofaciens*	-	-
Verrucomicrobia (Verrucomicrobiaceae)	*Akkermansia muciniphila*	-	+

2.1.4 Mikrobiom a metabolismus léčiv

Orální aplikace je nejčastější způsob podávání léků, 84 % z padesáti nejprodávanějších farmaceutických produktů v USA a v Evropě je podáváno ústy [75]. Orální aplikace je zároveň jednoznačně nejkomplexnější cestou podávání léčiv (Obr. 3). Aby orálně podávané léčivo bylo učinné, musí a) dojít k jeho rozpuštění v tekutinách gastrointestinálního traktu b) zůstávat beze změny v střevním lumen c) projít přes epiteliální membrány a d) podstoupit minimální metabolické přeměny při prvním průchodu játry nebo GIT. Biologická dostupnost perorálně podaného léčiva je multifaktoriální proces a je závislá především na jeho rozpustnosti, stabilitě, schopnosti přecházet přes membrány a metabolických přeměnách, které podstupuje.

O roli rozpustnosti, schopnosti přecházet přes membrány a biotransformaci léčiv v játrech bylo napsáno mnoho, méně pozornosti však bylo věnováno jejich stabilitě v střevním lumen. Nestabilita léčiva je často spojována s pH a/nebo degradací léčiva enzymy v tenkém střevě. Důležitým faktorem stability, který je velmi často přehlížen, je však také účinek střevní mikroflóry [14].

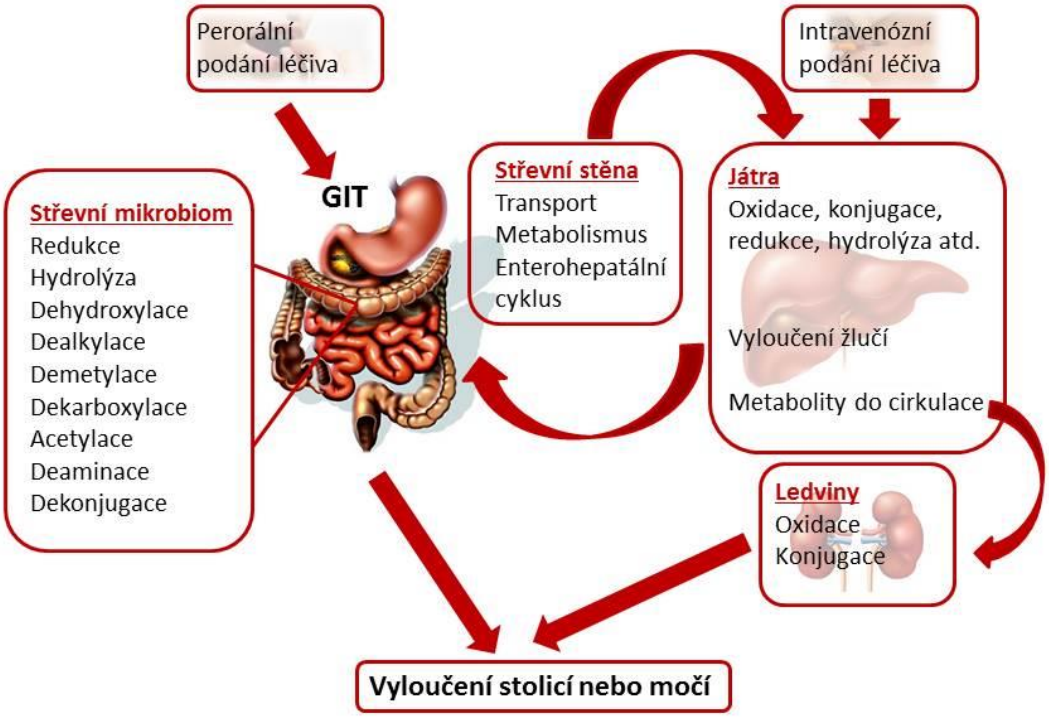
Střevní bakterie vybavené velkou škálou enzymů mají schopnost metabolizovat léčiva a jiná xenobiotika ve srovnatelné míře jako jakákoliv jiná část lidského těla. Scheline dokonce předpokládal, že střevní mikroflóra má schopnost fungovat jako orgán s metabolickým potenciálem minimálněm stejným jako játra [76]. Mezi jaterním a mikrobiálním metabolismem jsou však značné rozdíly. V játrech dochází zejména k oxidačním a konjugačním reakcím, které produkují vysokomolekulární polární sloučeniny. Zatímco střevní mikrobiota je zapojena do redukčních a hydrolytických reakcí produkujících nízkomolekulární nepolární metabolity. Rychlost a rozsah bakteriálního metabolismu jsou ovlivněny množstvím léčiva, které se dostane do distální části střeva.

Většina léků se rychle a kompletně absorbuje již na začátku tenkého střeva a má tak minimální kontakt se střevní mikroflórou. To vysvětluje skutečnost, proč za posledních čtyřicet let bylo identifikováno pouze asi třicet léčiv uvedených na trh jako substáty střevních mikroorganismů. Nicméně mezi kandidáty na nová léčiva je stále velký počet sloučenin, s nízkou rozpustností a/nebo schopností přecházet

přes membrány [77]. Léčiva s těmito vlastnostmi procházejí do nižších částí GIT, kde dochází k jejich interakci s bakteriemi. Kromě toho se léčiva, která jsou aplikována intravenózně nebo jsou zcela absorbována v horní části tenkého střeva, mohou dostat do střevního lumen sekrecí nebo difúzí z krevního oběhu nebo mohou být vyloučena žlučí enterohepatálním oběhem. Ve většině těchto případů dochází ke kontaktu léčiva se střevní mikrobiotou. K přímému kontaktu s bakteriemi v tlustém střevě dochází také po rektálním podání léčiva ve formě čípků nebo klystýrů.

Z těchto informací je zřejmé, že existuje možnost interakce střevních bakterií s léčivy a jejich vliv na stabilitu léčiv v střevním lumen by neměl být zanedbáván. Vliv střevní mikroflóry na stabilitu léčiva je klinicky relevantní, protože bakteriální metabolismus může produkovat metabolity, které jsou farmakologicky aktivní, neaktivní nebo dokonce toxické [14].

Ve většině případů však není znám detailní mechanismus, specifická reakce a bakteriální kmen zodpovědný za modifikaci léčiv. V současné době nové metody molekulární biologie, zvláště sekvenování bakteriální DNA a pyrotagging technologie, umožňují studovat, jakým způsobem ovlivňují střevní bakterie biodostupnost, účinnost a toxicitu léčiv. Několik nedávných studií ukázalo, že střevní mikroflóra může ovlivňovat farmakokinetiku perorálně podávaných léčiv, a proto může mít významné důsledky pro jejich biodostupnosti [40, 41].



Obrázek 3. Místo vstupu do organismu a metabolismus léčiva po perorálním a intravenózním podání (modifikováno podle [78]).

2.1.4.1 Mechanismy působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv

Přestože znalosti týkající se střevního mikrobiomu a jeho vlivu na metabolismus léčiv za poslední dobu vyrazně pokročily, celá řada otázek zůstává nezodpovězena nebo známe odpovědi jen částečně. Například, jaký je mechanismus a které bakteriální druhy jsou zapojené do interakce? Na základě studií metabolismu a farmakokinetiky některých léčiv byly navrženy možné mechanismy:

První skupinou jsou přímé mechanismy, kdy je prokázáno přímé spojení mezi střevním mikrobiomem a odpovídající biotransformací léčiva, zahrnující také přímou vazbu léčiva na mikrobiální buňky.

Aktivace léčiva. Střevní mikrobiota může přeměňovat inaktivní terapeutikum (tzv. prodrug) na jeho aktivní formu. Příkladem je lék ulcerózní

kolitidy sulfasalazin, které obsahuje protizánětlivě působící 5-aminosalicylovou kyselinu (5-ASA) spojenou dvojnou vazbou (azoskupinou) s molekulou sulfapyridinu. Léčivo je inaktivní dokud se nedostane do distálního střeva, kde je bakteriálními azoreduktasami redukčně rozštěpena azoskupina v molekule sulfasalazinu a dochází k uvolnění 5-ASA [79].

Detoxikace léčiva. Střevní mikrobiom také kóduje enzymy, které detoxikují léčiva, čímž mění jejich farmakologickou účinnost a/nebo toxicitu. Jedním z příkladů bakteriálního detoxikačního mechanismu je kardiotonikum digoxin, který je inaktivován komenzální bakterií *Eggerthella lenta* z kmene *Actinobacteria*. Digoxin je jedním z mála příkladů, kde je přesně identifikovaný bakteriální druh zodpovědný za biotransformaci léčiva [80].

Přímá vazba na xenobiotikum. Dalším důležitým příkladem, avšak zatím málo prozkoumaným, je přímá interakce mezi střevním mikrobiomem a léčivem. Příkladem je interakce bakterie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) s prekurzorem dopaminu léčivem levodopou (L-DOPA), často předepisovaným pacientům s Parkinsonovou chorobou. Na rozdíl od dopaminu může orálně podávaná L-DOPA procházet hematoencefalickou bariérou, kde je dekarboxylována na dopamin. Je také dlouho známo, že pacienti s Parkinsonovou nemocí mají zvýšené riziko vzniku žaludečních vředů, což je způsobeno především působením bakterie *H. pylori*, která poškozuje sliznice žaludku a dvanáctníku. Nedávné studie ukázaly, že odstranění bakterie *H. pylori* antibiotiky zvyšuje biodostupnost L-DOPY a zlepšuje účinnost léčby u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Kromě přímé vazby může *H. pylori* ovlivňovat biodostupnost L-DOPA narušením její absorpce přes střevní stěnu, produkcí ROS nebo přímo její biotransformací [81].

Druhou skupinou mechanismů, kterými střevní mikrobiom může výrazně zasahovat do metabolismu léčiv, jsou ty **nepřímé**. Jedním z nepřímých mechanismů je enterohepatální cyklus zodpovědný za prodloužení efektu střevních mikrobiot na biotransformaci léčiv. Léčivo často podléhá konjugačním reakcím s kyselinou glukuronovou za katalýzy jaterními UDP-glukuronosyltransferasami a produkce polárního konjugátu, který je snadno vyloučen žlučí. Jakmile se konjugát dostane

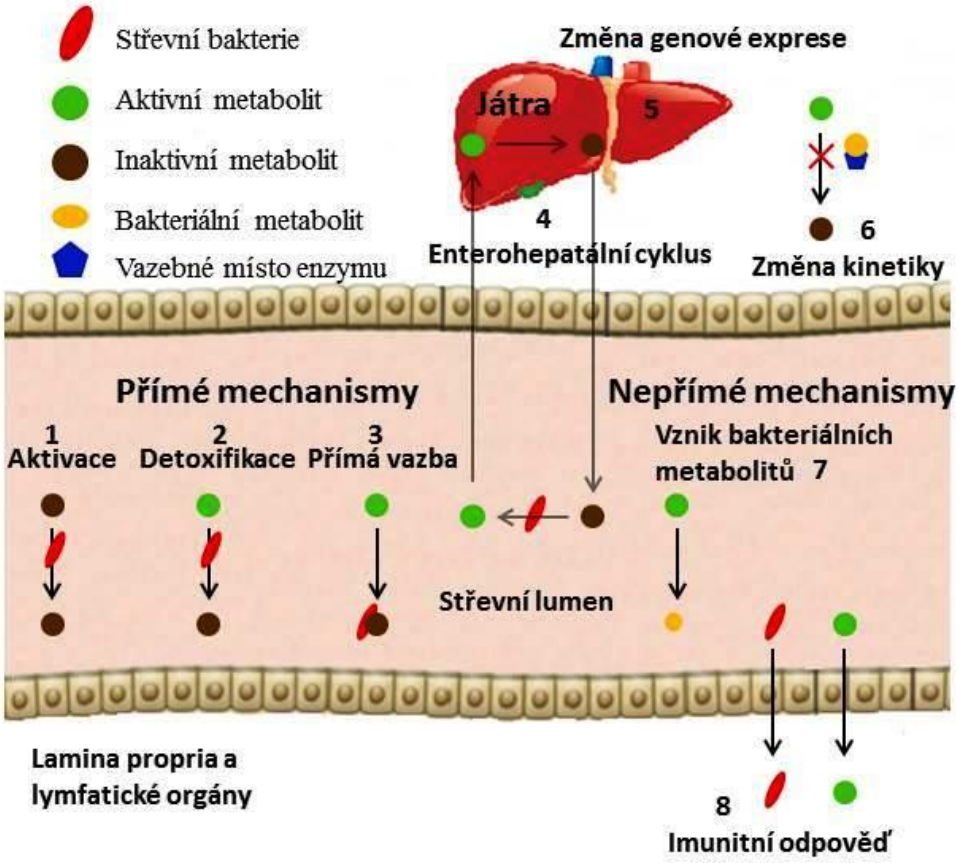
do střeva je štěpen bakteriálními β-glukoronidasami, což může mít negativní následky. Typickým příkladem je irinotecan, léčivo podávané pacientům s rakovinou tlustého střeva, které je ve střeve přeměněno zpět na svou cytotoxickou formu způsobující nežádoucí vedlejší účinky v GIT [82].

Výsledky posledních studií ukazují, že jedním z možných mechanismů působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv může být jeho vliv na expresi jaterních biotransformačních enzymů. Několik prací poukazuje na změnu exprese mRNA cytochromů P450 u bezmikrobních myší postrádajících zcela střevní bakterie v porovnání s kontrolními zvířaty s normální střevní mikroflórou [83, 84]. Také cílená monokolonizace bezmikrobních myší definovanými bakteriálními druhy, jak komenzálními, tak probiotickými, má vliv na hladiny exprese jednotlivých cytochromů P450.

K významným interakcím mezi střevními bakteriemi a hostitelským organismem dochází také v případě metabolických drah společných pro enzymy hostitelského organismu s těmi, které jsou kódovány střevním mikrobiomem. V roce 2008 byly evidovány případy, kdy mléčné výrobky obsahující melamin způsobily epidemii ledvinových kamenů, akutní selhání ledvin a několik úmrtí. Melamin je sám o sobě v malých dávkách netoxický, ale pokud je podáván v kombinaci s kyselinou kyanurovou tvoří krystalky nerozputného melamin kyanurátu, který byl nalezen v renálních tubulech postižených pacientů. Co bylo zdrojem kyseliny kyanurové nebylo zpočátku známo, až *in vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že za její přítomnost jsou zodpovědné střevní bakterie degradující melamin (např. *Klebsiella terrigena*) [85].

Další možností je soupeření produktu bakteriálního metabolismu a léčiva o stejné vazebné místo na biotransformačním enzymu. Metabolity produkované střevním mikrobiomem tak mohou ovlivňovat účinnost nebo toxicitu daného léčiva. Mezi takováto léčiva patří například běžně užívané antipyretikum, paracetamol, nebo antivirotikum sorivudin. Oba dva případy budou detailněji zmíněny v následující kapitole. Nedávné studie léků proti rakovině ukázaly, že střevní mikrobiom může mít vliv na účinnost léčiv také stimulací imunitního systému

hostitelského organismu [86]. Všechny výše zmíněné mechanismy jsou shrnuty na Obrázku 4.



Obrázek 4. Mechanismus ovlivnění metabolismu léčiv střevními bakteriemi.

Přímý mechanismus: (1) produkce aktivních metabolitů, (2) detoxikace, (3) přímá vazba bakteriálních buněk na léčivo. **Nepřímé mechanismy** vlivu střevního mikrobiomu na fyziologii hostitelského organismu: (4) enterohepatální oběh, (5) změna exprese genů zapojených do metabolismu xenobiotik, (6) změna kinetiky způsobená bakteriálními metabolity soutěžícími o vazebná místa enzymů s léčivem, (7) produkce bakteriálních metabolitů zapojených do metabolických drah hostitelského organismu a (8) stimulace imunitní odpovědi (podle [82]).

2.1.4.2 Léčiva metabolizovaná bakteriemi v gastrointestinálním traktu

Schopnost střevního mikrobiomu metabolizovat léky byla poprvé rozpoznána přibližně před 40 lety [87]. Dnes jsou známy asi čtyři desítky léků a bioaktivních přírodních látek obsažených v potravě, které jsou přímo metabolizovány bakteriálními enzymy, a jejich počet stále roste [14, 88] (Tab. 3).

Metabolismus **sorivudinu** je výborným příkladem důležitosti studia zapojení střevních bakterií do metabolismu orálně podávaných léčiv a možných změn v jejich farmakologické aktivitě nebo dokonce toxicitě. Sorivudin je anolog thyminu užívaný jako antivirální léčivo způsobující kompetitivní inhibici virální DNA polymerázy. V roce 1993 byl stažen z japonského trhu po osmnácti náhlých úmrtích pacientů léčených na rakovinu, kterým byl orálně podáván 5-fluorouracil v kombinaci právě se sorivudinem. Okuda et al., zjišťovali přesný mechanismus této fatální lékové interakce a zjistili, že za toxicitu sorivudinu je zodpovědný jeho bakteriální metabolit [89]. Metabolit (E)-5-(2-bromovinyl) uracil produkovaný střevními bakteriemi – hlavně druhy z kmene *Bacteroidetes*, může inhibovat metabolismus 5-flurouracilu, což způsobuje jeho toxickou hladinu v organismu [90]. Experimenty s bezmikrobními potkany tuto skutečnost potvrdily [91].

Acetaminofen, **paracetamol** (*N*-acetyl-p-aminofenol), je jeden z nejvíce používaných volně prodávaných léků na světě pro své analgetické a antipyretické vlastnosti. Biotransformace a potenciální toxicita paracetamolu byla intenzivně studována a jeho osud v lidském organismu je velmi dobře znám [92, 93]. Orálně podávaný paracetamol je převážně metabolicky přeměňován na dva farmakologicky inaktivní metabolity dvěma cestami - glukuronidací nebo *O*-sulfonací za vzniku glukuronidu resp. sulfátu paracetamolu. Přibližně třetina množství paracetamolu je oxidována primárně cytochromy P450 2E1, 1A2 a 3A4 na vysoce reaktivní metabolit N-acetyl-benzochinonimin (NAPQI), který je zodpovědný za jeho toxicitu [94]. NAPQI je detoxifikován konjugací s glutathionem a následně vyloučen močí. Hlavním orgánem zapojeným do metabolismu paracetamolu jsou játra, v menší míře ledviny. Poslední studie ukazují, že za interindividuální rozdíly v toxicitě paracetamolu jsou částečně zodpovědné také střevní bakterie. Střevní bakterie (např. *Clostridium difficile*) produkují z aminokyselin a tyrosinu *p*-kresol,

substrát lidského jaterního enzymu sulfotransferasy 1A1 (SULT1A1), který je zodpovědný také za již zmíněnou *O*-sulfonaci paracetamolu. Bakteriální metabolit *p*-kresol tedy soutěží s paracetamolem o vazebné místo SULT1A1. U pacientů s přirozeně vyšší hladinou *p*-kresolu dochází ke snížení schopnosti sulfonace paracetamolu způsobenou vazbou tohoto bakteriální metabolitu na vazebné místo SULT1A1 a pravděpodobně ke zvýšení produkce NAPQI a tedy zvýšení rizika hepatotoxicity paracetamolu [95].

Ve světle těchto výsledků je zřejmé, že stabilita léčiv v intestinálním lumen a potenciální zapojení střevního mikrobiomu do jejich metabolismu by neměly být přehlíženy. I v případě tak běžně užívaného léčiva, jakým je paracetamol, je nutné brát v úvahu roli mikrobiomu a jeho vliv na odpověď na léčbu u jednotlivých pacientů.

Tabulka 3. Přehled léků metabolizovaných střevními bakteriemi [96].

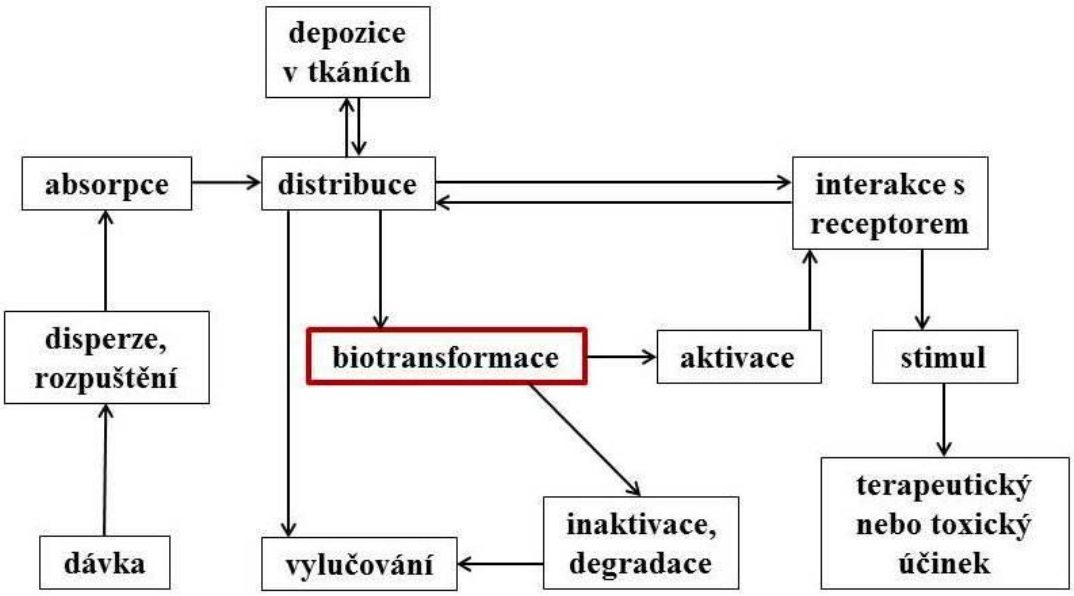
Klinické využití	Léčivo	Vliv bakterií na léčivo	Bakteriální metabolismus	Druh bakterie	Ref
Antibiotika	Prontosil	aktivace prodrug	Azo redukce	neznámý	[97, 98]
	Neoprontosil	aktivace prodrug	Azo redukce	neznámý	[97, 98]
	Metronidazol		Redukce	neznámý	[99, 100]
	Chloramfenikol	zvýšení toxicity	Vznik aminu a hydrolýza	neznámý	[101]
Protizánětlivá léčiva	Sulfasalazin	aktivace prodrug	Azo redukce	neznámý	[79, 102, 103]
	Balsalazid	aktivace prodrug	Azo redukce	neznámý	[104]
	Olsalazin	aktivace prodrug	Azo redukce	neznámý	[105]
	Sulfinpyrazon	zvýšení aktivity	Redukce sulfoxidu	neznámý	[106]
	Sulindak	zvýšení aktivity	Redukce sulfoxidu	neznámý	[106]
	Nabumeton	snížení biodostupnosti	Redukce	neznámý	[107]
	Mesalazin		Acetylace	neznámý	[108-110]
Analgetika	Acetaminofen (paracetamol)	zvýšení toxicity	O-sulfatace; C-S štěpení acetaminofen-3-cysteinu	*Clostridium difficile*	[95]
	Fenacetin	snížení aktivity	Deacetylace	neznámý	[111]
Kardiotonika	Digoxin	snížení aktivity	Redukce	*Eggerthella lenta*	[80, 112]
Anti-psychotika	Risperidon	indukce symptomů Parkinsonovy choroby	Štěpení izoxazolového kruhu nebo hydroxylace	neznámý	[113]
	L-Dopa	snížení aktivity	Dehydroxylace	neznámý	[114]
	Zonisamid	ovlivnění redukce	Redukce	neznámý	[115]
Antivirotika	Sorivudin	zvýšení toxicity	Hydrolýza	*Bacteroides*	[91]
Antimykotika	Flucytosin	zvýšení aktivity nebo toxicity	Deaminace	neznámý	[116]
Hypolipidemika	Lovastatin	změněná farmakokinetika	Hydrolýza	neznámý	[41, 117-119]
Hypnotika	Nitrazepam	indukce teratogenicity	Nitro redukce	*Clostridium leptum*	[120-122]
Antiepileptika	Klonazepam		Nitro redukce	neznámý	[123]
Cytostatika	Mizonidazol		Nitro redukce	neznámý	[124]
Antiulcerotika	Omeprazol	vznik sulfidu	Redukce sulfoxidu	neznámý	[125]
	Ranitidin	snížená absorbce ve střevě a biodostupnost	N-oxid redukce	neznámý	[126]
	Nizatidin		N-oxide redukce	neznámý	[127]
Antihelmintika	Levamisol	zvýšení aktivity	Otevření thiazolového kruhu	*Bacteroides, Clostridium spp.*	[128]
Prebiotika	Lactulóza	stimulace růstu bakterií	Hydrolýza	neznámý	[129]

2.2 Metabolismus xenobiotik

Xenobiotika jsou definována jako látky cizí pro lidský organismus, které v něm nejsou za běžných podmínek produkovány. Patří sem látky z potravy, z okolního prostředí (např. pesticidy, herbicidy, pigmenty, konzervační látky) a dále synteticky připravené molekuly včetně léčiv. Je zřejmé, že k tomu, aby se projevil terapeutický popřípadě toxický efekt léčiva, musí dojít k jeho kontaktu s biologickým systémem. Nejdříve musí dojít k absorpci do organismu, nejčaštěji přes gastrointestinální trakt do krevního řečiště a následně probíhá distribuce léčiva cévami do jater, hlavního orgánu metabolismu cizorodých látek. Nakonec dochází k vyloučení (exkreci) léčiva nebo jeho metabolitu z organismu. Léky, které jsou absorbovány biologickým systémem, se velmi často vyznačují lipofilní strukturou. Tyto látky proto nejsou snadno vyloučitelné z organismu, protože mohou být opět reabsorbovány v ledvinách nebo z GIT po vyloučení žlučí. Metabolismem (biotransformací) xenobiotik dochází k přeměně těchto lipofilních sloučenin na látky více polární, které jsou snadněji vylučovány. Dochází tak ke snížení jeho potenciálního toxického efektu. Interakce mezi léčivem a organismem je velice komplikovaný proces zahrnující celou řadu vzájemně podmíněných kroků. Výsledné farmakologické chování léčiva je dáno fyzikálně-chemickými vlastnostmi účinné látky, lékovou formou, způsobem podání, dávkou a mírou uplatnění všech výše zmíněných procesů, které jsou schématicky shrnuté na Obrázku 5 [130].

Metabolismus xenobiotik je v organismu zprostředkován biotransformačními enzymy vyznačujícími se širokou substrátovou specifitou. Některé z těchto enzymů mají specifickou afinitu pro jednotlivé substráty, jiné hrají významnou roli také v metabolismu endogenních látek např. žlučových kyselin, eikosanoidů, vitamínů, mastných kyselin a steroidních hormonů. Výsledkem působení biotransformačních enzymů je udržení homeostázy organismu během expozice cizorodou látkou. Nicméně, působením biotranformačních enzymů může např. dojít ke změně farmakologické aktivity léčiva nebo dokonce ke vzniku toxických metabolitů. Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra, tkáňová lokalizace biotransformačních enzymů je však mnohem širší, vyskytují se např. i

v ledvinách, plících, mozku, GIT, varlatech, srdci, nadledvinkách a krevních buňkách [131].



Obrázek 5. Osud léčiva v organismu (převzato z [132]).

Metabolické přeměny cizorodých látek se tradičně rozdělují do dvou fází, v poslední době byla navržena také třetí fáze zahrnující roli membránových transportérů (která však nezahrnuje metabolické přeměny, jedná se vlastně o transport) [133]. Během první fáze biotransformace dochází k odhalení nebo vložení polární funkční skupiny do molekuly xenobiotika, čímž se zvýší jeho hydrofilita. Reakcemi první fáze jsou hlavně oxidace, redukce a hydrolýza a mezi polární funkční skupiny patří především -OH, $-NH_2$, -SH a -COOH skupina. Metabolit I. fáze je oproti parentní látce více polární a může být vyloučen z organismu ledvinami nebo vstoupit do II. fáze biotransformace. Při II. fázi polární metabolit podstupuje konjugační reakce, kdy se na metabolit naváže endogenní látka, nejčastěji UDP-glukuronová kyselina (jako tomu bylo u paracetamolu) a dojde ke vzniku polárních konjugátů, které jsou pak snadno vyloučeny z organismu močí nebo žlučí. Ne vždy musí v biotransformačním procesu I. fáze předcházet II. fázi. Pokud cizorodá látka již obsahuje funkční skupinu vhodnou pro konjugační

reakce II. fáze, I. fáze není nutná. Naopak, je-li metabolit I. fáze dostatečně polární pro vyloučení z organismu, nepodléhá již II. fázi biotransformace [134].

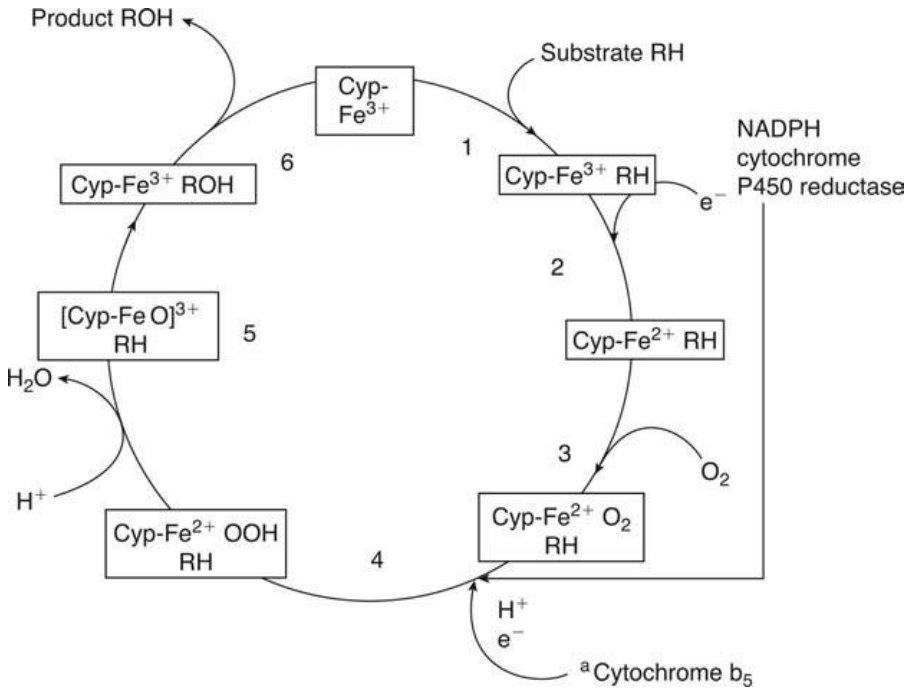
2.2.1 Cytochromy P450

Nejznámějšími biotransformačními enzymy I. fáze jsou cytochromy P450 (CYP). Více než tři čtvrtiny známých oxidačních reakcí léčiv jsou katalyzovány právě touto rodinou enzymů. Lidské CYP jsou přítomné v mnoha tkáních, především v játrech, ale i ve střevech, plících a ledvinách, v měním množství také v mozku a srdci. Co se týče buněčné lokalizace, vyskytují se převážně v endoplasmatickém retikulu resp. v tzv. mikrosomální frakci (vzniklé z endoplasmatického retikula při rozbití buněk), jsou však přítomné i v mitochondriích, ale vždy jsou vázány na buněčné membrány [74].

CYP tvoří velkou rodinu monooxygenáz obsahujících hem jako prostetickou skupinu. Nejčastějšími reakcemi jsou hydroxylace, což je dáno jejich schopností zabudovat jeden atom kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku uvolnit v podobě vody. Spolu s CYP enzymy je součástí monooxygenázového systému také flavoprotein NADPH: cytochrom P-450 oxidoreduktasa (zkráceně CYPOR), která na ně přenáší postupně dva elektrony. Pro reakci jsou tak nezbytné NADPH, kyslík, FAD, FMN, cytochrom b_5 a fosfolipidy [135].

Samotná oxidace substrátu katalyzovaná CYP enzymy probíhá v šesti krocích (Obr. 6). **V prvním kroku** se substrát váže na CYP obsahující železo v oxidované formě. Následně v **kroku číslo dvě** dochází k redukci železa z oxidačního stavu +III do oxidačního stavu +II. Elektron je přenášen pomocí výše zmiňovaného flavoproteinu CYPOR z NADPH. V tomto redukovaném stavu mohou CYP vázat na centrální atom železa hemu také další ligandy, se kterými poskytují diferenční spektra. Nejznámnějším příkladem je komplex s oxidem uhelnatým, absorbující VIS záření o vlnové délce 450 nm, který dal této rodině enzymů název – cytochromy P450.

Krok 3 zahrnuje vazbu molekulárního kyslíku a přestavbu ternárního komplexu železo – oxidovaný cytochrom P450 – substrát. Oxidační stav kyslíku a železa v ternárním komplexu není zatím přesně znám. Během **kroku 4** se druhý elektron z NADPH váže na ternární komplex prostřednictvím reduktázy, nejčastěji CYPOR. **Krok číslo 5** se vyznačuje přestavbou komplexu a vazbou atomu kyslíku na substrát. Přesný mechanismus není jasný, ale zdá se, že se kyslík váže na substrát v aktivované formě a druhý atom kyslíku je redukován na vodu, která je dalším produktem reakce. **V posledním šestém kroku** dochází k uvolnění oxidovaného produktu a regeneraci oxidované formy CYP [74, 130].



$$SH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow SOH + H_2O + NADP^+$$

Obrázek 6. Schematické znázornění katalytického cyklu cytochromů P450. RH, substrát; ROH, hydroxylovaný produkt (převzato z [130]).

V současné době je známo 57 lidských forem CYP, ale pouze asi desítka těchto enzymů patřících do prvních tří skupin (CYP 1-3) je zodpovědná za většinu biotransformaci xenobiotik, včetně 70-80 % všech klinicky užívaných léčiv. Znalost osudu léčiva a zapojení konkrétní formy CYP při jeho metabolismu jsou velmi důležité s ohledem na možné lékové interakce, nicméně výsledky získané v experimentech *in vitro* jsou stále velmi daleko od běžné klinické praxe. K interakcím mezi léčivy dochází relativně často a je skutečností, že mohou vést ke vzniku nežádoucích až toxických účinků léčiva nebo ke snížení jeho terapeutického účinku a tedy k selhání léčby. Rozpoznání faktorů, které jsou zodpovědné za neobyčejnou rozdílnost ve farmakokinetice a farmakodynamice u jednodlivých pacientů je stále velkou výzvou. Za jeden z hlavních zdrojů této enormní variability jsou považovány právě CYP [136].

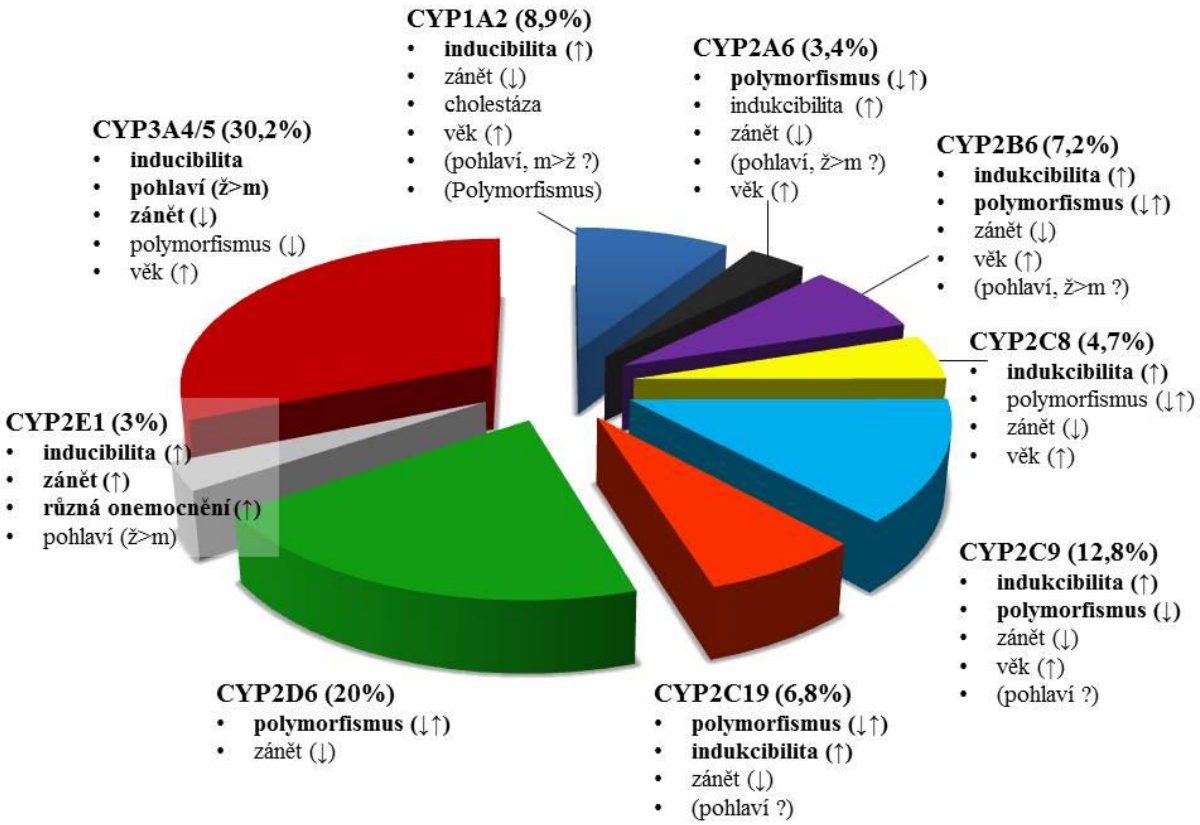
Nejdůležitější formou CYP z hlediska metabolismu léčiv u člověka a zároveň nejzastoupenější formou v játrech je CYP3A4. Kromě jater je CYP3A4 také nejvíce exprimovanou formou cytochromů P450 ve střevních enterocytech a je tak významně zapojen do metabolismu orálně podávaných léčiv. Spolu s CYP3A5 se vyskytuje také v mozku, plících a ledvinách [137]. Dalším enzymem v podrodině CYP3A je CYP3A7 vyskytující se však výhradně v játrech lidského plodu. V dospělosti je forma CYP3A7 téměř úplně nahrazena CYP3A4, nicméně vztah mezi těmito dvěma formami je velice komplexní a důvod přítomnosti této formy u člověka zatím není zcela znám [138].

Spektrum léčiv, u kterých je do jejich metabolismu zapojen CYP3A4, je široké a otevírá tak celou řadu možností pro lékové interakce, kdy může být extrémně snížená nebo naopak zvýšená hladina jednoho z podaných léčiv. Celou řadu strukturně nesourodých látek řadíme také mezi induktory CYP3A4, tj. látky, schopné zvýšit expresi tohoto CYP, např. benzodiazepiny, fenobarbital, kyselina valproová a další.

Exprese každého CYP je ovlivněna jedinečnou kombinací mechanismů a faktorů včetně genetického polymorfismu, indukce xenobiotiky, regulace cytokiny, hormony, patologickým stavem organismu, stejně tak pohlavím, věkem a dalšími [136]. Bylo například zjištěno, že pohlaví ovlivňuje řadu farmakologicky

významných parametrů, včetně exprese biotransformačních enzymů a transportérů [139]. Mnohé studie ukazují na to, že ženy metabolizují léčiva mnohem efektivněji než muži, což je pravda především pro substráty nejdůležitější formy CYP pro metabolismus léčiv u člověka, CYP3A4. Analýzy rovněž ukazují, že hladina proteinu CYP3A4 v játrech je vyšší u žen v porovnání s muži a stejný trend je i na úrovni mRNA [140]. Významným faktorem ovlivňujícím kapacitu metabolizovat léčiva je také věk. U novorozenců je tato kapacita velmi nízká z důvodu nezralosti celé řady enzymových systémů včetně CYP, které se plně vyvinou během prvního roku života. U starší populace se schopnost metabolizovat léčiva s věkem značně snižuje. Tyto změny nemusí vždy souviset se sníženou expresí či aktivitou biotransformačních enzymů. Studie ukazují, že většina forem CYP vykazuje mírné zvýšení v expresi a aktivitě během života, což je zvlášť zřejmé pro formu CYP2C9 [141]. Důvodem pro omezení metabolizmu léčiv u starších osob je časté současné užívání více léků, čímž dochází k inhibici biotransformačních enzymů. Dále je ve vyšším věku redukovaný jaterní krevní oběh a funkce ledvin [142]. Různá onemocnění a patologické stavy mají samozřejmě i negativní vliv na schopnost organismu metabolizovat léčiva. Například jaterní cirhóza způsobí změny ve struktuře jater, což vede ke snížení jaterního krevního oběhu, ztrátě funkčních hepatocytů, snížení metabolické kapacity jaterních biotransformačních enzymů a snížení syntézy plazmatických proteinů. To vše vede ke snížení clearence léčiva, ale zároveň ke zvýšení hladiny volného léčiva v krvi. Během infekce, zánětu nebo nádorových onemocnění se uvolňují do krve interleukiny (IL-1β,TNF-α a IL-6), které fungují jako signální molekuly a vyvolávají změny v expresi jaterních genů vedoucí k snížení exprese celé řady biotransformačních enzymů [143].

Dalším, jak ukazují poslední studie, neméně důležitým faktorem ovlivňujícím expresi CYP enzymů je vliv střevního mikrobiomu, o kterém pojednávala první část teoretického přehledu.



Obrázek 7. Procentuální rozdělení klinicky významných forem cytochromů P450 v lidských játrech a faktory ovlivňující tyto enzymy (modifikováno podle [136]).

2.3 Modely pro studium vztahu mezi střevním mikrobiomem a metabolismem léčiv

Většina střevních mikrobiot se nachází v tlustém střevě, které je tak hlavním místem bakteriální biotransformace endogenních a exogeních látek. Jeho nepřístupnost však brání přímému pozorování metabolické aktivity střevních mikrobiot. Lidské a zvířecí experimenty pro studium této oblasti jsou velmi nákladné a mají etické nevýhody. Jedním z problémů pro použití *in vivo* experimentů na lidech je např. toxicita použitých markerových substrátů. Nabízí se tedy *in vitro* přístup, který je ale velmi zjednodušující. Nedokáže zachytit neustálý příliv živin a endogenních látek, jejich přeměnu v gastrointestinálním traktu, absorpci fermentačních produktů a interakce mezi hostitelským organismem a bakteriální populací. S ohledem na tyto obtíže, je současný výzkum více zaměřen na studium jednotlivých specifických vlastností, spíše než na snahu o kompletní simulaci lidského střeva [14].

V současné době používaným modelem pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv jsou *in vivo* experimenty s laboratorními zvířaty s cíleně změněnou střevní mikroflórou. Jedná se o zvířata gnotobiotická nebo zvířata se změněnou střevní mikroflórou aplikací antibiotik. Absorbce a metabolismus orálně podávaného léčiva je pak porovnávána u těchto experimentálních modelů s kontrolní skupinou zvířat s neovlivněnou střevní mikroflórou. Gnotobiotická zvířata jsou modely s přesně definovanou střevní mikroflórou. Mohou to být zvířata bezmikrobní, která zcela postrádají střevní mikroflóru nebo zvířata osídlená přesně definovaným bakteriálním kmenem nebo více kmeny [144].

Pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv neexistuje jeden ideální model, vhodná je spíše kombinace různých metod.

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv, především na jejich farmakokinetiku. Dále byl sledován vliv střevních bakterií a jejich produktů na expresi jaterních biotransformačních enzymů. Níže uvedené experimenty by měly přispět novými informacemi k porozumění možným mechanismům interakcí mezi střevními bakteriemi a metabolismem léčiv.

Konkrétní cíle:

1. Studium možného zapojení komenzálních a probiotických bakterií do metabolismu protizánětlivého léčiva nabumetonu *in vitro.*

2. Zjištění vlivu antibiotika imipenemu na farmakokinetiku současně podávaného modelového léčiva nabumetonu u potkanů.

3. Studium vlivu monokolonizace komenzálními a probiotickými bakteriemi na expresi mRNA CYP u bezmikrobních myší.

4. Ověření možného efektu butyrátu a propionátu – fermentačních produktů střevních bakterií – na expresi mRNA, proteinu a enzymovovu aktivitu CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro stanovení enzymových aktivit

Substráty fenacetin, kumarin, warfarin, bufuralol, testosteron, stejně jako příslušné metabolity paracetamol, 7-hydroxykumarin, 7-hydroxywarfarin byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

6β-hydroxytestosteron byl získán od firmy Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA) a 1´-hydroxybufuralol byl obdržen od firmy BD Genstest (Woburn, MA, USA). Midazolam byl zakoupen od firmy Abcam (Cambridge, UK).

4.1.2 Chemikálie pro stanovení množství proteinů

Primární a sekundární protilátky pro formy CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 a CYP3A4, stejně jako kontrola aplikace vzorků β-aktin obdrženy od firmy Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); primární a sekundární protilátka pro CYP2C9 byla zakoupena od firmy Acris (Herford, Německo). Primární protilátka pro CYP2A6 byla pořízena od firmy BD Gentest (Woburn, MA, USA) a sekundární protilátka pro CYP2A6 byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Primární kozí protilátka proti potkanímu CYP3A1 byla získána od firmy Abcam (Cambridge, Velká Británie), sekundární králičí protilátka proti kozím proteinům byla získána od firmy Sigma-Aldrich CZ (Prague, Czech Republic). Standard proteinu pro elektroforézu byl získán od firmy BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Chemiluminiscenční kit pro detekci protilátek byl získán od firmy Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Komerční testovací souprava pro stanovení celkových proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

4.1.3 Chemikálie pro stanovení hladiny mRNA

Tablety s inhibitory proteas (EDTA free Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets) byla získána do firmy Roche (Praha, Roche CZ). SOD Assay Kit-

WST (Dojindo, Tabaru, Japonsko) byl zakoupen od firmy Probior (Mnichov, Německo).

4.1.4 Další chemikálie

Methanol a dichlormethan byly zakoupeny od firmy Merck (Praha, Česká republika); kyselina fosforečná (H_3PO_4), kyselina octová (CH_3COOH), chlorid sodný (NaCl), 2-propanol, chloroform a síran hořečnatý ($MgSO_4$) byly dodány firmou Lach-Ner (Neratovice, Česká republika); acetonitril (ACN) byl obdržen od firmy VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika); dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) a uhličitan sodný (Na_2CO_3) byly pořízeny od firmy Lachema (Brno, Česká republika); isocitrátdehydrogenáza (IDH), nikotinamidadenindinukleotidfosfát ($NADP^+$), isocitrát, kyselina chloristá ($HClO_4$), dimetylsulfoxid (DMSO) byl získán od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika); stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 $U \cdot ml^{-1}$) se streptomycinem (10 $mg \cdot ml^{-1}$) (PenStrep), manitol, sorbitol, amphotericin B, glutathion, tricin, Williamsovo médium E; WME, kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N´-ethansulfonová (HEPES), Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem s přídavkem F12 (DMEM/F12), fetální bovinní sérum (FBS), glukosa, chlorid draselný (KCl), chlorid vápenatý ($CaCl_2$) a hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4) byly obdrženy od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tienam® iv (500 mg) obsahující imipenem a sodnou sůl cilastatinu (inhibitor metabolismu imipenemu v ledvinách) byl získán od firmy MSD (Merck Sharp & Dohme Idea, Inc.). 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton) byl syntetizován v laboratoři prof. Milana Nobilise podle publikace [145]. Nabumeton, stejně jako butyrát a propionát sodný, byl získán od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

4.1.5 Přístrojové vybavení

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

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

Analytické váhy Sartorius 4503 MP 6E (Göttingen, Německo)

Centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie)

Centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Centrifuga Labofuge 400, Heraeus (Hanau, Německo)

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

Chlazená centrifuga Mikro 22R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 38R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Německo)

Chemiluminiscenční western blot skener Li-COR C-DiGit™, KRD (Praha, Česká republika)

Koncentrátor vzorků TERMOVAP TV 10 (ECOM, Praha, CZ)

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

pH metr HI 2211, Hanna instruments (Praha, Česká republika)

SNAP i.d.® Protein Detection System, Merck Millipore (Praha, Česká republika)

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

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

Spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000, Varian (Mulgrave, VIC, Austrálie)

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

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

Termomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Německo)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Biorad (Praha, Česká republika)

Třepací inkubátor BIOSAN ES 20, Merci (Brno, Česká republika)

Třepací vodní lázeň, Grant Instruments (Cambridge, Velká Británie)

Ultracentrifuga Beckman Optima™ LE-80K, Beckman (Ramsey, MN, USA)

Ultrazvuková čisticí jednotka Elmasonic S 10 (H), Elma-Ultrasonic, (Singen, Německo)

Ultrazvuková UP 200S, Hielscher Ultrasonic (Teltow, Německo)

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

Vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

Vortex Reax top, Heidolph Instruments (Schwabach, Německo)

Zařízení pro přípravu čisté a ultračisté vody Watrex Ultrapur (Watrex, Praha, CZ)

4.1.5.1 HPLC systém

Software (Shimadzu CLASS-VP, Japonsko), řídící jednotka (Shimadzu systém controller SCL-10AVP, Japonsko), detektor (Shimadzu UV-VIS detektor SPD-10AVP, Japonsko), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO-10AC, Japonsko), autosampler se smyčkou 50 µl (Shimadzu Autoinjector SIL-10ADVP, Japonsko), degaser mobilní fáze (Prominence degasser DGU-20A5, Japonsko), pumpa (Shimadzu Liquid chromatograph LC-10AT, Japonsko).

4.2 Enzymové systémy

4.2.1 Lidské hepatocyty

Segmenty lidských jater byly získány od multiorgánových dárců. Odběr a zpracování materiálu bylo provedeno s povolením etické komise a bylo v souladu s platnou českou legislativou. Hepatocyty byly isolovány podle metody Pichard-Garcia et al. 2002 [146]. Po isolaci byly hepatocyty vysety na kultivační desky pokryté vrstvou kolagenu o hustotě 1,4 x 10^5 buněk·ml^{-1}. Kultivační médium (složené dle [147]) bylo obohaceno pro vysetí 2% fetálním bovinním sérem. Médium bylo vyměněno za bezsérové den poté a kultura byla ponechána stabilizaci po dobu 48 - 72 hodin před vlastní aplikací testovaných látek. Kultury byly uchovány v inkubátoru při teplotě 37°C a v 5% CO_2.

4.2.1.1 Roztoky pro izolaci a kultivaci lidských hepatocytů

Premix: glukosa (7 mmol·l^{-1}), glutamin (2,4 mmol·l^{-1}), penicilin G (16 µmol·l^{-1}), streptomycin sulfát (9,6 µmol·l^{-1}), pyruvát sodný (400 µmol·l^{-1}), dexamethason (1,78 µmol·l^{-1}), holo-transferin (5 mg·l^{-1}), ethanolamin (1 µmol·l^{-1}), inzulin (350 nmol·l^{-1}), glukagon (0,2 mg·l^{-1}), kyselina linolová (11 µg·l^{-1})

HEPES 1: HEPES (20 mmol·l^{-1}), NaCl (120 mmol·l^{-1}), KCl (5 mmol·l^{-1}), glukosa (0,5%), amphotericin B (4,1 µg·l^{-1}), PenStrep (1%), manitol (0,1 µmol·l^{-1}), sorbitol (0,1 µmol·l^{-1}), glutathion redukovaný (0,1 µmol·l^{-1}), pH 7,4

HEPES 2: HEPES (20 mmol·l^{-1}), NaCl (120 mmol·l^{-1}), KCl (5 mmol·l^{-1}), glukosa (0,5%), amphotericin B (4,1 µg·l^{-1}), PenStrep (1%), pH 7,4

HEPES 3: HEPES (20 mmol·l^{-1}), NaCl (120 mmol·l^{-1}), KCl (5 mmol·l^{-1}), glukosa (0,5%), amphotericin B (4,1 µg·l^{-1}), PenStrep (1%), $CaCl_2$ (7 µmol·l^{-1}), kolagenasa typ IV (600 mg·l^{-1})

HEPES 4: HEPES (20 mmol·l^{-1}), NaCl (120 mmol·l^{-1}), KCl (5 mmol·l^{-1}), glukosa (0,5%), amphotericin B (4,1 µg·l^{-1}), PenStrep (1%), bovinní sérum (5%, v/v)
EGTA: KCl (5,4 mmol·l^{-1}), KH_2PO_4 (440 µmol·l^{-1}), NaCl (140 mmol·l^{-1}), Na_2HPO_4 (340 µmol·l^{-1}), EGTA (500 µmol·l^{-1}), Tricin (25 mmol·l^{-1}), amphotericin B (4,1 µg·l^{-1}), PenStrep (1%), pH 7,2

Kultivační médium ISOM: Williamsovo médium E; WME (0,5 l), DMEM/F12 (HAM) médium (0,5 l), pH 7,2, kyselina askorbová (15 mg), premix (37 ml), fetální bovinní sérum (5%, v/v)

Bezsérové médium ISOM: WME (0,5 l), DMEM/F12 (HAM) médium (0,5 l), pH 7,2, kyselina askorbová (15 mg), premix (37 ml)

4.2.2 Mikrosomální frakce

Mikrosomy nejsou za fyziologických podmínek přítomny v živých buňkách, ale vznikají *in vitro* při degradaci endoplazmatického retikula. V těchto micelárních útvarech se nachází nejvyšší koncentrace CYP enzymů v buňce, proto byly izolovány pro stanovení exprese proteinu jednotlivých forem CYP a stanovení jejich enzymových aktivit.

Jaterní mikrosomální frakce byla získána diferenciální centrifugací podle stanoveného protokolu [148]. Jaterní tkáň byla jednotlivě homogenizována ve fosfátovém pufru (pH 7,4) o koncentraci 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ s použitím Potter-Elvehjemova homogenizátoru. Pufr pro homogenizaci obsahoval také tabletu s inhibitorem proteas (Roche CZ, Praha). Mikrosomální frakce byla uložena při −80 °C. Koncentrace celkových proteinů v jaterní mikrosomální frakci byla stanovena s využitím metody s kyselinou bicinchoninovou podle protokolu [149]. Koncentrace CYP v jaterních mikrosomech byla stanovena diferenční spektroskopií [150].

4.2.2.1 Roztoky pro izolaci jaterní mikrosomální frakce

Homogenizační pufr: sacharosa (250 $mmol \cdot l^{-1}$), EDTA (1 $mmol \cdot l^{-1}$), pH 7,4

Promývací pufr: TRIS (50 $mmol \cdot l^{-1}$), KCl (150 $mmol \cdot l^{-1}$), pH 7,4

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

4.3 Inkubace nabumetonu s bakteriemi *in vitro* za aerobních a anaerobních podmínek

Živé bakteriální suspenze komenzálních bakterií *Escherichia coli* ATCC 25922 (1 x 10^9 CFU·ml^{-1}) a suspenze probiotických kmenů *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* (1 x 10^9 CFU·mL^{-1}) byly inkubovány 24 hodin s 50µmol·l^{-1} protizánětlivým nesteroidním léčivem nabumetonem ve standardním médiu (masový extrakt 10,0 g·l^{-1}; pepton 10,0 g·l^{-1}; chlorid sodný 5,0 g·l^{-1}). Stejným způsobem byla inkubována komenzální bakterie *Parabacteroides distasonis* a probiotická bakterie *Lactobacillus casei*, ale za anaerobních podmínek v anaerobním boxu (Whitley A35) naplněném běžně užívanou anaerobní atmosférou (H_2, N_2 a CO_2) (Tab. 4). V kontrolních vzorcích byly inkubovány vybrané bakteriální kmeny bez nabumetonu.

Tabulka 4. Přehled vybraných komenzálních a probiotických bakterií inkubovaných s protizánětlivým léčivem nabumetonem za aerobních a anaerobních podmínek.

	Aerobní podmínky	**Anaerobní podmínky**
Komenzální bakterie	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Parabacteroides distasonis*
Probiotické bakterie	***Lactobacillus casei***	***Lactobacillus casei***
	Lactobacillus plantarum	
	Escherichia coli Nissle 1917	

Pro stanovení metabolitů byl použit HPLC systém Shimadzu Class VP (Kyoto, Japonsko) s UV a fluorescenční detekcí. Metoda chromatografické separace nabumetonu a jeho metabolitů je detailně popsána v následující kapitole.

4.4 Stanovení farmakokinetiky 6-MNA u potkanů po aplikaci imipenemu

4.4.1 Navržení experimentu a zpracování vzorků

Pro tento experiment byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (tělesná váha 282 – 330 g, průměrná váha 304 g). Před aplikací testovaného léčiva (nabumetonu), bylo experimentální skupině třiceti potkanů intragastrickou sondou aplikováno antibiotikum imipenem jednou denně po dobu tří dní. Imipenem byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku těšně před aplikací a byl podáván v dávce 45 $mg \cdot kg^{-1}$. Druhé kontrolní skupině třiceti potkanů (tělesná váha 268 – 330 g, průměrná váha 304 g) byl aplikován stejným způsobem fyziologický roztok. Čtvrtý den byla aplikována všem potkanům (N = 60) suspenze nabumetonu ve vodném roztoku s 1% dimetyl sulfoxidem v jedné dávce (15 mg/kg). Po 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 24; 48 a120 hodinách aplikace nabumetonu byly odebrány vzorky krve potkanů z břišní aorty. Potkani byli uvedeni do anestezie jednou intramuskulární dávkou fentanylu (40 $\mu g \cdot kg^{-1}$ tělesné váhy) a dexmedetomidinu (200 $\mu g \cdot kg^{-1}$ tělesné váhy) a následně aplikací diazepamu (5 $mg \cdot kg^{-1}$ tělesné váhy). Vzorky krve (7ml) s 0,2 $mol \cdot l^{-1}$ EDTA byly centrifugovány při 3200 g po dobu 10 min. Potom byla plazma oddělena a uložena při -57°C až do použití. Celý experiment byl prováděn podle schválených etických postupů.

4.4.2 Stanovení metabolitů pomocí HPLC

4.4.2.1 Podmínky HPLC

Analytické stanovení bylo provedeno podle metody Nobilis et al. (2003) [151]. Stanovení analytů byla provedena pomocí kolony LiChrospher 100 RP18 end-capped (250 mm × 4,6 mm) s velikostí částic 5 μm, chráněné předkolonou LiChroCART 4-4 se stejnou stacionární fází (Merck, Darmstadt, Germany). Chromatografická separace byla provedena pomocí systému Shimadzu Class VP System s fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka 230 nm, emisní vlnová délka 350 nm). Mobilní fáze pro separaci nabumetonu, 6-MNA (6-metoxy-2-naftyloctová kyselina), a vnitřní standard (naproxen) obsahovala acetonitril-UHQ, vodu

a octovou kyselinu (40:60:0.1 v/v/v) a rychlost průtoku byla 1 $ml \cdot min^{-1}$ při 40°C. Typický čas analýzy byl 35 minut.

4.4.2.2 Příprava vzorků

Před HPLC stanovením, vzorky plazmy byly extrahovány do diethyletheru. 50 μl vzorků plazmy byly smíchány s 5 μl roztoku vnitřního standardu 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ naproxenu a následně 4,2 μl koncentrované HCl. Plazma byla krátce intenzivně promíchána. Následně byl přidán diethyl ether (1,5 ml) a obsah zkumavky byl promíchán pro dobu 1 minuty. Po extrakci byla směs centrifugována při 2000 g, teplotě 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl opatrně přenesen do čistých zkumavek a odpařen pomocí dusíku při 40°C. Zbytek vzorku ve zkumavkách byl rozpuštěn ve150 μl mobilní fáze a 50 μl takto připraveného vzorku bylo nastříknuto na chromatografickou kolonu.

Pro validaci analytické metody byl rozpuštěn vzorek nabumetonu a jeho aktivního metabolitu 6-MNA ve 100% (v/v) metanolu; finální koncentrace obou analytů byla 2,4 $mmol \cdot ml^{-1}$. Plazmatické standardy byly připraveny přidáním 10 μl 6-MNA a 10 μl nabumetonu k 50 μl plazmy bez aplikace léčiva a pro získání finálních koncentrací od 0,798 do 19,98 $nmol \cdot ml^{-1}$ 6-MNA a stejných koncentrací pro nabumeton. Zásobní roztok vnitřního standardu, naproxenu, byl připraven rozpuštěním naproxenu v 50% metanolu na finální koncentraci 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ a 5 μl tohoto roztoku bylo přidáno do všech vzorků. Dále byly vzorky pro validaci metody připraveny podle postupu přípravy vzorků plazmy pro farmakologický experiment popsaného výše a začínající extrakcí do diethyl etheru.

Kontrolní vzorky pro stanovení přesnosti a správnosti v jednotlivých dnech byly připraveny přidáním nabumetonu a 6-MNA k plazmě bez aplikace léčiva tak, aby finální koncentrace analytů byla v případě parentní látky nabumetonu i jeho metabolitu 6-MNA 3,99 a 12 $nmol \cdot l^{-1}$. Koeficient rozdílnosti v přesnosti a správnosti stanovení (intra-day and inter-day) byl nižší než 15 %. Pro tento případ byla použita metoda kalibrace s vnitřním standardem. Lineární regrese poskytla hodnoty koeficientu stanovení $r^2 = 0,9951$ pro 6-MNA a $r^2 = 0,9823$ pro nabumeton.

Průměrný výtěžek (recovery) pro nabumeton a 6-MNA byl 60,5 %, resp. 75,8 %. Limit kvantifikace byl detekován 0,266 nmol·ml^{-1} pro oba analyty a stanoven jako nejnižší koncentrační bod pro kalibrační křivku, přičemž nejvyšší koncentrace příšlušného analytu byla reprodukovatelná s přesností a správností 20 %.

4.4.3 Statistická analýza dat

Výsledky byly podrobeny statistické analýze s využitím neparametrického Mann-Whitney *U* testu na hladině významnosti 0.05. Analýza byla provedena pomocí programu Statistica 12 (Statsoft CR, Praha, Česká republika).

4.5 Vliv monokolonizace nepatogenními bakteriemi na expresi mRNA, proteinu a enzymovou aktivitu CYP u bezmikrobních myší

4.5.1 Bakteriální kmeny

Gram^{+} kmen *Lactobacillus plantarum*^{NIZ02877} izolovaný poprvé z hot-dogu ve Vietnamu (dar od Dr. Francois Leulier, Lyon) byl kultivován přes noc v médiu Man, Rogosa a Sharpe (MRS) (Oxoid, Thermo-Fisher Scientific, UK) při 37 °C. Kultury pěstované přes noc v živné půdě MRS (Oxoid, UK) byly zcentrifugovány, promyty ve sterilním fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty (PBS) a následně byla koncentrace upravena na 10^9 CFU·ml^{-1}. Druhým použitým bakteriálním kmenem v našem experimentu byl G^{-} nepatogenní kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 izolovaný z lidské střevní mikroflóry (Mutaflor, Ardeypharm, Německo) [152].

4.5.2 Navržení experimentu

Myši inbredního kmene BALB/c byly v našem experimentu rozděleny do čtyř skupin: bezmikrobní (Germ Free, GF); GF myši monokolonizované *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877}; GF myši monokolonizované *Escherichia coli* Nissle 1917 a kontrolní (specific pathogen-free, SPF) myši. GF myši se narodily a byly chovány ve sterilních podmínkách v plastickém isolátoru typu Trexler

a krmeny 50 kGy ozářenými pelety Altromin 1410 (Altromin, Lage, Německo) a sterilní vodou *ad libitum*. Kultury jednotlivých kmenů byly promyty ve sterilním PBS a byly připraveny bakteriální suspenze obsahující $2x10^8$ CFU bakteriálních buněk. Následně bylo aplikováno 200 µl suspenze bezmikrobním GF myším intragastrickou sondou – první skupině suspenze s *L. plantarum*^{NIZO2877} a druhé skupině s *E. coli* Nissle 1917. Každý týden byly s využitím standardních mikrobiologických metod kontrolovány fekální vzorky na přítomnost aerobních a anaerobních bakterií, plísní a kvasinek. Kontrolní SPF myši byly chovány v IVC klecích (Tecniplast, Itálie) a krmeny stejnou sterilní dietou jako myši v ostatních skupinách. SPF myši byly také pravidelně kontrolovány na nepřítomnost potenciálních patogenů podle mezinárodně ustanovených standardů (FELASA). Všechna zvířata byla chována v laboratoři s 12 hodinovým denním režimem při teplotě 22 °C. Pro náš experiment byly použity dva měsíce staré myši. Vě věku 8 - 12 týdnů byly myši utraceny cervikální dislokací a vykrváceny. Játra byla asepticky odstraněna, zvážena a zamrazena v kapalném dusíku a následně uložena při -70 °C až do dalšího zpracování. Celý experiment byl prováděn podle schválených etických postupů.

4.5.3 Izolace RNA a kvantitativní Real-Time PCR (qPCR)

Celková RNA byla izolována z jaterní tkáně uchovávané v RNA lateru (Qiagen, Dynex, Česká Republika) s využitím kitu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky a kompaktnost RNA byla ověřena gelovou elektroforézou. První vlákno cDNA bylo syntetizováno z celkové RNA pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche, Praha, Česká Republika). Real-time PCR pro kvantifikaci exprese CYPs byla provedena pomocí přístroje LightCycler 1536 Instrument (Roche, Praha, Česká Republika) s využitím specifické eseje TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, Česká Republika). Vzorky byly pipetovány na 1536 jamkovou destičku pomocí přístroje Automate Labcyte Echo (Dublin, Irsko). Výpočty byly provedeny na základě metody "Delta-Delta Ct method" [153].

Výsledná data byla vyjádřena jako změna exprese u experimentálních skupin v porovnání s kotrolní SPF skupinou. Geny HPRT1 a18S byla použity jako vnitřní kontroly.

4.5.4 Stanovení exprese proteinu CYP3A

Množství proteinu CYP enzymů bylo stanoveno pomocí metody Western Blottingu. 50 μg proteinů mikrosomální frakce myších jater bylo separováno pomocí SDS-PAGE elektroforézy (10% stacking gel) a přeneseno na nitrocelulózové membrány s využitím přístroje Trans-Blot Turbo^{TM} Transfer System of Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Imunodetekce proteinu CYP3A byla provedena pomocí monoklonální protilátky specifické na potkaní protein CYP3A1 (1:500) a specifická sekundární protilátka s konjugovanou křenovou peroxidázou byla použita pro vizualizaci odpovídajících bandů (1: 10 000) pomocí chemiluminiscenčního kitu od firmy Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Německo). Intenzita bendů byla vyhodnocena pomocí přístroje C-DiGit™ Blot Scanner (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.5.5 Stanovení enzymové aktivity CYP3A

Enzymová aktivita CYP3A4/5 byla měřena v jaterní mikrosomální frakci podle stanovené metody s využitím midazolamu jako substrátu [154]. HPLC analýza (provedena v triplikátech) stanovení vzniklého metabolitu 1'-hydroxymidazolamu byla provedena pomocí přístroje Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s UV detekcí. Stanovení metabolitu bylo provedeno použitím monolytické kolony end-capped Chromolith Performance RP-18 (100 mm × 4.6 mm) chráněné předkolonou Chromolith (5 mm × 4.6 mm) se stejnou stacionární fází (Merck, Darmstadt, Německo). Mobilní fáze byla složená z octanu sodného a acetonitrilu (62:38; v/v), při pH 6 a průtoku mobilní fáze 0,8 ml·min^{-1}. Nastříknutý objem vzorku a standardních roztoků byl 50 μl a kolona byla

vytemperována na 30 °C. Vlnová délka fotodiodového detektoru byla nastavena na 240 nm. Čas analýzy byl 10 min.

4.5.6 Statistická analýza

Všechna data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou ± SD. Statistické výpočty byly provedeny pomocí programu Statistica 12 (StatSoft ČR, Praha, Česká republika). Analýzy variance a následně post-hoc Fisherrův LSD test byl použit pro srovnání rozdílů v normálně distribuované proměnné mezi skupinami. Statistická významnost byla stanovena za použití nepárového t-testu nebo Mann-Whitney U testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud byla hodnota P nižší než 0,05.

4.6 Vliv butyrátu a propionátu sodného na expresi a enzymovou aktivitu CYP v játrech

Jako experimentální model pro stanovení možného vlivu butyrátu a propionátu sodného jaterní biotransformační enzymy byly použity primární kultury lidských hepatocytů. Tento model byl použit pro sledování změny exprese a aktivit vybraných CYP. V našem experimentu byly použity jaterní vzorky od třech dárců. Hepatocyty byly izolovány, jak bylo výše popsáno podle stanoveného protokolu [155]. Po izolaci byly hepatocyty vysety na kultivační desky a bylo doplněno médium (1,5 ml). Hepatocyty byly inkubovány s butyrátem nebo propionátem sodným v různých koncentracích po dobu 24 hodin a následně byly ke kultivačnímu médiu přidány specifické substráty jednotlivých forem CYP po dobu 2 hodin. Médium bylo následně odebráno a zcentrifugováno (10 min, 5000 g). Supernatant byl přenesen do mikrozkumavek typu Eppendorf a zamražen na -80°C až do příslušných stanovení.

4.6.1 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP

Enzymové aktivity jednotlivých forem CYP byly stanoveny v primárních kulturách lidských hepatocytů podle zavedených metod a za použití specifických substrátů. V následujících tabulkách (Tabulka 5) je znázorněno schéma přípravy reakčních směsí, specifické substráty pro jednotlivé formy CYP a použité koncentrace studovaných látek. Pro stanovení jednotlivých aktivit byl použit HPLC Prominence system (Shimadzu; Tokyo, Japan) s UV nebo fluorescenční detekcí.

Tabulka 5. Schéma přípravy reakčních směsí pro stanovení aktivity CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4) v primárních kulturách lidských hepatocytů.

CYP1A2 [156]	
Objem reakční směsi	1 500 µl
Substrát	200 µM fenacetin
Metabolit	paracetamol
Typ reakce	*O*-deetylace
Studované látky	Butyrát sodný/Propionát sodný 10µM,100µM, 200µM a 500µM
Množství odebraného média	200 µl
Zastavení reakce	10 µl 70% $HClO_4$
Mobilní fáze	MFA: metanol, pH 2,9 (20%) + H_2O (80%); MFB: 100% metanol
Centrifugace 10 min, 13 400 rpm	

CYP2A6 [157]	
Objem reakční směsi	1 500 µl
Substrát	33,3 µM kumarin
Metabolit	7-hydroxykumarin
Typ reakce	7-hydroxylace
Studované látky	**Butyrát sodný/Propionát sodný** 10µM,100µM, 200µM a 500µM
Množství odebraného média	100 µl
Zastavení reakce	200 µl metanolu
Mobilní fáze	0,5% CH_3COOH (60%)/ACN (40%)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm	

CYP2C9	
Objem reakční směsi	1 500 µl
Substrát	166,7 µM warfarin
Metabolit	7-hydroxywarfarin
Typ reakce	7-hydroxylace
Studované látky	**Butyrát sodný/Propionát sodný** 10µM,100µM, 200µM a 500µM
Množství odebraného média	250 µl
Zastavení reakce	5 µl 70% $HClO_4$
Mobilní fáze	KH_2PO_4, pH 3 (52%)/metanol (32%)/ACN (16%)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm	

CYP2D6 [158]	
Objem reakční směsi	1 500 µl
Substrát	83,3 µM bufuralol
Metabolit	1´-hydroxybufuralol
Typ reakce	1´-hydroxylace
Studované látky	**Butyrát sodný/Propionát sodný** 10µM,100µM, 200µM a 500µM
Množství odebraného média	200 µl
Zastavení reakce	20 µl 70% $HClO_4$
Mobilní fáze	ACN (30%)/2mM $HClO_4$ (70%)
Centrifugace 5 min, 1 500 rpm	

CYP3A4 [159]	
Objem reakční směsi	1 500 µl
Substrát	333,3 µM testosteron
Metabolit	6β-hydroxytestosteron
Typ reakce	6β-hydroxylace
Studované látky	**Butyrát sodný/Propionát sodný** 10µM,100µM, 200µM a 500µM
Množství odebraného média	500 µl
Zastavení reakce	100 µl směsi 1M Na_2CO_3/2M NaCl
Mobilní fáze	64% metanol
extrakce do 2 ml dichlormetanu → centrifugace 5 min, 3 000 rpm → 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem → odparek rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze	

4.6.2 Stanovení exprese proteinů vybraných forem CYP

Množství proteinů CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů bylo stanoveno metodou Western blotu. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (10% rozdělovací gel) a následně přeneseny na nitrocelulózové membrány (0,45 μm) použitím přístroje Trans-Blot® TurboTM Transfer System (Bio-Rad, Palo Alto, CA, USA). Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA metody [149]. Membrány byly blokovány v 5% odtučněném mléku/TBS-Tween 20 po dobu 2 h. Imunodetekce proteinů CYP byla provedena pomocí primárních protilátek proti CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4. Signál byl vizualizován příslušnými sekundárními protilátkami s křenovou peroxidázou (viz Chemikálie). Navázané proteiny byly detekovány použitím chemiluminiscenčního kitu (Santa Cruz, CA, USA). Intenzita signálu byla vyhodnocována pomocí přístroje C-DiGitTM Blot Scanner (Li-Cor, Bad Homburg, Německo).

4.6.3 Izolace RNA a kvantitavní PCR v reálném čase (qPCR)

Celková RNA byla izolována z jater lidských dárců v RNAlateru (Qiagen, Hilden, Německo) za použití kitu RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Německo), který byl použit podle instrukcí výrobce. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky při 260, 280 a 230 nm použitím přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Integrita RNA byla kontrolována pomocí gelové elektroforézy. První vlákno cDNA bylo syntetizováno z celkové RNA za použití kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis (Roche, Praha, Česká republika). Analýza PCR v reálném čase pro kvantifikaci enzymů CYP byla provedena na přístroji LightCycler 1536 Instrument (Roche, Praha, Česká republika) s použitím specifického testu TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems, Life technologies, CZ, Prague). Do 1536-jamkových destiček byly vzorky pipetovány pomocí automatického přístroje Labcyte Echo (Labcyte, Sunnyvale, CA, USA). Výpočty byly založeny na metodě „Delta-Delta Ct“ [153].
Data byla vyjádřena jako násobek změny jednotlivých experimentálních skupin ve srovnání s kontrolou. Geny HPRT1 a 18S byly použity jako vnitřní kontrola [160].

5 VÝSLEDKY

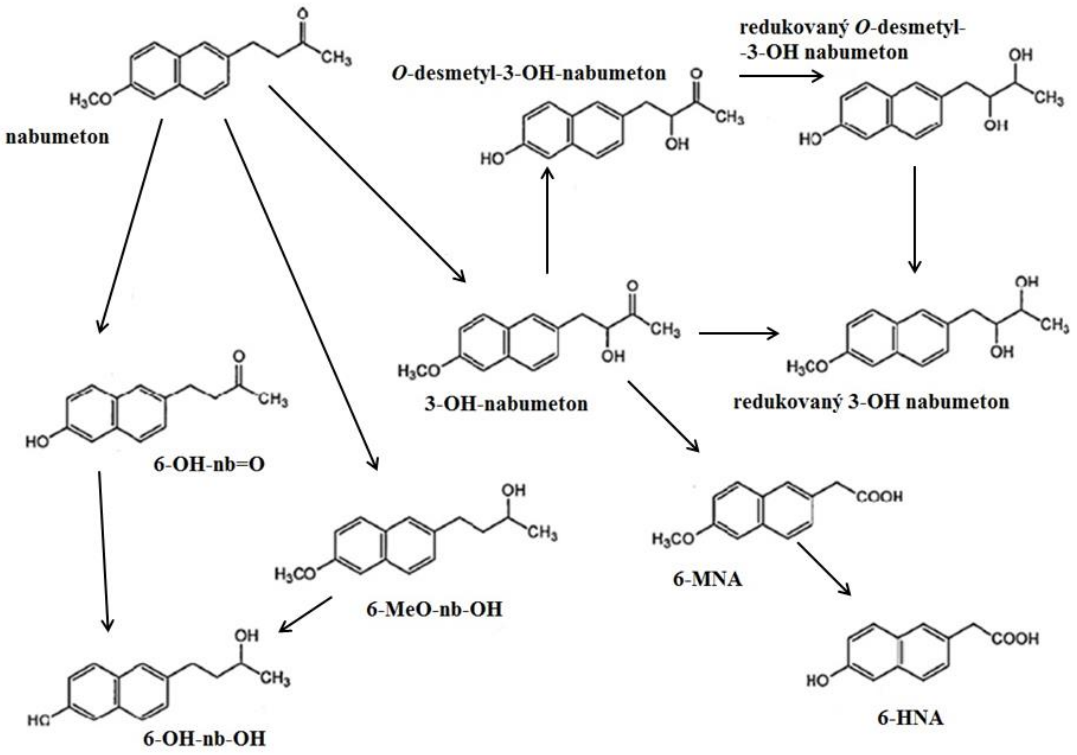
5.1 Metabolismus protizánětlivého léčiva nabumetonu komenzálními a probiotickými bakteriemi *in vitro* za aerobních a anaerobních podmínek

Bakterie sídlící v lidském GIT jsou vybavené velkou škálou bakteriálních enzymů, které mohou metabolizovat léčiva. Podle některých studií celková bakteriální metabolická aktivita odpovídá aktivitě jater [14]. Jako první přístup pro zkoumání možnosti zapojení bakteriálních enzymů do metabolismu příslušného léčiva jsme provedli *in vitro* experimenty s kultivovatelnými bakteriemi.

Pro naše experimenty jsme použili jako modelové léčivo nabumeton (4-(6-metoxy-2-naftyl)-2-butanon), nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID), jehož metabolismus je velmi dobře popsán [145, 161]. Samotný nabumeton vykazuje velmi slabé farmakologické účinky, je to původní neúčinná forma tzv. proléčivo (prodrug). Po orální aplikaci je nabumeton velmi dobře absorbován z GIT a transportován do jater, kde dochází oxidačním štěpením postranního řetězce nabumetonu ke vzniku aktivního metabolitu, kyseliny 6-metoxy-2-naftyl octové (6-MNA). Ta je silným inhibitorem cyklooxygenasy 2 (COX-2). K dalším biotransformačním reakcím nabumetonu patří *O*-desmetylace, redukce a hydroxylace. V moči pacientů byly detekovány také hydrofilní metabolity, které vznikají v průběhu druhé fáze biotranformace nabumetonu [145]. Přehled biotransformace I fáze nabumetonu je znázorněn na Obrázku 8.

Nabumeton se používá hlavně k léčbě bolesti a zánětu u pacientů s osteoartrózou nebo revmatoidní artritidou. Užívání nabumetonu je spojováno s nízkým výskytem žaludečního podráždění, krvácení, ulcerace a gastrointestinální perforace, které byly často pozorovány po dlouhodobé aplikaci jiných NSAID [162].

V naší studii byla sledována účast vybraných komenzálních a probiotických bakteriálních kmenů při metabolismu nesteroidního protizánětlivého léčiva nabumetonu za aerobních i anaerobních podmínek.

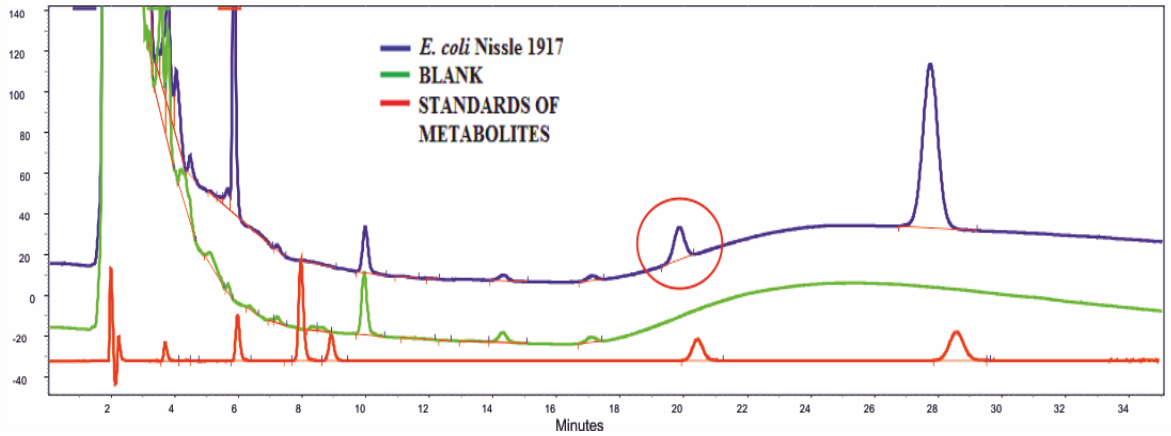


Obrázek 8. Metabolismus nabumetonu (modifikováno podle [145]).

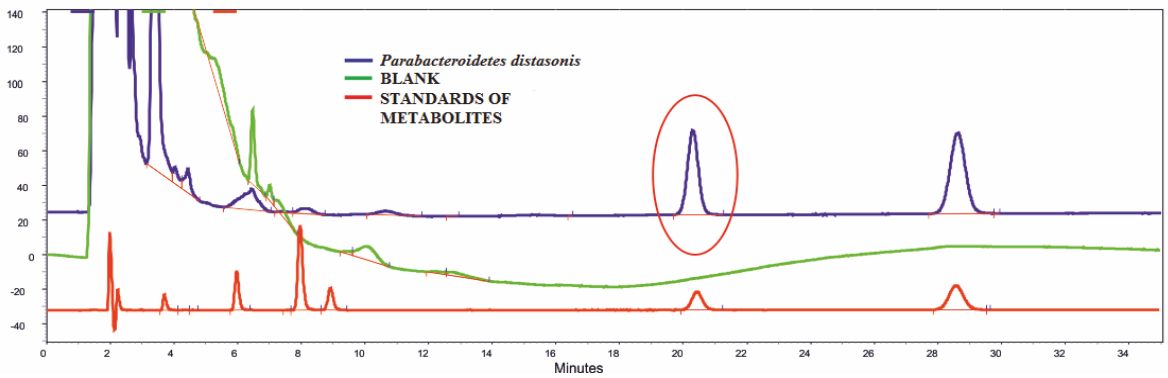
Nabumeton a jeho metabolity: nabumeton: 4-(6-methoxy-2-naftyl)-2-butanon ($C_{15}H_{16}O_2$); 6-HNA: 6-hydroxy-2-naftyloctová kyselina ($C_{12}H_{10}O_3$); 6-MNA: 6-metoxy-2-naftyloctová kyselina ($C_{13}H_{12}O_3$); 6-HO-nb-OH: 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-ol ($C_{14}H_{16}O_2$,); 6-HO-nb=O: 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-on ($C_{14}H_{14}O_2$); 3-HO-nabumeton: 4-(6-metoxy-2-naftyl)-3-hydroxybutan-2-on ($C_{15}H_{16}O_3$); 6-MeO-nb OH: 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol ($C_{15}H_{18}O_2$); redukovaný 3-HO-nabumeton: 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2,3-diol ($C_{15}H_{14}O_3$); O-desmetyl 3-OH-nabumeton: 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-3-hydroxybutan-2-on ($C_{14}H_{14}O_3$); redukovaný O-desmetyl 3-OH-nabumeton:4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2,3-diol ($C_{14}H_{12}O_3$).

Živé bakteriální suspenze komenzálních a probiotických bakterií *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *Parabacteroides distasonis* byly inkubovány s nabumetonem za aerobních i anaerobních podmínek. Metabolismus nabumetonu probiotickou bakterií *Lactobacillus casei* byl sledován pro porovnání za aerobních i anaerobních podmínek.

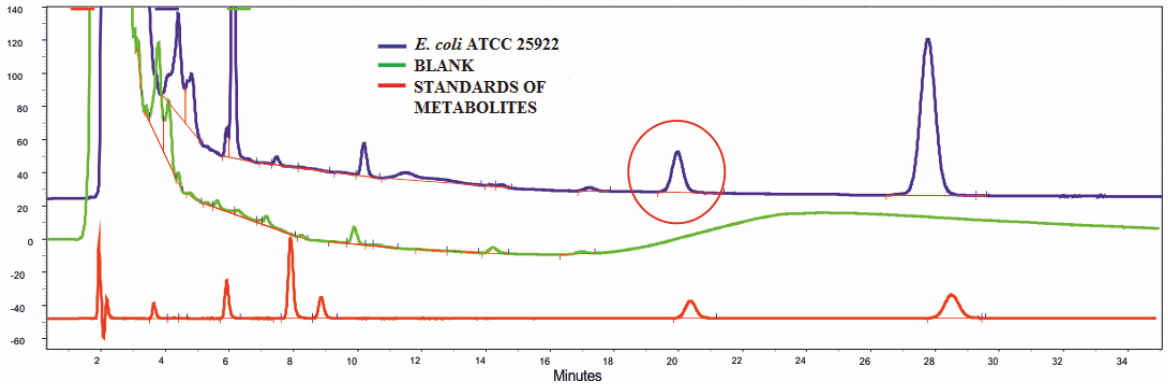
Na obrázcích 9 - 13 jsou výsledné chromatogramy získané po stanovení nabumetonu a jeho metabolitů v médiu s vybranými bakteriálními druhy pomocí HPLC. U všech vybraných bakterií, jak komenzálních, tak probiotických, byl detekován redukovaný metabolit 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton, 6-MeO-nb-OH), který je farmakologicky neaktivní.



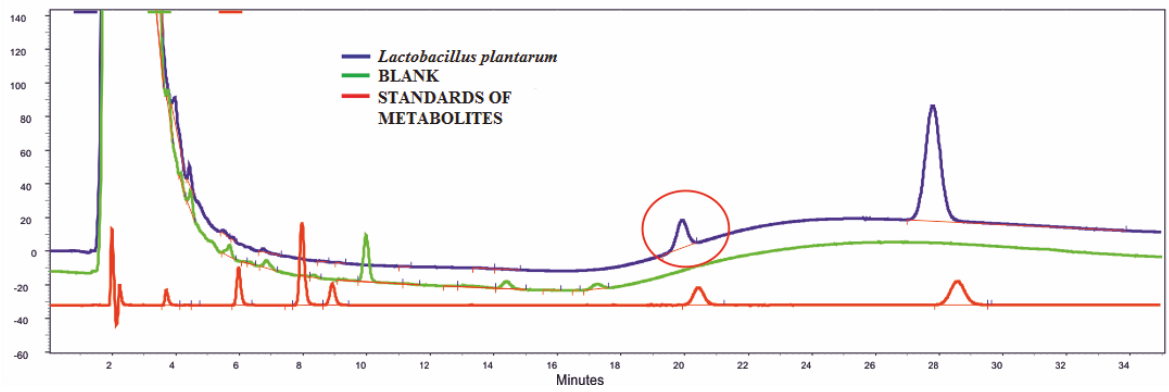
Obrázek 9. Záznam z HPLC analýzy metabolitů nabumetonu po inkubaci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$ nabumetonu s probiotickou bakterií *E. coli* Nissle 1917 v médiu za aerobních podmínek. Při vlnové délce 225 nm byl detekován jeden metabolit nabumetonu - 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton). Zeleně je označen záznam kontrolního vzorku bez přítomnosti nabumetonu a červeně standardy dosud známých metabolitů nabumetonu (identifikace viz text k Obrázku 8 a13).



Obrázek 10. Záznam z HPLC analýzy metabolitů nabumetonu po inkubaci 50 µmol·l^{-1} nabumetonu s komenzální bakterií *Parabacteroides distasonis* v médiu za anaerobních podmínek. Při vlnové délce 225 nm byl detekován jeden metabolit nabumetonu - 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton). Zeleně je označen záznam kontrolního vzorku bez přítomnosti nabumetonu a červeně standardy dosud známých metabolitů nabumetonu (identifikace viz text k Obrázku 8 a 13).

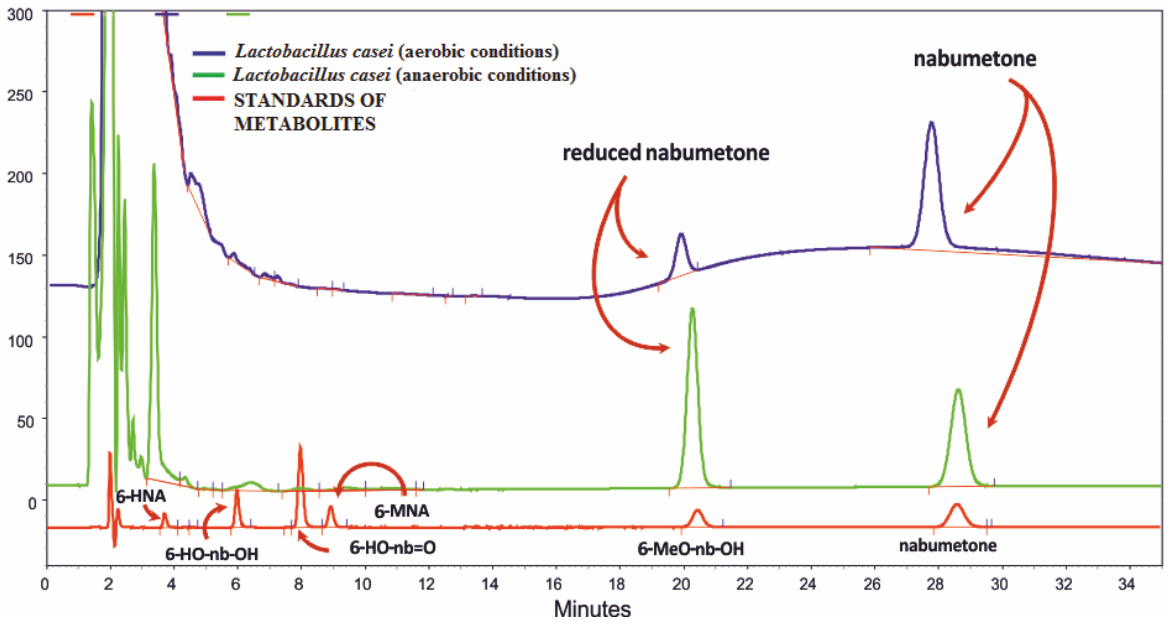


Obrázek 11. Záznam z HPLC analýzy metabolitů nabumetonu po inkubaci 50 µmol·l^{-1} nabumetonu s komenzální bakterií *E. coli* ATCC 25922 v médiu za aerobních podmínek. Při vlnové délce 225 nm byl detekován jeden metabolit nabumetonu - 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton). Zeleně je označen záznam kontrolního vzorku bez přítomnosti nabumetonu a červeně standardy dosud známých metabolitů nabumetonu (identifikace viz text k Obrázku 8 a 13).



Obrázek 12. Záznam z HPLC analýzy metabolitů nabumetonu po inkubaci 50 µmol·l^{-1} nabumetonu s probiotickou bakterií *Lactobacillus plantarum* v médiu za aerobních podmínek. Při vlnové délce 225 nm byl detekován jeden metabolit nabumetonu - 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton). Zeleně je označen záznam kontrolního vzorku bez přítomnosti nabumetonu a červeně standardy dosud známých metabolitů nabumetonu (identifikace viz text k Obrázku 8 a 13).

Probiotická bakterie *Lactobacillus casei* byla inkubována s nabumetonem za aerobních i anaerobních podmínek. Jak je vidět na záznamu z HPLC (Obr. 13), stejně jako ostatní vybrané bakterie, *Lactobacilus casei* metabolizovala nabumeton v médiu na redukovaný metabolit 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol za aerobních i anaerobních podmínek. Za anaeroních podmínek však vzniklo redukovaného metabolitu přibližně 4 krát více v porovnání s aerobními podmínkami.



Obrázek 13. Záznam z HPLC analýzy metabolitů nabumetonu po inkubaci 50 µmol·l^{-1} nabumetonu s probiotickou bakterií *Lactobacillus casei* v médiu za aerobních (modře) a anaerobních (zeleně) podmínek. Při vlnové délce 225 nm byl detekován jeden metabolit nabumetonu - 4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (redukovaný nabumeton). Červeně je označen záznam standardů dosud známých metabolitů nabumetonu (identifikace viz text k Obrázku 8).

Porovnáním množství vzniklého redukovaného metabolitu nabumetonu činností všech vybraných komenzálních a probiotických bakterií je zřejmé, že pro bakteriální redukční metabolismus nabumetonu jsou výhodnější anaerobní podmínky (což více odpovídá prostředí v útrobách GIT). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6.

Tabulka 6 Množství vzniklého redukovaného nabumetonu (%) vzhledem k výchozímu množství nabumetonu. Metabolická aktivita probiotických a komenzálních bakterií in vitro za aerobních a anaerobních podmínek.

Aerobní podmínky	
	Redukovaný nabumeton (%)
E. coli ATCC 25922	15,9
E. coli Nissle 1917	12,1
Lactobacillus casei	14,7
Lactobacillus plantarum	13,8
Anaerobní podmínky	
Lactobacillus casei	56,9
Parabacteroides distasonis	42,6

Z těchto výsledků je zřejmé, že komenzální i probiotické bakterie mohou být zapojeny do metabolismu nabumetonu tvorbou farmakologicky neaktivního metabolitu - redukovaného nabumetonu (Obr. 8). Nabumeton je tvořen vybranými bakteriemi *in vitro* za aerobních i anaerobních podmínek. Střevní mikrobiota tedy může snižovat množství absorbovaného nabumetonu z GIT a tím následně snížit množství vzniklého aktivního metabolitu kyseliny 6-metoxy-2-naftyloctové (6-MNA).

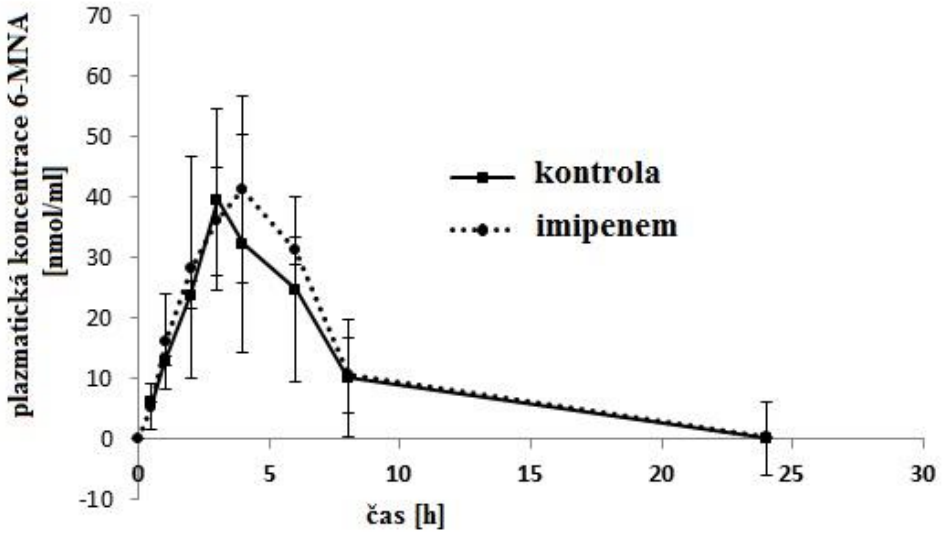
5.2 Vliv změněné střevní mikroflóry aplikací antibiotika imipenemu na farmakokinetiku nabumetonu u potkanů

V pilotním *in vitro* experimentu bylo zjištěno, že komenzální bakterie *E. coli* ATCC 25922 metabolizuje modelové léčivo nabumeton na redukovaný farmakologicky neaktivní metabolit, a tím může ovlivňovat jeho biodostupnost. Na základě těchto výsledků bylo potřeba zjistit, jestli změna ve funkci a zastoupení střevních mikrobiot může ovlivnit biodostupnost nabumetonu také za *in vivo* podmínek. Jako *in vivo* model změněné střevní mikroflóry byla použita aplikace beta-laktamového širokospektrého antibiotika imipenemu potkanům, na základě studií potvrzujících antimikrobiální efekt imipenemu na střevní mikrobiom potkana [163, 164].

Imipenem byl podáván orálně experimentální skupině potkaních samců kmene Wistar (N = 30) po dobu 3 dní v dávce 45mg·kg^{-1} a kontrolní skupině (N=30) byl podáván stejným způsobem pouze fyziologický roztok. Čtvrtý den byl všem zvířatům orálně aplikován nabumeton v jedné dávce 15mg·kg^{-1}. Pro aplikaci imipenemu i nabumetonu byla použita žaludeční sonda, která umožnila vpravit tyto látky až do žaludku zvířete. Všichni potkani byly uvedeni do celkové anestezie směsí fentanylu (40 µl·kg^{-1}), dexmetedomidinu (200 µl·kg^{-1}) a diazepamu (5 mg·kg^{-1}) podáním i.m. a po 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 24; 48 a 120 hodinách byly z abdominální aorty odebrány vzorky krve. Pro stanovení plazmatické koncentrace 6-MNA bylo použito HPLC s UV detekcí. Detailní navržení experimentu, zpracování vzorků a metoda HPLC stanovení jsou popsány v kapitole Metody.

Farmakokinetika hlavního metabolitu nabumetonu, 6-MNA byla stanovena u skupiny potkanů, kterým byl podáván imipenem a výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou, které imipenem podáván nebyl. Časový průběh plazmatické koncentrace 6-methoxy-2-naftyloctové kyseliny (6-MNA), je zobrazen na Obrázku 15. Farmakokinetika 6-MNA ukazuje nárůst plochy pod křivkou za 24 hodin (AUC_{0-24} = 277,67 ± 74,01 nmol·h·ml^{-1}) u experimentální skupiny s imipenemem v porovnání s kontrolní skupinou, které byl podáván pouze fyziologický roztok (AUC_{0-24} = 229,03 ± 100,89 nmol·h·ml^{-1}) o 20 %, změny však nebyly statisticky

signifikantně významné. Nejvyšší plazmatická koncentrace 6-MNA se u skupiny, které byl podáván imipenem (37,42 ± 11,44 nmol·ml^{-1}) významně nelišila od nejvyšší plazmatické koncentrace u kontrolních zvířat (34,61 ± 13,67 nmol·ml^{-1}) a čas potřebný k dosažení této maximalní hladiny koncentrace 6-MNA se prodloužil o 6 min (t_{max} = 3,77 ± 1,32 h pro skupinu s imipenememem a t_{max} = 3,67 ± 1,25 h pro kontrolní skupinu). Všechny sledované farmakokinetické parametry jsou shrnuty v Tabulce 7.



Obrázek 15. Vliv imipenemu na farmakokinetiku aktivního metabolitu nabumetonu 6-MNA.

Farmakokinetika 6-MNA s a bez (kontrolní skupina) podávání antibiotika imipenemu. Každý bod reprezentuje průměrné hodnoty ± S.D.; N=3.

Tabulka 7. Farmakokinetické parametry u potkanů pro orální aplikaci nabumetonu s podáváním nebo bez podávání antibiotika imipenemu.

FK - parametry	6-MNA	
	Fyziologický roztok	Imipenem
$t_{1/2}$ [h]	2,49±0,24	2,76±0,19
c_{max} [µg/ml]	34,61±13,67	37,42±11,44
t_{max} [h]	3,67±1,25	3,77±1,32
AUC_{0-24} [nmol.h/ml]	229,03±100,89	277,67±74,01
$AUC_{0-\infty}$ [nmol.h/ml]	230,25±100,7	278,39±74,13

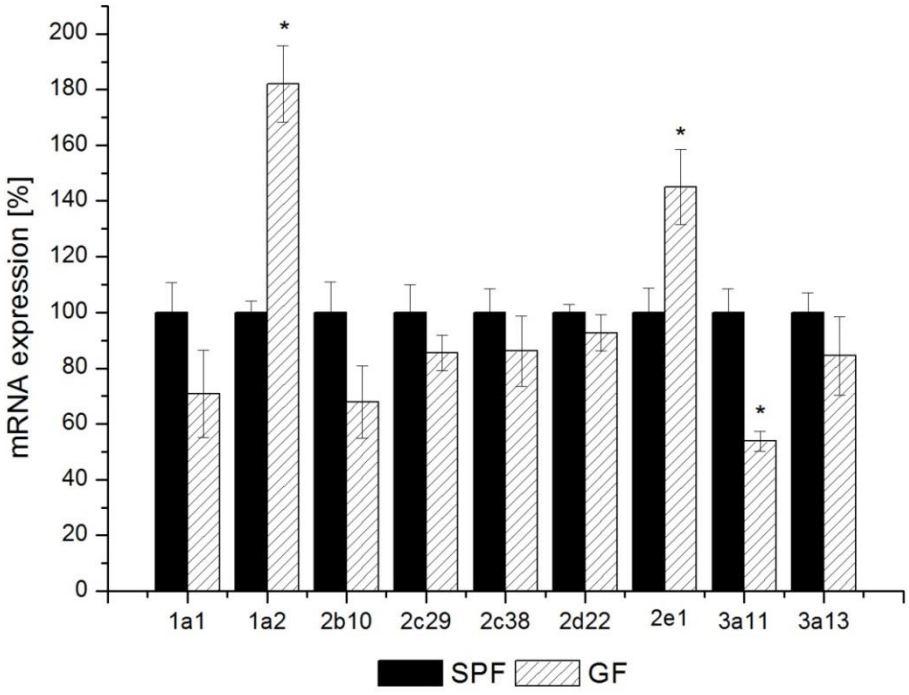
$t_{1/2}$ poločas, čas potřebný ke snížení koncentrace léčiva na polovinu; c_{max}, maximální plazmatická koncentrace léčiva; t_{max}, čas potřebný k dosáhnutí maximální koncentrace léčiva; AUC_{0-24}, plocha pod křivkou za 24 hodin; $AUC_{0-\infty}$, plocha pod křivkou přepočítána na nekonečno. Výsledná data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty ± S.D.; N=30.

5.3 Vliv střevního mikrobiomu na expresi jaterních cytochromů P450

Jak bylo již zmíněno v předchozím textu, je známo, že bakterie osídlující lidský GIT mají schopnost metabolizovat některá léčiva a ovlivňovat tím i jejich biodostupnost. Stále však zůstává celá řada nezodpovězených otázek ohledně molekulárního mechanismu působení střevních mikrobiot na hostitelský organismus, na buňky, proteiny i na enzymy metabolismus léčiv. Jedním z možných mechanismů ovlivnění biotransformace léčiv střevním mikrobiomem je změna exprese jaterních biotransformačních enzymů. GF myši, zcela postrádající střevní mikroflóru, jsou vhodným modelem pro studium vlivu střevních mikrobiot na fyziologii hostitelského organismu.

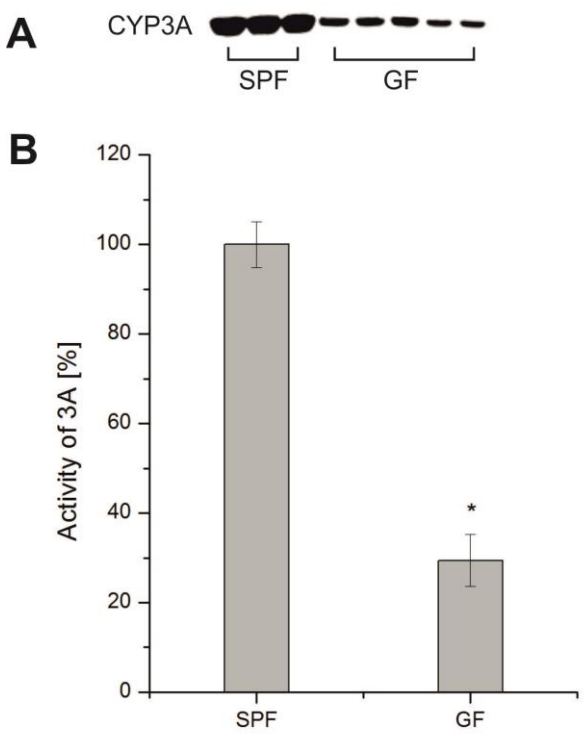
V našem experimentu byla pozornost věnována cytochromům P450. V jaterní tkáni GF myší byla stanovena exprese mRNA, v mikrosomální jaterní frakci byla stanovena exprese proteinu a enzymové aktivity vybraných CYP. Jako kontrolní skupina byly použity SPF myši, s normální střevní mikroflórou. Na obrázku 16 jsou znázorněny hladiny mRNA vybraných genů *Cyp* u GF myší v porovnání s kontrolními (SPF) zvířaty.

Exprese mRNA *Cyp1a2* byla u bezmikrobních myší výrazně zvýšená (o 82 %) v jaterní mikrosomální frakci v porovnání s SPF myšmi. Také exprese *Cyp2e1* byla signifikantně zvýšená (o 45%) u bezmikrobních myší. Na druhou stranu, nepřítomnost střevní mikroflóry vedla k výraznému snížení hladiny mRNA *Cyp3a11* (o 46 %) u GF myší. GF myši vykazovali také sníženou hladinu mRNA *Cyp1a1, Cyp2b10, 2c29, 2c38* a *3a13*, nicméně, tyto změny nebyly signifikantně významné. Hladina mRNA *Cyp2d22* byla nezměněná u GF myší v porovnání s kontrolami (Obr. 16).



Obrázek 16. Hladiny exprese mRNA vybraných genů *Cyp* v jaterní mikrosomální frakci bezmikrobních a kontrolních myší. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± S.D. ze čtyř zvířat a jako procento v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou jsou označeny jako *P<0.05. SPF, specific pathogenfree myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ- free myši postrádající střevní mikroflóru.

Na základě změn v hladinách mRNA u GF myší v porovnání s kontrolními zvířaty bylo provedeno také stanovení exprese proteinů pomocí metody Western blotu a stanovení enzymové aktivity s využitím specifických substrátů a s detekcí metabolitů pomocí HPLC. V případě CYP3A byla zjištěna signifikantně snížená hladina exprese proteinu (o 45 %), v souladu se sníženou hladinou exprese mRNA Cyp3a11. Také enzymatická aktivita stanovená pomocí HPLC s využitím midazolamu - specifického substrátu pro lidský CYP3A4/5 - byla signifikantně snížená v játrech GF myší (o 71 %) v porovnání s kontrolní skupinou myší (Obr. 17AB). U ostatních vybraných CYP enzymů nebyly pozorovány změny v expresi proteinu, ani enzymových aktivitách.



Obr. 17 A. Stanovení exprese proteinu CYP3A v jaterní mikrosomální frakci SPF a GF myší. **B.** Stanovení enzymové aktivity CYP3A v jaterní mikrosomální frakci SPF a GF myší pomocí substrátu midazolamu (specifický substrát pro lidský CYP3A4/5). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± S.D. ze čtyř zvířat a jako procento v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantně snížené hodnoty v porovnání s kontrolní (SPF) skupinou jsou označeny jako *P<0.0001. SPF, specific pathogen-free myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

5.3.1 Vliv monokolonizace bezmikrobních myší bakteriemi *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} nebo *Escherichia coli Nissle* 1917 na expresi mRNA vybraných cytochromů P450.

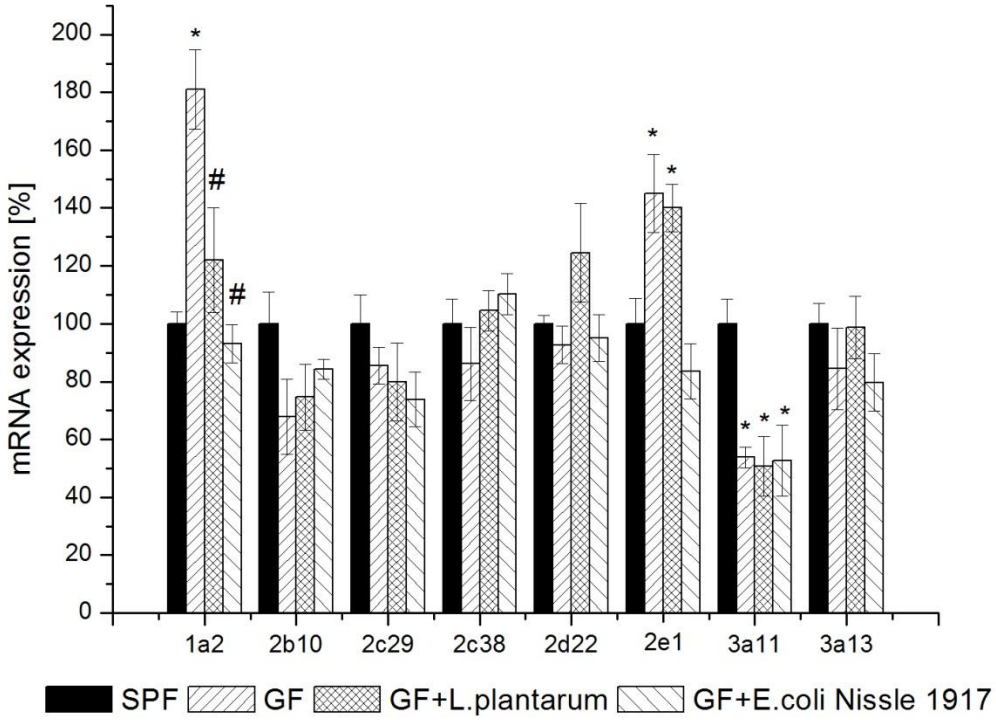
Dalším cílem při studiu vlivu mikrobiomu na metabolismus léčiv je najít odpověď na otázku, jaké mikrobiální druhy mohou ovlivnit expresi jednotlivých biotransformačních enzymů. Pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv jsou vhodné gnotobiotické modely s přesně definovanou střevní mikroflórou – bezmikrobní myši zcela postrádající střevní mikroflóru nebo bezmikrobní myši osídlené přesně definovaným bakteriálním druhem/y.

V naší studii jsme stanovovali změnu v expresi mRNA *Cyp1a2, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c38, Cyp2d22, Cyp2e1, Cyp3a11* and *3a13* v játrech GF myší a GF myší kolonizovaných nepatogenní bakterií *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} nebo probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917 v porovnání s kontrolními zvířaty (SPF).

Nejdříve jsme studovali vliv monokolonizace bezmikrobních myší bakteriálními kmeny v porovnání s bezmikrobními myšmi (Obr. 18). Zatímco u bezmikrobních myší byla exprese mRNA *Cyp1a2* signifikantně zvýšená v porovnání s kontrolní skupinou (viz Obr. 16), kolonizace bezmikrobních myší oběma vybranými bakteriálními kmeny vedla ke snížení exprese mRNA *Cyp1a2*, zpět k hladině exprese mRNA u kontrolních (SPF) myší (Obr. 18). Jinými slovy, kolonizace bezmikrobních myší vybranými bakteriálními druhy obnovila expresi mRNA *Cyp1a2* na hladiny odpovídající jaterním vzorkům SPF myší.

V případě genu *Cyp3a11*, monokolonizace bezmikrobních myší oběma vybranými bakteriálními kmeny, neměla výrazný vliv na expresi mRNA. Exprese mRNA *Cyp3a11* zůstala signifikantně snížená u monokolonizovaných bezmikrobních myší v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 18), tak jak to bylo pozorováno u bezmikrobních myší (viz Obr. 16). V tomto případě tedy monokolonizace bezmikrobních myší vybranými bakteriemi nevedla k změně exprese blíže k hladinám u kontrolních myší (tak jak bylo pozorováno u genu *Cyp1a2*).

U bezmikrobních myší monokolonizovaných *L. plantarum*[NIZO2877] byla zjištěna zvýšená hladina mRNA *Cyp2e1*, (stejně jako u bezmikrobních myší, viz Obr. 16 v porovnání s SPF skupinou, tato změna nebyla ale pozorována u bezmikrobních myší kolonizovaných probiotickým kmenem *E. coli* Nissle 1917 (Obr. 18). V dalších vybraných genech (*Cyp2b10, 2c29, 2c38, 2d22 and 3a13*) nebyly zjištěny významné změny vlivem monokolonizace bezmikrobních myší.



Obrázek 18. Hladiny exprese mRNA vybraných genů *Cyp* v jaterní mikrosomální frakci bezmikrobních (GF) myší, GF myší monokolonizovaných *L. plantarum*[NIZO2877], GF myší monokolonizovaných *E. coli* Nissle 1917 a kontrolních (SPF) myší. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± S.D. ze čtyř zvířat a jako procento v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou jsou označeny jako *****P<0.05. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty v porovnání s GF myšmi jsou označeny jako [#]P<0.05. SPF, specific pathogen-free myši s normální střevní mikroflórou; GF, germ-free myši postrádající střevní mikroflóru.

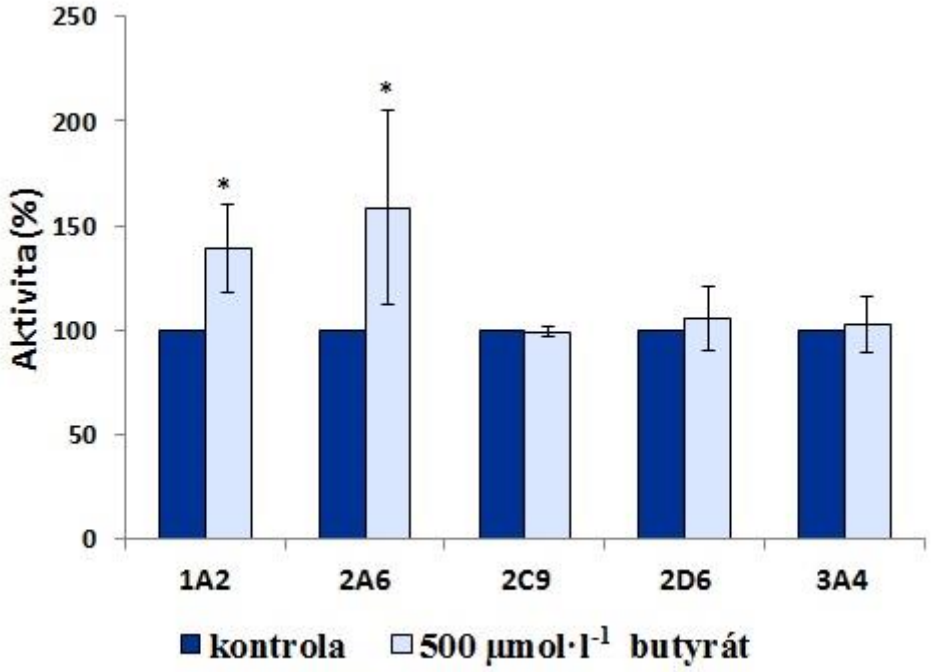
5.4 Vliv butyrátu a propionátu na expresi mRNA, proteinu a enzymatickou aktivitu cytochromů P450 v primárních kulturách lidských hepatocytů

Zvýše uvedených výsledků je zřejmé, že střevní mikrobiom může ovlivňovat expresi jaterních biotransformačních enzymů. Za tento efekt mohou být zodpovědné produkty bakteriálního metabolismu ve střevním lumen. Jedním z kandidátů regulace jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) produkované komenzálními bakteriemi v lidském tlustém střevě ve vysoké koncentraci 50 - 200 $mmol \cdot l^{-1}$. Hlavně butyrát je znám pro své potenciální protizánětlivé a antikarcinogenní účinky, a také schopností regulovat expresi genů v játrech. V naší studii jsme sledovali vliv butyrátu sodného na expresi mRNA a proteinu a enzymatickou aktivitu jaterních cytochromů P450 v primárních kulturách lidských hepatocytů.

V pilotním experimentu byl aplikován butyrát sodný o koncentraci 500 $\mu mol \cdot l^{-1}$ na primární kultury lidských hepatocytů od třech různých dárců. Primární kultury lidských hepatocytů byly vysety na kultivační desky a inkubovány s butyrátem sodným o koncentraci 500 $\mu mol \cdot l^{-1}$ po dobu 24 hodin. Po této době byly do média přidány specifické substráty pro jednotlivé formy CYP. Následně byla stanovená enzymatická aktivita cytochromů P450 CYP1A2 (substrát fenacetin), CYP2A6 (substrát kumarin), CYP2C9 (substrát warfarin), CYP2D6 (substrát bufuralol) a CYP3A4 (substrát testosteron) pomocí uvedených substrátů a s využitím přístroje Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) s UV/fluorescenční detekcí. Kontrolní vzorky primárních kultur lidských hepatocytů byly připraveny a inkubovány za stejných podmínek jen bez aplikace butyrátu sodného. Výsledky jsou udávány jako procento aktivity vzhledem ke kontrolním vzorkům, kde nebyl butyrát přítomen.

V případě CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 nebyly pozorovány signifikantní změny po aplikaci butyrátu sodného, zatímco aktivita CYP1A2 (o 39 %) a hlavně

CYP2A6 (o 59 %) byly signifikantně zvýšené u vzorků s 500μmol·l^{-1} butyrátem sodným v porovnání s kontrolními vzorky (Obr. 19).

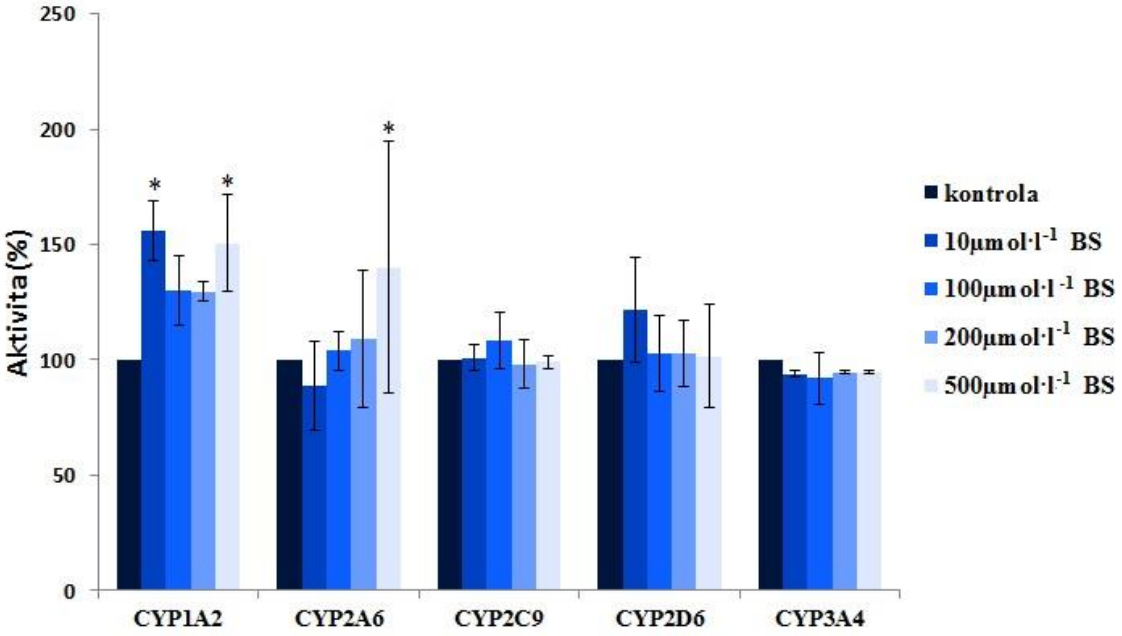


Obrázek 19. Aktivita enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 v primárních kulturách lidských hepatocytů po 24 hodinové inkubaci s 500μmol·l^{-1} butyrátem sodným v porovnání s kontrolními vzorky. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ± S.D.; N=3. Signifikantně zvýšené hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou jsou označeny jako *P<0.05.

V následujícím experimentu byla testována koncentrační závislost působení butyrátu sodného na enzymové aktivity CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů. Primární kultury lidských hepatocytů byly opět vysety na kultivační desky a inkubovány s butyrátem sodným o koncentraci 10μmol·l^{-1},100μmol·l^{-1}, 200μmol·l^{-1} a 500μmol·l^{-1} po dobu 24 h. Enzymové aktivity vybraných forem CYP byly stanoveny pomocí specifických substrátů stejně jako v pilotním experimentu. Na Obr. 20 jsou výsledky stanovení aktivit vybraných CYP u kontrolních vzorků a vzorků, kde byl aplikován butyrát sodný v různých koncentracích. Stejně jako po

aplikaci butyrátu sodného v koncentraci 500 μmol·l^{-1} ani nižší zvolené koncentrace nezpůsobily signifikantní změny v aktivitách CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4.

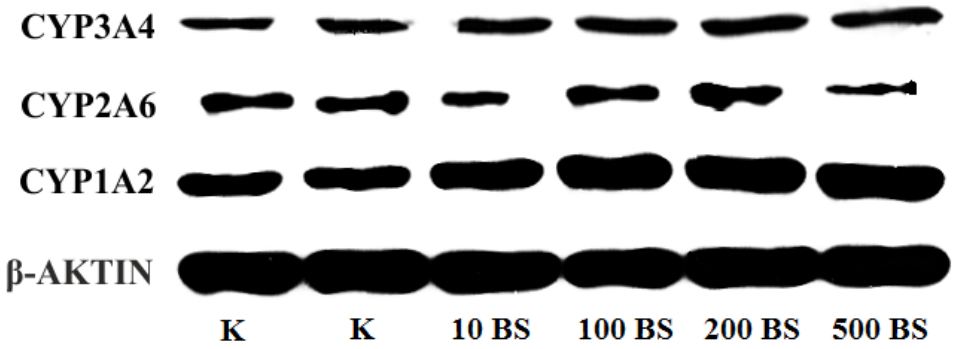
Aktivita CYP1A2 byla zvýšená u všech zvolených koncentrací, přičemž je zajímavé, že nejvyšší aktivita byla naměřena při nejnižší koncentraci 10 μmol·l^{-1} (o 56 %) a při nejvyšší koncentraci 500 μmol·l^{-1} (o 51 %). Zdá se tedy, že nárůst aktivity CYP1A2 vlivem butyrátu sodného není lineární. V případě CYP2A6 byla signifikantně zvýšená aktivita pouze u koncentrace 500 μmol·l^{-1} (o 40 %) u ostatních koncentrací žádné změny pozorované nebyly.



Obrázek 20. Enzymatická aktivita pěti forem CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů po 24 hodinové inkubaci s 10 μmol·l^{-1}, 100 μmol·l^{-1}, 200 μmol·l^{-1} a 500 μmol·l^{-1} butyrátem sodným v porovnání s kontrolními vzorky primárních kultur, které byly připraveny a inkubovány za stejných podmínek jen bez aplikace butyrátu sodného. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ± S.D.; N=3.

U enzymů, kde byly zaznamenány změny v aktivitě působením butyrátu sodného, byla stanovena také exprese proteinu pomocí metody Western blottingu. V případě CYP1A2 došlo k nárůstu exprese proteinu po aplikaci butyrátu sodného v porovnání s kontrolními vzorky v souladu s výsledky enzymové aktivity. Naopak

u CYP2A6 nebyly pozorovány žádné změny na hladině exprese proteinu vlivem butyrátu sodného, a to ani v nejvyšší zvolené koncentraci 500 μmol·l^{-1} (Obr. 21).

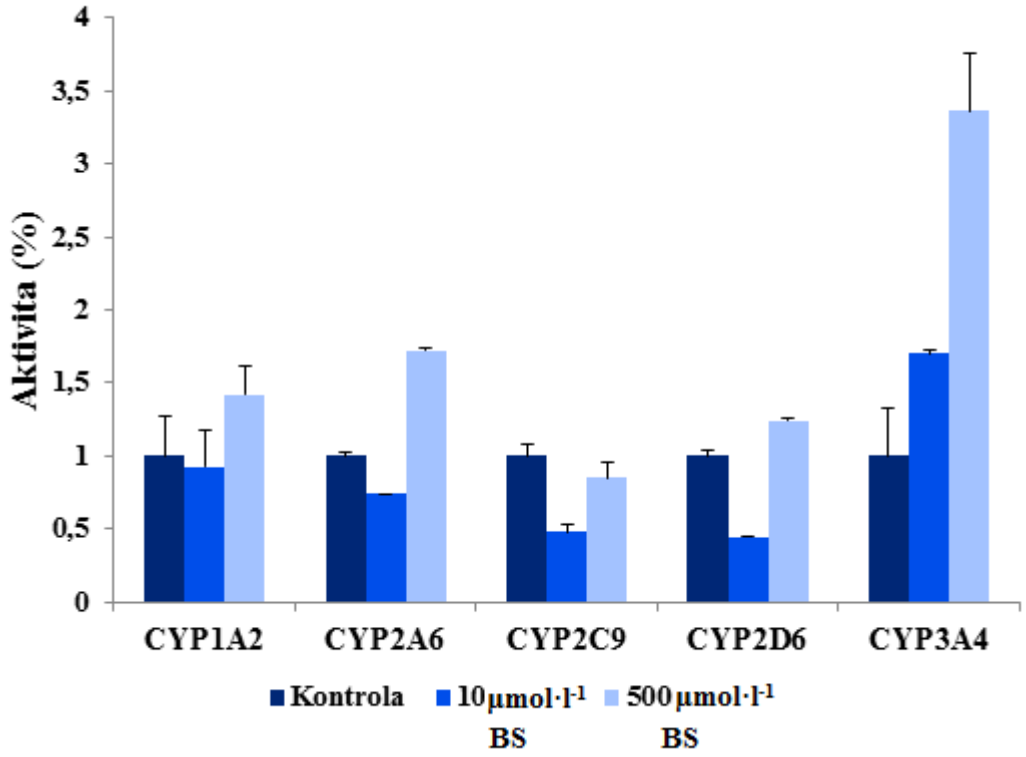


Obrázek 21. Vliv butyrátu sodného (10μmol·l^{-1},100μmol·l^{-1}, 200μmol·l^{-1} a 500μmol·l^{-1}) na expresi proteinu CYP1A2, CYP2A6 a CYP3A4 v primárních kulturách lidských hepatocytů. K, kontrola a BS, butyrát sodný. Jako kontrola aplikace vzorků byl použit β-aktin.

Hladina exprese proteinu byla stanovena také u dalších isoforem CYP, ale žádné signifikantní změny nebyly pozorovány, shodně se stanovenými aktivitami.

U všech zvolených isoforem CYP bylo také ověřeno možné ovlivnění hladiny exprese mRNA butyrátem sodným pomocí metody PCR. Zvýšení exprese mRNA bylo pozorováno při nejvyšší koncentraci 500 μmol·l^{-1} butyrátu sodného u genů *Cyp1a2* a *Cyp2a6,* v souladu s výsledky enzymových aktivit a v případě CYP 1A2 i expresí proteinu, nicméně zjištěné změny nebyly statisticky významné.

Nejvyšší navýšení hladiny exprese mRNA bylo překvapivě stanoveno při stejné koncentraci butyrátu sodného u *Cyp3a4,* kdy byla exprese zvýšena více jak 3 krát a zvýšení hladiny mRNA způsobila i koncentrace 10 μmol·l^{-1} (Obr. 22). Nicméně ani exprese proteinu ani enzymová aktivita CYP3A4 aplikovanými koncentracemi butyrátu sodného ovlivněna nebyla.

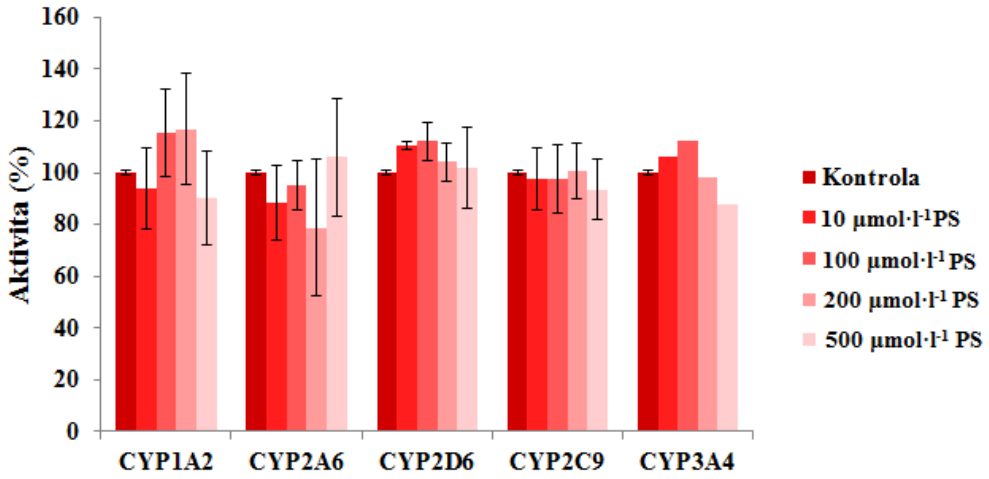


Obrázek 22. Vliv butyrátu sodného na expresi mRNA u vybraných cytochromů P450 v lidských hepatocytech. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ± S.D.; N=2. BS, butyrát sodný.

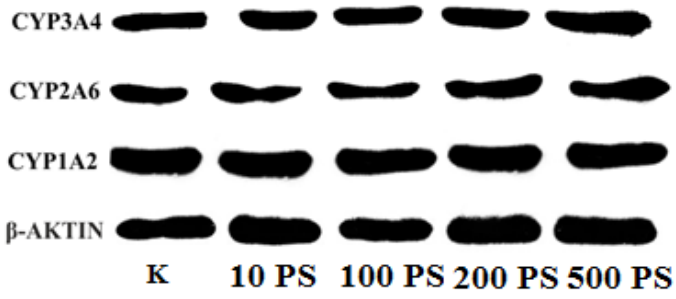
Propionát je dalším produktem bakteriální fermentace v lidském GIT a stejně jako butyrát je studován pro své potenciální pozitivní účinky na lidský organismus. I v případě propionátu jsme zkoumali jeho možné zapojení do metabolismu léčiv ovlivněním biotransformačních enzymů, přesněji vliv propionátu sodného na expresi proteinu a enzymatickou aktivitu CYP enzymů v primárních kulturách lidských hepatocytů.

Primární kultury lidských hepatocytů byly vysety na kultivační desky a inkubovány s propionátem sodným o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$,100 $\mu mol \cdot l^{-1}$, 200 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a 500 $\mu mol \cdot l^{-1}$ po dobu 24 h. Následně byly, aplikovány specifické substráty pro vybrané formy CYP, pomocí kterých byla stanovena jejich enzymová aktivita, stejně jako v případě butyrátu. Na rozdíl od butyrátu, nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v aktivitách CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a

CYP3A4 vlivem vybraných koncentrací propionátu sodného (Obr. 23). Také exprese odpovídajících proteinů nebyla výrazně ovlivněna (Obr. 24).



Obrázek 23. Enzymatická aktivita pěti forem cytochromů P450 v primárních kulturách lidských hepatocytů po 24 hodinové inkubaci s 10 µmol·l^{-1}, 100 µmol·l^{-1}, 200 µmol·l^{-1} a 500 µmol·l^{-1} propionátem sodným v porovnání s kontrolními vzorky primárních kultur, které byly připraveny a inkubovány za stejných podmínek bez aplikace PS. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ± S.D.; N=3.



Obrázek 24. Vliv 10µmol·l^{-1}, 100µmol·l^{-1}, 200µmol·l^{-1} a 500µmol·l^{-1} propionátu sodného na expresi proteinu CYP1A2, CYP2A6 a CYP3A4 v primárních kulturách lidských hepatocytů. K, kontrola a PS, propionát sodný. Jako kontrola aplikace vzorků byl použit β-aktin.

6 DISKUZE

Schopnost střevního mikrobiomu metabolizovat léčiva byla rozpoznána již před více jak 40 lety [87]. V současné době jsou známy desítky léků, které jsou modifikovány bakteriálními enzymy a jejich počet stále roste [14, 88, 96, 165]. Poslední studie ukazují, že střevní mikroflóra může mít vliv na farmakokinetiku perorálně podávaných léků a ovlivňovat tak jejich biodostupnost. Jako první přístup pro zkoumání možnosti zapojení bakteriálních enzymů do metabolismu příslušného léčiva se nabízí *in vitro* experimenty s kultivovatelnými bakteriemi.

V naší předběžné *in vitro* studii byl inkubován nabumeton s živými bakteriálními suspenzemi komenzální *E. coli* ATCC 25922 (1×10^9 CFU·ml^{-1}) a bylo zjištěno, že tento bakteriální druh může metabolizovat určité množství parentní látky na redukovaný farmakologicky neaktivní metabolit. Z naměřených dat bylo možné předpokládat, že bakteriální metabolismus může být příčinou sníženého množství absorbovaného nabumetonu z gastrointestinálního traktu a to může vést k omezení jeho následné konverze na aktivní metabolit 6-MNA. Komenzální bakterie se tedy teoreticky mohou podílet na snížení biodostupnosti nabumetonu. Při dalších experimentech jsme zjistili, že nejen komenzální, ale i probiotické bakterie (*L. casei* a *E. coli* Nissle 1917), byly schopné za *in vitro* podmínek nabumeton metabolizovat na farmakologicky neaktivní metabolit. Je otázkou, zda přítomnost probiotických bakterií může vést ke změně farmakokinetických parametrů orálně podávaných léčiv. Matušková et al. publikovali výsledky, kde probiotická bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917 měnila farmakokinetické parametry antiarytmika amiodaronu – došlo ke zvýšení biologické dostupnosti léčiva [48]. Zajímavé je, že jiný probiotický bakteriální kmen *Lactobacillus casei* vykazoval jiný způsob ovlivnění farmakokinetiky amiodaronu (došlo k prodloužení času k dosažení maximální koncentrace amiodaronu o dvě hodiny) [166]. Z těchto výsledků vyplývá, že podávání probiotických bakterií může mít vliv na farmakokinetiku současně podaného léčiva, velmi však záleží na vlastnostech podaného probiotika, na vlastnostech interagujícího léčiva a také na aktuálním stavu organizmu.

Na základě těchto dat jsme se rozhodli studovat vliv střevní mikroflóry na farmakokinetické procesy (nebo časový průběh hladin léčiva nebo na vlastnosti enzymů metabolismu léčiv) v GIT experimentálních modelů buď s cíleně alterovanou střevní mikroflórou (např. u konvenčních modelů podáním antibiotik), nebo dokonce za podmínek úplné absence střevní mikrobioty s použitím bezmikrobního, GF modelu.

V první řadě byl u běžně kolonizovaných experimentálních modelů sledován možný efekt změněné střevní mikroflóry způsobené podáváním antibiotik na farmakokinetiku nabumetonu. Vzhledem k výsledkům studie *in vitro* jsme předpokládali, že eliminace alespoň části střevních mikrobiot (např. komenzální *E.coli* ATCC 25922) působením antibiotik by mohla změnit biodostupnost současně podávaného léčiva, v našem případě nabumetonu. Přitom jsme očekávali nárůst koncentrace podávaného léčiva v plazmě, protože část nabumetonu jinak metabolizovaná mikrobioty by měla být ušetřena díky potlačenému efektu mikrobiomu antibiotiky.

Jak je zřejmé z našich výsledků (Obr. 15), farmakokinetika hlavního metabolitu, 6-MNA, u zvířat stresovaných podáváním imipenemu se sice signifikantně nelišila od kontrolních zvířat, nicméně došlo k nárůstu plochy pod křivkou AUC_{0-24} u hlavního metabolitu o 20 % a celková plocha pod křivkou v rozmezí 0. hodina až nekonečno ($AUC_{0-\infty}$) se zvýšila o 21 %. Toto navýšení by mohlo znamenat zvýšenou biodostupnost 6-MNA (resp. nabumetonu) způsobenou omezenou aktivitou střevního mikrobiomu. Další sledované farmakokinetické parametry byly zvýšeny po aplikaci imipenemu v menší míře; $t_{1/2}$ se zvýšil 11 %, c_{max} o 8 %, t_{max} o 3 % (Tab. 7). Aktivita bakteriálních enzymů zřejmě aplikovaným antibiotikem nebyla natolik ovlivněna, aby se efekt projevil významným zvýšením hladin aktivního metabolitu.

Při diskusi tohoto výsledku je třeba mít na paměti, že léčiva mohou být metabolizována bakteriálními enzymy v gastrointestinálním traktu dříve, než jsou absorbována do cirkulace, a tak může mít střevní mikrobiota značný (i když často přehlížený) vliv na stabilitu a biodostupnost léčiv [14, 96]. Kromě toho mohou xenobiotika měnit složení střevního mikrobiomu, a tím i aktivitu mikrobiálních

enzymů. Může tedy nastat situace, kdy současné podávání léků ovlivňujících střevní mikrobiom a léků s jiným terapeutickým účinkem může způsobovat nežádoucí lékové interakce. Yoo et al. zjistili, že současné podávání antibiotik a lovastatinu může ovlivňovat metabolismus lovastatinu, a může tak snižovat jeho farmakologický účinek [40]. Z literatury vyplývá, že antibiotika mohou mít efekt na metabolismus léčiv a ovlivňovat jejich farmakologický účinek,v mnohem větší míře, než se dříve předpokládalo [167]. Podle nedávných studií antibiotika způsobují značné krátko- i dlouhodobé změny ve složení střevního mikrobiomu, což může vést k částečnému snížení jeho celkové diverzity [37]. Na druhou stranu, jiné studie apelují na značnou plasticitu ve složení střevního mikrobiomu a jeho schopnost obnovit původní složení po ukončení podávání antibiotik [38, 39]. Manichanh et al. podávali vankomycin s imipenememem potkanům v pitné vodě po dobu 3 dnů, protože je známo, že tato kombinace antibiotik má širokospektrou aktivitu proti G^+ a G^- bakteriím. Po třech dnech aplikace antibiotik byl pozorován 10ti násobný pokles v množství střevních mikrobiot, přičemž byly hlavně ovlivněny dva nejzastoupenější kmeny (*Bacteroidetes* and *Firmicutes*). Na druhou stranu, jiné bakteriální kmeny (*Proteobacteria* and *Tenericutes*), které jsou za běžných podmínek minoritní, přerostly a zabraly uvolněná místa [163]. Zdá se tedy, že střevní mikroflóra změněná podáváním antibiotik je schopná vykonávat stejné základní funkce jako původní mikroflora, dokonce může vykazovat i podobné enzymové aktivity. V naší studii, při sledování hladin 6-MNA po aplikaci imipenemu, pravděpodobně došlo částečně k tomuto efektu. Ačkoliv dominantní bakteriální kmeny (*Bacteroidetes* and *Firmicutes*) mohou být ovlivněny aplikací imipenemu, za běžných podmínek minoritní kmeny zastoupí jejich funkce a vznik hlavního metabolitu nabumetonu zůstal ovlivněn jen zčásti. Situaci komplikuje také fakt, že vliv střevních mikrobiot na farmakokinetiku léčiv je ovlivněn celou řadou faktorů, jako je druh použitého antibiotika, studovaného léčiva, modelového organismu a počátečním stavu střevní mikroflóry.

Cílem naší studie bylo zjistit, jestli aplikace antibiotik může mít vliv na farmakokinetické parametry současně podávaného léčiva, a tím ovlivňovat léčbu. Získané výsledky ukazují, že současné podávaní antibiotik jako je imipenem (znám

pro svoji vysokou antibakeriální aktivitu a schopnost měnit složení střevního mikrobiomu), může (ale také nemusí) měnit farmakokinetiku dalších léčiv. Vzhledem ke komplexnosti vzájemného vztahu mezi složením střevního mikrobiomu a působením léčiv nelze učinit obecný závěr, ale každou dvojicí vzájemně působících léků je třeba posuzovat individuálně.

Ke studiu vlivu osídlení GIT na vlastnosti enzymů metabolismu léčiv jsme měli k dispozici vzorky získané z bezmikrobních, GF myší. Data uveřejněná v poslední době [50, 51, 83, 84] totiž ukazovala, že jedním z možných mechanismů působení střevního mikrobiomu na metabolismus léčiv může být jeho vliv na expresi jaterních biotransformačních enzymů. Nejdůležitějšími biotransformačními enzymy I. fáze metabolismu léčiv jsou cytochromy P450, které katalyzují více než tři čtvrtiny známých oxidačních reakcí léčiv [74]. Vhodným modelem pro studium vlivu střevního mikrobiomu na metabolismus xenobiotik jsou jednak zvířata axenická - germ - free – bez mikroflóry v trávicím traktu a na povrchu těla nebo takzvané gnotobiotické zvířecí modely s přesně definovanou střevní mikroflórou.

V naší studii jsme stanovili expresi mRNA u *Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c38, Cyp2d22, Cyp2e1, Cyp3a11* a *3a13* v jaterní mikrosomální frakci bezmikrobních myší a bezmikrobních myší monokolonizovaných bakteriálními kmeny *Lactobacillus plantarum*^{NIZO2877} a *Escherichia coli* Nissle 1917 v porovnání s kontrolními (SPF) myšmi.

Lidský CYP3A4 je nejzastoupenější biotranformační enzym I. fáze v játrech i ve střevě a je zodpovědný za metabolismus více jak 50 % všech klinicky užívaných léčiv. Ve shodě s předešlými studiemi [84, 168, 169], byla exprese mRNA *Cyp3a11*, myšího ortologu lidského CYP3A4, signifikantně snížená v játrech bezmikrobních myší v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 16). Také exprese proteinu CYP3A a enzymatická aktivita byla signifikantně snížená za GF podmínek (Obr. 17AB).

Po kolonizaci bezmikrobních myší kmenem *L. plantarum*^{NIZO2877} nebo probiotickou bakterií *E. coli* Nissle 1917 zůstala hladina exprese mRNA *Cyp3a11* snížená na stejné hladině jako u bezmikrobních myší (Obr. 18). Naše výsledky hladiny mRNA u bezmikrobních myší po kolonizaci dvěma nepatogenními bakteriálními kmeny jsou srovnatelné s výsledky nedávné studie s využitím směsi osmi bakteriálních probiotických kmenů, jejichž aplikace také nevedla k obnovení hladiny exprese mRNA ke stavu u kontrolních zvířat [51]. Naše výsledky společně s výsledky dalších studií ukazují na kmenově nespecifické snížení exprese mRNA *Cyp3a11* za bezmikrobních podmínek [50, 51, 84]. Z uvedeného vyplývá, že střevní

mikrobiota je schopna regulovat nejvýznamnější lidský biotransformační enzym, a to jak na hladině exprese mRNA a proteinu, tak i jeho enzymatickou aktivitu (Obr. 16 a 17AB).

V našem experimentu jsme pozorovali také změny exprese mRNA u dalších CYP u bezmikrobních myší, avšak některé naše výsledky se liší od studií publikovaných jinými autory. Naše výsledky ukazují na signifikantní zvýšení exprese mRNA *Cyp1a2* u bezmikrobních myší, tedy opačný trend v porovnání s *Cyp3a11*. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií Claus et al. [83] a Toda et al. [84]; na druhou stranu jsou naše výsledky v souladu se studií Selwyn et al. [51]. Kolonizace bezmikrobních myší kmeny Gram^{+} *L. plantarum*^{NIZO2877} a také Gram^{-} *E. coli* Nissle 1917 snížila hladinu exprese mRNA *Cyp1a2* na hladinu exprese kontrolní skupiny (Obr. 18). Rozdíly v publikovaných výsledcích jsou pravděpodobně způsobeny použitím různých myších kmenů v experimentech.

Zajímavým výsledkem je, že v případě genu *Cyp2e1* jsme zjistili opačný efekt kolonizace bezmikrobních myší Gram^{+} *L. plantarum*^{NIZO2877} a Gram^{-} *E. coli* Nissle 1917. Kolonizace bezmikrobních myší bakteriií *L. plantarum*^{NIZO2877} nezměnila expresi *Cyp2e1* v porovnání s bezmikrobními myšmi a zůstala zvýšená oproti kontrolní skupině myší, zatímco kolonizace probiotickou bakterií *E. coli Nissle 1917* způsobila snížení exprese *Cyp2e1*, to znamená obnovení exprese odpovídající hodnotám naměřeným u kontrolních zvířat. Tento fakt jen odráží komplexnost regulace biosyntézy jednotlivých CYP. Jedním z faktorů, který expresi těchto enzymů ovlivňuje, mohou být i nízkomolekulární metabolity, které jsou produkovány mikroorganismy přítomnými v gastrointestinálním traktu.

Přesnému porozumění molekulárního mechanismu regulace syntézy jaterních biotransformačních enzymů střevním mikrobiomem je stále velmi daleko, stojíme teprve na začátku těchto studií. K lepšímu poznání by mohlo přispět studium produktů bakteriálního metabolismu, které mohou být za tento efekt zodpovědné. Jedním z kandidátů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) produkované komenzálními bakteriemi v lidském tlustém střevě ve vysoké koncentraci 50 – 200 mM. Hlavními SCFA jsou acetát, propionát a butyrát.

Všechny tyto molekuly vznikají činností bakterií rodu *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Prevotella*, ale i dalších, v poměru přibližně 60:20:20 [63]. Především butyrát je znám jako zdroj energie pro hostitelský organismus, ale má také funkci při regulaci genové exprese mnoha cílových genů včetně těch, pro jaterní biotransformační enzymy [73].

V naší studii jsme sledovali vliv butyrátu sodného na expresi (mRNA, proteinu) a na enzymatickou aktivitu jaterních biotransformačních enzymů – cytochromů P450 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Po aplikaci butyrátu byla aktivita CYP1A2 zvýšená u všech zvolených koncentrací butyrátu (10 $\mu mol \cdot l^{-1}$, 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$, 200 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a 500 $\mu mol \cdot l^{-1}$). Při nejvyšší koncentraci butyrátu (500 $\mu mol \cdot l^{-1}$) byla aktivita zvýšena o 51 %. V případě CYP2A6 byla signifikantně zvýšená aktivita pouze u koncentrace 500μM (o 40 %). U ostatních koncentrací žádné změny enzymové aktivity pozorované nebyly. V případě CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 nebyly vlivem butyrátu sodného pozorovány žádné změny enzymové aktivity oproti kontrole. Také exprese proteinu CYP1A2 byla zvýšená po aplikaci butyrátu sodného v porovnání s kontrolními vzorky v souladu s výsledky enzymové aktivity. Naopak u CYP2A6 nebyly pozorovány žádné změny na hladině exprese proteinu. U nejvyšší koncentrace butyrátu sodného (500$\mu mol \cdot l^{-1}$) byla detekována zvýšená exprese mRNA genů *Cyp1a2* a *Cyp2a6*, v souladu s výsledky enzymových aktivit a v případě CYP 1A2 i expresí proteinu, nicméně zjištěné změny nebyly statisticky významné.

Detekované zvýšení exprese mRNA, proteinu a aktivita CYP1A2 vlivem butyrátu sodného v primárních kulturách lidských hepatocytů by mohlo být vysvětlitelné předpokládaným vlivem butyrátu na expresi AhR receptoru. Naše data jsou tak v souladu s prací Korecka et al., 2016, kde se uvádí, že aplikace butyrátu GF myším indukuje právě expresi AhR [73].

7 ZÁVĚRY

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem vlivu střevních bakterií na metabolismus léčiv, především na jejich farmakokinetiku. Dále byl sledován vliv střevních bakterií a jejich fermentačních produktů na expresi vybraných jaterních CYP jak na úrovni proteinu, tak i mRNA, a případně aktivity těchto enzymů. Na základě stanovených cílů bylo dosaženo těchto výsledků:

Efekt mikrobiomu na farmakokinetiku nabumetonu

- Komenzální i probiotické bakterie jsou zapojeny do metabolismu nabumetonu tvorbou farmakologicky neaktivního metabolitu (4-(6-metoxy-2-naftyl)-butan-2-ol, redukovaný nabumeton), který je tvořen vybranými bakteriemi *in vitro* za aerobních i anaerobních podmínek. Střevní mikrobiota by tedy mohla snižovat množství absorbovaného nabumetonu z GIT a tím následně snížit množství vzniklého aktivního metabolitu 6-MNA.

- Farmakokinetika hlavního aktivního metabolitu nabumetonu, 6-MNA, se u potkanů stresovaných současným podáváním antibiotika imipenemu signifikantně nelišila od kontrolních zvířat, nicméně došlo k nárůstu plochy pod křivkou AUC_{0-24} u hlavního metabolitu o 20 % a celková plocha pod křivkou v rozmezí 0. hodina až nekonečno ($AUC_{0-\infty}$) se zvýšila o 21 %.

Cytochromy P450 u bezmikrobních myší

- Při studiu CYP u bezmikrobních myší bylo zjištěno, že exprese mRNA *Cyp3a11*, myšího ortologu lidského CYP3A4, byla signifikantně snížená (o 46 %) v jaterní mikrosomální frakci GF myší v porovnání s kontrolní SPF skupinou. Také exprese proteinu CYP3A a jeho enzymatická aktivita byla signifikantně snížená v játrech GF myší (o 45 % resp. 71 %).

- Exprese mRNA *Cyp1a2* a *Cyp2e1* byla signifikantně zvýšená v jaterní mikrosomální frakci GF myší v porovnání s SPF myšmi (o 82 % resp. 45 %).

Hladina mRNA *Cyp1a1, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c38, Cyp2d22 a Cyp3a13* byla nezměněná u GF myší v porovnání s kontrolami.

Cílená monokolonizace bezmikrobních myší a její vliv na CYP

- Zatímco u GF myší byla exprese mRNA *Cyp1a2* signifikantně zvýšená v porovnání s kontrolní skupinou, kolonizace GF myší nepatogenní bakterií *L. plantarum*^{NIZO2877} nebo probiotickou bakterií *E. coli* Nissle 1917 vedla ke snížení exprese mRNA *Cyp1a2*, zpět k hladině exprese mRNA u kontrolních (SPF) myší.
- V případě genu *Cyp3a11*, monokolonizace GF myší *L. plantarum*^{NIZO2877} nebo *E. coli* Nissle 1917, neměla výrazný vliv na expresi mRNA. Exprese mRNA *Cyp3a11* zůstala signifikantně snížená u monokolonizovaných GF myší v porovnání s kontrolní skupinou, tak jak to bylo pozorováno u GF myší.
- U GF myší monokolonizovaných *L. plantarum*^{NIZO2877} byla zjištěna zvýšená hladina mRNA *Cyp2e1*, (stejně jako u bezmikrobních myší) v porovnání s SPF skupinou, tato změna nebyla však pozorována u GF myší kolonizovaných probiotickým kmenem *E. coli* Nissle 1917.

Studium efektu krátkých mastných kyselin na regulaci exprese CYP

- Aplikace butyrátu sodného – fermentačního produktu střevních bakterií - na primární kultury lidských hepatocytů vedla ke zvýšení enzymové aktivity CYP1A2 u všech zvolených koncentrací butyrátu (10 μmoll^{-1}, 100 μmol·l^{-1}, 200 μmol·l^{-1} a 500 μmol·l^{-1}). Také exprese proteinu CYP1A2 byla zvýšená po aplikaci butyrátu sodného v porovnání s kontrolními vzorky v souladu s výsledky enzymové aktivity. U nejvyšší koncentrace butyrátu (500μmol·l^{-1}) došlo také ke zvýšení enzymové aktivity CYP2A6.

8 SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace vztahující k disertaci:

1. Jourová L., Anzenbacher P. and Anzenbacherová E. Gut microbiota can influence the metabolism of drugs. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2016, **160**(3):317-326 IF_{2016}: 1,243

2. Jourová L., Anzenbacher P., Lišková B., Matušková Z., Hermanová P., Hudcovic T., Kozáková H., Hrnčířová L., Anzenbacherová E. Colonization by nonpathogenic bacteria alters mRNA expression of cytochromes P450 in originally germ-free mice. Folia Microbiol. 2016, přijato k publikaci. IF_{2016}: 1,61

3. Jourová L., Anzenbacher P., Matušková Z., Večeřa R., Kolář M., Anzenbacherová E. Imipenem, a carbapenem type antibiotic, does not alter pharmacokinetics of a model drug nabumetone. Abstract in Toxicology Letters, 2015, **238**(2):S332.

4. Anzenbacherová E., Špičáková A., Jourová L., Ulrichová J., Adamus M., Bachleda P., Anzenbacher P. Interaction of rocuronium with human liver cytochromes P450. J Pharmacol Sci. (2015) **127(2)**:190-5. IF_{2015}: 2,106

5. Tománková V., Lišková B., Skalová L., Bártíková H., Boušová I., Jourová L., Anzenbacher P., Ulrichová J., Anzenbacherová E. Altered cytochrome P450 activities and expression levels in the liver and intestines of the monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. Life Sci. (2015) **15**; 133:15-20. IF_{2015}: 2,702

Prezentace na konferencích:

1. Jourová L., Tománková V., Anzenbacherová E., Bártíková H., Boušová I. and Anzenbacher P. The influence of cranberry on the activity of cytochromes P450 in mouse liver microsomes. 18th Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference TOXCON 2013, 19-21. 6. 2013, Hradec Králové, Česká republika.

2. Ulrichová J., Jourová L., Tománková V., Kosina P., Kopečná Zapletalová M., Anzenbacherová E. Effect of the procyanidin A2 on activity of cytochromes P450 in human hepatocytes. 2013 Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 14-17. 7. 2013, St. Louis, Missouri, USA.

3. Tománková V., Jourová L., Anzenbacherová E., Bártíková H., Boušová I., Anzenbacher P. The influence of polyphenon E on the activity of cytochromes P450 in mouse liver microsomes. *13th International Nutrition & Diagnostics Conference* (INDC 2013), 26.-29.8.2013, Olomouc, Česká republika.

4. Anzenbacher P., Jourová L., Tománková V., Bártková H., Bousová I., Anzenbacherová E. Obese and normal mice differ in enzyme activities of cytochromes P450 after administration of green tea extract. 49th Eurotox 2013, 1-4. 9. 2013, Interlaken, Švýcarsko.

5. Anzenbacher P., Lišková B., Nekvindová J., Tománková V., Jourová L., Bártíková H., Boušová I., Skálová L., Anzenbacherová E. Influence of cranberry and polyphenon E on gene expression of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. 63rd Czech and Slovak Pharmacological Days, 11.-13.9.2013, Olomouc, Česká republika.

6. Jourová L., Anzenbacher P., Matušková Z., Kolář M., Tlaskalova-Hogenova H., Kverka M., Anzenbacherová E. Metabolism of nabumetone by commensal and probiotic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations MDO 2014, 18-22. 5. 2014, Stuttgart, Německo.

7. Lišková B., Anzenbacher P., Tománková V., Jourová L., Bártíková H., Boušová I., Skálová L., Anzenbacherová E. Influence of american cranberry on gene expression and activity of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations MDO 2014, 18-22. 5. 2014, Stuttgart, Německo.

8. Tománková V., Jourová L., Anzenbacherová E., Bartíková H., Boušová I., Anzenbacher P. Normal and obese mice: comparison of activities of liver microsomal cytochromes P450. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations MDO 2014, 18-22. 5. 2014, Stuttgart, Německo.

9. Kosina P., Pivodová V., Jourová L., Tománková V., Hrbáč J., Anzenbacherová E., Ulrichová J. Vliv flavonolignanů ostropestřce mariánského na vybrané biochemické parametry v in vivo studii na králících. XXIV. Biochemický sjezd, 18-21. 9. 2014, Bratislava, Slovensko.

10. Anzenbacher P., Tománková V., Jourová L., Bártíková H., Boušová I., Skálová L., Anzenbacherová E., Lišková B. Influence of Green tea extract in various dosage schemes on gene expression of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. *XXVIII. Xenobiochemické sympózium*, 17.-19.6.2015, Kremnica, Slovensko.

11. Jourová L., Anzenbacher P., Matušková Z., Večeřa R., Kolář M., Anzenbacherová E. Imipenem, a carbapenem type antibiotic, does not alter pharmacokinetics of a model drug nabumetone. 51st Congress of the

European Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16. 9. 2015, Porto, Portugalsko.

12. Jourová L., Anzenbacher P., Lišková B., Matušková Z., Hudcovic T., Kozáková H., Anzenbacherová E. Germ-free mice as a model: May the gut microbiota alter the expression levels and activity of biotransformation enzymes? 21st Interdisciplinary Toxicological Conference, (TOXCON), June 22-24. 2016, Stará Lesná, Slovensko.

13. Anzenbacherová E., Nekvindová J., Bousova I., Bartikova H., Jourová L., Anzenbacher P. Gut microbiome species richness differ after intake of green tea and cranberry extracts by lean and obese mice. 10th World Congress on Polyphenols application, June 29, 30 – July 1, 2016, Porto, Portugalsko.

14. Jourová L., Anzenbacher P., Lišková B., Hudcovic T., Kozáková H., Anzenbacherová E. Kolonizace probiotickými bakteriemi ovlivňuje expresi mRNA cytochromů P450 u bezmikrobních myší. Konference vědeckých prací studentů DSP, 14. 9. 2016, Olomouc, Česká republika.

9 LITERATURA

1. Turnbaugh PJ, Stintzi A. Human health and disease in a microbial world. Front Microbiol. 2011. 2: p. 190.
2. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. Eur J Cancer Prev. 1997. 6 Suppl 1: p. S43-5.
3. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nat Rev Immunol. 2016. 16(6): p. 341-52.
4. Viggiano D, Ianiro G, Vanella G, Bibbo S, Bruno G, Simeone G, Mele G. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015. 19(6): p. 1077-85.
5. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. Proc Nutr Soc. 2003. 62(1): p. 67-72.
6. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins Fdos S. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. J Immunol Res. 2014. 2014: p. 689492.
7. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, Prifti E, Vieira-Silva S, Gudmundsdottir V, Krogh Pedersen H, Arumugam M, Kristiansen K, Voigt AY, Vestergaard H, Hercog R, Igor Costea P, Kultima JR, Li J, Jorgensen T, Levenez F, Dore J, Nielsen HB, Brunak S, Raes J, Hansen T, Wang J, Ehrlich SD, Bork P, Pedersen O. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. Nature. 2015. 528(7581): p. 262-6.
8. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. Nat Med. 2013. 19(5): p. 576-85.
9. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacol Res. 2013. 69(1): p. 52-60.
10. Stojancevic M, Bojic G, Salami HA, Mikov M. The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs. Curr Issues Mol Biol. 2014. 16: p. 55-68.

11. Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. Cell. 2013. 152(1-2): p. 39-50.
12. Shamat MA. The role of the gastrointestinal microflora in the metabolism of drugs. Int J Pharm. 1993. 97(1): p. 1-13.
13. Mikov M. The metabolism of drugs by the gut flora. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1994. 19(3): p. 201-207.
14. Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. Int J Pharm. 2008. 363.
15. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nat Rev Microbiol. 2005. 3(5): p. 431-8.
16. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. Int J Pharm. 2008. 364(2): p. 213-26.
17. Walter J, Ley R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. Annu Rev Microbiol. 2011. 65: p. 411-29.
18. Miller TL, Wolin MJ. Methanogens in human and animal intestinal Tracts. Syst Appl Microbiol. 1986. 7(2): p. 223-229.
19. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. PLoS Biol. 2006. 4(1): p. e3.
20. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005. 307(5717): p. 1915-20.
21. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Munoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environ Microbiol. 2009. 11(10): p. 2574-84.
22. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. Early Hum Dev. 2010. 86 Suppl 1: p. 13-5.
23. Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. World J Gastroenterol. 2014. 20(41): p. 15163-76.
24. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L,

Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariaz G, Dervyn R, Foerstner KU, 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 SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. 2011. 473(7346): p. 174-80.

25. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. Proc Natl Acad Sci. 2011. 108(Supplement 1): p. 4586-4591.
26. Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease. Genome Med. 2011. 3(3): p. 14.
27. Belizario JE, Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. Front Microbiol. 2015. 6: p. 1050.
28. Shashkova T, Popenko A, Tyakht A, Peskov K, Kosinsky Y, Bogolubsky L, Raigorodskii A, Ischenko D, Alexeev D, Govorun V. Agent Based Modeling of Human Gut Microbiome Interactions and Perturbations. PLoS One. 2016. 11(2): p. e0148386.
29. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D, Bargiela R, von Bergen M. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. Gut. 2013. 62(11): p. 1591-1601.
30. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. 102(31): p. 11070-5.
31. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2016. 12(3): p. 154-67.
32. Panzer AR, Lynch SV. Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. Curr Opin Rheumatol. 2015. 27(4): p. 373-80.

33. Zapata HJ, Quagliarello VJ. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. J Am Geriatr Soc. 2015. 63(4): p. 776-81.
34. Kelly JR, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. Ann Epidemiol. 2016.
35. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Fagiuoli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. World J Gastroenterol. 2016. 22(1): p. 361-8.
36. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. J Clin Invest. 2014. 124(10): p. 4212-8.
37. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. The ISME journal. 2007. 1(1): p. 56-66.
38. De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. J Clin Microbiol. 2005. 43(11): p. 5588-92.
39. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. 108 Suppl 1: p. 4554-61.
40. Yoo DH, Kim IS, Van Le TK, Jung IH, Yoo HH, Kim DH. Gut microbiota-mediated drug interactions between lovastatin and antibiotics. Drug Metab Dispos. 2014. 42(9): p. 1508-13.
41. Yoo HH, Kim IS, Yoo DH, Kim DH. Effects of orally administered antibiotics on the bioavailability of amlodipine: gut microbiota-mediated drug interaction. J Hypertens. 2016. 34(1): p. 156-62.
42. Jourová L, Anzenbacher P, Matušková Z, Večeřa R, Kolář M, Anzenbacherová E. Imipenem, a carbapenem type antibiotic, does not alter pharmacokinetics of a model drug nabumetone. Toxicology Letters. 2015. 238(2, Supplement): p. S332.
43. Kim DH. Gut Microbiota-Mediated Drug-Antibiotic Interactions. Drug Metab Dispos. 2015. 43(10): p. 1581-9.
44. Sanders ME. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. Clin Infect Dis. 2008. 46(Supplement 2): p. S58-S61.
45. Sanders ME. Probiotics and microbiota composition. BMC Med. 2016. 14(1): p. 82.

46. Sanders ME. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. J Clin Gastroenterol. 2011. 45 Suppl: p. S115-9.
47. Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. Genome Med. 2016. 8(1): p. 52.
48. Matuskova Z, Anzenbacherova E, Vecera R, Tlaskalova-Hogenova H, Kolar M, Anzenbacher P. Administration of a probiotic can change drug pharmacokinetics: effect of E. coli Nissle 1917 on amidarone absorption in rats. PLoS One. 2014. 9(2): p. e87150.
49. Matuskova Z, Anzenbacher P, Vecera R, Siller M, Tlaskalova-Hogenova H, Strojil J, Anzenbacherova E. Effect of Lactobacillus casei on the Pharmacokinetics of Amiodarone in Male Wistar Rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2017. 42(1): p. 29-36.
50. Selwyn FP, Cheng SL, Bammler TK, Prasad B, Vrana M, Klaassen C, Cui JY. Developmental Regulation of Drug-Processing Genes in Livers of Germ-Free Mice. Toxicol Sci. 2015. 147(1): p. 84-103.
51. Selwyn FP, Cheng SL, Klaassen CD, Cui JY. Regulation of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Germ-Free Mice by Conventionalization and Probiotics. Drug Metab Dispos. 2016. 44(2): p. 262-74.
52. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. Mol Endocrinol. 2014. 28(8): p. 1221-38.
53. Russell WR, Duncan SH, Flint HJ. The gut microbial metabolome: modulation of cancer risk in obese individuals. Proc Nutr Soc. 2013. 72(1): p. 178-88.
54. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. J Appl Microbiol. 2012. 113(2): p. 411-7.
55. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013. 10(8): p. 473-86.
56. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. Expert Rev Mol Med. 2006. 8(20): p. 1-27.

57. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. Front Physiol. 2011. 2: p. 94.
58. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Behav Brain Res. 2015. 277: p. 32-48.
59. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. J Endocrinol. 2013. 218(3): p. R37-47.
60. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. J Physiol Pharmacol. 2008. 59 Suppl 2: p. 251-62.
61. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes. 2016. 7(3): p. 189-200.
62. Richards AL, Burns MB, Alazizi A, Barreiro LB, Pique-Regi R, Blekhman R, Luca F. Genetic and transcriptional analysis of human host response to healthy gut microbiota. mSystems. 2016. 1(4).
63. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. J AOAC Int. 2012. 95(1): p. 50-60.
64. Bolognini D, Tobin AB, Milligan G, Moss CE. The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids. Mol Pharmacol. 2016. 89(3): p. 388-98.
65. Riviere A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. Front Microbiol. 2016. 7: p. 979.
66. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. Environ Microbiol. 2016.
67. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. Aliment Pharmacol Ther. 2008. 27(2): p. 104-19.
68. Eeckhaut V, Ducatelle R, Sas B, Vermeire S, Van Immerseel F. Progress towards butyrate-producing pharmabiotics: Butyricicoccus pullicaecorum capsule and efficacy in TNBS models in comparison with therapeutics. Gut. 2014. 63(2): p. 367.
69. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, Gonzalez A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M,

Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. Cell Host Microbe. 2014. 15(3): p. 382-92.

70. Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. Dig Dis Sci. 2012. 57(11): p. 2955-64.
71. Wu N, Yang X, Zhang R, Li J, Xiao X, Hu Y, Chen Y, Yang F, Lu N, Wang Z, Luan C, Liu Y, Wang B, Xiang C, Wang Y, Zhao F, Gao GF, Wang S, Li L, Zhang H, Zhu B. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. Microb Ecol. 2013. 66(2): p. 462-70.
72. Geirnaert A, Steyaert A, Eeckhaut V, Debruyne B, Arends JB, Van Immerseel F, Boon N, Van de Wiele T. Butyricicoccus pullicaecorum, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions. Anaerobe. 2014. 30: p. 70-4.
73. Korecka A, Dona A, Lahiri S, Tett AJ, Al-Asmakh M, Braniste V, D'arienzo R, Abbaspour A, Reichardt N, Fujii-Kuriyama Y. Bidirectional communication between the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and the microbiome tunes host metabolism. NPJ Biofilms and Microbiomes. 2016. 2: p. 16014.
74. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cell Mol Life Sci. 2001. 58(5-6): p. 737-47.
75. Lennernas H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. J Pharm Pharmacol. 2005. 57(3): p. 273-85.
76. Scheline RR. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. Pharmacol Rev. 1973. 25(4): p. 451-523.
77. Davis SS. Formulation strategies for absorption windows. Drug Discov Today. 2005. 10(4): p. 249-57.
78. Wilson ID, Nicholson JK. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. Transl Res. 2016.
79. Peppercorn MA, Goldman P. The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. J Pharmacol Exp Ther. 1972. 181(3): p. 555-62.

80. Lindenbaum J, Rund DG, Butler VP, Jr., Tse-Eng D, Saha JR. Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. N Engl J Med. 1981. 305(14): p. 789-94.
81. Niehues M, Hensel A. In-vitro interaction of L-dopa with bacterial adhesins of Helicobacter pylori: an explanation for clinicial differences in bioavailability? J Pharm Pharmacol. 2009. 61(10): p. 1303-7.
82. Carmody RN, Turnbaugh PJ. Host-microbial interactions in the metabolism of therapeutic and diet-derived xenobiotics. J Clin Invest. 2014. 124(10): p. 4173-81.
83. Claus SP, Ellero SL, Berger B, Krause L, Bruttin A, Molina J, Paris A, Want EJ, de Waziers I, Cloarec O, Richards SE, Wang Y, Dumas ME, Ross A, Rezzi S, Kochhar S, Van Bladeren P, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. MBio. 2011. 2(2): p. e00271-10.
84. Toda T, Saito N, Ikarashi N, Ito K, Yamamoto M, Ishige A, Watanabe K, Sugiyama K. Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver. Xenobiotica. 2009. 39(4): p. 323-34.
85. Zheng X, Zhao A, Xie G, Chi Y, Zhao L, Li H, Wang C, Bao Y, Jia W, Luther M, Su M, Nicholson JK, Jia W. Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota. Sci Transl Med. 2013. 5(172): p. 172ra22.
86. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, Molina DA, Salcedo R, Back T, Cramer S, Dai RM, Kiu H, Cardone M, Naik S, Patri AK, Wang E, Marincola FM, Frank KM, Belkaid Y, Trinchieri G, Goldszmid RS. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. Science. 2013. 342(6161): p. 967-70.
87. Scheline RR. Drug metabolism by intestinal microorganisms. J Pharm Sci. 1968. 57(12): p. 2021-37.
88. Kang MJ, Kim HG, Kim JS, Oh do G, Um YJ, Seo CS, Han JW, Cho HJ, Kim GH, Jeong TC, Jeong HG. The effect of gut microbiota on drug metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013. 9(10): p. 1295-308.
89. Okuda H, Ogura K, Kato A, Takubo H, Watabe T. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. J Pharmacol Exp Ther. 1998. 287(2): p. 791-9.
90. Nakayama H, Kinouchi T, Kataoka K, Akimoto S, Matsuda Y, Ohnishi Y. Intestinal anaerobic bacteria hydrolyse sorivudine, producing the high blood

concentration of 5-(E)-(2-bromovinyl)uracil that increases the level and toxicity of 5-fluorouracil. Pharmacogenetics. 1997. 7(1): p. 35-43.

91. Ashida N, Ijichi K, Watanabe Y, Machida H. Metabolism of 5'-ether prodrugs of 1-beta-D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil in rats. Biochem Pharmacol. 1993. 46(12): p. 2201-7.
92. Lau GS, Critchley JA. The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. J Pharm Biomed Anal. 1994. 12(12): p. 1563-72.
93. Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. Br J Clin Pharmacol. 1980. 10 Suppl 2: p. 291S-298S.
94. Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO. Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. Xenobiotica. 2009. 39(1): p. 11-21.
95. Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(34): p. 14728-33.
96. Jourova L, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2016. 160(3): p. 317-26.
97. Fouts JR, Kamm JJ, Brodie BB. Enzymatic reduction of prontosil and other azo dyes. J Pharmacol Exp Ther. 1957. 120(3): p. 291-300.
98. Gingell R, Bridges JW, Williams RT. The Role of the Gut Flora in the Metabolism of Prontosil and Neoprontosil in the Rat. Xenobiotica. 1971. 1(2): p. 143-156.
99. Koch RL, Goldman P. The anaerobic metabolism of metronidazole forms N-(2-hydroxyethyl)-oxamic acid. J Pharmacol Exp Ther. 1979. 208(3): p. 406-10.
100. Koch RL, Chrystal EJ, Beaulieu BB, Jr., Goldman P. Acetamide--a metabolite of metronidazole formed by the intestinal flora. Biochem Pharmacol. 1979. 28(24): p. 3611-5.
101. Holt R. The bacterial degradation of chloramphenicol. Lancet. 1967. 1(7502): p. 1259-60.
102. Das KM, Eastwood MA, McManus JPA, Sircus W. The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis: I The relationship between

metabolites and the response to treatment in inpatients. Gut. 1973. 14(8): p. 631-636.

103. Peppercorn MA, Goldman P. Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. Gastroenterology. 1973. 64(2): p. 240-5.

104. Chan RP, Pope DJ, Gilbert AP, Sacra PJ, Baron JH, Lennard-Jones JE. Studies of two novel sulfasalazine analogs, ipsalazide and balsalazide. Dig Dis Sci. 1983. 28(7): p. 609-15.

105. Wadworth AN, Fitton A. Olsalazine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in inflammatory bowel disease. Drugs. 1991. 41(4): p. 647-64.

106. Strong HA, Renwick AG, George CF, Liu YF, Hill MJ. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria. Xenobiotica. 1987. 17(6): p. 685-96.

107. Jourova L AP, Matuskova Z, Nobilis M, Vecera R, Tlaskalova-Hogenova H, Kverka M, Kolar M, Anzenbacherova E. Imipenem, a carbapenem type antibiotic, does not alter pharmacokinetics of a model drug nabumetone. Toxicol Lett. 2015. 238: p. S332.

108. Delomenie C, Fouix S, Longuemaux S, Brahimi N, Bizet C, Picard B, Denamur E, Dupret JM. Identification and functional characterization of arylamine N-acetyltransferases in eubacteria: evidence for highly selective acetylation of 5-aminosalicylic acid. J Bacteriol. 2001. 183(11): p. 3417-27.

109. Dull BJ, Salata K, Goldman P. Role of the intestinal flora in the acetylation of sulfasalazine metabolites. Biochem Pharmacol. 1987. 36(21): p. 3772-4.

110. van Hogezand RA, Kennis HM, van Schaik A, Koopman JP, van Hees PA, van Tongeren JH. Bacterial acetylation of 5-aminosalicylic acid in faecal suspensions cultured under aerobic and anaerobic conditions. Eur J Clin Pharmacol. 1992. 43(2): p. 189-92.

111. Smith G, Griffiths L. Metabolism of N-acylated and O-alkylated drugs by the intestinal microflora during anaerobic incubation in vitro. Xenobiotica. 1974. 4(8): p. 477-487.

112. Magnusson JO, Bergdahl B, Bogentoft C, Jonsson UE. Metabolism of digoxin and absorption site. Br J Clin Pharmacol. 1982. 14(2): p. 284-5.

113. Meuldermans W, Hendrickx J, Mannens G, Lavrijsen K, Janssen C, Bracke J, Le Jeune L, Lauwers W, Heykants J. The metabolism and excretion of risperidone

after oral administration in rats and dogs. Drug Metab Dispos. 1994. 22(1): p. 129-38.

114. Goldin BR, Peppercorn MA, Goldman P. Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1973. 186(1): p. 160-6.

115. Kitamura S, Sugihara K, Kuwasako M, Tatsumi K. The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide. J Pharm Pharmacol. 1997. 49(3): p. 253-6.

116. Vermes A, Kuijper EJ, Guchelaar HJ, Dankert J. An in vitro study on the active conversion of flucytosine to fluorouracil by microorganisms in the human intestinal microflora. Chemotherapy. 2003. 49(1-2): p. 17-23.

117. Endo A, Yamashita H, Naoki H, Iwashita T, Mizukawa Y. Microbial phosphorylation of compactin (ML-236B) and related compounds. J Antibiot (Tokyo). 1985. 38(3): p. 328-32.

118. Serizawa N, Nakagawa K, Tsujita Y, Terahara A, Kuwano H. 3 alpha-Hydroxy-ML-236B (3 alpha-hydroxycompactin), microbial transformation product of ML-236B (compactin). J Antibiot (Tokyo). 1983. 36(5): p. 608-10.

119. Serizawa N, Nakagawa K, Tsujita Y, Terahara A, Kuwano H, Tanaka M. 6 alpha-Hydroxy-iso-ML-236B (6 alpha-hydroxy-iso-compactin) and ML-236A, microbial transformation products of ML-236B. J Antibiot (Tokyo). 1983. 36(7): p. 918-20.

120. Rafii F, Sutherland JB, Hansen EB, Jr., Cerniglia CE. Reduction of nitrazepam by Clostridium leptum, a nitroreductase-producing bacterium isolated from the human intestinal tract. Clin Infect Dis. 1997. 25 Suppl 2: p. S121-2.

121. Takeno S, Hirano Y, Kitamura A, Sakai T. Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice. Toxicol Applied Pharmacol. 1993. 121(2): p. 233-238.

122. Takeno S, Sakai T. Involvement of the intestinal microflora in nitrazepam-induced teratogenicity in rats and its relationship to nitroreduction. Teratology. 1991. 44(2): p. 209-214.

123. Elmer GW, Remmel RP. Role of the intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat. Xenobiotica. 1984. 14(11): p. 829-40.

124. Koch RL, Beaulieu BB, Jr., Goldman P. Role of the intestinal flora in the metabolism of misonidazole. Biochem Pharmacol. 1980. 29(24): p. 3281-4.

125. Watanabe K, Yamashita S, Furuno K, Kawasaki H, Gomita Y. Metabolism of omeprazole by gut flora in rats. J Pharm Sci. 1995. 84(4): p. 516-7.
126. Basit AW, Lacey LF. Colonic metabolism of ranitidine: implications for its delivery and absorption. Int J Pharm. 2001. 227(1-2): p. 157-65.
127. Basit AW, Newton JM, Lacey LF. Susceptibility of the H2-receptor antagonists cimetidine, famotidine and nizatidine, to metabolism by the gastrointestinal microflora. Int J Pharm. 2002. 237(1-2): p. 23-33.
128. Shu YZ, Kingston DG, Van Tassell RL, Wilkins TD. Metabolism of levamisole, an anti-colon cancer drug, by human intestinal bacteria. Xenobiotica. 1991. 21(6): p. 737-50.
129. Elkington SG, Floch MH, Conn HO. Lactulose in the Treatment of Chronic Portal-Systemic Encephalopathy. N Engl J Med. 1969. 281(8): p. 408-412.
130. Timbrell JA, *Principles of Biochemical Toxicology 4th ed.* 2009, Informa Healthcare USA, Inc.: New York, NY 10017.
131. Anzenbacher P, Zanger UM, *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. 2012, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim. p. 753.
132. Hampl F, Rádl S, Paleček J. Farmakochemie. 3 upr. rozšířené vydání. ed. 2015, Praha, Česká republika: Vysoké škola chemicko-technologická v Praze. 640.
133. Billat PA, Roger E, Faure S, Lagarce F. Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going? Drug Discov Today. 2017.
134. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2010. 154(2): p. 103-16.
135. Guengerich FP, Johnson WW. Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. Biochemistry. 1997. 36(48): p. 14741-50.
136. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther. 2013. 138(1): p. 103-41.
137. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. Clin Pharmacokinet. 2006. 45(1): p. 13-31.
138. Fanni D, Fanos V, Ambu R, Lai F, Gerosa C, Pampaloni P, Van Eyken P, Senes G, Castagnola M, Faa G. Overlapping between CYP3A4 and CYP3A7 expression in

the fetal human liver during development. J Matern Fetal Neonatal Med. 2014: p. 1-5.

139. Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Int J Clin Pharmacol Ther. 1999. 37(11): p. 529-47.

140. Lamba V, Panetta JC, Strom S, Schuetz EG. Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression. J Pharmacol Exp Ther. 2010. 332(3): p. 1088-99.

141. Yang X, Zhang B, Molony C, Chudin E, Hao K, Zhu J, Gaedigk A, Suver C, Zhong H, Leeder JS, Guengerich FP, Strom SC, Schuetz E, Rushmore TH, Ulrich RG, Slatter JG, Schadt EE, Kasarskis A, Lum PY. Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. Genome Res. 2010. 20(8): p. 1020-36.

142. Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. Clin Pharmacokinet. 2005. 44(1): p. 33-60.

143. Zidek Z, Anzenbacher P, Kmonickova E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. Br J Pharmacol. 2009. 157(3): p. 342-61.

144. Martin R, Bermudez-Humaran LG, Langella P. Gnotobiotic Rodents: An In Vivo Model for the Study of Microbe-Microbe Interactions. Front Microbiol. 2016. 7: p. 409.

145. Nobilis M, Mikusek J, Szotakova B, Jirasko R, Holcapek M, Chamseddin C, Jira T, Kucera R, Kunes J, Pour M. Analytical power of LLE-HPLC-PDA-MS/MS in drug metabolism studies: identification of new nabumetone metabolites. J Pharm Biomed Anal. 2013. 80: p. 164-72.

146. Pichard-Garcia L, Gerbal-Chaloin S, Ferrini JB, Fabre JM, Maurel P. Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. Methods Enzymol. 2002. 357: p. 311-21.

147. Isom HC, Secott T, Georgoff I, Woodworth C, Mummaw J. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. Proc Natl Acad Sci. 1985. 82(10): p. 3252-3256.

148. Lake BG. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. in Biochemical Toxicology, A Practical Approach B.M. K. Snell. Editor. 1987, IRL Press Oxford. p. 183-215.

149. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985. 150(1): p. 76-85.
150. Schenkman JB, Jansson I. Spectral analyses of cytochromes P450. Methods Mol Biol. 1998. 107: p. 25-33.
151. Nobilis M, Kopecký J, Květina J, Svoboda Z, Pour M, Kuneš J, Holčapek M, Kolářová L. Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet, fluorescence and mass spectrometric detection. J Pharm Biomed Anal. 2003. 32(4–5): p. 641-656.
152. Hudcovic T, Stepankova R, Kozakova H, Hrncir T, Tlaskalova-Hogenova H. Effects of monocolonization with Escherichia coli strains O6K13 and Nissle 1917 on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. Folia Microbiol (Praha). 2007. 52(6): p. 618-26.
153. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001. 25(4): p. 402-8.
154. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450IIIA4. Mol Pharmacol. 1989. 36(1): p. 89-96.
155. Soucek P. Novel sensitive high-performance liquid chromatographic method for assay of coumarin 7-hydroxylation. Journal of Chromatography B. 1999. 734(1): p. 23-29.
156. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, McManus ME, Tukey RH, Quattrochi LC, Gelboin HV, Miners JO. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. J Pharmacol Exp Ther. 1993. 265(1): p. 401-7.
157. Waxman DJ, Chang TK. Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. Methods Mol Biol. 2006. 320: p. 91-6.
158. Crespi CL, Chang TK, Waxman DJ. CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Methods Mol Biol. 2006. 320: p. 121-5.

159. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. J Biol Chem. 1986. 261(11): p. 5051-60.
160. Matouskova P, Bartikova H, Bousova I, Hanusova V, Szotakova B, Skalova L. Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. PLoS One. 2014. 9(1): p. e86033.
161. Nobilis M, Holcapek M, Kolarova L, Kopecky J, Kunes M, Svoboda Z, Kvetina J. Identification and determination of phase II nabumetone metabolites by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. J Chromatogr A. 2004. 1031(1-2): p. 229-36.
162. Hedner T, Samulesson O, Wahrborg P, Wadenvik H, Ung KA, Ekbom A. Nabumetone: therapeutic use and safety profile in the management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Drugs. 2004. 64(20): p. 2315-43; discussion 2344-5.
163. Manichanh C, Reeder J, Gibert P, Varela E, Llopis M, Antolin M, Guigo R, Knight R, Guarner F. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. Genome Res. 2010. 20(10): p. 1411-9.
164. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Treserra F, Crespo E, Antolin M, Malagelada J. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. Gut. 1994. 35(8): p. 1090-1097.
165. Saad R, Rizkallah MR, Aziz RK. Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. Gut Pathog. 2012. 4(1): p. 16.
166. Matuskova Z, Anzenbacher P, Vecera R, Siller M, Tlaskalova-Hogenova H, Strojil J, Anzenbacherova E. Effect of Lactobacillus casei on the Pharmacokinetics of Amiodarone in Male Wistar Rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2016.
167. Kim DH. Gut Microbiota-Mediated Drug-Antibiotic Interactions. Drug Metab Dispos. 2015.
168. Anzenbacher P, Matušková Z., Hudcovic T., Tlaskalová-Hogenová H., Anzenbacherová E. Microbiota and drug metabolism Sborník abstraktů, 65. Česko-Slovenské Farmakologické dny, 16-18. září, Praha, Česká Republika. 2015.
169. Selwyn FP, Cui JY, Klaassen CD. RNA-Seq Quantification of Hepatic Drug Processing Genes in Germ-Free Mice. Drug Metab Dispos. 2015. 43(10): p. 1572-80.