

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv rostlinných alkaloidů na střevní mikrobiom

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martina Lorková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv rostlinných alkaloidů na střevní mikrobiom" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za přátelský přístup během konzultací, trpělivost a za hodnotné odborné rady, které mi dopomohly k sepsání této práce. Také bych ráda poděkovala mé rodině a příteli za podporu při studiu.

Vliv rostlinných alkaloidů na střevní mikrobiom

Souhrn

Alkaloidy amarylkovitých rostlin jsou sloučeniny, které patří do velké skupiny izochinolinových alkaloidů. V posledních letech se cení především jejich antiproliferační aktivity a selektivity vůči nádorově změněným buněčným liniím. Někteří zástupci této skupiny, včetně lykorinu a haemanthaminu, vykazují cytotoxické účinky na buněčné linie kolorektálního karcinomu. Málo se ví však o tom, jak tyto alkaloidy působí na střevní mikrobiom a jak ho ovlivňují během léčby využívající cytostatika.

V této práci jsme testovali *in vitro* adhezenci dvou bakteriálních druhů. Jednalo se o *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus plantarum*. V obou případech jsme zjišťovali, jaká bude jejich adherence na buňky kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 společně s vybranými alkaloidy. Tato buněčná směs je kultivována minimálně 14 dní při 37 °C a 5 % CO₂. Při vlastním testu k nim byly přidány lykorin a haemanthamin v koncentracích 2; 1; a 0,5 μM/ml a vinorelbin v 0,5 a 0,05 μM/ml. K buněčnému modelu byly po 14 dnech přidány alkaloidy s vybraným druhem laktobacilů na dobu 2 hodin. Po této inkubaci byly buňky sklizeny pomocí 1% TRITONU a následně rozpuštěny ve fosfátovém pufru. Takto připravená suspenze je pipetována na Petriho misku a přelita ROGOSA agarem. Petriho misky se nechaly inkubovat 72 hodin s následným spočítáním kolonií.

Výsledky naznačují, že alkaloidy adhezenci převážně snižovaly. Pouze v ojedinělých případech došlo k jejímu navýšení, a to v případě haemanthaminu při působení na *L. gasseri* v koncentraci 0,5 μM/ml a při působení na *L. plantarum* v 2; 1 μM/ml. U vinorelbinu to bylo pouze na *L. gasseri* a v koncentraci 0,5 μM/ml. Lykorin adhezi pouze snižoval. Co se týče rozdílů mezi jednotlivými druhy laktobacilů, adherence *L. gasseri* byla více ovlivňována lykorinem a haemanthaminem než adherence *L. plantarum*. Po statistickém zhodnocení se ukázalo, že rozdíl v adhezencích byl statisticky nevýznamný ($p < 0,05$).

Z výsledků je patrné, že testované alkaloidy mají jen minimální účinek na adhezenci laktobacilů. To je pravděpodobně zapříčiněno cytostatickým účinkem na buněčné linie. Nicméně, bylo by vhodné, aby se interakce mezi cytostatiky a probiotiky v budoucnu zcela objasnila.

Klíčová slova: Alkaloidy, adheze, lykorin, probiotika, *Amaryllidaceae*

Effect of plant alkaloids on intestinal microbiome

Summary

Alkaloids of amaryllis plants are compounds belonging to a large group of isoquinoline alkaloids. In recent years, they have been particularly appreciated for their antiproliferative activity and selectivity for tumour-modified cell lines. Some representatives of this group, including lycorine and haemantamine, exhibit cytotoxic effects on colorectal cancer cell lines. However, little is known about how these alkaloids act on the intestinal microbes and how they affect it during treatment using cytostatics.

This work included *in vitro* adherence tests of two bacterial species. These were *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus plantarum*. In both cases, we investigated their adherence to Caco-2 and HT29 colorectal carcinoma cells. This cell mixture is cultured for at least 14 days at 37 °C and 5 % CO₂. In their own test, lycorine and haemantamine were added thereto at concentrations of 2; 1; and 0.5 µM/ml and vinorelbine at 0.5 and 0.05 µM/ml. After 14 days, the alkaloids with the selected lactobacilli strain were added to the cell model for 2 hours. After this incubation, cells were harvested with 1% TRITON and subsequently dissolved in phosphate buffer. The suspension thus prepared is pipetted into a Petri dish and passed through ROGOSA agar. Petri dishes we are allowed to incubate for 72 hours followed by counting colonies.

The results indicate that alkaloids mostly reduced adherence. Only in rare cases did it increase, in the case of haemantamine when it acted on *L. Gasseri* at a concentration of 0.5 µM/ml and on *L. plantarum* at a concentration of 2.1 µM/ml. For vinorelbine, this only happened for *L. Gasseri* at a concentration of 0.5 µM/ml. Lycorine only reduced adhesion. Regarding the differences between the different lactobacilli, the adherence of *L. Gasseri* was more influenced by lycorine and haemantamine than it was found in *L. plantarum* adherence. After statistical evaluation, the difference in adherence was found to be statistically insignificant ($p < 0.05$).

From the results, it is clear, that the tested alkaloids have only minimal effect on lactobacilli adherence. This is probably due to the cytostatic effect on cell lines. Nevertheless, in the future would be merited to clarify this interaction between cytostatics and probiotics.

Keywords: Alkaloids, adhesion, lycorine, probiotics, *Amaryllidaceae*

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce a hypotéza.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Mikrobiom	10
3.1.1 Charakteristika mikrobiomu	10
3.1.2 Složení intestinálního mikrobiomu.....	10
3.1.2.1 Actinobacteria	10
3.1.2.2 Bacteroidetes.....	11
3.1.2.3 Firmicutes.....	11
3.1.3 Změny GIT mikrobiomu během života	12
3.1.4 Vnější vlivy na GIT mikrobiom.....	13
3.1.5 Funkce intestinálního mikrobiomu	14
3.1.5.1 Specifické funkce probiotik	15
3.2 Kolorektální karcinom a vliv probiotik	17
3.2.1 Charakteristika kolorektálního karcinomu.....	17
3.2.1.1 Rizikové a preventivní faktory.....	18
3.2.1.2 Formy kolorektálního karcinomu.....	19
3.2.1.3 Etiologie kolorektálního karcinomu.....	20
3.2.1.4 Terapie.....	21
3.2.2 Probiotika a nádorová onemocnění.....	21
3.2.2.1 Probiotika a radiační terapie.....	22
3.2.2.2 Role probiotik během chemoterapie	23
3.2.3 Působení mikrobiomu na chemoterapeutika.....	24
3.3 Alkaloidy	25
3.3.1 Charakteristika	25
3.3.2 Amarylkovité alkaloidy (<i>Amaryllidaceae</i>)	26
3.3.2.1 Alkaloidy a buněčný cyklus	27
3.3.3 Působení alkaloidů na střevní mikrobiom	30
4 Materiál a metodika.....	31
4.1 Materiál.....	31
4.2 Metodika	31
4.2.1 Příprava bakteriální suspenze	31
4.2.2 Kultivace buněčných linií	32
4.2.3 Založení 24-jamkové destičky	32
4.2.4 Test adherence	32
4.2.5 Statistické vyhodnocení	33

5	Výsledky.....	34
6	Diskuze.....	36
7	Závěr	40
8	Seznam použité literatury	41

1 Úvod

V dnešní době je nádorové onemocnění jednou z hlavních příčin úmrtí a počet nových případů, stejně jako počet lidí s ním žijících, se neustále zvyšuje. Světová zdravotnická organizace (WHO) poukazuje na to, že bez dalších terapeutických pokroků se počet úmrtí zapříčiněných nádorovým onemocněním zvýší do roku 2030 o 80 %. Také z tohoto důvodu dochází v posledních letech k nárůstu studií zaměřujících se právě na možné terapeutické uplatnění biologicky aktivních látek rostlinného původu. Některé rostlinné látky jsou již proti nádorovým onemocněním využívány a mnohé jsou testovány v klinických studiích. Nicméně, stále existuje velké množství nedostatečně prozkoumaných látek a jejich interakcí.

Alkaloidy jsou organické látky zásadité povahy. Mají cyklickou strukturu a obsahují dusík v negativním oxidačním stavu. Jsou to produkty bakterií, hub, rostlin a živočichů. Nejčastěji je však najdeme v rostlinách, kde plní roli sekundárních metabolitů. Jedná se převážně o toxické látky, které vykazují farmakologické účinky. Těch bylo využíváno již v starověku a mají široké uplatnění v tradiční medicíně. V roce 2017 bylo známo okolo 5 500 různých alkaloidů. Terapeuticky se využívá jejich protinádorové, protizánětlivé, antivirové a antimalarické aktivity. Vzhledem k jejich počtu a možným účinkům je velmi nadějně, že právě některé látky z této skupiny budou splňovat vše potřebné pro boj proti nádorovým onemocněním.

Ovšem obrovský význam má pro lidský organismus také mikrobiom a zejména jeho část v distálním úseku gastrointestinálního traktu. V posledních letech se ukazuje, že množství a složení mikrobů hraje významnou roli ve zdraví člověka a při vývoji nových léčiv by se na to nemělo zapomínat. Kromě negativního vlivu cytostatik na mikrobiom, je si třeba také uvědomit, že i bakterie mohou působit na léčivo negativně a jeho účinnost snižovat. Bohužel interakce mezi alkaloidy, jakožto cytostatiky a střevním mikrobiomem nejsou dosud dostatečně prozkoumány a v případě negativního působení látek vůči mikrobům může nastat celá řada nežádoucích účinků. Zvláštní pozornost by proto měla být věnována především vlivu alkaloidů na adhezenci bakterií ke střevní sliznici.

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce bylo zjistit jaký vliv mají alkaloidy s antiproliferační aktivitou na střevní mikrobiom. A zda případně jsou některé druhy probiotik výrazně vhodnější pro pacienty s kolorektálním karcinomem při chemoterapii.

Hypotézou je, že rostlinné alkaloidy využívané při léčbě nádorových onemocnění mohou mít pozitivní vliv na střevní mikrobiom.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiom

3.1.1 Charakteristika mikrobiomu

Lidské tělo je hostitelem pro relativně nezávislý mikrobiom zahrnující pět hlavních regionálních systémů. A to ekosystém dýchacích cest, dutiny ústní, střeva, kůže a urogenitálního systému. Mikrobiom zahrnuje bakterie, archea, eukaryota, houby a viry (Greenhalgh et al. 2016; Cani 2018). Počet mikroorganismů je asi 10^{14} , což je více než počet somatických buněk (Maukonen & Saarela 2015; Cani 2018). Největším rezervoárem mikrobů v lidském těle je distální část gastrointestinálního traktu (GIT). Rajilić-Stojanović & de Vos (2014) uvádí, že bylo identifikováno přes 1000 druhů mikroorganismů. Konkrétně 92 druhů eukaryot, 8 archeí a 957 druhů bakterií. Jiný zdroj udává, že počet známých druhů bakterií ve střevě již přesáhl 1 000 jednotek (Ramakrishna 2013).

3.1.2 Složení intestinálního mikrobiomu

Lidský GIT mikrobiom ovládají čtyři hlavní bakteriální kmény, jedná se o Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria a Proteobacteria (Mondot et al. 2013; Ramakrishna 2013). Proteobacteria však oproti ostatním tvoří pouze malé procento (Mondot et al. 2013). Do tohoto kmene patří například čeleď Enterobacteriaceae s typickým rodem *Escherichia* (Jang et al. 2017).

3.1.2.1 Actinobacteria

Tento kmen tvoří řády Bifidobacteriales (např. *Bifidobacterium* spp.), Coriobacteriales (např. *Collinsella* spp.) a málo zastoupená třída Actinobacteria (např. *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.) (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

Bifidobakterie jsou přítomné již u kojenců, a to hlavně díky přítomnosti v mateřském mléce. Díky jejich příznivým účinkům na lidské zdraví, jsou někteří zástupci tohoto rodu komerčně dostupní jako probiotika (Ramakrishna 2013; Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Tyto bakterie působí příznivě proti nedostatku vitamínu K, atopickému ekzému, syndromu dráždivého střeva nebo autismu (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

Propionibacterium spp. se rovněž používají jako probiotika, a to z toho důvodu, že dokáží produkovat vitamín B₁₂ a vyrábět propionát z laktátu. Tento rod je také přítomen již krátce po narození v intestinálním traktu novorozence (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). *In vitro*

pokusy ukázaly, že metabolické produkty dvou zástupců dokáží indukovat apoptózu buněk kolorektálního karcinomu (Jan et al. 2002).

3.1.2.2 Bacteroidetes

Většina těchto gastrointestinálních zástupců patří do následujících čeledí: Bacteroidaceae (např. *Bacteroides* spp.), Prevotellaceae (např. *Prevotella* spp.), Rikenellaceae a Porphyromonadaceae (např. *Porphyromonas* spp.). Bakterie těchto čeledí produkují jantarovou kyselinu, octovou kyselinu a v některých případech propionovou kyselinu. Jedná se o nejstabilnější složku GIT mikrobiomu u zdravého dospělého člověka (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Jejich snížené množství ve střevě má souvislost s obezitou nebo syndromem dráždivého střeva. Také se zdá, že je tato skupina přítomna ve větším množství u pacientů trpících diabetem typu 1 a 2 (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

Ačkoliv *Bacteroides* spp. jsou stále považovány za příležitostné patogeny, mají i svou světlou stránku. Dokáží metabolizovat sacharidy a proteiny na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, a tím přináší několik zdravotních přínosů (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014; Greenhalgh et al. 2016). Mezi jejich další důležité funkce patří dekonjugace žlučových kyselin, schopnost růst na hleny nebo využít močovinu jako zdroj dusíku. Stejně jako *Bifidobacterium* spp. využívají k růstu oligosacharidy z mateřského mléka (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

3.1.2.3 Firmicutes

Tato skupina je nejrozmanitější a nejbohatší, někdy tvoří až 80 % intestinálního mikrobiomu u zdravých jedinců (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Firmicutes můžeme rozdělit do tříd: Bacilli (např. *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Leuconostoc* spp.), Clostridia (např. *Clostridium difficile*, *Veillonella* spp.) a Mollicutes (např. *Mycoplasma* spp.). Většina, a zejména *Clostridium* spp. a *Bacillus* spp. dokáží tvořit spóry, díky této vlastnosti jsou schopné přežít v gastrointestinálním traktu i mimo něj (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Firmicutes jsou primárně spojeny se získáváním energie z potravy a souvisí s přírůstkem tělesné hmotnosti (Mondot et al. 2013; Greenhalgh et al. 2016).

Nejznámějším zástupcem třídy Bacilli jsou laktobacily. Ty jsou známe především díky jejich probiotickým vlastnostem. Ovšem oproti jiným intestinálním rodům (např. *Streptococcus* nebo *Veillonella*) jsou laktobacily zastoupeny v GIT pouze v malém množství, z tohoto důvodu

by měly být součástí stravy. *Enterococcus* spp. jsou obecně uznávány jako oportunní patogeny, ačkoliv jsou tyto druhy běžné a mohou dokonce vykazovat probiotické vlastnosti (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014). Nicméně, zvýšené hladiny *Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp. byly přítomné u pacientů s kolorektálním karcinomem (Wang et al. 2012).

3.1.3 Změny GIT mikrobiomu během života

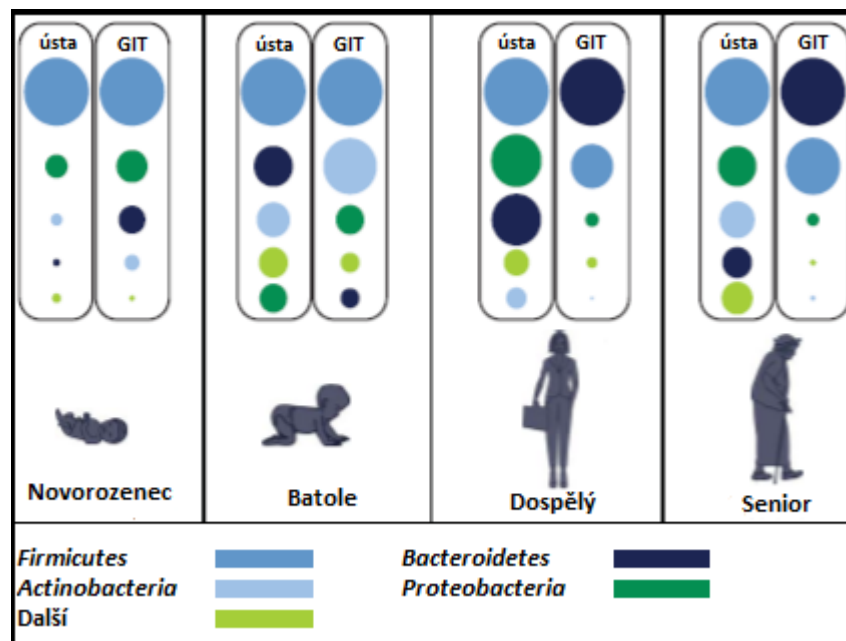
Kolonizace GIT mikroorganismy jedince může začít již v děloze matky během těhotenství (Vitetta et al. 2014). Prokázalo se, že se mikroorganismy vyskytují na placentě, plodové membráně i v pupečnickové krvi, a to u zcela zdravých matek (Aagaard et al. 2014; Greenhalgh et al. 2016) Významný je, z hlediska mikrobiálních změn, také porod. Je známo, že děti porozené přirozenou cestou vykazují vyšší výskyt *Lactobacillus* spp. a *Prevotella* spp., zatímco děti rozené císařským řezem mají zvýšené podíly *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. a *Propionibacterium* spp. (Mondot et al. 2013). Po narození se mikrobiom rozvine a přizpůsobí novým podmínkám, kdy dochází ke změnám ve variabilitě, struktuře i funkčních vlastnostech (Thompson et al. 2015). Mezi první kolonizátory patří bakterie *Escherichia coli* nebo jiné z čeledi Enterobacteriaceae. Po vzniku anaerobního prostředí začne kolonizace striktně anaerobními bakteriemi, jako jsou *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. (Mondot et al. 2013).

V dětství ve střevním mikrobiomu převažují opět zástupci kmenů Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes. Mimo jiné i rody (z třídy Clostridia) *Roseburia* spp., *Faecalibacterium* spp., *Ruminococcus* spp. (Hollister et al. 2015). Ty produkují butyrát, který je spojován se zdravým GIT mikrobiomem. Důležitá je také produkce vitamínu B₁₂, který podporuje trvalý vývoj (Greenhalgh et al. 2016). V pubertě se pak, na rozdíl od dospělého mikrobiomu, vyskytují ve větší míře *Clostridium* spp. a *Bifidobacterium* spp. (Hopkins et al. 2001).

V dospělosti se lidský mikrobiom ustálí a nedochází k významnějším změnám. To však platí pouze v případě, kdy není přítomna infekce, antibiotická terapie nebo drastická dietní intervence (David et al. 2014). Největší zastoupení mají kmeny Firmicutes a Bacteroidetes, a rovněž mají největší vliv na funkci ekosystému GIT (Thomas et al. 2011).

Ve stáří se mikrobiom opět mění a předpokládá se, že celkové zdraví starších osob je úzce spojeno s jeho složením. Ve stáří jsou hladiny kmene Firmicutes o něco vyšší než v dospělosti. Avšak převahu má opět kmen Bacteroidetes viz obrázek 1. Také dochází ke snížení ochranných účinků komenzálních bakterií rodů *Bifidobacterium* nebo *Bacteroides* (Merchant et al. 2016).

Naopak se zvyšují počty bakterií čeledi Enterobacteriaceae nebo rodu *Streptococcus* a kvasinek (Merchant et al. 2016). Tyto změny souvisí s celkovým poklesem kvality života. Mohou být způsobeny zvýšeným užíváním léků, nedostatkem stravy nebo změnou hormonální hladiny (Greenhalgh et al. 2016).



Obrázek 1: Fyziologické změny mikrobiomu během života v ústech a GIT (Greenhalgh et al. 2016)

3.1.4 Vnější vlivy na GIT mikrobiom

Složení mikrobiomu se mění s věkem, geografickou oblastí, ve které žijeme, genetickou výbavou jedince, stravou, pohlavím, použitím antibiotik a dalšími (Greenhalgh et al. 2016). Vše je více či méně propojeno, lidé bydlící ve městech oproti těm na vesnicích často mívají, kromě jiných environmentálních vlivů, odlišné například stravovací návyky. Co se týče genetiky, zjistilo se, že některé rody bakterií mohou mít dědičnou dispozici. Goodrich a kolegové (2014) provedli studii která zkoumala, jaké mikrobiální rody jsou hostitelskou genetikou ovlivněny. Nejvíce se dědil *Christensenella* spp., který byl v korelaci s nízkým indexem hmotnosti u lidí. Tuto skupinu také zajímalo, zda hladiny tohoto rodu nesouvisí spíše se stravovacími návyky, to se však nepotvrdilo.

Stravování má rovněž podíl na složení bakterií v intestinálním mikrobiomu, vliv byl prokázán například u rodu *Bacteroides* spp.. Ukázalo se, že tento rod je velmi citlivý na stravovací návyky (David et al. 2014; Maukonen & Saarela 2015). Změny jsou výrazné zvláště u západní stravy, kde převládají technologicky zpracované potraviny s vysokým

obsahem jednoduchých sacharidů, živočišných bílkovin a tuků. Hladina těchto bakterií pak klesá (Greenhalgh et al. 2016). Bohužel, přítomnost vlákniny v jídelníčku je v této oblasti nedostatečná. Bakterie fermentují vlákninu na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, proto by měla být zařazována do stravy denně. Její přínos spočívá v poskytování energie pro mikrobiom, čímž se podílí na modulaci imunitního systému a udržování epiteliární bariéry (Greenhalgh et al. 2016). Také se zjistilo, že mikrobiom u osob s nadváhou, případně obezitou produkuje méněcenné metabolity a tím znesnadňuje boj proti nádorovému onemocnění. Mikrobiom u osob s normální hmotností byl schopen spustit apoptózu prostřednictvím katalázy a lipidové peroxidace (Hernández-Arriaga et al. 2017).

V posledních letech se často diskutuje o vlivu antibiotik na střevní mikrobiom a naopak. Potvrdilo se, že podávání antibiotik přímo narušuje ekosystém gastrointestinálního traktu a následná nerovnováha vede k poklesu rozmanitosti. Tím, že se selektivně zmenšuje specifická bakteriální populace, může dojít k prudkému růstu jiného druhu, který bývá za normálních okolností podřízen (Mondot et al. 2013). Složení mikrobiomu se dokáže obnovit, a to přibližně po měsíci od konce užívání antibiotik. U některých druhů však dochází k trvalé ztrátě (Olle 2013). A ačkoliv změny po expozici antibiotik nemusí být hned patrné, dochází k dlouhodobým změnám v genové expresi, a to zapříčiní vznik chronických onemocnění (Nobel et al. 2015). Pokud léčba antibiotiky přetrvává, dochází k závažnějšímu narušení rovnováhy mezi mikroorganismy GIT a člověk je ohrožen infekcí způsobenou bakterií *Clostridium difficile*, která má sklon k recidivám (Martin et al. 2018). Infekce je nebezpečná především ve stáří. Antibiotika mohou mít také široký dopad již v útlém věku. Dieta a léky (hlavně antibiotika), kterým je novorozenec vystaven, v kombinaci s mikroby GIT v raném životě, mohou být klíčové pro aberantní molekulární signály, které vytváří predispozici k chronickým zánětlivým onemocněním v dospělosti (Vitetta et al. 2014). K obnovení přirozeného mikrobiomu se prokázala být účinná transplantace fekální mikroflóry (Dutta et al. 2014; Martin et al. 2018). Nebo podávání probiotik, prebiotik nebo symbiotik.

3.1.5 Funkce intestinálního mikrobiomu

Primární aktivita mikrobiomu spočívá ve fermentaci sacharidů například na laktát, acetrát, propionát, butyrát, H₂ a CO₂. Energie získaná z těchto produktů pokrývá asi 10 % potřebné lidské denní energie (Mondot et al. 2013; Ramakrishna 2013; Maukonen & Saarela 2015). Kromě tvorby energie, jsou metabolity důležité z hlediska regulace pH, osmózy nebo motility střeva (Mondot et al. 2013). Bakterie produkují také enzymy nutné pro trávení, k tvorbě vitaminů (např. biotin – vitamin B₇, vitamin K) nebo dalších klíčových sloučenin

(např. gamma-aminomáselná kyselina) (Ramakrishna 2013; Rajilić-Stojanović & de Vos 2014; Martin et al. 2018).

Samotnou svou přítomností jsou bakterie užitečné, a to z důvodu tvorby bariéry před kolonizací exogenními nebo oportunistickými patogeny (Mondot et al. 2013; Takiishi et al. 2017). Podstatný vliv mají také na imunitní systém hostitele (Martin et al. 2018). Střevní bakterie jsou předpokladem pro produkci imunoglobulinu A ve střevní sliznici. Důležitá je i funkce modulovat expresi hostitelských genů, ty mohou regulovat některé fyziologické funkce člověka (Maukonen & Saarela 2015). Vitetta a kolegové (2014) uvádí, že produkty metabolismu bakterií ve střevě působí jako signalizační molekuly, které ovlivňují hostitelské funkce metabolické odpovědi. Z těchto důvodů je mikrobiální složení GIT zkoumáno daleko více než mikrobiální systémy na jiném místě v těle.

Specifickou skupinou bakterií jsou probiotika. Jejich přínos není zatím jednoznačný, ale mnozí se domnívají, že poskytují jak profylaktický účinek, tak i terapeutický.

3.1.5.1 Specifické funkce probiotik

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství mají pro hostitele zdravotní přínos (Boyle et al. 2006; Maukonen & Saarela 2015). První myšlenka, že živé mikroorganismy mohou zlepšit zdraví anebo předcházet nemocem, se zrodila na počátku dvacátého století. Předpokládalo se, že podávání bakterií jejichž produktem je laktát, může zmírnit růst a hladinu patogenních bakterií v GIT (Mego et al. 2013; Rushdy & Gomaa 2013; Vitetta & Hall et al. 2014). Prebiotikum je neživá složka potravy, která poskytuje hostiteli zdravotní přínos. Ten je spojený s modulací střevního mikrobiomu (Fotiadis et al. 2008). Jako prebiotika se například používají oligosacharidy z vlákniny. Kombinované použití prebiotik a probiotik se označuje jako synbiotika. To ale platí, pouze pokud je přínos pro zdraví synergický (Rushdy & Gomaa 2013). Probiotika a synbiotika bývají nejčastěji konzumovány v rozmanitých formách, jako je jogurt, mléko, sýry a jiné mléčné výrobky.

Probiotické bakterie jsou neinvazivní, a i přes silné přilnutí k intestinálnímu epitelu by neměly být patogenní (Boyle et al. 2006; Mego et al. 2013). Obvykle kolonizují lidské střevo pouze přechodně a nevytvářejí toxiny nebo metabolity nebezpečné pro lidské zdraví (Boyle et al. 2006; Mego et al. 2013). Zároveň musí být odolné vůči žaludeční kyselině a žlučovým solím.

Většina z aktuálně používaných probiotik patří do rodů: *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp.. V probiotických přípravcích se však také používají rody: *Enterococcus*

spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp. a *Saccharomyces* spp. (Boyle et al. 2006; Maukonen & Saarela 2015).

Obecně se dá říct, že probiotika mění metabolickou aktivitu střevního mikrobiomu, mění fyzikálně-chemické podmínky v tlustém střevě, mohou vázat potenciální karcinogeny, produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem a protinádorové nebo anti-mutagenní sloučeniny (Fotiadis et al. 2008). Kyseliny s krátkým řetězcem mohou být využity při restituci kolonocytů (Mego et al. 2013). V případě butyrátu byla prokázána inhibice proliferace rakovinných buněk a podpora apoptózy *in vitro*. Příznivé účinky byly pozorovány i u propionátu a acetátu bakterie *Propionibacterium acidipropionici* (Fotiadis et al. 2008).

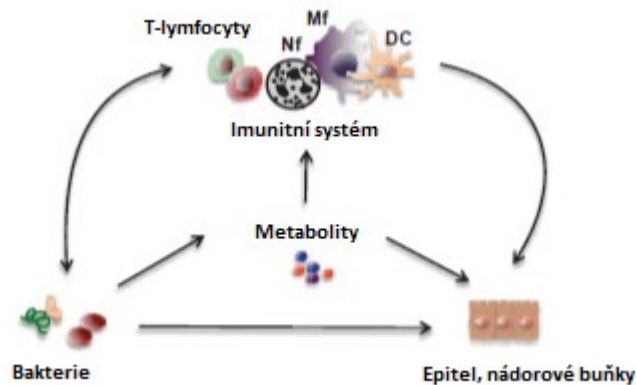
Mimo jiné, produkují bakteriociny, peroxid vodíku a biosurfaktanty, ty napomáhají jejich přežití a mohou konkurenčně inhibovat adherenci více patogenních bakterií vůči střevnímu epitelu (Boyle et al. 2006). Také mnoho probiotických druhů *in vitro* indukuje produkci mucinu buňkami intestinálního epitelu a některé také indukují tvorbu defensinu - 2 (Boyle et al. 2006). Defensin - 2 je antibiotický peptid, který je lokálně regulován zánětem. Je produkován neutrofily (Schroder & Harder 1999).

Imunologický přínos probiotik spočívá v regulaci buněčných signalizačních cest a v regulaci produkce cytokinů (Vitetta & Hall et al. 2014). Zjistilo se, že klíčová je signalizace pomocí Toll like receptorů (TLR), kterou zajišťuje komenzální mikrobiom a je esenciální pro homeostázu střevního epitelu a ochranu před poškozením epitelu. Po rozpoznání molekulárních vzorců komenzálních mikroorganismů, začnou TLR stimulovat produkci epiteliárních ochranných faktorů. To je pravděpodobně důležitý mechanismus, kterým probiotika působí. TLR jsou aktivovány například pomocí lipopolysacharidů, flagellinu nebo lipoteichoové kyseliny. TLR začnou ovlivňovat produkci cytokinů pomocí intracelulárních signalizačních cest. Ty aktivují transkripční faktory, které zapříčiní tvorbu protizánětlivých látek (Boyle et al. 2006).

Ukázalo se, že určité druhy vykazují specifické imunologické účinky. Konkrétně *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) zvyšuje mitogenstimulaci a cirkulační koncentrace protizánětlivého cytokinu interleukinu 10 (IL-10) při podávání dětem (Boyle et al. 2006).

Příznivý účinek probiotik se potvrdil při patologických stavech jako je zácpa, průjem, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, syndrom dráždivého tračníku, virová gastroenteritida nebo nekrotizující enterokolitida (Rushdy & Goma 2013; Vitetta et al. 2014) Také pomáhají při atopickém ekzému, zmírňují příznaky laktóзовé intolerance a snižují sérový cholesterol

(Fotiadis et al. 2008). Pozornost je jim věnována i v onkologii, a to převážně díky probiotickým účinkům v oblasti prevence kolorektálního karcinomu. Důvodem je použití probiotik jako adjuvantní terapie pro protinádorovou léčbu. Způsoby, jimiž mohou bakterie ovlivňovat vývoj karcinomu je několik, zjednodušený pohled na tuto problematiku přináší obrázek 2.

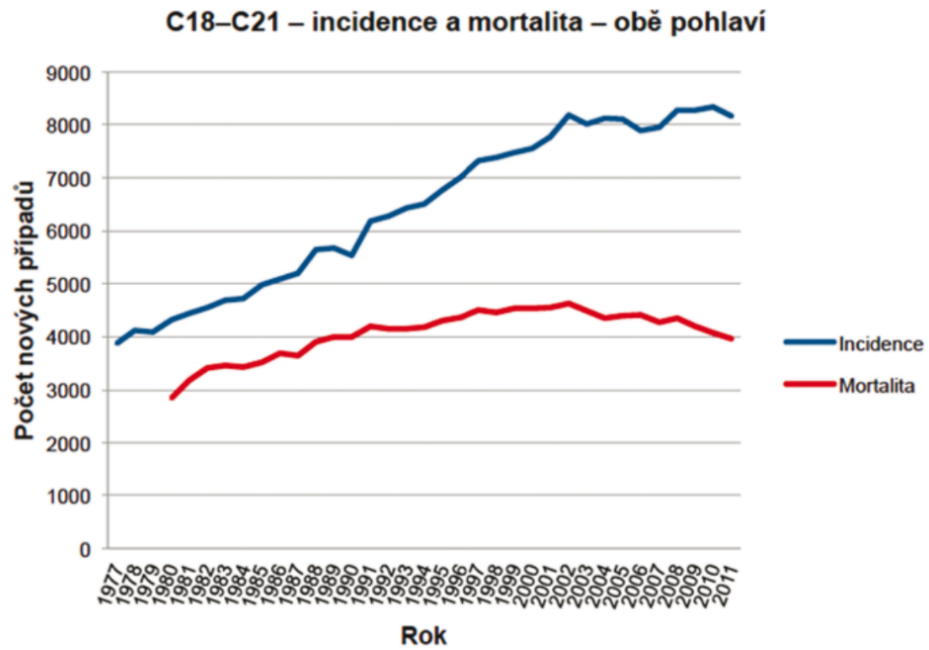


Obrázek 2: Bakterie mohou spolehlivě ovlivňovat rakovinné buňky třemi cestami. První spočívá v přímém působení, ve druhé jsou změněné buňky ovlivňovány pomocí metabolitů, které mohou zapříčinit reakci imunitního systému nebo opět působit přímo. Poslední možná cesta je pomocí interakce bakterií s imunitním systémem. Na obrázku zastupují imunitní systém buňky T-lymfocyty, Nf – neutrofilů, Mf – makrofágy a DC – dendritické buňky (Posocco et al. 2015).

3.2 Kolorektální karcinom a vliv probiotik

3.2.1 Charakteristika kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (KK) je maligní nádorové onemocnění tlustého střeva. KK je příčinou vysoké úmrtnosti a morbidit u pacientů s rakovinou po celém světě. Je to třetí nejčastěji diagnostikovanou rakovinou u mužů, a dokonce druhou nejčastější u žen (Zhou & Zheng 2013; Doskočil et al. 2015; Kuipers et al. 2015). Incidence a mortalita KK v posledních letech jsou zobrazeny na obrázku 3. KK spolu s karcinomem žaludku jsou nejčastější karcinomy gastrointestinálního traktu. Společně patří do kategorie gastrointestinálních karcinomů.



Obrázek 3: Incidence a mortalita KK na 100 000 osob (Schneiderová & Bencko 2015).

3.2.1.1 Rizikové a preventivní faktory

KK je silně spojený s faktory životního stylu. Riziko onemocnění stoupá s kouřením, obezitou, konzumací alkoholu, konzumací stravy s vysokým obsahem tuků nebo s vyšší konzumací červeného masa (Schneiderová & Bencko 2015). Důsledky se pak projeví na buněčné a molekulární úrovni. Kromě ovlivnitelných rizikových faktorů, existují také faktory neovlivnitelné. Zde patří pohlaví a věk. Jak roste incidence s věkem je patrné na obrázku 4. Vyšší incidence onemocnění je typická pro muže ve věku nad 50 let (Schneiderová & Bencko 2015).

Na druhou stranu, existují také preventivní doporučení, která riziko snižují. Patří zde strava bohatá na vlákninu, kyselinu listovou a další vitaminy (Coppedè 2014; Kuipers et al. 2015). Příznivý vliv mají také mléčné výrobky, ovoce, zelenina a celozrnné pečivo. Důležitým faktorem v prevenci je i fyzická aktivita, která by měla probíhat alespoň 30 minut denně (Kuipers et al. 2015).



Obrázek 4: Věková struktura pacientů s diagnostikovaným KK. Věková struktura ukazuje % zastoupení věkových skupin (popř. zemřelých na diagnózu). Strmý vzestup tohoto onemocnění začíná již po 45. roce věku (Schneiderová & Bencko2015).

3.2.1.2 Formy kolorektálního karcinomu

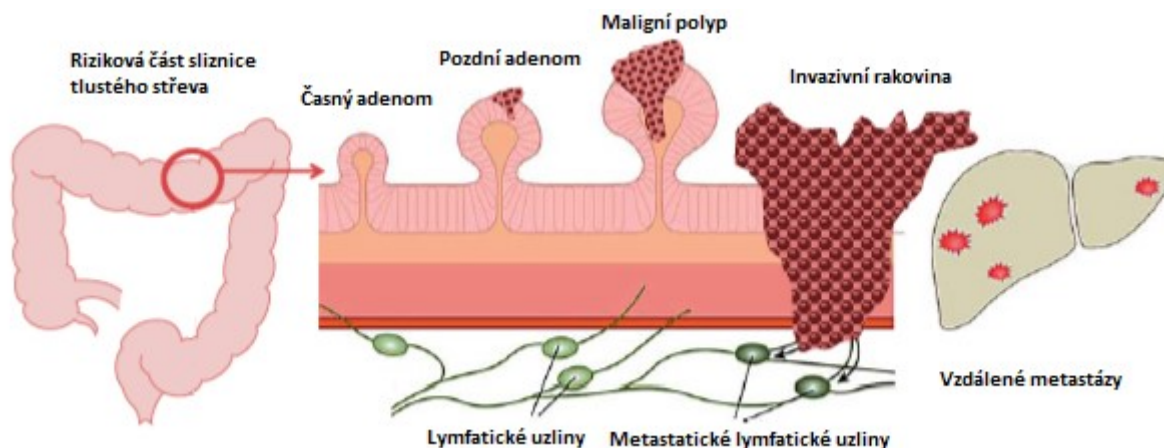
Kolorektální karcinom je způsoben postupnou akumulací jak genetických, tak epigenetických změn (Chen & Fang 2015). Nejčastěji se vyskytuje ve dvou formách, a to ve formě sporadické (asi 70 %) a v menší míře ve formě hereditární (asi 30 %) (Schneiderová & Bencko 2015). KK existuje také ve formě asociované s idiopatickými střevními záněty, jako jsou ulcerózní kolitida nebo Crohnova nemoc. Tato forma spolu s hereditární (familiární) formou však není příliš častá (Zavoral et al. 2013; Bosman & Yan 2014).

Sporadická forma KK je důsledkem akumulace epigenetických změn, které souvisí především s životním stylem (Hagland et al. 2013). Epigenetické změny jsou ty, které ovlivňují genovou expresi, avšak nejsou způsobeny změnou v nukleotidové sekvenci DNA (Chen & Fang 2015). Podílejí se například na změnách v metylaci DNA nebo při specifických histonových modifikacích. Výsledkem je pak změna funkce určitých genů (Coppedè 2014; Chen & Fang 2015).

Hereditární forma vzniká na podkladě genetických syndromů. S touto problematikou je spojován například Lynchův syndrom nebo familiární adenomatózní polypóza (Coppedè 2014; Kuipers et al. 2015).

3.2.1.3 Etiologie kolorektálního karcinomu

KK vzniká z normální sliznice tlustého střeva, avšak v závislosti na určitých faktorech, může v daném místě vzniknout intraepiteliální neoplazie a poté dojít k růstu benigních adenomatózních lézí. Pokud nedojde k jejich odstranění, mohou se tyto léze rozvinout v karcinomy, viz obrázek 5 (Hagland et al. 2013). Vývoj asymptomatického adenomu v karcinom trvá obvykle několik let (Chen & Fang 2015). Takto pozměněné buňky pak ztrácí schopnost buněčných oprav a apoptózy (Zavoral et al. 2013; Raskov et al. 2014).



Obrázek 5: Vznik a vývoj rakoviny tlustého střeva (Hagland et al. 2013)

K lepšímu pochopení mechanismů karcinogeneze byly popsány tři hlavní koncepty etiologických cest (Bosman & Yan 2014). První je dráha chromozomální nestability. Objasnění dráhy bylo usnadněno objevem genu APC (adenomatous polyposis coli), ten je odpovědný za familiární adenomatózní polypózu (FAP) (Zavoral et al. 2013; Bosman & Yan 2014). Mutace APC aktivují signální dráhu Wnt, která hraje hlavní roli ve vývoji KK. Aktivace Wnt dráhy je již přítomna u adenomatózních polypů, prekursorových lézí KK, a proto je považována za časnou lézi v karcinogenezi. Velké množství adenomatózních polypů a následná rakovina se u tohoto onemocnění rozvíjí již v mladém věku (Kuipers et al. 2015). K APC mutacím dochází rovněž i u pacientů se sporadickou formou. Obvykle však až od 70 let a na rozdíl od FAP jsou mutace somatické, nikoliv zárodečné (Zavoral et al. 2013).

Druhá cesta je spojená s nestabilitou mikrosatelitů a je zodpovědná za vývoj hypermutujících karcinomů. Prototyp těchto cest byl objeven při hledání genetického původu dědičné nepolypózní rakoviny tlustého střeva, která je dnes známá jako Lynchův syndrom (Bosman & Yan 2014). Během replikace DNA dochází k chybám jako je chybné zařazení nebo vyloučení jedné báze nebo krátkého úseku. Toto je následně opraveno díky funkci enzymů mutátorových genů (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 nebo EPCAM) (Kuipers et al. 2015). Ovšem

pokud tyto geny nefungují správně, dochází k hromadění mutací, které se vyskytují v sekvencích mikrosatelitů. Jedná se o opakující se sekvence DNA, většinou o délce 1 až 6 páru bází, které se vyskytují v celém genomu (Zavoral et al. 2013; Kuipers et al. 2015). Mikrosatelitová nestabilita se krom Lynchova syndromu vyskytuje ve 12 % také ve sporadické formě. U té je způsobena promotorovou metylací, která vypíná transkripci proteinu, jenž je zodpovědný za opravy DNA (Zavoral et al. 2013).

Třetí cesta souvisí s mechanismy regulujícími transkripci, jenž často způsobí utlumení tumor-supresorových genů. Ty jsou zodpovědné za regulaci buněčného dělení, ovlivňují diferenciaci a apoptózu buněk. Klíčovým regulačním faktorem je tumor supresorový gen p53. Jeho inaktivace hraje podstatnou roli ve vzniku maligních nádorových onemocnění (Zavoral et al. 2013, Doskočil et al. 2015).

3.2.1.4 Terapie

Léčba KK se odvíjí od toho, v jakém stádiu se karcinom vyskytuje. Dle Modré knihy české onkologické společnosti se v prvotních stádiích přistupuje k resekci bez použití chemoterapie a radioterapie. Ty jsou však už u pokročilejších lézí nutné a doplňují se chirurgickou léčbou. Jako chemoterapeutika jsou doporučeny 5-fluorouracil/leukovorin nebo kapecitabin. Dále se používají například léky irinotekan nebo oxaliplatina (Doskočil et al. 2015; Kuipers et al. 2015) Dle potřeby se používají také různé kombinace a existuje celá řada dalších látek, které mohou být použity.

Chemoterapie dosáhla, díky zmapování lidského genomu, značného pokroku. Bylo identifikováno několik potenciálních molekulárních cílů, které mohou být využity ve specifické léčbě jednotlivých podskupin pacientů. Proto by v následujících letech mělo dojít k pokroku v chirurgii i chemoradioterapii a léčba by se měla stále více individualizovat. To, společně s včasným screeningem onemocnění, by v ideálním případě mělo zapříčinit delší životnost a lepší kvalitu života pacientů s kolorektálním karcinomem (Kuipers et al. 2015).

3.2.2 Probiotika a nádorová onemocnění

Současné klinické důkazy příznivého působení probiotik jsou omezené, a to hlavně z důvodu obav týkajících se vyvolání iatrogenní infekce zprostředkované přenosem rezistence vůči antibiotikům (Boyle et al. 2006; Mego et al. 2013). Pacienti s nádorovým onemocněním jsou imunokompromitováni, a to nejen v důsledku samotného onemocnění, ale také díky protinádorové léčbě (Mego et al. 2013). Značná část probiotických rodů je přirozeně odolná

vůči antibiotikům (např. rod *Lactobacillus* spp. vůči vankomycinu) (Boyle et al. 2006; Mego et al. 2013). Rezistence je ve většině případů vnitřní (chromozomálně kódována) a tudíž nejsou snadno přenosné na jiné druhy (Boyle et al. 2006). Bohužel některé druhy mohou nést potenciálně přenosné plazmidové rezistence. To by mohlo být nebezpečné, pokud by se probiotika staly infekčními činidly nebo by svou odolnost přenesly na endogenní mikrobiom (Mego et al. 2013).

Probiotika svými vlastnostmi napomáhají udržovat homeostázu, tím také snižují vedlejší účinky spojené s léčbou nádorového onemocnění. Rovněž má mléčná kyselina příznivý účinek na toxické účinky protinádorové terapie. Její účinky ovlivňují aktivaci nebo deaktivaci metabolitů způsobujících průjem (Mego et al. 2013). Kromě toho, mohou být mutagenní sloučeniny, běžně přítomné v západní stravě, vázány bakteriemi mléčného kvašení. Přítomnost vazby byla v korelaci s redukcí mutagenity pozorované po expozici bakteriálních rodů. Bylo prokázáno, že laktobacily rozkládají nitrosaminy. To jsou prokázané karcinogeny u zvířat a byly nalezeny i v lidských výkalech (Fotiadis et al. 2008).

Množství důkazů, které podporují probiotické užívání jako protinádorovou léčbu, je nedostatečné a liší se v počtu použitých druhů nebo v dávce probiotik. Zároveň byla většina pokusů provedena pouze na malém množství osob, a proto je zapotřebí zrealizovat velké propracované klinické studie na toto téma.

3.2.2.1 Probiotika a radiační terapie

Radiační terapie zodpovídá za celou řadou nežádoucích účinků. Mezi ně patří ztráty chuti k jídlu, nevolnosti nebo opět průjem. Ionizující záření působí na střevní sliznici a tím také naruší složení střevního mikrobiomu. Průjem u lidí podstupujících radiační terapii v oblasti břicha a pánve se vyskytuje v rozmezí 50 až 90 % (Andreyev et al. 2005). Tento stav může být léčen léky (např. loperamid), ale v některých případech musí být radioterapie přerušena. Na rozdíl od chemoterapie nezpůsobuje radioterapie hematologickou toxicitu a následnou neutropenii. Proto je riziko iatrogenní infekce způsobené probiotiky velmi nízké (Andreyev et al. 2005; Mego et al. 2013).

Proběhla dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie s 482 pacienty. Studie zkoumala přípravek, který obsahoval životaschopné lyofilizované bakterie několika různých druhů laktobacilů a bifidobakterií a jeden *Streptococcus* spp.. Tato studie potvrdila, že přípravek je účinný a bezpečný. Pacienti užívající probiotika měli významně nižší incidenci průjmu a závažnost jeho projevů, ve srovnání s placebem. Autoři také hlásili významně nižší

počet střevních polypů a kratší dobu užívání léků (lorepamid) v probiotické skupině (Blanarova et al. 2009).

3.2.2.2 Role probiotik během chemoterapie

Cílem chemoterapie je pomocí cytostatik zastavit průběh růstu nádorových buněk. Nevýhodou je, že cytostatika nerozlišují nádorové buňky od těch zdravých a zapříčiní celou řadu nežádoucích účinků. Mezi ně patří například alopecie, orgánová toxicita, průjmy nebo neutropenie. Úbytek bílých krvinek je obzvláště závažný, a to z důvodu zhoršení funkcí imunitního systému a následným rizikem infekčních komplikací (Mego et al. 2013). Dalším problémem je změna složení střevního mikrobiomu. Bylo zjištěno, že do jednoho dne po hospitalizaci se změní polovina endogenních mikroorganismů neutropenických pacientů, přičemž gramnegativní (často nozokomiální) kmeny nahrazují ty původní. Původní bývají ničeny samotným chemoterapeutikem nebo dodatečným širokospektrým antibiotikem (Mego et al. 2013). Probiotika mohou být během chemoterapie účinná prevence proti kolonizaci střev patogenními mikroorganismy, vzniku neutropenie nebo průjmu.

Na téma neutropenie a probiotika proběhly dvě malé klinické studie (Mego et al. 2005; Mego et al. 2006). V první byl probiotický druh *Enterococcus faecium* podáván 6 pacientům s rakovinou varlat léčených chemoterapeutiky. Po podání probiotik nebyla febrilní epizoda pozorována ani u jednoho z nich (Mego et al. 2005). Nicméně ve studii od Mego a kolegů (2006), do které bylo zařazeno 14 pacientů s akutní nebo chronickou myeloidní leukémií, nebyl pozitivní účinek tohoto rodu prokázán. *E. faecium* nebyl účinný při prevenci febrilní neutropenie. To však nevylučuje ochranný účinek jiných probiotických kmenů.

Potvrzený je však účinek probiotik a jejich produktu (mléčné kyseliny) v případě průjmu. Metaanalýzy (Kale-Pradhan et al. 2010; McFarland 2006; Hempel et al. 2012) potvrdily účinnost probiotik v prevenci antibiotiky vyvolaných průjmů, včetně infekce vyvolané bakterií *Clostridium difficile* (Kale-Pradhan et al. 2010). Výskyt průjmu během léčby akutní leukémie je mezi 15 % a 80 %. Těžké průjmy jsou nejčastější během indukční fáze chemoterapie. Ve studii bylo preventivní podávání probiotického kmene *E. faecium* spojeno s nízkou incidencí (14 %) průjmu, a to i přes skutečnost, že polovina pacientů dostávala indukční terapii (Mego et al. 2006).

Jedním z klíčových léků používaných při léčbě kolorektálního karcinomu je irinotekan. Ten svým metabolitem (SN - 38) vyvolává průjem v 60 až 90 %. SN - 38 je glukuronidován v játrech a následně dekonjugován ve střevě. Za dekonjugaci je zodpovědný bakteriální enzym

beta – D – glukuronidáza. Dekonjugovaná forma způsobuje přímé poškození sliznice a vznik malabsorpce (Fotiadis et al. 2008). Je však známo, že probiotické bakterie snižují aktivitu beta – D – glukuronidázy, a proto se mohou aplikovat při prevenci průjmu vyvolaného tímto léčivem (Mego et al. 2013).

Dalším lékem využívaným v léčbě KK je 5 - fluorouracil (5 - FU). Ten rovněž poškozuje střevní sliznici a je spojen s vývojem laktózové intolerance (Österlund et al. 2004). Podávání probiotik by mohlo zmírnit průjem podobným způsobem jako u klasické populace s laktózovou intolerancí (Österlund et al. 2004; Mego et al. 2013). V klinické studii (Österlund et al. 2007) byli pacienti s KK, léčeni 5 - FU a leucovorinem, náhodně rozděleni do dvou skupin. Jedna skupina pacientů dostávala LGG a vlákninu, zatímco druhá skupina pouze placebo. Pacienti, kteří dostávali probiotika měli pouze mírné průjmy a hlásili méně bolesti v břiše a celkově vyžadovali méně péče.

Nicméně, nesmíme ani zapomínat, že mikroorganismy mohou zapříčinit i různá onemocnění. Bakterie mohou být zodpovědné za metabolické, autoimunitní nebo neuropsychiatrické nemoci, například syndrom dráždivého tračníku, alergii, obezitu, diabetes, onemocnění jater nebo rakovinu (Cani 2018; Martin et al. 2018). Důležité jsou také jejich schopnosti ovlivňovat účinnost celé řady léčiv.

3.2.3 Působení mikrobiomu na chemoterapeutika

Při léčbě nádorových onemocnění musí být terapeutické léky pečlivě vybírány nejen podle stádia progresu onemocnění, ale také podle interakce s mikroby. Ty totiž mohou účinky léků ovlivňovat. Jsou známy tři způsoby. Mikrobiom může usnadňovat účinnost léků, rušit a neutralizovat protirakovinné účinky nebo zprostředkovat toxicitu. Je známo, že mikroorganismy moduluji například 5 - fluorouracil, cyklofosfamid, irinotekan, oxaliplatin, gemcitabin nebo methotrexát. Nejčastější následky interakce chemoterapeutika s mikrobiomem jsou: translokace bakterií, imunomodulace prostředí, metabolizace léčiva či enzymatická degradace. Důležité je také snížení bakteriální rozmanitosti (Alexander et al. 2017).

Viaud a kolegové (2013) provedli studii na myších, u kterých zkoumali vliv malých intestinálních komenzálních mikroorganismů na léčbu cyklofosfamidem. Zjistili, že toto léčivo způsobuje diskontinuitu střevní bariéry. Tím se umožnil přechod bakterií do sekundárních lymfatických orgánů a došlo ke stimulaci specifických T-lymfocytů, které napomáhaly účinkům cyklofosfamidu a inhibici tumoru. U myší, u kterých byl v důsledku antibiotik mikrobiom narušen, k inhibici tumoru nedocházelo. Co se týče imunomodulace, zde nedochází

k translokaci bakterií do sekundárních orgánů imunitního systému, ale bakterie samy produkují zánětlivé cytokiny nebo přímo aktivují buňky imunitního systému, čímž také podporují účinky chemoterapeutika (Alexander et al. 2017).

Bakterie také díky jejich metabolismu a enzymatické degradaci mohou látky např. redukovat, hydrolyzovat, dekarboxylovat nebo dealkylovat. Do oběhu jsou následně vylučovány metabolity, které mohou působit toxicky (Alexander et al. 2017). Častý je také případ, kdy díky bakteriálním enzymům dojde k inaktivaci léčiva. Bylo potvrzeno, že některé bakterie mohou být rezistentní na chemoterapeutické léčivo gemcitabin a přeměňovat ho do jeho neaktivní formy. Klíčový se ukázal bakteriální enzym cytidin-deamináza, který je typický pro bakterie třídy Gammaproteobacteria. Dále také zjistili, že některé bakterie způsobují rezistenci i na lék oxaliplatin. Zde však rezistence není zprostředkována cytidin-deaminázou (Geller et al. 2018). Enzymatická degradace se projevuje také u irinotekanu (Fotiadis et al. 2008), jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole.

Z předchozích poznatků vyplývá, že mikroorganismy hrají klíčovou roli v různých patologických stavech. To vede k úsilí preventivně upravit složení mikrobiomu, a zajistit podmínky při kterých bude účinek chemoterapeutik mikroby podporován (Mondot et al. 2013, Alexander et al. 2017). Zdokonalování znalostí v této oblasti může být klíčové i pro sestavení terapeutik, které se v budoucnu zaměří na mikrobiologicky zprostředkované řízení zdraví v průběhu života (Greenhalgh et al. 2016). Důležité je také najít látky, které nebudou bakteriemi negativně ovlivňovány, ale naopak budou mikrobi jejich pozitivní účinky umocňovat. V současnosti je zkoumána celá řada cytostatických látek, které by mohly doplnit nebo případně nahradit dosud používaná chemoterapeutika. Velkou skupinou těchto látek jsou právě alkaloidy, jejichž někteří zástupci vykazují žádoucí účinky proti některým rakovinným onemocněním.

3.3 Alkaloidy

3.3.1 Charakteristika

Alkaloidy jsou skupina přirozeně se vyskytujících organických chemických sloučenin. Mají cyklickou strukturu a obsahují dusík v negativním oxidačním stavu, který má omezenou distribuci v živém organismu (Kabera et al. 2014; Roy 2017).

Jsou to produkty široké škály organismů, které zahrnují bakterie, houby, rostliny a některé živočichy. V současnosti je známo již 27 000 alkaloidů (Kukula-Koch & Widelski 2017). Nejčastějším zdrojem alkaloidů jsou kvetoucí rostliny. Bylo zjištěno, že asi 20 % rostlinných

druhů obsahuje alkaloidy (Roy 2017). Ty pak, jako sekundární metabolity rostlin, slouží především k jejich ochraně proti býložravcům a patogenům. Mají významné biologicky aktivní účinky. Obecně platí, že jsou alkaloidy velmi toxické, ale zároveň mají v malých dávkách terapeutický účinek (Ahmed et al. 2017).

U člověka alkaloidy ovlivňují nervový systém prostřednictvím neurotransmiterů. Mají vliv například na acetylcholin, epinefrin, norepinefrin, gama aminomáselnou kyselinu, dopamin nebo serotonin. Výhoda využívání rostlinných látek jako léčiv spočívá v tom, že jsou bezpečnější než syntetické alternativy a cenově dostupnější (Roy 2017). Čisté, izolované rostlinné alkaloidy a jejich syntetické deriváty se používají jako základní léčivé látky na celém světě pro jejich analgetické, antispastické a baktericidní účinky (Qiu et al. 2014; Roy 2017). Některé také vykazují antiproliferační (Khazir et al. 2014), antivirové nebo antimetastatické účinky na různé typy rakoviny *in vitro* i *in vivo* (Qiu et al. 2014).

Na základě jejich biosyntetického prekurzoru a heterocyklického kruhového systému byly sloučeniny zařazeny do různých kategorií, které zahrnují indol, piperidin, tropan, purin, pyrrolizidin, imidazol, chinolizidin, isochinolin, a pyrrolidin (Roy 2017). Látky jako aminokyseliny, peptidy, nukleotidy, nukleové kyseliny a aminy nejsou obvykle nazývané alkaloidy (Kabera et al. 2014).

3.3.2 Amarylkovité alkaloidy (*Amaryllidaceae*)

Čeď Amarylkovitých zahrnuje 75 rodů a asi 1100 druhů, ty jsou široce rozšířeny v tropických a subtropických oblastech Jižní Ameriky a Jižní Afriky (Ding et al. 2017). Mezi známé zástupce patří narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) nebo sněženky (*Galanthus*). Jako první z této rodiny byl izolován alkaloid lycorin z *Narcissus pseudonarcissus* (Narcis žlutý) v roce 1877 (Van Goietsenoven et al. 2010). Již v minulosti byly tyto rostliny využívány nejen jako okrasné, ale také jako lidové rostlinné léky. V současnosti bylo u mnoho alkaloidů z této skupiny popsáno několik farmakologických účinků. Příkladem jsou protinádorové, antimikrobiální, antimalarické, cytotoxické, antivirové a protizánětlivé účinky nebo účinky na centrální nervový systém (CNS) či schopnost inhibovat acetylcholinesterázu (AChE) (Jin 2016; Cimmino et al. 2017; Ding et al. 2017). Úspěšným zástupcem je také galanthamin, který je již schválen pro použití v Evropské unii a ve Spojených státech pro léčbu Alzheimerovy choroby (Ding et al. 2017). Důležitou vlastností je také to, že tyto zástupci vykazují vysokou selektivitu vůči nádorovým buňkám a nízkou toxicitu vůči buňkám zdravým (Dalecká et al. 2013).

Alkaloidy amarylkovitých rostlin jsou sloučeniny, které patří do velké skupiny izochinolinových alkaloidů. Předpokládá se, že se alkaloidy tvoří biogeneticky intramolekulární oxidační vazbou norbelladinů. Dle způsobu spojení se tyto alkaloidy dělí do několika skeletárních typů: lykorinový typ (lykorin), galantaminový typ (galanthamin), tazettinový typ (tazettin), pankratistatinový typ (pankratistatin), homolykorinový typ (homolykorin), haemanthaminový typ (haemanthamin), krinanový typ (krinin), norbelladinový typ (norbelladin) nebo montaninový typ (montanin). Další jsou minoritní skupiny vycházející z fenanthidonu, fenanthridinu, plicaminu, gracilinu, galanthindolu. K dnešnímu dni bylo získáno celkem 357 různých struktur (Ding et al. 2017).

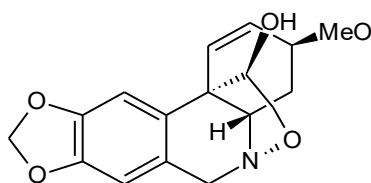
3.3.2.1 Alkaloidy a buněčný cyklus

Alkaloidy, které jsou schopny modulovat buněčný cyklus, se liší tím, ve které fázi cyklu působí a jakým způsobem buňku moduluji (Dalecká et al. 2013). Buněčný cyklus se skládá z fáze G1, fáze S, fáze G2 a M fáze. V G1 fázi dorůstá buňka po předchozím dělení a připravuje se na další. Po této fázi může buňka začít S fázi nebo může opustit buněčný cyklus a přejít do tzv. klidové fáze G0, kde se již nedělí. (Nair & van Staden 2018). V S fázi dochází k replikaci DNA a vzniká chromozom se dvěma sesterskými chromatidami (Li et al. 2004). Následně se v G2 fázi zdvojnásobí organely a tvoří se struktury pro dělení (Kastan & Bartek 2004). Poté nastává M fáze, která se skládá z mitózy a cytokineze. Během mitózy rozdělí buňka svou DNA a cytoplazmu na dvě části. Mitóza se skládá z profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze (Hirano 2015; Paier et al. 2018).

Regulaci buněčného cyklu zajišťují dva kontrolní body, jeden na přelomu fáze G1 a S a druhý mezi G2 a M fázi. Mimo jiné, zde působí nejznámější tumor supresorový gen p53. Ten rozhoduje, zda buňka opravena nebo dojde k apoptóze. Také existuje kontrolní bod v metafázi, který zjišťuje, zda se chromozomy srovnaly a napojily na dělicí vřeténko. Cyklus je kontrolován i proteiny, zejména cykliny. Ty se váží na cyklin-dependentní kinázy (CDK) a řídí je. Hladina CKD v průběhu buněčného cyklu je konstantní, mění se však hladiny cyklinů pro vstup do jednotlivých fází. Určují postup buněčným cyklem (Nair & van Staden 2018).

Spousta chemoterapeutik ovlivňuje právě buněčný cyklus. Například 5-fluorouracil, gemcitabin, methotrexát a irinotekan působí v S fázi. Cistiplatina na přelomu S a G2 fáze. Docetaxel, paclitaxel jsou známy tím, že moduluji M fázi (Nair & van Staden 2018). Také *Vinca* alkaloidy (vinkristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin a vinflunin) jsou schopné vázat mikrotubuly a zapříčinit jejich rozpad (Paier et al. 2018). Stejně jsou na tom některé

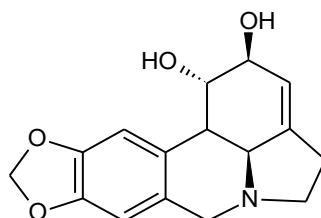
amarylkovité alkaloidy (lykorin, heamanthamin, heamanthidin), které zodpovídají za dezorganizaci mikrotubulů. Ty, jsou nutné pro tvorbu dělicího vřetena a správný průběh mitózy (Van Goietsenoven et al. 2010). Li a kolegové také zjistili, že lykorin dokáže inhibovat histon deacetylázu, a ta zapříčiní zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1. Léčba lykorinem také snížila expresi genu p53 (Li et al. 2012). Jiný zdroj uvádí, že lykorin indukuje apoptózu nádorových buněk vnitřní mitochondriální cestou prostřednictvím modulace proteinu Mcl-1, který apoptózu inhibuje (Dalecká et al. 2013). He et al. (2015) uvádí, že haemanthamin (obr. 6) vyvolává apoptózu také snížením procentuálního zastoupení buněk ve fázi S buněčného cyklu.



Heamanthamin

Obrázek 6: Vzorec haemanthaminu (Jin 2016)

Ačkoli jsou protinádorové aktivity detekované ve všech řadách amarylkovitých alkaloidů, lykoriny (obr. 7), haemanthamin, haemanthidin a fenantridonový typ (pancratistatin, narciklazin) jsou nejčastějšími volbami v takto zaměřených studiích (Van Goietsenoven et al. 2010).



Lykorin

Obrázek 7: Vzorec lykorinu (Jin 2016)

V současnosti jsou pancratistatin a narciklazin, díky jejich protinádorové aktivitě, přítomny v různých fázích klinického testování s možnou komercializací. Oba inhibují různé nádorové buňky, pancratistatin komplikuje cévní zásobení nádoru a způsobuje jeho nekrózu (Ding et al. 2017). Narciclasin a pancratistatin působí na rakovinné buňky epitelálního původu (karcinom), ale ne na gliomové buňky. Jako další nadějný amarylkovitý alkaloid se však jeví lykorin. Ten nejspíše účinkuje prostřednictvím cytostatických účinků (Van Goietsenoven et al. 2010).

Například ve studii (Van Goietsenoven et al. 2010) účinku vybraných alkaloidů na šest různých rakovinných buněčných linií se pohybovaly IC_{50} lykorinu v rozmezí od 4,2 po 8,7 μM . Ukázalo se, že apoptóza nebyla indukována v lidských glioblastomových buňkách ani v koncentraci 10 \times vyšší než jeho *in vitro* inhibiční hodnota IC_{50} . Také ve studii Lamoral-Theys a kolegové (2009) byl lykorin testován na čtyři různé rakovinné buněčné linie, zde se jeho IC_{50} pohybovala od 4,3 do 8,5 μM . V jiné studii byl lykorin testován na buněčnou linii leukémie HL60, IC_{50} se pohybovala okolo 1 μM (Li et al. 2004)

Haemanthamin nebyl součástí výzkumů tolikrát jako lykorin, ale objevil se například ve studii Nair (2018), kde je uvedeno, že haemanthamin a haemanthidin vykazují v dávkách od 5 do 20 μM inhibiční účinky na leukemickou buněčnou linii Jurkat. Také He a kolegové (2015) zjistili, že IC_{50} haemanthaminu na 6 různých rakovinných buněčných liniích se pohybuje od 4,5 μM do 8,5 μM .

Kromě výše zmíněných se nadějně jeví i další zástupci amarylkovitých alkaloidů. Ve studii Chen a kolegové (2016) zjistili, že amarylkovitý alkaloid hipeastrin inhiboval buněčné linie HT29 při dávce $IC_{50} = 3,98 \mu\text{g/ml}$. Vaněčková a kolegové (2016) testovali cytotoxickou aktivitu proti Caco-2 a HT29. Buphanisin prokázal zajímavou cytotoxicitu proti oběma liniím, IC_{50} v případě Caco-2 byla 8,59 μM a v případě HT29 byla 5,32 μM . Masi a kolegové (2019) testovali alkaloidy z *Haemanthus humilis* (Bělokvět) na 6 různých rakovinných linií a zjistili, že alkaloid montanin měl v případě střevní linie HCT-15 $IC_{50} = 6,8 \mu\text{M}$.

Bohužel některé amarylkovité alkaloidy vykazují i značné toxické účinky. Mohou nastat gastrointestinální problémy (zvracení, průjem), kardiopulmonální účinky (respirační onemocnění, paralýza, až zástava srdce), halucinace nebo neurotoxické účinky na CNS (Ding et al. 2017). *Boophone disticha* a *Crinum macowanii* (Křín), což jsou amarylkovité rostliny, projevíly genotoxický účinek vůči lidským lymfocytům a rostliny rodu *Narcissus* (Narcis) již byly v minulosti používány k vyvolání halucinace nebo k sebevraždám. Po požití *N. pseudonarcissus* (N. žlutý) nebo *N. jonquilla* (Narcis okolíkatý) dochází z počátku k bolestem břicha, zvýšenému slinění, nevolnosti, zvracení a k průjmu. Požití malého množství rostliny může následně způsobit neurologické nebo srdeční následky, ovšem pokud je požit větší množství může následovat i smrt (Ding et al. 2017).

Toxický účinek mohou mít alkaloidy také na probiotické bakterie, a právě to by mohlo vyvolat spoustu komplikací s jejich využitím v terapii nádorových onemocnění.

3.3.3 Působení alkaloidů na střevní mikrobiom

Na druhou stranu, v některých případech je toxický účinek alkaloidů na bakterie žádoucí. Je tomu tak hlavně v případě patogenních bakterií. Světová zdravotnická organizace v posledních letech bojuje s narůstající rezistencí bakterií vůči antibiotikům. Nemoci, bakteriálního původu, které se dnes běžně léčí, nebudou na současně používaná antibiotika reagovat. Proto jsou alkaloidy zkoumány také z hlediska antibakteriálních účinků (Nair et al. 2017). Bohužel díky tomuto trendu je většina studií zaměřená právě na vliv alkaloidů proti patogenům, a nikoliv na interakci s prospěšnými druhy bakterií. Nicméně, je žádoucí, aby došlo k nalezení takových látek, které by dokázaly inhibovat proliferační aktivitu nádorových buněk a zároveň by zvyšovaly adhezenci prospěšných bakterií k nádorovým buňkám.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Lactobacillus plantarum (CCM 385; lidská stolice) a *Lactobacillus gasseri* (DSMZ 2243; lidský kmen). České sbírky mikroorganismů. Bujon Wilkins Chalgren a Rogosa agar od Oxoid (UK).

Buněčné kultury adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2, HT29 zakoupené z European Collection of Cell Culture (ECACC). Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, penicilín, streptomycin, trypsin, fosfátový pufř (PBS), byly získány od Sigma-Aldrich (CZ). Dimethylsulfoxid (DMSO) zakoupen u Lach-Ner (CZ). Triton-X100 od Sigma-Aldrich (USA).

Amarylkovité alkaloidy lycorin, haemanthamin byly izolovány z rostlin druhu *Zephyranthes robusta*. Jako standard byl použit komerčně dostupný vinca alkaloid Vinorelbin od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Čistota všech testovaných sloučenin byla $\geq 95\%$. Tento výsledek byl ověřen spektroskopii a nukleární magnetickou rezonancí. Amarylkovité alkaloidy použité v této práci byly připraveny na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Dále byly použity Reader infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria), vodní lázeň (Schoeller Instruments, ČR), vodní lázeň (Huber Kältemmaschinenbau AG, DE), termostat (Schoeller Instruments, ČR), centrifuga (Universal 320, Schoeller Instruments, ČR), analytické váhy Practum 213-1S (Sartorius, Německo), laboratorní míchačka Vortex (IKA®, DE), souprava na čištění vody (Merck Millipore, USA). Kultivační láhve, serologické pipety, 24-jamkové kultivační destičky a 96-ti jamkové kultivační destičky, Petriho misky byly pořízeny od ThermoFisher (UK).

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Lactobacily byly přes noc kultivovány ve Wilkins-Chalgren bujónu při 37 °C za anaerobních podmínek. Poté byly centrifugovány (2000 rpm, 10 minut), třikrát promyty fosfátovým pufřem PBS a resuspendovány v PBS na koncentraci 10⁸ KTJ/ml, stanovené z jejich optické hustoty při 600 nm, pomocí Tecan Infinite M200.

4.2.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu ve formě buněčné linie Caco-2 a HT29 byly pěstovány v DMEM mediu s 10% FBS, 1% roztokem penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvátém sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami.

Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm²) s 15 ml příslušného media, ty pak byly vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 95 % vzduchu, 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly po sedmidenní kultivaci propláchnuty pomocí PBS, aby bylo odstraněno staré medium a inhibitor trypsinu. Následně bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut. Po 3 minutách byl trypsin neutralizován pomocí 1 ml media. Následně byla buněčná monovrstva seškrábána pomocí buněčné škrabky a přepipetována do 15 ml zkumavky typu Falcon. Takto byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 200 × g. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v novém mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a dáno k 15 ml nového DMEM, media v kultivační láhvi pro další kultivaci. Kultivační láhev byla umístěna do CO₂ inkubátoru (37 °C a 5% CO₂ atmosféra).

4.2.3 Založení 24-jamkové destičky

Z buněčné suspenze, která byla důkladně rozpuštěna, bylo odebráno 100 µl, smícháno se 100 µl tripanové modře a následně byla odebrána kapka a byla dána na Bürkerovu komůrku. V 1 ml suspenze byl spočítán obsah buněk. Dle výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Do směsi bylo přidáno $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29. Tato směs byla pipetována na jamku v objemu 500 µl a takto připravená destička byla uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní bylo každé 2–3 dny vyměněno medium za čerstvé. Po 14 dnech by měla proběhnout plná diferenciacce buněk a také by mělo dojít k plné konflucenci monovrstvy.

4.2.4 Test adherence

Staré medium bylo odsáto a buněčné monovrstva byla 3× promyta PBS. Poté byly na monovrstvu přidány 3 různé alkaloidy. V případě lycorinu a haemanthaminu v koncentracích: 2, 1 a 0,5 µM. V případě vinorelbinu v koncentracích 0,5 a 0,05 µM. Použité koncentrace vychází z článku Doskočil a kolegové (2015), kde byly stanoveny IC₅₀ a my jsme pracovali s hodnotami okolo této koncentrace. Dále byly na monovrstvu přidány bakteriální kmeny *L. plantarum* a *L. gasseri*. Poté následovala inkubace po dobu 2 hodin při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Po uplynutí této doby byly jamky 3× promyty PBS, pro odstranění

neadherovaných bakterií na monovrstvách, které byly následně rozrušeny přidáním 300 μ l 1% Tritonu-X100 na jamku po dobu 30 s a dále doplněny PBS. Poté byly suspenze s životaschopnými bakteriemi zředěny a naočkovány na Petriho misky a zality Rogosa agarem. Po 72 hodinách inkubace za aerobních podmínek a při 37 °C byly spočítány KTJ a byla stanovena adherence, vyjádřená jako procento adherovaných bakterií s daným alkaloidem na množství adherovaných bakterií bez působení alkaloidů.

4.2.5 Statistické vyhodnocení

K statistickému vyhodnocení byl využit f-test k analýze rozptylu a následně t-test při hladině významnosti $p < 0,05$ prostřednictvím aplikace Excel. U zjištěných dat byl vyjádřen průměr \pm směrodatná odchylka.

5 Výsledky

V této práci jsme porovnávali *in vitro* adhezenci bakterií *L. plantarum* a *L. gasseri* v prostředí, kde byl přítomný daný alkaloid. Výsledná hodnota byla porovnána s adhezencí, která proběhla za stejných podmínek až na přítomnost alkaloidu. Použili jsme lykorin a haemanthamin. Jako kontrola byl použit *Vinca* alkaloid vinorelbin. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 1 a znázorněny v grafech 1 a 2.

Lykorin inhiboval adhezenci jak v případě *L. gasseri*, tak i v případě *L. plantarum*. U obou druhů bakterií byl inhibiční vliv lykorinu při 1 $\mu\text{M/ml}$ o něco málo vyšší než u koncentrace 2 $\mu\text{M/ml}$. Koncentrace 0,5 $\mu\text{M/ml}$ také adhezenci snižovala, ale hodnoty jsou oproti předchozím koncentracím nižší. Pokud srovnáme *L. gasseri* a *L. plantarum* je patrné, že lykorin měl menší vliv na adhezi *L. plantarum*.

Haemanthamin v případě *L. gasseri* opět adhezii snižoval a opět při koncentraci 1 $\mu\text{M/ml}$ více než při koncentraci 2 $\mu\text{M/ml}$. Při koncentraci 0,5 $\mu\text{M/ml}$ naopak došlo k zvýšení adherence, pouze ale o 0,15 % \pm 1,46 oproti adheze bez haemanthaminu. U *L. plantarum* došlo k zvýšení adherence při koncentraci 2 $\mu\text{M/ml}$ i 1 $\mu\text{M/ml}$, bylo to o hodnoty 0,48 % \pm 1,17 a 0,32 % \pm 1,50. Při koncentraci 0,5 $\mu\text{M/ml}$ byla adheze opět nižší, oproti vzorku bez alkaloidu. Co se týče míry negativního ovlivnění adherence, z výsledků je patrné, že haemanthamin, stejně jako lykorin, více ovlivňoval *L. gasseri*.

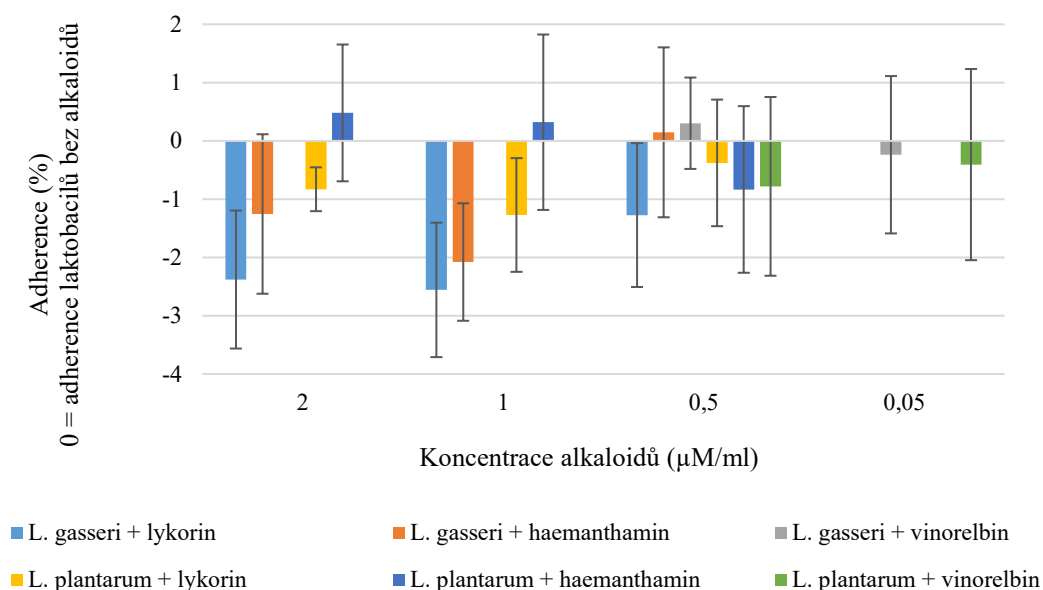
Poslední byl vinorelbin, ten byl použit pouze ve dvou koncentracích, a to v 0,5 $\mu\text{M/ml}$ a 0,05 $\mu\text{M/ml}$. Při koncentraci 0,5 $\mu\text{M/ml}$ v případě *L. gasseri* došlo k mírnému zvýšení adheze o 0,30 % \pm 0,78. V ostatních případech došlo u obou druhů bakterií ke snížení adheze.

Nicméně statistická analýza ukázala, že výsledky nejsou statisticky průkazné ($p < 0,05$).

Tab. 1: Adherence laktobacilů s alkaloidy ve srovnání s adhezencí laktobacilů bez alkaloidů

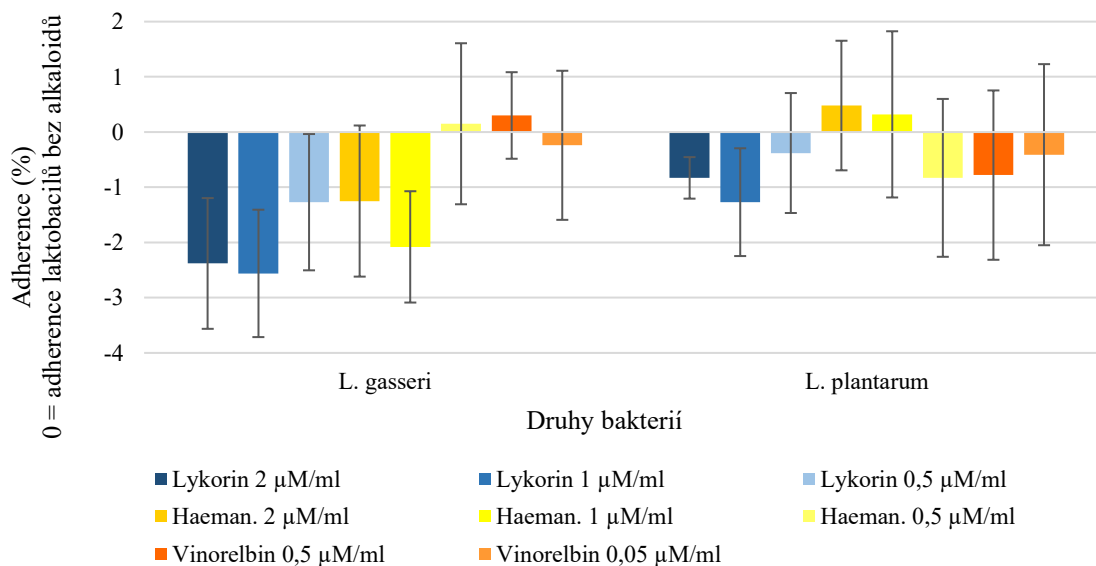
Alkaloid	$\mu\text{M/ml}$	Druh laktobacilu	
		<i>L. gasseri</i> průměr (%) \pm SD	<i>L. plantarum</i> průměr (%) \pm SD
Lykorin	2	-2,38 \pm 1,18	-0,83 \pm 0,38
	1	-2,56 \pm 1,15	-1,27 \pm 0,98
	0,5	-1,27 \pm 1,23	-0,38 \pm 1,09
Haemanthamin	2	-1,25 \pm 1,37	0,48 \pm 1,17
	1	-2,08 \pm 1,01	0,32 \pm 1,50
	0,5	0,15 \pm 1,46	-0,83 \pm 1,43
Vinorelbin	0,5	0,30 \pm 0,78	-0,78 \pm 1,53
	0,05	-0,24 \pm 1,35	-0,41 \pm 1,64

Vliv alkaloidů na adhezi laktobacilů z hlediska koncentrací



Graf 1: Adherence laktobacilů na buněčnou linii kolorektálního karcinomu s alkaloidy. Lykorin, haemanthamin v koncentracích 2, 1 a 0,5 μM a vinorelbin v koncentracích 0,5 a 0,05 μM. Z grafu je patrné, že alkaloidy adhezenci bakterií spíše snižují a se snižující se koncentrací dochází k menšímu vlivu na adhezenci.

Vliv alkaloidů na adhezi laktobacilů z hlediska bakterií



Graf 2: V první části grafu vidíme tři testované alkaloidy a jejich vliv na *L. gasseri*, v druhé části vliv na *L. plantarum*. Pokud srovnáme obě části vidíme, že větší koncentrace alkaloidů více ovlivňují *L. gasseri* než *L. plantarum*.

6 Diskuze

Poslední verze databáze GLOBOCAN obsahuje odhady výskytu, úmrtnosti a prevalence 36 typů nádorových onemocnění v 185 zemích světa. Odhadlo se, že rok 2018 měl přinést 18,1 milionů nových případů nádorového onemocnění. Pro kolorektální karcinom byl odhad 1,8 milionů nových případů a 881 000 úmrtí. Celkově se kolorektální karcinom řadí na 3. místo z hlediska incidence a na 2. místo z hlediska úmrtí (Bray et al. 2018).

V přírodě můžeme najít celou řadu aktivních látek, které mohou být využity i jako léčiva. Rostliny syntetizují mnoho sekundárních metabolitů, které jim pomáhají přežít. Mezi ně patří, mimo jiné, alkaloidy. Ukázalo se, že alkaloidy mohou být přínosné i pro zdraví lidí nebo zvířat (Debnath et al. 2018). Pro alkaloidy obsažené v amarylkovitých rostlinách je typická jejich strukturální rozmanitost, stejně tak i velké množství různých biologických aktivit. Dominantním tématem se však staly jejich cytotoxické účinky (Nair et al. 2016).

Hlavní strategií nádorových onemocnění je chemoterapie. K té mohou být využity právě amarylkovité alkaloidy. Jejich účinky na kolorektální karcinom se staly v mnoha případech předmětem zkoumání posledních let. Stejně tak, se rozvíjí i výzkumy zaměřené na působení lidského mikrobiomu a jeho interakce s léčivem. Mikrobiom může ovlivňovat léčivo několika způsoby, ať už příznivě nebo negativně. Stejně tak, funguje tato interakce i z druhé strany, kdy léčivo může ovlivňovat mikrobiom.

Mikrobiom má důležitou funkci ve fyziologickém fungování organismu. Velkou roli má i při nádorových onemocněních, jak v regulaci imunitní odpovědi, tak i v případě zmírnění důsledků terapie (Helmink et al. 2019). Příznivé účinky v těchto situacích vykazují hlavně probiotika, do nichž patří především *Lactobacillus* spp. nebo *Bifidobacterium* spp. (Sharif et al. 2018). Probiotika jsou přípravky obsahující životaschopné mikroby (Posocco et al. 2015). Mezi jejich hlavní výhody patří schopnost přežít v gastrointestinálním traktu, adherovat ke střevnímu epitelu, schopnost imunomodulace nebo bakteriálního antagonismu. Schopnost bakterií adherovat ke střevní sliznici se liší v závislosti na druhu bakterie. Bylo prokázáno, že rozhodující jsou hlavně biofyzikální a biochemické vlastnosti (Santarmaki et al. 2017).

Kromě dobrých adhezenčních vlastností, je nutné, aby probiotika používaná u pacientů s kolorektálním karcinomem vykazovala i další prospěšné vlastnosti. Například, v *in vivo* studii (Sivan et al. 2015) myši s nádorovým onemocněním, došlo, díky *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum*, k nárůstu imunitní odpovědi a větší odezvě na chemoterapii než u kontrolní skupiny. Proběhla také menší klinická studie (Liu & Huang 2014), které se

zúčastnilo 100 pacientů, jenž trpěli kolorektálním karcinomem nebo karcinomem žaludku. Po 4 týdnech došlo u 96 % skupiny, která dostávala mix bifidobakterií, ke zlepšení stavu. Ve skupině, která probiotika nedostávala hlásilo zlepšení pouze 32 %. Vyjma bifidobakterií, také lactobacily vykazují celou řadu prospěšných účinků. Ramiah a kolegové (2008) testovali, zda *L. plantarum* zabraňuje adhezi jiných bakterií na buňkách Caco-2. Jeho kolonizace na zmíněné buněčné linii zabránila adhezi 81 % buněk *Clostridium sporogenes* a 91 % *Enterococcus faecalis*. Navíc *L. plantarum* A7 a *L. rhamnosus* GG snížily rychlost růstu nádorových buněk HT29 a Caco-2 (Sadeghi-Aliabadi et al. 2014). Také druhy *L. acidophilus* a *L. casei* dokáží spolehlivě inhibovat proliferaci nádorových buněk, včetně linie HT29 (Choi et al., 2006). Rovněž *L. paracasei*, dokáže inhibovat proliferaci, ale zároveň, má i schopnost adherovat k buňkám karcinomu tlustého střeva Caco-2 (Chondrou et al., 2018). Ovšem bakteriální adheze může být ovlivněna právě chemoterapeutikem a důsledkem může být její snížení nebo naopak zvýšení.

Na zmíněnou problematiku je zaměřená i tato práce, ve které, bylo cílem zjistit jaký budou mít amarylkovité alkaloidy na adhezi vliv. Co se týče výběru laktobacilů, zvolili jsme dva druhy a to *L. gasseri* a *L. plantarum*. *L. plantarum* vykazuje skvělé funkční vlastnosti a vysokou adhezní kapacitu ke střevnímu epitelu (Santarmaki et al. 2017).

Pro nastolení podmínek *in vitro* prostředí kolorektálního karcinomu jsme použili směsnou kulturu buněčných linií Caco-2 a HT29. Tato směsná kultura dokáže simulovat vhodné podmínky pro bakteriální adhezi, bakteriální transport nebo pro sledování bakteriálního antagonismu (Grajek & Olejnik 2004).

S výběrem alkaloidů jsme navázali na studii Doskočil a kolegové (2015), kde nejnápadnějších cytotoxických výsledků bylo dosaženo u tří alkaloidů, a to u haemanthaminu, haemanthidinu a lykorinu. Inhibiční koncentrace pro 50 % buněk (IC_{50}) haemanthaminu byla v případě Caco-2 = 0,99 μ M a v případě HT29 = 0,59 μ M; u haemanthidinu to bylo 3,3 μ M a 1,7 μ M a u lykorinu 0,99 μ M a 1,2 μ M. V této práci jsme použili lykorin a haemanthamin.

V naší studii jsme pracovali s koncentrací 2; 1 a 0,5 μ M. Tyto koncentrace byly vybrané záměrně, aby se posoudil vliv na adhezi s koncentrací vyšší a nižší, než je IC_{50} . Výsledky, ale ukázaly, že testované alkaloidy nemají statisticky významný vliv na adhezi testovaných kmenů a hypotéza byla vyvrácena. To může být zapříčiněno i toxicitou alkaloidů vůči testovaným kmenům. Tu již dokázali Narasimha Rao & Venkatachalam (2000), kteří zkoumali fenantroindolizidinové alkaloidy pergularinin a tylophorinidin z indické rostliny *Pergularia pallida*. Tyto alkaloidy byly hodnoceny z hlediska své biologické aktivity, a především aktivity

vůči *Lactobacillus leichmannii*. IC₅₀ byla u pergularininu 45 µM a tylophorinidinu 40 µM. Koncentrace alkaloidů 75–95 µM vedly k úplné ztrátě aktivity enzymu dihydrofolátreduktáza, který je klíčovým cílem v chemoterapii a byl purifikován právě z *L. leichmannii*. Nicméně, takto vysoké koncentrace se již nepovažují za cytotoxické a nemají další význam při hledání léku proti nádorovým onemocněním. Jiná studie (Kato et al. 2008), která zkoumala inhibiční aktivitu alkaloidů zjistila, že sinomenin inhiboval *Lactobacillus* spp. při koncentraci IC₅₀ = 969 µM. Což je opět vysoká koncentrace, která by měla pravděpodobně fatální důsledky pro gastrointestinální trakt a navazující soustavy bez rozdílu nádorových a normálních buněk.

Inhibiční vlivy na probiotika byly také objeveny u berberinových alkaloidů. Například Xie a kolegové (2011) zjistili, že berberin inhiboval růst *Lactobacillus* spp., jehož větší zastoupení má mít souvislost s obezitou. Berberinové alkaloidy testované na *Bifidobacterium adolescentis* prokázaly inhibiční účinek se vzrůstající koncentrací, IC₅₀ byly 790,3 µg/ml (berberin), 339,6 µg/ml (koptisin) a 229,8 µg/ml (palmatin) (Yan et al., 2009). U mikrobiomu krys byla inhibovaná i celá řada patogenních bakterií, ale u *Lactobacillus* spp. došlo k posílení (Zhang et al., 2015). Podobně dopadla i studie (Fan et al. 2015), která zkoumala několik skupin prasat. Skupina, kde prasata dostávala probiotické bakterie i berberin, měla ve výkalech vyšší hladiny probiotických bakterií oproti kontrolní skupině a zároveň stejné hodnoty jako ta skupina, kde prasata dostávala pouze probiotika. Kromě výzkumu na zvířatech, byl berberin součástí i randomizované, dvojité zaslepené, placebem kontrolované klinické studie (Yifei et al. 2018), které se zúčastnilo 409 pacientů s diagnostikovaným *diabetes mellitus* II. typu. Studie ukázala, že u pacientů, kterým byly podávány probiotika v kombinaci s berberinem, došlo k výraznému zlepšení kontroly glykémie oproti skupině, která dostávala placebo nebo pouze probiotické bakterie. Z tohoto lze odvodit, že kombinace berberinu s probiotickými bakteriemi může být prospěšná.

Existují i další, níže zmíněné, případy, kdy alkaloidy probiotika negativně neovlivnily. Gupta a kolegové (2016) zkoumali antimikrobiální aktivitu rostliny *Azadirachta indica* (*Azadirachta indická*). Alkaloidy byly přítomné v kůře, listech a semenech. Nicméně v listech a semenech byly kromě alkaloidů také taniny, saponiny, flavonoidy a fenolové sloučeniny. Pouze v kůře byly samotné alkaloidy. U jednotlivých částí rostliny byla zjišťována antimikrobiální aktivita proti *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* a *L. casei*. Kůra ani u jednoho z probiotických druhů nejevila antibakteriální účinky. Také Thuy a kolegové (2012) se zaměřili na dva nové aporfínové alkaloidy z čeledi láhevnikovitých. Tyto dva alkaloidy vykazovaly střední aktivitu proti čtyřem testovaným rakovinným buněčným liniím. Následně byla

zkoumána také jejich aktivita proti bakteriím *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. První alkaloid bohužel vykazoval antibakteriální aktivitu proti všem čtyřem druhům. Nicméně druhý alkaloid, inhiboval pouze *S. aureus* a *B. subtilis*, probiotické bakterie nijak neovlivnil.

Alkaloidy lykorinového typu, nemají výrazný vliv nejen na probiotické bakterie, jak ukázaly naše výsledky, ale ani na ty patogenní. Lykorin byl testován například proti grampozitivnímu patogenu *Corynebacteriu fascians*, ale dle výsledků k antibakteriálním účinkům zde nedošlo. Testoval se i proti dalším 11 různým patogenům v několika koncentracích a ani tady významné inhibiční účinky lykorin nevykazoval (Nair et al. 2017). Opět, pouze jen, mírné antibakteriální účinky lykorinu na některé druhy střevních bakterií uvádějí Bendaif a kolegové (2018). Stejně tak, Ločárek a kolegové (2015), kteří testovali několik amarylkovitých alkaloidů proti kvasinkám, *E. coli* a *S. aureus*. Lykorin inhiboval pouze kvasinky a ani na jeden z bakteriálních druhů nepůsobil. Podobně na tom byl také haemanthamin, který měl vliv pouze na některé kvasinky, ale neměl žádný vliv na bakterie. Minimální antibakteriální účinky lykorinu mohou být spjaty s mitochondriálními geny. Bakterie, jež neobsahují mitochondriální DNA jsou pak vůči lykorinu rezistentní (Cao et al. 2013).

Ačkoliv to vypadá, že lykorin ani haemanthamin nevykazují na bakterie žádné inhibiční účinky nebo pouze malé, bohužel, výzkumy provedené na toto téma se mezi sebou liší v mnoha faktorech. Proto není zcela adekvátní je porovnávat a vyvozovat závěry pouze z těchto informací. Je potřeba dalších výzkumů, které by se zaměřily vyloženě na vliv antiproliferačních alkaloidů na probiotické bakterie, jelikož ani množství studií zabývajících se touto problematikou není dostatečné.

7 Závěr

Amarylkovité alkaloidy lykorin a haemanthamin vykazují pozitivní antiproliferační aktivitu proti nádorovým buňkám. Oba alkaloidy by proto mohly být zvažovány jako budoucí chemoterapeutikum při léčbě kolorektálního karcinomu. Na základě této diplomové práce lze říci, že alkaloidy adhezi laktobacilů ovlivnily pouze minimálně. To se shoduje i s některými poznatky dosavadních studií, které nejčastěji dokazují, že amarylkovité alkaloidy v nízkých koncentracích nemají na probiotické bakterie výrazný negativní vliv. Hypotéza, že alkaloidy využívané při léčbě nádorových onemocnění mohou mít pozitivní vliv na mikrobiom, byla vyvrácena. K jejímu případnému potvrzení by bylo potřeba provést další a rozsáhlejší výzkum.

Co se týče výběru probiotických bakterií pro pacienty s kolorektálním karcinomem, dobré adherentní vlastnosti a příznivé účinky na nádorové buňky vykazují zástupci *Lactobacillus* spp., například *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* nebo zástupce *Enterococcus* spp., jímž je *E. faecium*. Vhodnými probiotiky jsou také zástupci *Bifidobacterium* spp.. Ovšem výsledky studií se mnohdy liší a určit jednoznačně nejvýhodnější druhy není možné.

8 Seznam použité literatury

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine* **6**:1–11.
- Ahmed E et al. 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **6**:205–214. Dostupné z <http://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/PartC/6-2-2-130.pdf>.
- Alexander JL, Wilson ID, Teare J, Marchesi JR, Nicholson JK, Kinross JM. 2017. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **14**:356–365. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.20>.
- Andreyev HJN, Vlavianos P, Blake P, Dearnaley D, Norman AR, Tait D. 2005. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: Role for the gastroenterologist? *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **62**:1464–1471.
- Bendaif H, Melhaoui A, Ramdani M, Elmsellem H, Douez C, El Ouadi Y. 2018. Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreaticum foetidum* Pom (Moroccan endemic *Amaryllidaceae*). *Microbial Pathogenesis* **115**:138–145. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.037>.
- Blanarova C, Galovicova A, Petrasova D. 2009. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *Bratislava Medical Journal* **110**:98–104.
- Bosman FT, Yan P. 2014. Molecular pathology of colorectal cancer Pathways in the development of colorectal cancer. *Pol J Pathol* **65**:257–266.
- Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. 2006. Probiotic use in clinical practice: What are the risks? *American Journal of Clinical Nutrition* **83**:1256–1264.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**:394–424.
- Cani PD. 2018. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut* **67**:1716–1725.
- Cao Z, Yang P, Zhou Q. 2013. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry* **56**:1382–1391.
- Cimmino A, Evidente M, Evidente A, Superchi S, Masi M. 2017. *Amaryllidaceae* alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* **29**:486–499.
- Coppedè F. 2014. The role of epigenetics in colorectal cancer. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* **8**:935–948.
- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemicke Listy* **107**:701–708.
- David LA et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*

505:559–563. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/nature12820>.

- Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K. 2018. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry* **9**:56–72. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.
- Ding Y, Qu D, Zhang KM, Cang XX, Kou ZN, Xiao W, Zhu JB. 2017. Phytochemical and biological investigations of *Amaryllidaceae* alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* **19**:53–100.
- Doskočil I, Hošálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. 2015. Cytotoxic activities of *Amaryllidaceae* alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **13**:394–398.
- Dutta SK, Girotra M, Garg S, Dutta A, von Rosenvinge EC, Maddox C, Song Y, Bartlett JG, Vinayek R, Fricke WF. 2014. Efficacy of combined jejunal and colonic fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **12**:1572–1576. Elsevier, Inc. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2013.12.032>.
- Fan G, Chang J, Yin Q, Wang X, Dang X. 2015. Effects of probiotics, oligosaccharides, and berberine combinations on growth performance of pigs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **39**:637–642.
- Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **14**:6453–6457.
- Geller LT et al. 2018. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *HHS Public Access* **357**:1156–1160.
- Goodrich JK et al. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**:789–799. Elsevier Inc. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>.
- Grajek W, Olejnik A. 2004. Epithelial cell culture *in vitro* as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **13**:5–24.
- Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. 2016. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental microbiology* **18**:2103–2116.
- Gupta Y, Sharma D, Sharma Y. 2016. Bactericidal activity of different parts of *Azadirachta indica* on probiotic microbes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **9**:50–53.
- Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Søreide K. 2013. Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. *Digestive Surgery* **30**:12–25.
- He M, Qu C, Gao O, Hu X, Hong X. 2015. Biological and pharmacological activities of *amaryllidaceae* alkaloids. *RSC Advances* **5**:16562–16574. Royal Society of Chemistry. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA14666B>.

- Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. 2019. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine* **25**:377–388. Springer US. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>.
- Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN V, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG. 2012. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **307**:1959–1969.
- Hernández-Arriaga AM, Dave Oomah B, Campos-Vega R. 2017. Microbiota source impact in vitro metabolite colonic production and anti-proliferative effect of spent coffee grounds on human colon cancer cells (HT29). *Food Research International* **97**:191–198. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.004>.
- Hirano T. 2015. Chromosome dynamics during mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**:1–15.
- Hollister EB et al. 2015. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* **3**:36. *Microbiome*. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* **48**:198–205.
- Chen H-M, Fang J-Y. 2015. Epigenetic Biomarkers for the Early Detection of Gastrointestinal Cancer. *Gastrointestinal Tumors* **1**:201–208. Dostupné z <https://www.karger.com/Article/FullText/380784>
- Chen GL, Tian YQ, Wu JL, Li N, Guo MQ. 2016. Antiproliferative activities of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I. *Scientific Reports* **6**:1–10.
- Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **42**:452–458.
- Chondrou P, Karapetsas A, Kioussi DE, Tsela D, Tiptiri-Kourpeti A, Anastopoulos I, Kotsianidis I, Bezirtzoglou E, Pappa A, Galanis A. 2018. *Lactobacillus paracasei* K5 displays adhesion, anti-proliferative activity and apoptotic effects in human colon cancer cells. *Beneficial Microbes* **9**:975–983.
- Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G, Brenner C. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death and Differentiation* **9**:179–188.
- Jang J, Yan T, Ishii S, Hur H-G, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology* **123**:570–581.
- Jin Z. 2016. *Amaryllidaceae* and: *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* **33**:1318–1343. Royal Society of Chemistry. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1039/C6NP00068A>.

- Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**:377–392.
- Kale-Pradhan PB, Jassal HK, Wilhelm SM. 2010. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: A meta-analysis. *Pharmacotherapy* **30**:119–126.
- Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**:316–323.
- Kato A, Yasui M, Yano N, Kawata Y, Moriki K, Adachi I, Hollinshead J, Nash RJ. 2009. Alkaloids inhibiting l-histidine decarboxylase from *Sinomenium acutum*. *Phytochemistry Letters* **2**:77–80.
- Khazir J, Mir BA, Pilcher L, Riley DL. 2014. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters* **7**:173–181. Phytochemical Society of Europe. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.010>.
- Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, Velde CJH, Watanabe T. 2015. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers* **1**:1–25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kukula-Koch WA, Widelski J. 2017. Alkaloids. *Pharmacognosy* 163–198.
- Lamoral-Theys D et al. 2009. Lycorine, the main phenanthridine amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**:6244–6256.
- Li F, Long T, Lu Y, Ouyang Q, Tang C. 2004. The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:4781–4786.
- Li L, Luo Y, Dai H-J, Zheng J, Chen H-Y, Wang S-L, Liu J, Xiao X-J, Ye M. 2012. Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell International* **12**:49.
- Liu J, Huang XE. 2014. Efficacy of *Bifidobacterium tetragenous* viable bacteria tablets for cancer patients with functional constipation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**:10241–10244.
- Ločárek M et al. 2015. Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected *Amaryllidaceae* Species. *Natural product communications* **10**:1537–1540.
- Martin TC, Visconti A, Spector TD, Falchi M. 2018. Conducting metagenomic studies in microbiology and clinical research. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:8629–8646.
- Masarykův onkologický ústav. 2018. Modrá kniha České onkologické společnosti. Masarykův onkologický ústav. Brno.
- Masi M et al. 2019. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African *Amaryllidaceae*: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany*:1–5.

- Maukonen J, Saarela M. 2015. Human gut microbiota: Does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society* **74**:23–36.
- McFarland L V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology* **101**:812–822.
- Mego M et al. 2005. Prevention of febrile neutropenia in cancer patients by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74. Phase I study. *Neoplasma* **52**:159–164.
- Mego M et al. 2006. Prevention of febrile neutropenia in cancer patients by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74. Phase II study. *Supportive Care in Cancer* **14**:285–290.
- Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. 2013. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complementary Therapies in Medicine* **21**:712–723. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2013.08.018>.
- Merchant HA, Liu F, Orlu Gul M, Basit AW. 2016. Age-mediated changes in the gastrointestinal tract. *International Journal of Pharmaceutics* **512**:382–395. Elsevier B.V. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.024>.
- Mondot S, de Wouters T, Doré J, Lepage P. 2013. The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions. *Digestive Diseases* **31**:278–285. Dostupné z <https://www.karger.com/Article/FullText/354678>.
- Nair JJ, Bastida J, van Staden J. 2016. In Vivo Cytotoxicity Studies of *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Natural Product Communications* **11**:1934578X1601100. Dostupné z <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100134>.
- Nair JJ, Wilhelm A, Bonnet SL, van Staden J. 2017. Antibacterial constituents of the plant family *Amaryllidaceae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**:4943–4951. Elsevier Ltd. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.052>.
- Nair JJ, van Staden J. 2018. Cell cycle modulatory effects of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Life Sciences* **213**:94–101. Elsevier Inc. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.073>
- Narasimha Rao K, Venkatachalam SR. 2000. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the in vitro cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicology in Vitro* **14**:53–59.
- Nobel YR et al. 2015. Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nature Communications* **6**:1–15. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8486>.
- Olle B. 2013. Medicines from microbiota. *Nature Biotechnology* **31**:309–315. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2548>.
- Österlund P, Ruotsalainen T, Peuhkuri K, Korpela R, Ollus A, Ikonen M, Joensuu H, Elomaa I. 2004. Lactose Intolerance Associated With Adjuvant 5-Fluorouracil – Based chemotherapy for colorectal cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology* **2**:696–703.

- Österlund P, Ruotsalainen T, Korpela R, Saxelin M, Ollus A, Valta P, Kouri M, Elomaa I, Joensuu H. 2007. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: A randomised study. *British Journal of Cancer* **97**:1028–1034.
- Paier C, Maranhão S, Carneiro T, Lima L, Rocha D, Santos R, Farias K, Moraes-Filho M, Pessoa C. 2018. Natural products as new antimetabolic compounds for anticancer drug development. *Clinics* **73**:1–11.
- Posocco D, Dmitrieva O, Grivennikov SI. 2015. Microbiome Implications in Intestinal Tumorigenesis. *Intestinal Tumorigenesis*:189–209.
- Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, Wang XJ. 2014. Natural alkaloids: Basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines* **12**:401–406. China Pharmaceutical University. Dostupné z [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60063](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60063)
- Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews* **38**:996–1047.
- Ramakrishna BS. 2013. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of gastroenterology and hepatology* **28**:9–17.
- Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LMT. 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology* **159**:470–475.
- Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. 2014. Colorectal carcinogenesis—update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology* **20**:18151–18164.
- Roy A. 2017. A Review on the Alkaloids an Important Therapeutic Compound from Plants. *International Journal of Plant Biotechnology* **3**:1–9.
- Rushdy AA, Gomaa EZ. 2013. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology* **63**:81–90.
- Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H, Mirlohi M. 2014. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iranian journal of basic medical sciences* **17**:815–819.
- Santarmaki V, Kourkoutas Y, Zoumpoulou G, Mavrogonatou E, Kiourtzidis M, Chorianopoulos N, Tassou C, Tsakalidou E, Simopoulos C, Ypsilantis P. 2017. Survival, Intestinal Mucosa Adhesion, and Immunomodulatory Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains. *Current Microbiology* **74**:1061–1067.
- Sharif MK, Mahmood S, Ahsan F. 2018. Role of probiotics Toward the Improvement of Gut Health With Special Reference to Colorectal cancer. *Diet, Microbiome and Health* 35–50. Elsevier Inc. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811440-7/00002-8>.
- Schneiderová M, Bencko V. 2015. Kolorektální karcinom – současný pohled na rizikové a protektivní faktory, možnosti prevence. *Onkologie* **9**:178–182.

- Schroder J, Harder J. 1999. Human beta-defensin 2. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **31**:645651.
- Sivan A et al. 2015. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**:1084–1089.
- Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. 2017. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* **5**:1–12. Taylor & Francis.
- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology* **2**:1–16.
- Thompson AL, Monteagudo-Mera A, Cadenas MB, Lampl ML, Azcarate-Peril MA. 2015. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**:1–15. Dostupné z <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2015.00003/abstract>.
- Thuy TTT, Quan TD, Anh NTH, Sung T Van. 2012. Cytotoxic and antimicrobial aporphine alkaloids from *Fissistigma poilanei* (*Annonaceae*) collected in Vietnam. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* **26**:1296–1302.
- Van Goietsenoven G et al. 2010. *Amaryllidaceae* alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products* **73**:1223–1227.
- Vaněčková N et al. 2016. Isolation of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* **6**:80114–80120.
- Viaud S et al. 2013. The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. *Science* **342**:971–976.
- Vitetta L, Briskey D, Alford H, Hall S, Coulson S. 2014. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. *Inflammopharmacology* **22**:135–154.
- Vitetta L, Hall S, Linnane AW. 2014. Live probiotic cultures and the gastrointestinal tract: symbiotic preservation of tolerance whilst attenuating pathogenicity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**:1–5. Dostupné z <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00143/abstract>.
- Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME Journal* **6**:320–329. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.109>.
- Xie W, Gu D, Li J, Cui K, Zhang Y. 2011. Effects and action mechanisms of berberine and *Rhizoma coptidis* on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *PLoS ONE* **6**:1–10.
- Yan D, Han YM, Wei L, Xiao XH. 2009. Effect of berberine alkaloids on *Bifidobacterium adolescentis* growth by microcalorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **95**:495–499.

- Yifei Z et al. 2018. Probiotics Plus Berberine as an Anti-Diabetic Regimen in Patients with Type 2 Diabetes, Particularly in the Elderly: A Multicentre Randomised Controlled Trial. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3204706>
- Zavoral M, Vojtěchová G, Suchánek Š. 2013. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie (Switzerland)* 7:172–175.
- Zhang X et al. 2015. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats. *Scientific Reports* 5:1–10.
- Zhou JJ, Zheng S. 2013. Colorectal Cancer: Basic and Translational Research. *Gastrointestinal tumors* 1:18–24. Dostupné z <http://www.karger.com/Article/FullText/354994>.