

**UNIVERZITA KARLOVA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra Biochemie

**Bakalářská práce**

**2020**

**Osipov Artem**

# UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Artem Osipov

**Anaerobní metabolismus léčiv a potravních doplňků - modely  
zažívací soustavy**

**Anaerobic metabolism of drugs and nutraceuticals - models of  
digestive tract**

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11.06.2020

## **Abstrakt**

Tato práce předkládá výběrový přehled literatury o mikrobiomu, se zaměřením na střevní mikrobiom, který je reprezentován přednostně anaerobními a obligátně anaerobními bakteriálními druhy. Soustředila se především na hlubší pochopení interakcí střevního mikrobiomu a hostitele v aplikační oblasti medicíny a farmakologie, proto část mojí práce je věnována tomu, jak za anaerobních podmínek tlustého střeva bakterie lidského mikrobiomu metabolizují nutrienty a léčiva. S cílem shrnutí současných poznatků o metabolismu sloučenin vlivem mikroorganismů. V další části se věnuje popisu moderních metod modelování interakcí lidského gastrointestinálního traktu a bakteriální kultury. V závěrečné části práce je podrobněji popsán modelový systém «gut-on-chip», který je momentálně jednou z nejmodernějších a nejperspektivnějších metod studování anaerobního metabolismu potravních doplňků a léčiv.

## **Abstract**

This work presents a selective review of the literature on the microbiome, focusing on the intestinal microbiome, which is preferably represented by anaerobic and obligately anaerobic bacterial species. It focused mainly on a deeper understanding of the interactions of the intestinal microbiome and the host in the field of medicine and pharmacology, so part of my work is devoted to the metabolism of nutrients and drugs provided by bacteria of the human microbiome under anaerobic conditions of the large intestine in order to summarize current knowledge about the metabolism of compounds by microorganisms. The next part describes the modern methods of modeling the interactions of the human gastrointestinal tract and bacterial culture. The final part of the thesis describes in more detail the model system «gut-on-chip», which is currently one of the most modern and promising methods of studying the anaerobic metabolism of food supplements and drugs.

### **Klíčová slova:**

střevo, mikrobiom, metabolismus, léčivo, bakterie, metody, anaerobní podmínky

### **Key words:**

gut, microbiome, metabolism, drug, bacteria, methods, technique, anaerobic condition

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za jeho otevřený přístup a věcné rady v průběhu konzultování této práce.

Zároveň srdečně dekuji svým rodičům a známým, kteří mě v průběhu celého bakalářského studia podporovali.

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Střevní mikrobiom.....	9
2.1	Historie zkoumání lidského mikrobiomu.....	9
2.2	Složení střevního mikrobiomu.....	10
2.3	Mikrobiota tenkého střeva .....	11
2.4	Anaerobní metabolismus nutrientů zajištěný mikrobiomem.....	12
2.4.1	Anaerobní metabolismus sacharidů v tlustém střevě.....	13
2.4.2	Produkce bakteriálních plynů v tlustém střevě .....	15
2.4.3	Anaerobní metabolismus tuků v tlustém střevě .....	17
2.4.4	Anaerobní metabolismus proteinů v tlustém střevě .....	17
2.5	Metabolismus žlučových kyselin v tlustém střevě.....	22
2.6	Syntéza vitaminů .....	24
2.7	Metabolismus fenolik.....	25
3	Anaerobní metabolismus léčiv zajištěný střevním mikrobiomem .....	27
3.1	Biotransformace perorálně podávaných léčiv (podle Dostálek, 2006) .....	27
3.2	Metabolické reakce zprostředkované střevním mikrobiomem.....	27
3.2.1	Redukční metabolismus.....	27
3.2.2	Demethylace, deaminace, dealkylace, dehydratace, dekarboxylace a oxidace.....	30
4	Moderní metody studia střevního mikrobiomu.....	32
4.1	Problém s <i>ex vivo</i> modelováním střevního mikrobiomu.....	32
4.2	Použití bioreaktorů ve výzkumu střevního mikrobiomu .....	35
4.3	Model zažívací soustavy «Gut-On-Chip» (podle Jalili-Firoozinezhad a kol., 2019) .....	37
5	Závěr .....	41
6	Literatura .....	42

## **Seznam zkratek**

**5ASA** - 5-aminosalicylová kyselina

**BCFA** - rozvětvené mastné kyseliny

**CA** - kyselina cholová

**CDCA** – kyselina chenodeoxycholová

**DCA** – kyselina deoxycholová

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**GIT** – gastrointestinální trakt

**LCA** – kyselina lithocholová

**MALDI-TOF** - hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční ionizací v matrici a průletovým analyzátozem

**PDMS** - dimethylsiloxanový polymer

**RNA** – ribonukleová kyselina

**16S rRNA**- 16S ribosomální ribonukleová kyselina

**TLR4** - Toll-like receptor 4

**SCFA** - mastné kyseliny s krátkým řetězcem

**UDCA** - kyselina ursodeoxycholová

**SIP** - sondování stabilními izotopy

# 1 Úvod

Lidské tělo je místem výskytu velkého množství mikroorganismů, které kolonizují všechny povrchy, jež nějakým způsobem dostávají do kontaktu s vnějším prostředím. Kůže, dýchací cesty, gastrointestinální a urogenitální trakt jsou místem bakteriálního osídlení, souhrně označovaného jako mikrobiom (také microbiota, mikroflóra). V této práci se soustředíme zejména na mikrobiom lidských střev.

Běžně střevní mikrobiom člověka obsahuje celkem jeden kilogram bakterií, většinou obligatně anaerobních. V mikrobiomu gastrointestinálního traktu (GIT) zdravého dospělého jedince je typicky dominují grampozitivní *Firmicutes*, gramnegativní *Bacteroidetes*, menší zastoupení mají *Actinobacteria*, *Proteobacteria* a *Verrucomicrobia*. Celkem je přítomno tisíc mikrobiálních druhů, které mají zhruba 9 milionů unikátních genů.

Na střevní mikrobiom mají vliv onemocnění GIT, navíc jeho složení a aktivitu bakterií ovlivňují i faktory jako věk člověka a životní prostředí, proměňuje se s cirkadiálními rytmy. Je také ovlivňován farmakologickými zásahy naopak ovšem může působit na léčiva, která se dostanou do GIT.

Při navrhování nového léčiva prochází tato sloučenina různými testy, při nichž se kontroluje nejen její účinnost, ale i případná toxicita nebo vedlejší účinky. Je také třeba poznat co nejlépe její metabolismus. Součástí tohoto studia by mělo být také poznání interakce zkoumané látky a mikrobiomu. Ačkoliv se této problematice poslední dobou věnuje zvýšená pozornost, je nutno přiznat, že dosavadní rozsah poznání není dostatečný. Svou roli hraje i to, že střevní mikrobiom není statický, ale proměnlivý a to i v závislosti na farmakologickém zásahu (hlavně antibiotiky, ale i jinými léky).

Střevní mikrobiom také zajišťuje metabolismus živin, které se dostávají do organismu s potravou. Můžeme říct, že bakterie jen «napomáhají» hostitele zpracovávat potřebné živiny a získávat energie a nutné substráty na syntézu jiných složek, nicméně metabolity biochemických pochodů mohou ovlivňovat imunitní systém hostitele a tak ovlivňovat exprese určitých genů a obecně mít vliv na fyziologii člověka.

Funkce mikrobiomu můžou být použity na zlepšení klinické odezvy třeba tak, že využijeme enzymy, exprimované mikrobiomem na přímou aktivaci neúčinné formy léku (proléčiva) nebo na změnění jeho metabolismu. Příkladem aktivace proléčiva mikrobiomem slouží



sulfalazin, který je vlivem střevních bakterií transformován na sulfapyridin a 5-aminosalicylovou kyselinu (5ASA).

Moje bakalářská práce je tak věnována kompletnímu přehledu anaerobního metabolismu látek působením střevních bakterií.

## 2 Střevní mikrobiom

### 2.1 Historie zkoumání lidského mikrobiomu (podle Pariente, 2019)

I když je studium střevního mikrobiomu dnes považováno za relativně moderní oblast výzkumu, má poměrně bohatou historii (pro její poznání je možno využít sbírky Nature Milestones (Pariente, 2019)). První popisy lidského mikrobiomu sahají až do 70. let sedmnáctého století, kdy Antonie van Leeuwenhoek začal používat nově sestrojený mikroskop. V jeho dopisech, které byly věnovány Královské společnosti v Londýně (1683) bylo popsáno a ilustrováno pět bakteriálních druhů přítomných v jeho ústech. Později také srovnával orální a fekální mikrobiom a popsal určité rozdíly.

V roce 1890 byly publikovány velmi známé Kochovy postuláty, čtyři kritéria definující souvislost mezi patogenem a nemocí. V té době byl široce populární výzkum bakteriálních patogenů, převážně aerobních - jelikož ale drtivá většina bakterií střevního mikrobiomu potřebuje anaerobní podmínky, tomuto tématu nebylo věnováno příliš pozornosti.

Metody zkoumání anaerobních mikroorganismů byly zaváděny od 40. let 20. století a tím začal růst zájem o složení a funkční schopnost střevního mikrobiomu (Clark, 2019). Poznání, že normální pokusní laboratorní potkaní mají jinou fyziologii než bezmikrobní potkaní, vedlo k dalším pokusům. Nakonec se zjistilo, že fyziologie takzvaných «germ-free» potkanů může být rekonstituována pomocí kolonizací bakteriemi z fekálních vzorků normálních potkanů (Eberl a kol., 2020).

Hlubší porovnání bezmikrobních a normálních zdravých potkanů v 60. letech 20. století a také rozvoj biochemických metod zkoumání vedlo k dalšímu porozumění životnímu cyklu bakterií a složení střevního mikrobiomu (Pariente, 2019). První použití transplantace fekálních bakterií je datováno rokem 1958 a provedeno Benem Eisemanem (Eiseman a kol., 1958). Schopnost střevního mikrobiomu metabolizovat léčiva byla poprvé zjištěna před téměř 50 lety (Scheline, 1968, Scheline, 1973) a zájem o tuto problematiku jenom vzrůstal. V 80. letech minulého století Woese a spolupracovníci zjistili, že fylogenetické vztahy mezi bakteriemi můžou být zkoumány studováním stabilní části jejich genetického kodu (Woese, a kol, 1985, Woese, 1987).

Bez ohledu na to, že řada článků uvádí, že sám pojem mikrobiom byl poprvé zaveden mikrobiologem Joshua Lederbergem v roce 2001 (Lederberg a kol., 2001), můžeme se s tím slovem setkat také už ve dřívějších studiích. Například práce (Whipps a kol., 1988) z roku

1988 poskytuje dobrou definici tohoto pojmu, zcela platnou i v současnosti. Mikrobiom je tu definován jako «charakteristická mikrobiální komunita zabírající dobře definované stanoviště, které má odlišné fyzikální-chemické vlastnosti».

Prudký rozvoj výzkumu střevního mikrobiomu přichází jako důsledek zavedení hmotnostní spektrometrie (zejména techniky MALDI-TOF; hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční ionizací v matrici a průletovým analyzátozem). Zavedení sekvenování 16S rRNA rovněž výrazně zvýšilo možnosti studia mikrobiomu GIT (Woese, 1987, Ravel, 2015).

## 2.2. Složení střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom člověka je velmi různorodý a skládá se z asi 500 bakteriálních druhů, které mají různé zastoupení u každého jedince. Celkem se počet buněk odhaduje na  $10^{13}$ - $10^{14}$  mikroorganismů (Pabst, 2017), což je velmi podobné počtu vlastních buněk v lidském organismu. Nejhojnější zastoupení má oddělení *Bacterioides* (nomenklatura je podle (Bednar a kol., 1996). Obecně lze říct, že GIT zdravého člověka obvykle obsahuje mikroorganismy ze dvou základních oddělení: gram-pozitivní *Firmicutes*, gram-negativní *Bacteroidetes*. O něco menší zastoupení mají *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrumicrobia* (Eckburg, a kol., 2005).

Složení mikrobiomu celého GIT není v každém jeho úseku stejné. Různé části tenkého střeva mají různé bakteriální zastoupení. Například v mikrobiomu jejunu a ilea dominují aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, k nimž patří zejména *Enterococci*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Lactobacilli*, *Staphylococci*, a *Streptococci*. Mikrobiom slepého střeva se skládá hlavně z obligatně anaerobních bakterií jako jsou *Lactobacillus*, *Enterococcus*, a *E. coli*. Hlavními bakteriálními skupinami tlustého střeva jsou striktní anaeroby, například *Clostridium coccooides* a *Clostridium leptum*. (Hayashi a kol., 2005, Marteau a kol., 2001).

Složení střevního mikrobiomu člověka je značně ovlivněno velkým množstvím faktorů včetně pohlaví. Tak bylo zjištěno, že rody *Lactobacillus*, *Prevotella* a *Streptococcus* mají větší zastoupení u žen, než u mužů (Fransen a kol., 2017). Pozoruhodná nedávná studie z roku 2020 přinesla nové poznatky o korelaci složení a rozmanitosti střevního mikrobiomu s lidským temperamentem a dokonce s psychickými onemocněními. Tak zvýšené zastoupení rodů *Akkermansia*, *Lactococcus* a *Oscillospira* bylo asociováno s lepšími společenskými schopnostmi, naopak jejich nedostatek má spojení s autistickými symptomy (Johnson, 2020).

Zajímavé, že GIT je v prenatální periodě života sterilní, ale okamžitě po narození je vystaven kolonizaci a působení bakterií. Střevní mikrobiom se významně liší už u novorozenců v závislosti na tom, zda porod probíhá vaginální cestou nebo za použití císařského řezu. Při přirodním porodu bude GIT dítěte kolonizován mateřskými vaginálními a fekálními bakteriemi, přednostně jsou to rody *Lactobacillus*, *Prevotella* a *Sneathia*. Na druhou stranu po provedení císařského řezu je střevní mikrobiom novorozence obohacen o takové bakteriální rody jako *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a jiné, v závislosti na prostředí porodnice (Rodríguez a kol., 2015, Biasucci a kol., 2010). Jak ukazují studia, rod *Bifidobacterium* z oddělení *Actinobacteria* je dominantní bakteriální skupinou u zdravých novorozenců.

Zajímavá studie (Arumugam a kol., 2011) z roku 2011 naznačuje, že lidskou populaci lze rozdělit na tři enterotypy: *Bacterioides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2), *Ruminococcus* (enterotyp 3). Během života se složení mikrobiomu mění: tak starší lidé mají větší podíl bakterií oddělení *Bacterioides* a naopak ve srovnání s mladými lidmi jim chybí některé druhy rodu *Clostridium* (Claesson a kol., 2011).

Kvůli rozdílům ve složení mikrobiomu u různých lidí a těžkostem zkoumání anaerobních a nekultivovatelných bakterií není však jednoduché říct, jaké přesné složení má střevní mikrobiom zdravého jedince. Je ale možno popsat složení a aktivitu bakterií tlustého a tenkého střeva.

## **2.3 Mikrobiota tenkého střeva**

Většina moderních studií je zaměřena na výzkum bakteriálního složení ve fekálních vzorcích, jinými slovy na mikrobiom tlustého střeva. Ačkoliv účelem mojí práce je popis anaerobního metabolismu látek, který probíhá hlavně v tlustém střevě, je důležité také vědět, jakým podmínkám jsou vystaveny sloučeny procházející přes tenké střevo a s jakými bakteriemi přicházejí do styku.

Tenké střevo je drsným prostředím pro mikrobiální život kvůli krátkému času průchodu a vylučování trávicích enzymů a žluči a proto vyžaduje odlišné strategie přežití mikrobů ve srovnání s těmi, které žijí v tlustém střevě. Tlusté střevo má naopak lepší podmínky pro bakteriální aktivitu, má velkou tranzitní dobu, vhodné pH spolu s nízkou buněčnou regenerací a redoxním potenciálem (Zoetendal a kol., 2012).

Bohužel nemáme moc informací o mikrobiomu tenkého střeva hlavně kvůli obtížím při vzorkování. Dá se ale říci, že mikrobiom tenkého střeva je celkově méně komplikovaný, než mikrobiom tlustého střeva. Sliznice tenkého střeva je nepřerušovaná, klky většinou nejsou pokryty mucinem a vnitřní vrstva hleny skoro neobsahuje žádné mikroby. Mikrobiální populace na povrchu můžou být odlišné a ve většině případů plní různé úlohy v rámci ekosystému (Merkunová a kol., 2008).

Nehledě na to, že se aminokyseliny považují za hlavní energetický zdroj lidského tenkého střeva (Wu, 1998), jejich biologická dostupnost pro bakterie je omezena, což stimuluje jejich *de novo* syntézu. Existuje velká fylogenetická distribuce genů souvisejících s centrálními metabolickými drahami, což ukazuje, že mikrobi v tenkém střevě mají rozsáhlý repertoár genů zapojených do importu a využití různých cukrů. Je nutno poznamenat, že bakterie obsahují geny související se syntézou kofaktorů jako kobalamin a biotin. Syntéza biotinu je fylogeneticky vztažena k oddělením *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Je třeba říct, že absorpce biotinu epiteliálními buňkami probíhá přímo ve střevě, proto můžeme dospět k závěru, že střevní bakterie do nějaké míry přispívají k zásobování organismu biotinem (Said, 2009).

Stejná práce (Zoetendal a kol., 2012) se zabývala měřením změn pH tenkého střeva v závislosti na čase a bylo potvrzeno, že pH vzorků, odebraných ráno, bylo o jednotku nižší, než v poledne. Podle autorů článku jde o důkaz vysokých nutričních fluktuací. V tenkém střevě byly detekovány vysoké koncentrace acetátu, laktátu a butyrátu, což potvrzuje aktivitu fermentujících bakterií. Důležité je to, že koncentrace acetátu a butyrátu v tenkém střevě byly stejné, jako v fekálních vzorcích, avšak koncentrace propionátu byla 3-5krát nižší, než v tlustém střevě. Jelikož bylo prokázáno, že metagenom bakterií tenkého střeva obsahoval více genů přiřazených k fermentačním cestám molekul butyrátu, můžeme usoudit, že tlusté střevo je kolonizováno větším množstvím bakteriálních druhů, schopných přímé syntézy butyrátu. Vysoké koncentrace acetátu a butyrátu jsou výsledkem přítomnosti a aktivity rodů *Streptococcus* a *Clostridium*.

## **2.4 Anaerobní metabolismus nutrientů zajištěný mikrobiomem**

Tři makronutrienty, přítomné v potravě člověka, jsou sacharidy, bílkoviny a tuky. Jelikož jedním z předmětů zájmu mé práce je anaerobní anabolismus, který probíhá v tlustém střevě, je důležité říct o osudu těchto makronutrientů právě v tomto úseku gastrointestinálního traktu. Sacharidy, bílkoviny a tuky se mohou dostat do tlustého střeva buď tak, že nepodstoupí

primární vstřebání například proto, že množství potravy převyšuje vstřebávací schopnosti, anebo díky strukturní složitosti vlastních biomolekul (a jejich následné obtížné štěpitelnosti) (Yao a kol., 2016).

### **2.4.1 Anaerobní metabolismus sacharidů v tlustém střevě**

Jak už bylo zmíněno, mikrobiom tlustého střeva zpracovává ty sacharidy, které nebyly vstřebány ve vyšších úsecích GIT. Lidské buňky produkují velmi málo enzymů na štěpení polysacharidů, i když jimi je produkována amylasa, což je hydrolasa, zajišťující štěpení škrobu v tenkém střevě. Lidé nemají schopnost štěpit komplexní polysacharidy vlákniny jako inulin a některé nestravitelné sacharidy jako rezistentní škrob (Cummings a kol., 1987). Většina těchto polysacharidů se tak dostane do tlustého střeva nepozměněna, proto jejich štěpení realizují střevní bakterie. Lidská dieta obsahuje i některé nestravitelné oligosacharidy. Příkladem mohou sloužit rafinosa a stachyosa (Scott a kol., 2008). Také jejich metabolismus se odehrává v tlustém střevě.

Polysacharidy mohou být propojeny mezi jednotlivými monosacharidy rozdílnými vazbami. Bakterie tlustého střeva proto mají řadu enzymů, které jsou schopné tyto typy vazeb štěpit (Bhattacharya a kol., 2015). Například *Bacteroides Thetaiotaomicron* má ve svém genomu na 260 glykosidhydrolas (Xu a kol., 2003), a to jen potvrzuje evoluční požadavek na přizpůsobení s cílem maximálního využití škrobu a dalších polysacharidů, dostupných jako součást lidské výživy. Monosacharidy mohou být konzumovány střevním mikrobiomem s malou interkonverzí nutnou pro vstoupení substrátů do glykolysy, Entner-Doudoroff dráhy a pentosofosfátovou dráhy na produkci pyruvátu a ATP (Wolfe, 2015).

Střevní mikrobiom má několik různých strategií zpracování pyruvátu, který může být získán nejen ze sacharidů, ale i z dalších substrátů. Pyruvát může být katabolizován za vzniku sukcinátu, laktátu nebo acetyl-CoA. Ve fekálních vzorcích zdravého jedince se však tyto metabolity nenacházejí ve vysokých koncentracích, jelikož jsou spotřebovány jinými bakteriemi za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem: acetátu, propionátu a butyrátu. Některé práce (Macfarlane a kol., 1992) ukazují zastoupení těchto kyselin v fekálních vzorcích v molárním poměru v rozmezí 3:1:1 až 10:2:1.

Tyto tři kyseliny hrají velmi různé a důležité role v lidském organismu. Butyrát je pravděpodobně nejdůležitější mastnou kyselinou v lidském těle, které zajišťují nejprvé klíčový energetický zdroj pro kolonocyty a zadruhé mají antitumorovou funkci díky kontrole

apoptozy rakovinných buněk střeva a schopností regulovat genovou expresi inhibicí histonových deacetylaz (Steliou a kol., 2012). Existují rovněž důkazy, že butyrát má svoji úlohu v aktivaci intestinální glukoneogeneze mechanismem založeným na cAMP, což má pozitivní vliv na energetickou homeostázu (De Vadder a kol., 2014). Hlavní producenty butyrátu ve střevním mikrobiomu jsou *Firmicutes*, *Lachnospiraceae* a *Faecalibacterium prausnitzii*.

Tvorba propionátu je pak charakteristická pro *Bacteroides*, *Negativicutes* a některé druhy oddělení *Clostridium* (Vital a kol., 2014). Propionát se také podílí na glukoneogenezi v játrech a stejně jako butyrát je zdrojem energie pro epitelální buňky střeva. Je zajímavé, že propionát je důležitou molekulou v signalizaci pocitu nasycení díky interakcím se střevními receptory GPR 41 a GPR 43, které následovně aktivují intestinální glukoneogenezi (Tazoe a kol., 2008). Konverze propionátu na glukosu během intestinální glukoneogeneze podporuje energetickou homeostázu tím, že snižuje produkci jaterní glukosy a následně potlačuje obezitu (De Vadder a kol., 2014).

Acetát je nejvíce zastoupená mastná kyselina s krátkým řetězcem, která je nezbytná pro růst bakterie. Například rozmnožování *Faecalibacterium prausnitzii* je nemožné za nepřítomnosti acetátu (Duncan a kol., 2004). V lidském těle je acetát transportován do okolních tkání, podílí se na syntéze cholesterolu a účastní se lipogeneze. Nedávné výzkumy (Frost a kol., 2014) také ukazují, že acetát má roli v chuťové regulaci.

Bakterie samozřejmě vytvářejí takové přechodné látky jako fumarát, sukcinát a laktát, které ale jsou zastoupeny ve fekáliích zdravých jedinců v dostatečně zanedbatelných množstvích (Rowland a kol., 2018). Například laktát je transformován na propionát nebo butyrát jinými bakteriemi, takže laktátu je ve fekáliích jen velmi málo. Naopak u lidí, kteří trpí ulcerativní kolitidou je množství laktátu ve fekáliích výrazně vyšší a laktát je sám o sobě indikátorem tohoto onemocnění (Bjerrum a kol., 2015). Výsledky výzkumu (Belenguer a kol., 2006) ukazují, že laktát, který byl produkován izolovaně kulturou *Bifidobacterium longum* na fruktooligosacharidovém mediu zcela zmizel, jakmile k systému byla přidána bakterie *Eubacterium hallii*. Avšak objevilo se značné množství butyrátu, bez ohledu na to, že *E. hallii* nemůže růst na sacharidovém substrátu. Další zajímavý výzkum (Louis a kol., 2010) ukazuje, že růst *Roseburia intestinalis* je stimulován acetátem, nicméně rozmnožování v mediu s přídavkem kultury s *B. longum* ukázal, že růst *R. intestinalis* byl potlačen až do té doby, když se v mediu nahromadilo dostatečné množství acetátu, produkováného bakteriemi *B. longum*.

## 2.4.2 Produkce bakteriálních plynů v tlustém střevě

Fermentace sacharidů střevními bakteriemi je ve velké míře asociována s produkcí takových plynů, jako jsou vodík, oxid uhličitý, sulfan a methan (Louis a kol., 2014). Ve vytvořeném plynu dominují vodík, oxid uhličitý (podrobněji viz níže) a dusík, jehož zastoupení je zhruba 25 %, podíl kyslíku se odhaduje na jedno procento (Suarez a kol., 1997). Srovnatelné nebo ještě menší zastoupení, kolem 1 %, mají amoniak, sulfan, indol, skatol, těkavé aminy (Suarez a kol., 1997).

Tvorba plynů však není univerzální vlastnost všech anaerobních bakterií. Následkem fermentační aktivity některých druhů se tak netvoří žádné plyny, například když jde o probiotika jako *Lactobacilli* a *Bifidobacteria* (Levitt a Bond, 1970). Z toho pak vyplývá, že využití probiotik může snížit tvorbu plynů v GIT člověka a tím pádem zabránit vzniku nepříjemných obtíží či chorob. Plyn, produkovaný v důsledku anaerobní bakteriální fermentace může být částečně eliminován plicemi nebo větry. Některá studia ukazují, že celkové množství plynu, eliminovaného jako flatus, může dosahovat až několika litrů denně (Cummings a Macfarlane, 1991).

Vodík tvoří asi 40% obsahu flatu a je pravděpodobně výhradně mikrobiálního původu (Wolf a kol., 2016). Dominantními producenty vodíku jsou *Bacteroides* a *Clostridium*, které patří k nejzastoupenějším bakteriálním oddělením v GIT. Celkové množství vodíku vytvořené bakteriemi GIT značně převyšuje množství eliminovaného vodíku, protože jeho velká část je použita přímo v GIT (Christl a kol., 1992).

Existují tři hlavní metabolické cesty pomocí nichž vodík může být odstraněn, aby se zoxidovaly elektronově bohaté produkty jako laktát, sukcinát a etanol. Jsou to disimilační redukce sulfátu, biochemické pochody jako metanogeneze a acetogeneze.

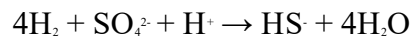
Disimilační redukce sulfátu se provádí takzvanými sulfátredukčními (SRB) bakteriemi. Tyto mikroorganismy používají sulfát jako akceptor elektronů na disimilaci organických substrátů a vodíku (Wolf a kol., 2016).

Hlavní rod střevních sulfátredučních bakterií je *Desulfovibrio* (Christl a kol., 1992).

Organismus získává sulfáty s potravou. Sulfát se také tvoří v důsledku mikrobiálního metabolismu síru obsahujících aminokyselin a sulfátovaných mucinů, které jsou glykoproteiny obsažené v gastrointestinálním traktu, účinkující jako lubrikanty a představující bariery mezi mukozovým povrchem a lumenem střeva.

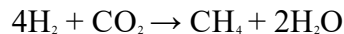


Vodík jako redukční činidlo redukuje sulfát a vzniká sulfid, tato reakce značně ovlivňuje celkové množství vodíku v GIT.



Je nutno poznamenat, že sulfan má toxické vlastnosti a může mít patologické následky pro člověka (Bhatia, 2012).

Metanogeneze je další mechanismus spotřeby vodíku:



Bakterie schopné metanogeneze a redukce sulfátu soutěží v gastrointestinálním traktu o vodík a to, jaký proces převažuje, záleží na množství dostupného sulfátu (Tomasova a kol., 2016).

Když je přítomen dostatek sulfátu, činnost sulfátredukčních bakterií převažuje díky větší afinitě k substrátu. Metanogeneze a disimilační redukce sulfátu jsou zásadní cesty spotřeby vodíku. Vzácnější využití vodíku představuje proces acetogeneze, při němž vodík reaguje s oxidem uhličitým za vzniku acetátu (Christl a kol., 1992).



Oxid uhličitý je druhým důležitým plynem, který je též součástí flatu, jeho procentní zastoupení kolísá mezi 5 až 50 %. Některé druhy *Clostridia* jako *C. sporogenes*, *C. butyricum*, a *C. perfringens* jsou schopné vytvářet vodík a oxid uhličitý najednou (Rowland, a kol., 2018). Jak bylo zmíněno,  $\text{CO}_2$  je recyklován spolu s vodíkem cestou methanogenezí a acetogenezí (Lajoie a kol., 1988).

Na rozdíl od vodíku a methanu může být oxid uhličitý tvořen velkou řadou různých pochodů, nejenom bakteriálním metabolismem v GIT. Tři zásadní možnosti, jak se může v GIT objevit  $\text{CO}_2$  jsou zaprvé difuze z krve do tlustého střeva, zadruhé okyselení hydrogenuhličitánu v horních částech gastrointestinálního traktu a nakonec bakteriální metabolismus (Suarez a kol., 1997).

Produkce plynu střevním mikrobiomem může mít určité klinické následky. Například společným rysem syndromu dráždivého tračnicku je nadměrná tvorba plynů a flatu, což poté může vést k nadýmání. Nepřítomnost mechanismu recyklování bakteriálního vodíku vede k pneumatisis cystoides intestinalis, která se vyznačuje nadměrnou produkcí plynů a

přítomností přeplněných plynem cyst na stěnách střeva. Absence SRB pak vede k tomu, že aktivita metanogenních a acetogenních bakterií produkuje pět až desetkrát více plynu než je obvykle (Christl a kol., 1993).

Přítomnost methanu v tlustém střevě je spojená s kolorektální rakovinou. Autoři výzkumu se ale domnívají, že tento fakt může být spíš důsledkem než příčinou onemocnění. Nemocní rakovinou mají sníženou dobu průchodu tlustým střevem a to vede k rozmnožování metanogenů (Flick a kol., 1990).

Lidé, kteří trpí nesnášenlivostí laktosy, mají problém s absorpcí laktosy v vyšších částech GIT, což znamená, že se laktosa dostává do tlustého střeva, kde je fermentována bakteriemi, a tak je produkován plyn (Szilagyí a Ishayek, 1994).

### **2.4.3 Anaerobní metabolismus tuků v tlustém střevě**

Jenom 5 % tuku přijatého z potravy se dostane do tlustého střeva. Střevní bakterie mají lipasy, které degradují triglyceridy a fosfolipidy. Triglyceridy představují asi 95 % tuků z potravních zdrojů, fosfolipidy většinou ve formě fosfatidylcholinu mají menší zastoupení a mohou mít endogenní původ ze žlučových kyselin (Iqbal a Hussain, 2009). Určité bakterie GIT jako *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Clostridia* a *Proteobacteria* mohou využít triglyceridovou kostru jako akceptor elektronů a redukovat glycerol na 1,3-propandiol (De Weirdt a kol., 2010). Intermediátem toho procesu je 3-hydroxypropanal (reteurin), který má antimikrobiální vlastnosti (Cleusix a kol., 2007).

Bakterie neumí v anaerobních podmínkách střeva degradovat volné tuky (free lipids). Navíc je prokázáno, že tuky mají antimikrobiální vlastnosti a působí na receptory hostitele. Příkladem slouží nenasycené mastné kyseliny, které jsou agonisté TLR4 receptorů a po navázání mohou vyvolávat záněty. Naopak nenasycené omega-3 kyseliny jsou antagonisté těchto receptorů, a tak organismus před záněty chrání (Cândido a kol., 2018).

### **2.4.4 Anaerobní metabolismus proteinů v tlustém střevě**

Výzkum (Macfarlane a kol., 1986) zabývající se bílkovinným metabolismem bakterií tlustého střeva ukázal, že mikrobiom má značnou proteolytickou aktivitu, konvertuje bílkoviny endogenního a exogenního původu na kratší peptidy, aminokyseliny a mastné kyseliny.

Bez ohledu na to, že se tato práce prováděla jednoduchou a nepřesnou metodou, autoři dokázali identifikovat *Bacteroides* a *Propionbacterium* jako nejvíce zastoupené bakteriální druhy, které měly proteolytickou aktivitu a byly nalezeny ve fekálních vzorcích. Mnohem později bylo potvrzeno, že tuto aktivitu rovněž mají *Clostridia*, *Streptococci*, *Staphylococci* a druhy *Bacillus* (Macfarlane a Macfarlane, 2006). Zajímavé je to, že Gibson se svojí skupinou ukázal, že proteolytická aktivita fekálního mikrobiomu se liší od mikrobiomu ilea (Gibson a kol., 1989). Fekální proteolýza je účinnější v degradaci hovězího sérového albuminu, což je globulární protein. Proteolytická aktivita fekálních bakterií je však nižší, než u bakterií v ileu.

Je nutné říct, že bakteriální vliv na celkovou proteolýzu metabolitů je prakticky zanedbatelný. Svědčí o tom procentní zastoupení proteolytických enzymů v fekálních vzorcích, kde se nachází daleko více enzymů hostitele, než enzymů bakteriálního původu. Aminokyseliny nejsou obecně považovány za zdroj energie, tak jako například sacharidy pro střevní mikrobiom, a proto není překvapením, že bakterie přednostně využívají a metabolizují sacharidy, než proteiny, samozřejmě v závislosti na poměru jejich zastoupení a dostupnosti.

Vstřebávání proteinů člověkem je variabilnější, než cesty vstřebání sacharidů a tuků, a značně záleží na faktorech, spojených s tím, jak byla potrava zpracovaná, v jakém poměru k ostatním makronutrientem ten protein je, jestli je protein rostlinného nebo živočišného původu. Tyto faktory ovlivňují to, jaké aminokyseliny a v jakém poměru budou dostupné mikrobiomu (Yao a kol., 2016).

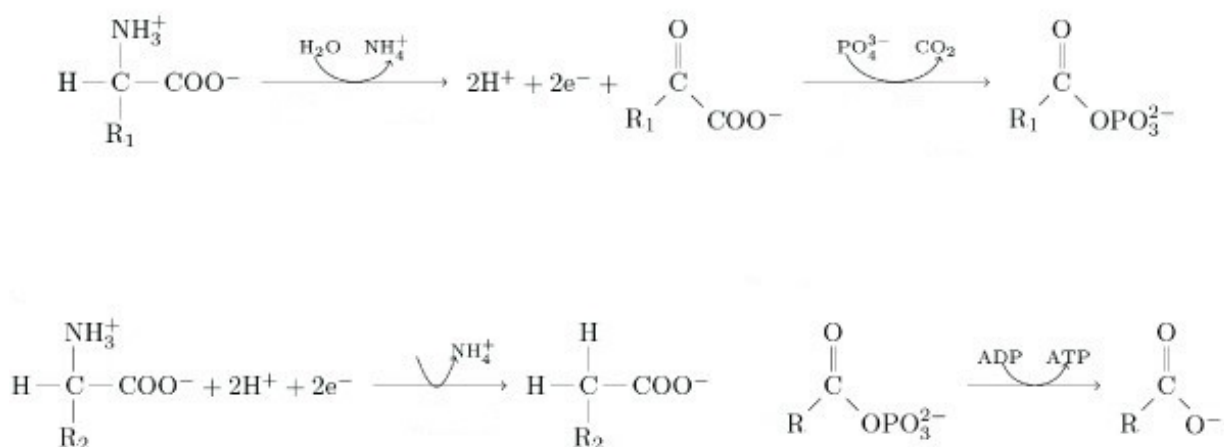
Obecně vzato, katabolismus proteinů ve střevě má negativní vedlejší význam, jelikož tvořené látky jsou většinou pro člověka toxické. Toxicitu mohou projevovat aminy, fenoly a indoly. Je taky důležité povšimnout, že se propionát a butyrát vytváří po fermentaci peptidů a aminokyselin určitými druhy *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Lin a kol., 2017). Výzkumy *in vitro* demonstrují, že aspartát, alanin, threonin a methionin jsou klíčové zdroje propionátu, zatímco butyrát je většinou získán fermentací glutamátu, lysinu, histidinu, cysteinu, serinu a methioninu.

Určité práce ukazují, že bakterie mají buď schopnost produkovat propionát, nebo butyrát. Jenom málo druhů mohou exprimovat enzymatické proteiny pro produkci obou mastných kyselin. Například *Roseburia inulinivorans* je producent butyrátu, ale za určitých podmínek může zcela změnit expresi svých genů. Tak bude exprimovat skupiny genů, schopné využívat fukosu jako zdroj energie a produkovat propionát a propanol pomocí cesty utilizace

propandiolu (Cummings a Macfarlane, 1991). Fukosa je zejména důležitý substrát pro organismus člověka, poněvadž hodně epiteliálních glukokonjugátů je fukosylováno. Možnost ovlivnění vlastního metabolismu podle aktuální dostupnosti substrátů poskytuje bakteriím možnost přežít podmínky nedostatku primárně žádoucích sloučenin, potřebných k rozmnožování. U *Bacteroides thetaiotaomicron* přítomnost fukosy jakožto růstového substrátu stimuluje expresi genů, jež se účastní fukosového metabolismu.

Pokud jde o katabolismus aminokyselin, bakterie provádějí buď deaminaci za tvorby karboxylové kyseliny a amoniaku, nebo dekarboxylaci s tvorbou aminu a oxidu uhličitého (Cremin a kol., 2003). Podle některých studií amoniak inhibuje mitochondriální spotřebu kyslíku a tímto způsobem snižuje katabolismus mastných kyselin intestinálními epiteliálními buňkami (Hughes a kol., 2008). To vede ke předpokladu, že zvýšená tvorba amoniaku negativně ovlivňuje organismus člověka (Eklou-Lawson a kol., 2009). Je třeba však poznamenat, že střevní bakterie mají schopnost rychlé asimilace amoniaku do mikrobiálních aminokyselinových syntetických pochodů a intestinální epiteliální buňky mohou regulovat koncentraci amoniaku konverzí do citrulinu a glutaminu (Oliphant a Allen-Vercoe, 2019). Proto není to úplně jasné, jaké množství katabolizovaného proteinu vytváří toxickou a nebezpečnou koncentraci amoniaku, navíc se daný parametr liší od člověka k člověku.

Další kroky závisejí na typu výchozí aminokyseliny, přičemž většina nakonec vede k meziproductům Krebsova cyklu, vzniku pyruvátu nebo prekurzorů mastných kyselin spojených s koenzymem A (Kanehisa a Goto, 2000, Louis a Flint, 2017). Za zvláštní zmínku stojí Sticklandovy reakce, které jsou uskutečňovány určitými druhy *Clostridium*, při nichž probíhá zároveň redukce a oxidace dvou aminokyselin za využití protonů jako elektronových akceptorů (Vladar, 2012), viz obrázek č. 1.



Obrázek 1.: Sticklandovy reakce zprostředkované bakteriemi rodu *Clostridium*, převzato a upraveno z (Vladar, 2012)

Jako konečné produkty mohou být vytvořeny mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem.

Rozvětvené mastné kyseliny (BCFA) se často využívají jako biomarkery katabolismu proteinu, i když se o jejich vlivu na zdraví ví jenom málo. Některá studia ale ukazují, že BCFA modulují metabolismus glukosy a tuků v játrech stejně jako SCFA (Jaskiewicz a kol., 1996). V intestinální epiteliální buňce isobutyryát může zase nahrazovat butyryát jakožto zdroj energie (Macfarlane a kol., 1986). Katabolismus aminokyselin obsahujících ve své struktuře atom síry (cystein a methionin), probíhá za vzniku sulfanu a methanthiolu. Sirovodík může podlehnout methylaci a vznikne tak methanthiol, jež může být následovně zase methylován na dimethylsulfid anebo může podstoupit demethylaci zpátky na sulfan a bude oxidován na sulfát. Možný osud sulfátu už bude dále diskutován, ale už teď si potřebujeme uvědomit, že konečné produkty zpracování sulfátů střevními bakteriemi jsou sulfidy.

Pokud se jedná o katabolismus aromatických aminokyselin, musíme říct, že jejich degradace vede k velmi rozmanitým indolickým a fenolovým produktům, které mimo jiného mohou být toxické nebo vykonávat funkce neurotransmiterů. Jako neurotransmiter se může chovat například tryptamin. Tryptamin je neurotransmiter, který hraje důležitou úlohu v regulaci intestinální motility, má taky imunitní funkce (Williams a kol., 2014). Schopnost dekarboxylace tryptofanu se nevyskytuje u bakterií příliš často, avšak některé druhy *Firmicutes* tu funkci mají, jako třeba *Ruminococcus gnavus* (Li a Young, 2013). Častější produkt degradace tryptofanu je indol, který je produkován mnohými druhy kmenu *Bacteroides* a *Enterobacteriaceae*. Indol napomáhá imunitnímu systému hostitele například

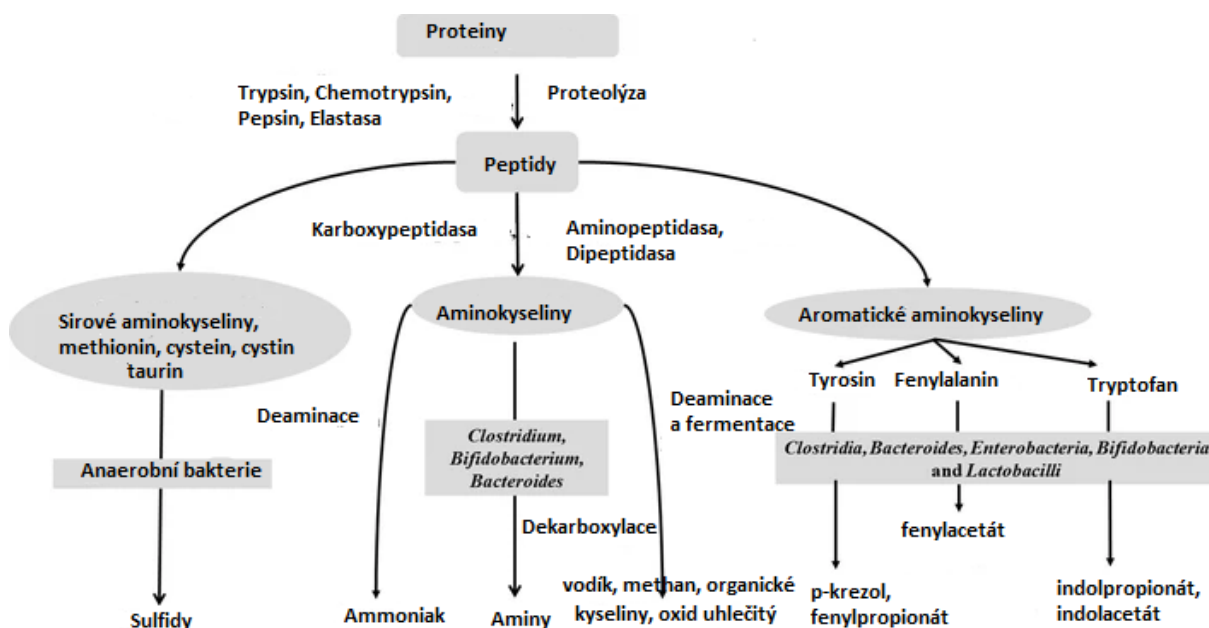
interakcí s pregnane X receptorem a aryl hydrocarbon receptorem. Navíc je to signální molekula, která má vliv na intestinální motilitu, formování biofilmu, odolnost vůči antibiotikům (Williams a kol., 2014). Je taky prokázáno, že přítomnost indolu naznačuje kolonizaci tlustého střeva patogenními bakteriálními druhy jako *Salmonella enterica*. Podle výsledků nedávné práce (Pugin a kol., 2017) přílišná produkce indolu způsobuje zvýšený export do jater, kde indol je sulfátován na indoxyl sulfát. Ten je zase toxin, který zapříčiňuje chronické onemocnění ledvin.

Katabolismus tyrosinu dává vzniknout tyraminu, fenolům a p-kumarátu. Tyramin je neurotransmiterem, za jeho produkci jsou zodpovědné *Enterococcus* a *Enterobacteriaceae* (Pugin a kol., 2017).

Katabolismus fenylalaninu může vést ke vzniku fenylethylaminu a kyseliny trans-skořicové. Na rozdíl od metabolismu tyrosinu a tryptofanu, o biochemii fenylalaninu se ví velmi málo. Fenylethylamin je také neurotransmiterem, který účinkuje jako «endogenní amfetamin» (Marcoabal a kol., 2012). Jeho přítomnost tak zvyšuje náladu, energii a pozornost, jelikož tato sloučenina má význam v neurochemii katecholaminu a serotoninu (Shimazu a kol., 2004).

Nedávné výzkumy fekálních vzorků přinesly nové poznatky a je prokázáno, že aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin a tryptofan) mohou být přeměněny na fenylypropanoidové metabolity, fenyloctovou kyselinu a 4-hydroxyfenyloctovou kyselinu. Organismy obsahovaly několik druhů *Bacteroides*, *Eubacterium hallii* a *Clostridium barlettii* (Russell a kol., 2013). Pozoruhodné je, že fenolické produkty jsou stejné jako ty, které dokážeme dostat po mikrobiálním rozkladu rostlinných fenolů.

Přehled biochemických dějů můžeme velmi zjednodušeně schematicky ukázat na obrázku č. 2.



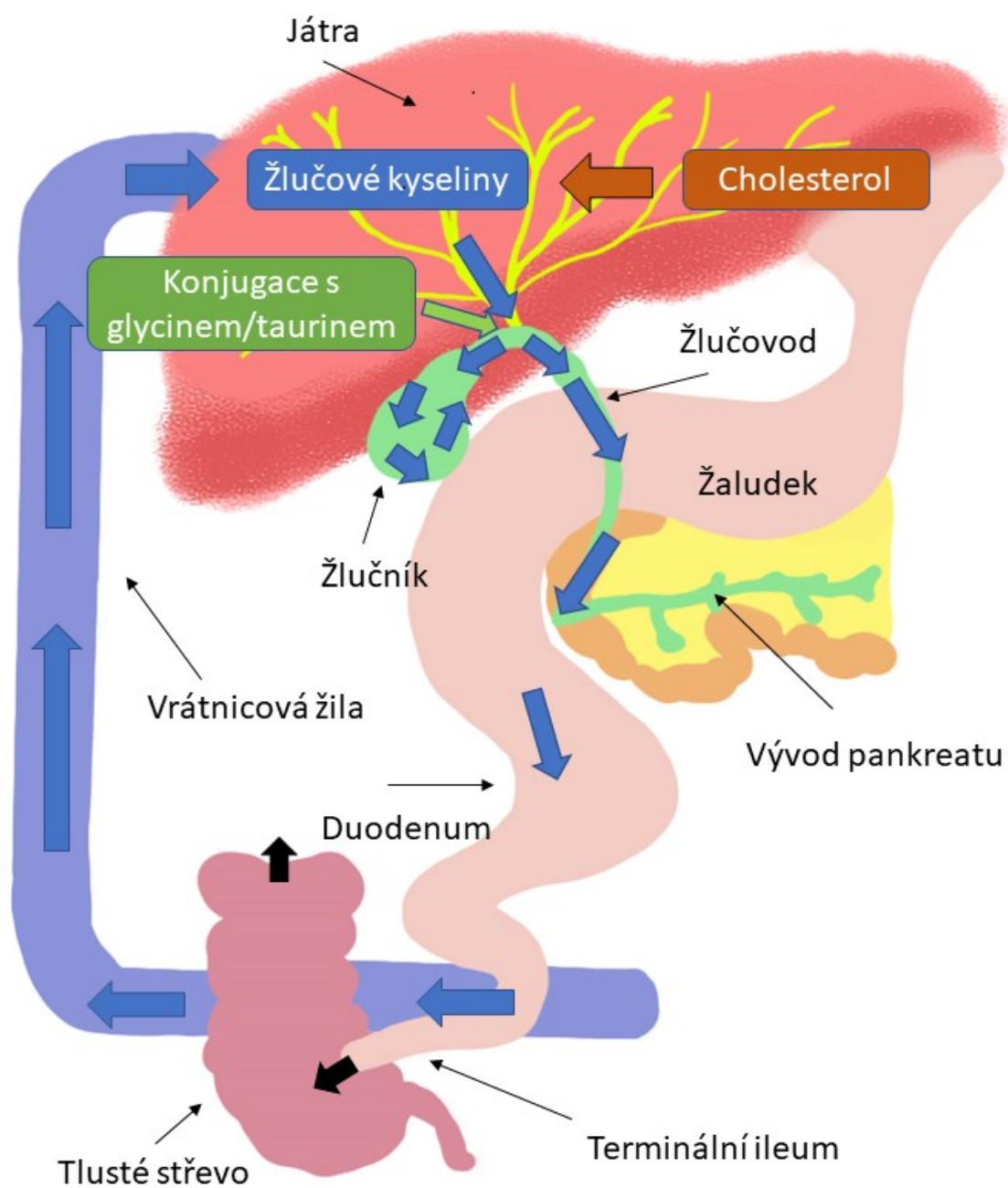
Obrázek 2.: Schéma katabolismu proteinu vlivem střevních bakterií, (upraveno podle Yadav a kol., 2018)

Metabolismus proteinů v tlustém střevě je stejně jako metabolismus sacharidů, podstatně ovlivněn procesem bakteriálního «cross-feeding» (Hermanussen a kol., 2010). Dai a kol. také předvedli, že bakterie významně přispívají k metabolismu aminokyselin a jejich biologické dostupnosti ve střevě a prokázali, že L-glutamin reguluje metabolismus řady esenciálních a neesenciálních aminokyselin. (Dai a kol., 2013).

## 2.5 Metabolismus žlučových kyselin v tlustém střevě

Žlučové kyseliny jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu několikastupňovým enzymatickým procesem. Primárními žlučovými kyselinami jsou kyselina cholová (CA) a chenodeoxycholová (CDCA) (Gustafsson a kol., 1977). Mikrobi fermentují jak steroidní základ molekuly, tak navázané na něj řetězce. Před tím, než jsou kyseliny sekretovány do žluče, jejich karboxylové skupiny mohou podstoupit konjugaci s taurinem nebo glycinem.

Kyseliny pomáhají trávení a vstřebávání lipidů v tenkém střevě. Následně se vstřebávají v distálním ileu a zase se recyklují zpět do jater. Pro nás je důležité, že část žlučových kyselin uniká enterohepatické cirkulaci a vstupuje do tlustého střeva (viz obr. č. 3) kde už pak významně přispívají do symbiotického vztahu mezi bakteriemi střevního mikrobiomu a hostitelem (Vecka a kol., 2019).



Obrázek 3.: Schéma metabolismu žlučových kyselin

Takové bakterie jako jsou *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, a *Listeria* umí syntetizovat hydrolasy, které štěpí amidovou vazbu, která existuje mezi žlučovou kyselinou a konjugovanou aminokyselinou (Jones a kol., 2008). Hlavní význam dekonjugace, ovlivněné bakteriemi spočívá ve snížení toxicity žlučových kyselin. Antibakteriální účinky



kyselin spočívají v detergentních účincích na bakteriální membránu a následném poškození DNA a struktury proteinů (Kurdi a kol., 2006).

Steroidní jádro může také být modifikováno bakteriálními enzymy, nakonec vznikají sekundární žlučové kyseliny. Po dekonjugaci hydroxylová skupina na sedmém atomu uhlíku steroidního jádra podstupuje dehydroxylaci. Rody *Clostridium* a *Eubacterium* například transformují CDCA a CA na kyselinu lithocholovou (LCA) a deoxycholovou (DCA) (Gustafsson a kol., 1977). Existují výzkumy (Hussaini a kol., 1995), které ukazují, že tyto sekundární aminokyseliny jsou asociovány s rakovinou tlustého střeva a vznikem žlučových kamenů. Játra ale nemohou snížit jejich toxicitu a sekundární žlučové kyseliny znovu rehydroxylovat, proto, jak už předtím bylo zmíněno, probíhá jejich konjugace s glycinem, taurinem a zřídka se sulfátem.

Kromě jiného, bakterie provádí epimerizační reakce, při kterých dochází ke změně konfigurace hydroxylových skupin. Nejběžnější příklad tohoto děje je epimerizace CDCA na kyselinu ursodeoxycholovou (UDCA) (Woollett a kol. 2003).

## 2.6 Syntéza vitaminů

Už dávno bylo známo, že střevní mikrobiota jsou schopna syntézy velké škály vitaminů, ke kterým patří vitamín K, celá skupina vitamínu B: biotin, cobalamin, folát, kyselina nikotinová, kyselina panthotenová, pyridoxin, thiamin a riboflavin (Hill, 1997).

Tyto vitamíny mají velmi důležitou funkci nejen pro metabolismus samotných bakterií, ale i pro lidský organismus obecně. Avšak některé práce ukazují, že bezmikrobní potkani, kteří samozřejmě neměli střevní mikrobiom a syntéza vitaminů byla znemožněna, mohli mít normální úroveň protrombinu, jehož tvorba závisí na vitamínu K. U některých pokusných zvířat bylo naopak pozorováno zvýšené krvácení a tím pádem snížené množství protrombinu. (Gustafsson a kol., 1962). Kromě toho existuje výzkum (Frick a kol., 1967) z roku 1967, při kterém u lidí, dodržující dietu s nízkým množstvím vitamínu K během 3-4 týdnů, nebyly zaznamenány žádné projevy spojené s nedostatkem vitamínu, avšak u těch jedinců, které brali antibiotika, byl zaznamenán značný nedostatek protrombinu v plasmě.

Práce (Magnúsdóttir a kol., 2015) zkoumala genomy 256 bakteriálních druhů střevního mikrobiomu na přítomnost biosyntetických cest osmi vitamínu ze skupiny B: biotinu, folátu, kobalaminu, niacinu, pantotenové kyseliny, pyridoxinu, riboflavinu a thiaminu. Nakonec se zjistilo, že některé bakterie mohou syntetizovat všechny vitamíny skupiny B, některé naopak

nejsou schopné syntetizovat žádné vitamíny. Drtivá většina bakterií může syntetizovat riboflavin a niacin. Všechny druhy oddělení *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* a *Proteobacteria* a některé druhy *Firmicutes* a *Actinobacteria* také měly důležité syntetické dráhy pro riboflavin a biotin. Vitamin B12 může být syntetizován všemi bakteriemi *Fusobacteria*, ostatní kmeny tuto schopnost projevily jen málo. Navíc se ukázalo, že kmen *Bacteroidetes* je zodpovědný za produkci 90 % množství vitamínů skupiny B.

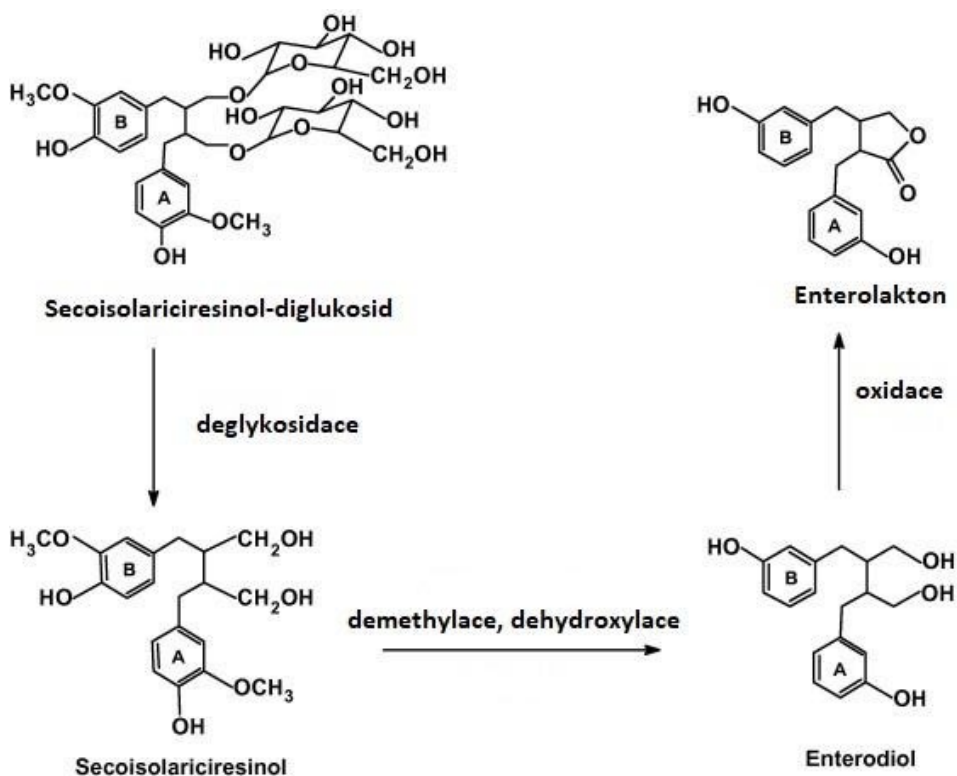
## 2.7 Metabolismus fenolik

Fenolika (také polyfenolické látky) jsou sloučeniny, které ve své struktuře mají alespoň jedno aromatické jádro, na které je navázána alespoň jedna hydroxylová skupina (Fraga, 2009).

V současné době se jejich biologická aktivita intenzivně zkoumá (Pérez-Jiménez a kol., 2011). Obecně lze říct, že se většina polyfenolických látek neabsorbují v tenkém střevě a tak se dostává do střeva tlustého (Manach a kol., 2004). Pozoruhodná studia na bezmikrobních potkanech a jiné výzkumy s in vitro inkubací fekálních vzorků jasně ukazují na to, že fenolika jsou metabolizovány mikrobiomem v tlustém střevě (Russell a kol., 2008).

Pro polyfenoly je příznačná velká strukturní rozmanitost, což má za následek rozdílnou biologickou aktivitu, zapojení do metabolických cest a biodostupnost (Manach a kol., 2004). Jsou to fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, lignany a sekoiridoidy (Russell a kol., 2008). Polyfenoly jsou zastoupeny v potravě hlavně v podobě glykosidů, to znamená, že jsou konjugovány s různými cukry, jako glukosa, galaktosa, rhamnosa a rutinosa.

Zajímavá práce (Quartieri a kol., 2016) z roku 2016 ukazuje degradaci secoisolariciresinol-glykosidu, glykokonjugátu lignanu. Různými bakteriálními druhy se uskutečňuje řada reakcí, nakonec vzniká enterolakton, viz obr. 4.



Obrázek 4.: Schéma metabolismu secoisolariciresinol-glukosidu střevními bakteriemi, upraveno podle (Hu a kol., 2007)

Hydroxyskořicové kyseliny jsou většinou esterifikovány s cukry, organickými kyselinami nebo s lipidy. Avšak jiné polyfenoly jako proantocyandiny a ellagitaniny jsou představovány v podobě oligomerů a polymerů, což komplikuje jejich biologickou dostupnost, a proto potřebují konvertaci na aglykony před absorpcí. Nehledě na to, že některé glykosidy mohou být metabolizovány intestinálními enzymy, drtivá většina konjugátů a esterů absorbována není a tak se látky dostávají do tlustého střeva, kde podléhají hydrolyze střevními bakteriemi (Marín a kol., 2015).

Hydrolyzu polyfenolů uskutečňují mikrobiální druhy: *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Lachnospiraceae CG19-1* a *Eubacterium ramulus* (Braune a kol., 2015). Po hydrolyze získané monomery a aglykony jsou metabolizovány jinými bakteriemi na jednodušší látky jako kyselina floretová (hydroxofenylpropionová).

## **3 Anaerobní metabolismus léčiv zajištěný střevním mikrobiomem**

### **3.1 Biotransformace perorálně podávaných léčiv** (podle Dostálek, 2006)

Jelikož předmětem našeho zájmu je anaerobní metabolismus léčiv střevními bakteriemi, je důležité si uvědomit, že se do střevního lumenu dostanou pouze ty léky, které byly podány perorálně, tj. nejpřirozenější a nejčastější cestou vstupu léčiva do organismu.

Dutina ústní se vyznačuje dobrým cévním zásobením a tenkým povrchem sliznice. Klasická perorální léková forma zůstává většinou v dutině ústní velmi krátkou dobu na to, aby byla zajištěna významná absorpce.

Nehledě na velkou plochu žaludečního epitelu je jeho význam pro absorpci většiny léčiv jen malý. Vedle špatné propustnosti žaludeční stěny je to zejména proto, že absorpce je limitována poměrně krátkou dobou, po kterou se léčivo v žaludku zadržuje - záhy dochází k vyprázdnění jeho obsahu do tenkého střeva.

Tenké střevo má nejlepší podmínky pro absorpci léčivých přípravků. Díky přítomnosti střevních klků tenké střevo má velkou vstřebávací plochu (200 m<sup>2</sup>), chymus zůstává v tenkém střevě po dobu 1-6 hodin. Kyselý obsah žaludku se vlivem pankreatické šťávy postupně alkalizuje. Kyselost je tady v každém úseku různá, v duodenu je pH asi 4-5, v ileu dosahuje hodnoty 8.

Tlusté střevo má značně nižší absorpční plochu, než tenké střevo, nicméně obsah tady zůstává poměrně dlouho (až 24 hodin). Tlusté střevo má dobré prokrvení, zase se zvyšuje kyselost (pH = 5-7).

### **3.2 Metabolické reakce zprostředkované střevním mikrobiomem**

Střevní mikrobiom je schopný různých metabolických reakcí, které biotransformují léky, metabolity léků a jiná xenobiotika. Nejdůležitějšími a nejlépe prozkoumanými reakcemi střevních bakterií jsou redukční a hydrolytické reakce, při kterých vznikají nepolární látky.

Jak už bylo předem zmíněno, reakce dekarboxylace, dehydrotace, dealkylace, dehalogenace a deaminace byly také v určitých studiích popsány.

#### **3.2.1 Redukční metabolismus**





například nitrazepam má teratogenní vlastnosti, když je nakonec acetylován v játrech na 7-acetylamionitrazepam (Takeno a Sakai, 1991). Když klonazepam byl orálně podán bezmikrobním potkanům, redukční metabolity byly zodpovědné za jenom 15 % radioaktivity vyloučené močí, naopak, když byla do těch potkanů vložena intestinální flora, zvýšila se nitroredukce na 77 % (Elmer a Remmel, 1984).

Stejně jako toxicita spojená s redukcí nitrazepamu, také je pozoruhodný metabolismus antibiotika chloramfenikolu, obsahujícího nitroskupinu. Produkt redukce tohoto léku, určeného na léčbu bakteriálních infekcí, hlavně na léčbu očních nemocí, podle řady studií může být příčinou onemocnění kostní dřeni. Chloramfenikol obsahuje amid kyseliny dichloroctové a nitrobenzenovou skupinu, která podléhá bakteriálnímu metabolismu. Experimenty ukazují na schopnost střevního mikrobiomu metabolizovat daný lék na několik konečných produktů, ze kterých p-aminofenyl-2-amin-1,3-propandiol projevuje nejtoxičtější chování (Yunis, 1989).

Další příklad nitroredukce byl pozorován u metabolismu radiačního sensitizeru mizonidasolu. Produktem redukce mizonidasolu je 1-(2-aminoimidazol-1-yl)-3-methoxypropan-2-ol, který byl pozorován ve fekálních vzorcích normálních potkanů (Koch a kol., 1980). Když byl potkanům podáván penicilin po dobu jednoho týdne před použitím mizonidasolu, zvýšil se poté účinek léku a snížila se jeho neurotoxicita (Sheldon, 1984).

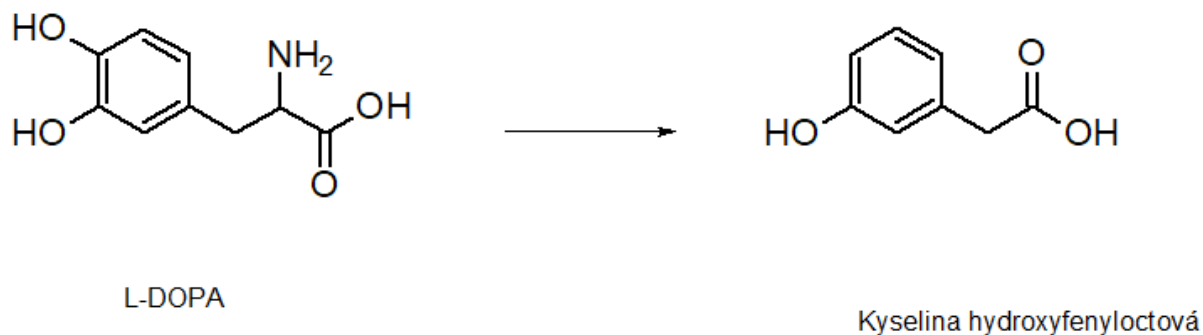
### **3.2.2 Demethylace, deaminace, dealkylace, dehydratace, dekarboxylace a oxidace**

Dealkylace, kterou zprostředkovávají bakterie, není v literatuře příliš často popsáný jev. Bakteriální demethylace byla například prokázána *in vitro* v pokusu s methamfetaminem a 4-hydroxymethamfetaminem (Caldwell a Hawksworth, 1973). Podle výsledků jiné práce, ve které *N*- a *O*-alkylované sloučeniny byly inkubovány s izolovanou potkaní střevní mikrobiotou, bylo ukázáno, že *O*-demethylace se projevuje jenom u relativně jednoduchých aromatických sloučenin, avšak *N*-demethylace nebyla během výzkumu zaznamenána (Smith a Griffiths, 1974).

Dealkylace, vyvolaná aktivitou intestinální flory je také charakteristická například pro metabolismus fostamatinibu, inhibitoru tyrosinkinasy. V tomto případě bylo zjištěno (Sweeny a kol., 2010), že produkt aktivity anaerobních střevních bakterií je benzen-3,5-diol, který vznikl *O*-demethylací a dehydroxylací jednoho z metabolitů fostamatinibu, R529. Inkubace

R529 s lidskými fekálií danou teorii potvrdila. Tím pádem autoři článku přicházejí k závěru, že metabolismus fostamatinibu z neaktivní formy do účinkující sloučeniny, benzen-3,5-diolu, je výsledek aktivity bakteriálních a hostitelských enzymů. Sled reakcí začíná *p*-*O*-demethylací pomocí cytochromu P450 a nakonec končí *O*-demethylací a dehydroxylací střevním mikrobiomem (Sweeny a kol., 2010).

Jedna z dalších enzymatických možných a prokázaných reakcí střevního mikrobiomu je schopnost dehydroxylace a dekarboxylace. Jedním z nejlépe popsáných příkladů slouží biotransformace L-DOPA na hydroxyfenyloctovou kyselinu (viz obr. 7), které si nejprve všimli při výzkumu složení moče nemocných Parkinsonovou chorobou. Hydroxyfenyloctová kyselina byla poté nalezena v moči potkanů, kterým byla orálně podávána L-DOPA nebo dopamin, chyběla ale u těch potkanů, kteří neměli střevní mikrobiom (Goldin a kol., 1973).



Obrázek 7.: Reakční schéma dehydroxylace L-DOPA, vytvořeno podle (Goldin a kol.,1973)

Deacetylace léčiv je ještě jedním dobře popsáným jevem aktivity mikrobiomu. Phenacetin je první syntetické antipyretikum a obvykle je používán jako analgetikum. Tento lék je absorbován z tenkého střeva a metabolizován v játrech za vzniku paracetamolu. Malá část phenacetinu je ale deacetylována na *p*-phenetidin (viz obr. 8), jak bylo ukázáno ve výzkumu, když obsah slepého střeva potkanu byl inkubován s phenacetinem za anaerobních podmínek (Smith a Griffiths, 1974).





Obrázek 8.: Reakční schéma deacetylace phenacetinu, vytvořeno podle (Smith a Griffiths, 1974)

Střevní bakterie jsou schopny též oxidačního metabolismu, který můžeme pozorovat například u metabolismu levamisolu. Anaerobní inkubace *in vitro* ukázala, že určité bakteriální druhy, hlavně odvozené od oddělení *Bacterioides* a *Clostridia*, dokážou tuto sloučeninu zoxidovat na řádu sloučenin, které mají ve své struktuře otevřený thiazolový kruh (Shu a kol., 1992). Jedním z produktů oxidace je levamisol I, který podle autoru tohoto výzkumu pravděpodobně má antitumorovou aktivitu. Autoři článku také zdůrazňují, že by levamisol měl projít řadou metabolických reakcí, která by zahrnovala oxidační krok nehledě na anaerobní podmínky.

Přestože schopnost oxidace a dehydrogenace látek střevním mikrobiomem se projevuje zřídka, některé práce potvrzují skutečnost, že bakterie tu funkci mají. Nejpřehlednější je interakce mezi lovastatinem a antibiotiky u krys: po inkubaci léčiva *in vitro* s přísádky lidské a krysí fekalasy, což je frakce fekálních bakteriálních enzymů (Yoo a kol., 2014), byly získány 4 metabolity: dimethylbutyrylový metabolit a 3 hydroxylované metabolity s otevřeným thiazolovým kruhem, k nimž patří aktivní hydroxykyselina. Je třeba poznamenat, že léčba antibiotiky přivedla ke snížení množství metabolitů hydroxykyseliny ve stolici o 60 %. Tak autoři dospěli k závěru, že když pacienti, kteří využívají lovastatin k regulaci plazmatických hladin cholesterolu, současně berou antibiotika, může dojít k problémům kontroly hladiny cholesterolu v séru v důsledku potlačení střevního mikrobiomu.

## 4 Moderní metody studia střevního mikrobiomu

### 4.1 Problém s *ex vivo* modelováním střevního mikrobiomu

Přestože za posledních deset let bylo velmi úspěšně prozkoumáno složení lidského mikrobiomu, zapojení různých mikrobiálních kultur do jednotlivých metabolických procesů pořád zůstává málo prozkoumaným tématem. Také hodně málo víme o vztazích mezi různými druhy a jejich přímém nebo nepřímém působení na lidský organismus.

Nedávná studia odhalila, že 75 % metabolických modelů, které byly založeny jen na genomice a literatuře, jež obsahovala informace o požadavcích k růstu, nedokázalo předpovědět růst stejných bakteriálních druhů v různých mediích (Tramontano, 2018).

Ukázalo se, že metabolické, metatranskripční a metaproteomické údaje neposkytují celkovou informaci o interakcích uvnitř lidského mikrobiomu, proto jedno z řešení tohoto problému podle autorů článku (Tramontano, 2018) by mohl být přístup syntetické ekologie - tj. studium složitých mikrobiálních systémů využívajících syntetická společenství.

Systém *in vitro* je definován jako prostředí mimo žijící organismus, který poskytuje jednoduchý a kontrolovaný systém, zaměřený na studium ekologických interakcí. Hlavním problémem studia metabolismu střevního mikrobiomu *in vitro* je nedostatek interakcí s hostitelem. Možnost modelovat *in vitro* prostředí podobné střevnímu prostředí hlavně pro high-throughput analýzu dělá studia *in vitro* dobrým začátečním krokem pro výzkumy *in vivo* (Saeidnia a kol., 2016). Pokud se jedná právě o lidské střevo, používá se několik druhů modelovacích systémů.

Nejvýznamnější systémy zahrnují hlavně klasické vsádkové fermentory s různými modifikacemi a také vícestupňové kontinuální fermentory s přidáním nebo bez přidání složek pro simulaci interakcí s lidským hostitelem, například přidáním lidských buněk k normálním kultivačním systémům (Wilmes a kol., 2018).

Vsádkové fermentory jsou nejjednodušší a nejrozšířenější modely. Přestože to jsou uzavřené systémy, do kterých musíme vkládat všechny důležité komponenty pro iniciaci mikrobiálního růstu už na začátku, dokážeme potom upravovat pH systému a postupně přidávat důležitý nutrient. Růst kmenu můžeme pak monitorovat konvenčními metodami, například průtokovou cytometrií, měřením optické hustoty nebo počítáním destiček (Falony, 2009). Hlavní nevýhodou této metody je nemožnost kvantifikovat stabilní stavy. Příklady standardních vsádkových fermentačních systémů zahrnují taky vsádkové reaktory, zkumavky, mikrotitrační destičky.

Kontinuální kultivační systémy na rozdíl od vsádkových fermentorů umožňují vyrovnání přítoku a odtoku média a tedy udržování bakteriálních kultur ve specifickém tempu růstu a fyziologickém stavu. Spojením několika kontinuálních reaktorů lze postupně modulovat několik různých okolních podmínek. Kupříkladu lze tak měnit pH, dobu zdržení v médiu, navíc přidání konkrétních složek v různých fázích může modulovat podmínky jednotlivých

kompartmentů střevního traktu (Wilmes a kol., 2018). Je zřejmé, že modely kontinuální kultivace inokulované lidskými fekálními vzorky nejsou schopné reprodukovat přesné složení mikrobiálního stavu pozorovaného v lidském střevě. Omezení samozřejmě spočívá v tom, že nehledě na to, že některé kinetické aspekty jako doba přepravy (transit time) gastrointestinálního traktu je v takových modelech skoro přesně zachována, přítomnost hostitele se celkem ignoruje.

Kontinuální kultivační modely jsou nicméně rychlým screeningovým nástrojem pro xenobiotické transformace a zkoumá se tak vliv nutraceutiků. Příklady standardních systémů kontinuální kultivace zahrnují chemostaty a minibioreaktory (Auchtung, 2015).

Použití mikrotitrační desky je specifický druh vsádkového fermentačního systému, který nabízí levnou, high-throughput metodu zkoumání velkého počtu bakteriálních interakcí naraz. Jelikož objem na mikrotitračních destičkách je malý, není tak snadno kontrolovat pH a přidávat nové substráty, jak je to u vsádkových plnohodnotných systému (Duetz, 2007).

Je zřejmé, že žádný kultivační systém zatím nedokázal zcela napodobovat mikrobiom *in vivo*. Nejlepší výsledky ale ukazuje metoda gut-on-chip (Kim a kol., 2016), HuMiX systém (Shah a kol., 2016), mini-bioreaktorový systém na screening růstu (Marzorati a Wiele, 2015). Využívá se taky kombinatorické kultivace kmenů v mikrotitračních destičkách s cílem následného měření optické hustoty a sekvenování 16S ribozomální RNA za účelem parametrizace matematického modelu (Venturelli a kol., 2018).

Lze říct, že vzhledem ke složitosti vzájemných interakcí a četnosti mikrobiálních kmenů v gastrointestinálním traktu, nejlepší možností odhalení této složitosti je kontrolované, opakovatelné pokusy *in vitro*. Nicméně jak už bylo mnohokrát zmíněno, nedokážeme se obejít bez pokusů *in vivo*.

Experimenty *in vivo* jsou zásadní pro studium mnoha aspektů ekologických interakcí, od zkoumání úlohy mikrobiomu ve vývoji hostitele a imunitních odpovědí až po pochopení komplexních interakcí mezi stravovacími a výživovými možnostmi hostitele a střevním ekosystémem. Dříve se studium metabolismu střevních bakterií provádělo jen za využití zvířecích modelů. Používání gnotobiotických zvířat zůstává nenahraditelné, protože pouze jejich použití umožňuje studium střevního mikrobiomu *in vivo*. Většina současných studií zaměřených na výzkum metabolismu střevního mikrobiomu *in vivo* využívá laboratorních potkanů jako pokusná zvířata (Elzinga a kol., 2019). Právě tato technika umožňuje větší

přehled do imunologických a metabolických pochodů v organismech, zejména pokud jde o gnotobiotická zvířata s definovanými střevními bakteriálními druhy. Nehledě na očividné přednosti této metody, má i svoje nevýhody a to jsou hlavně vysoké náklady, spojené s chovem zvířat a v neposlední řadě nízký výkon experimentu. Samozřejmě značným nedostatkem je rozdílná fyziologie člověka a myše, což vede k ztrátě relevanci těch pokusů vůči problémům lidského zdraví.

Alternativní technika studia střevního mikrobiotu je použití bioreakčních systémů, které dovolují studování metabolismu střevních bakterií *ex vivo*. Tyto bioreaktory umožňují zkoumání metabolických dějů v průběhu času v podmínkách velmi podobným skutečnému prostředí lidského střeva. Bez ohledu na to, že bioreakční systémy jsou zcela umělé (proto musíme velmi opatrně interpretovat získané výsledky), daný přístup ke zkoumání lidského mikrobiomu zahrnuje v sobě klíčovou výhodu a to je možnost kontrolování podmínek ekosystému i v průběhu času. Kvůli tomu se u této techniky v současné době prudce zvýšila popularita a tak se teď hojně využívá ve výzkumech střevního metabolismu (Purohit, 2018).

## **4.2 Použití bioreaktorů ve výzkumu střevního mikrobiomu**

Studium metabolismu a vnitřních vztahů mezi různými bakteriálními druhy je náročné hlavně tím, že jednotlivé kultury mají pro svůj vývoj a životní funkce unikátní nutriční a environmentální požadavky, které nejsou zcela splnitelné za využití běžných kultivačních metod. Bioreaktory poskytují řešení k překonání četných omezení konvenčních technik, které byly popsány výše. Založení a propagace mikrobiálních kultur je umožněna laditelností podmínek uvnitř bioreaktoru, které dokážou napodobovat podmínky gastrointestinálního traktu. Bioreaktory usnadňují studování komplexních mikrobiálních interakcí a poruch *in vitro* v kontrolovaném prostředí, aniž by došlo ke zmatení biotických a abiotických proměnných (Wissenbach a kol., 2016).

Metagenomická studia střevního mikrobiomu člověka poskytla hrubý přehled metabolických reakcí uvnitř ekosystému (Wang, 2015), avšak podle samotných autorů této práce dalším krokem k porozumění fungování systému mikrobiom-hostitel musí být detailnější porozumění jednotlivých metabolických drah. Potenciální metabolismus může být předpověděn na základě metagenomických údajů, nicméně existuje značný rozdíl mezi informací o genech a metabolickým fenotypem konkrétního mikrobiomu (Wang, 2015).

V metabolomických studiích je cílem získat seznam metabolitů buňky nebo tkáně, obvykle se používá spojení dvou metod: NMR a hmotnostní spektrometrie (Dumas, 2014). Každá z těchto metod má svoje přednosti a nedostatky, tak NMR je svojí podstatou kvantitativní, ale ne tak citlivá. Hmotnostní spektrometrie má vyšší citlivost, ale potřebuje standardy pro kvantifikaci. Vzhledem ke složitosti střevního metabolismu, nejlepší metoda jeho výzkumu je screening celkového profilu látek a následné modulace a potvrzení metabolických cest těmito úzce zaměřenými technikami. Používá se LC-MS/MS (dvojitá hmotnostní spektrofotometrie asociovaná s kapalinovou chromatografií). Nakonec jsou k dispozici MS/MS spektra všech metabolitů, které jsou potom kvantifikovány za pomoci nástrojů jako XCMS online (Smith a kol., 2006). Pomocí XCMS dokážeme normalizovat spektrální data a dostat kvantitativní údaje z fullscanu. (Ivanisevic a kol., 2013) Získaná informace je poté použita v takových databázích jako Metlin (Smith a kol., 2005) nebo MassBank (Horai a kol., 2010), a tak konečně lze identifikovat látky. Identifikace metabolických dějů a reakcí samotných může být taky automatizována pomocí dalších nástrojů, jimiž jsou moderní databáze. Jedním z příkladů je Kegg (Kanehisa a Goto, 2000). Je žádoucí údaje získané z výsledků hmotnostní spektrometrie doplnit pomocí cílených analýz, zaměřených na potvrzení existenci určitých klíčových substrátů.

V metabolomice se hodně diskutuje o poměru globální a cílené analýzy ve výzkumu metabolitů střevního mikrobiomu, proto je potřeba přijít na to, jak dokážeme spojením dvou metod dostat nejvýznamnější biologické výsledky.

Jak už bylo zmíněno, jednorozměrná protonová rezonance, NMR, se taky využívá k výzkumu střevního metabolismu, avšak se jedná o malé molekuly. Metody jsou komplementární, protože rozšiřují spektrum detekovatelných látek.

Nejdramatičtější nevýhodou analýzy izolovaných metabolomických údajů je to, že není možné předpovědět, jaké bakteriální druhy mají aktivitu, která by byla zodpovědná za vznik určitých detekovaných metabolitů ve fylogeneticky vysoce různorodém střevním mikrobiomu. Skupiny vědců se už pokoušeli bioinformaticky vyhodnotit metabolické funkce mikrobiomu v závislosti na metagenomických datech. Jiní badatelé tak zkoušeli porovnat aktivitu samotné izolované bakteriální kultury s globálními metagenomickými údaji. Bez ohledu na to, že obě metody byly přínosné a vědci dospěli k většímu chápání korelace mezi experimentálními a modelovými údaji, je důležité rozumět, že bakteriální kultury, které vyrostlé v izolaci v umělém prostředí bioreaktoru mají odlišný metabolický profil, než ty,

kteře se nacházejí v podmínkách přírodních. Částečné řešení toho problému spočívá v použití metody SIP (stable izotop probing nebo sondování stabilními izotopy), jejíž princip se zakládá na vložení do daného ekosystému izotopně označených substrátů, které se začleňují do metabolitů v podobě mastných kyselin, proteinů, DNA a RNA (Horai a kol., 2007).

Kombinace metagenomického přístupu s metabolomikou a SIP (Eyice a kol., 2015) se tak stává centrální a základní metodou výzkumu metabolické aktivity uvnitř mikrobiálního ekosystému. I když použití metody SIP má svoje nevýhody při zkoumání lidského a zvířecího metabolismu, tato metoda pořád zůstává nejlepší ve studiu metabolismu střevního mikrobiotu *ex vivo*, kdy můžeme libovolně upravovat podmínky a řídit množství a složení substrátů, dostávajících do systému.

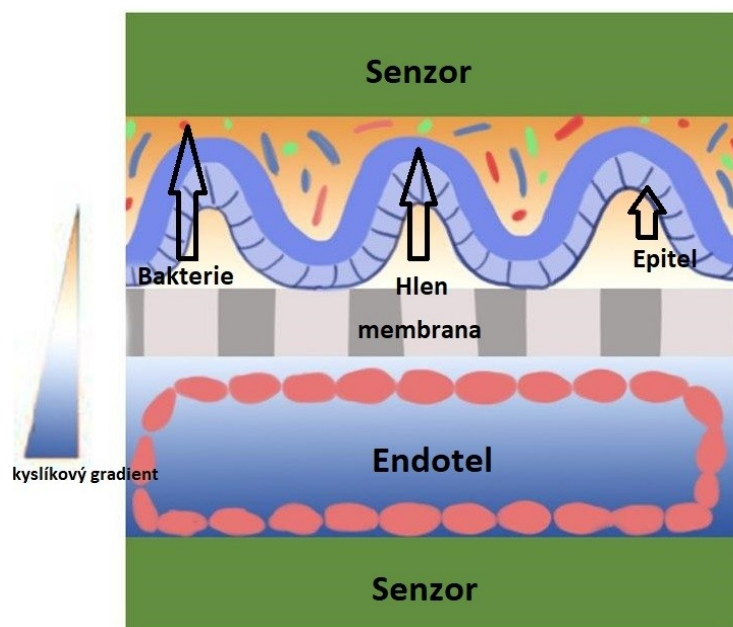
### **4.3 Model zaživací soustavy «Gut-On-Chip» (podle Jalili-Firoozinezhad a kol., 2019)**

Jedna z nejmodernějších metod zkoumání střevního mikrobiomu je speciální technika «gut-on-chip», která umožňuje výzkum interakce mezi živými intestinálními epitelálními buňkami produkujícími hlen a bakteriemi v prostředí s kontrolovatelnou úrovní kyslíku. Moji pozornost přitáhla nedávná práce (Jalili-Firoozinezhad a kol., 2019), která se pokusila modelovat podmínky lidského GIT pomocí anaerobní komory.

Autoři článku popsali konstrukci modelovacího zařízení (viz obr. 10): do anaerobní komory byly umístěny epitelální a endotelální buňky lidských buněčných linií a nad nimi a pod nimi

se nacházely senzory na stanovení kyslíku. Obě buněčné vrstvy oddělovala porézní membránová matrice. Je zajímavé, že bakteriální mikrobiota byla získána následujícím způsobem: nejdříve izolací z lidských fekálních vzorků a potom několikarocní inkubací v organismech gnotobiotických potkanů. Tím pádem bylo docíleno bakteriálního složení velmi podobného tomu, které v sobě přenáší zdravý člověk. Konkrétně bakteriální vrstva obsahovala 200 taxonomických jednotek z 11 různých bakteriálních rodů.

Unikátním rysem metody je, že byl vytvořen gradient hypoxie napříč tkáňovými vrstvami (endotélium-epitélium). Koncentrace kyslíku v komoře se dala přesně sledovat.



Obrázek 10.: Schéma konstrukce čipu, (vytvořeno podle (Jalili-Firoozinezhad a kol.,2019))

Základem relativně složité konstrukce tohoto zařízení byl opticky čirý dimethylsiloxanový polymer (PDMS), v němž byly umístěny čipy.

Celkem šest senzorů, obsahujících fluorescenční molekuly, se nacházelo střídavě v dolních a horních částech čipů. Změny fluorescenčních intenzit těchto senzorů byly způsobené zhašením fluorescence molekulami kyslíku. Signál byl zachycen kamerou VisiSens. Vzhledem k tomu, že čipy a senzory byly tvořeny z materiálu vysoce propustného pro plyny PDMS, senzorická odezva na koncentrační změny kyslíku byla dost rychlá, méně než 30 vteřin.

Aby bylo zajištěno dostatečné množství kyslíku na udržení funkčnosti lidských střevních buněk a zároveň anaerobního prostředí vhodného pro kultivaci složité komunity střevního mikrobiomu, byla před experimentem komora vypláchnuta dusíkem s pětiprocentním obsahem oxidu uhličitého. Tímto způsobem bylo docíleno nízké úrovně kyslíku v lumenu horní části komory, zatímco se epitel díky difuzi udržoval v dostatečně okysličeném stavu. Kyslík se dostával do systému z externích rezervoárů přes dolní kanál, vyplněný endoteliálními buňkami. Pomocí tohoto nastavení se podařilo vytvořit anaerobní podmínky s 0,5% obsahem kyslíku v lumenu komory.

Během 7 dnů v anaerobních podmínkách byly kultivovány lidské Caco-2 buňky. Jak je známo, Caco-2 je buněčná řada lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu, která při kultivaci za specifických podmínek podléhá diferenciaci. V důsledku diferenciaci tak může svojí morfologií a funkcí napodobovat enterocyty tenkého střeva, tj. sekretovat hlen.

Endoteliální buňky byly stejně kultivovány na dně dolního kanálu modelovacího systému, kde nakonec vznikl vaskulární endotel s těsnými spoji, obsahujícími kadherin.

Autoři článku uvádějí, že předtím, než do svého zařízení umístili izolovaný střevní mikrobiom, provedli pokus jen s obligátně anaerobním bakteriálním kmenem *Bacteroides fragilis*. Kontrola koncentrace kyslíku po třech dnech kultivace ukázala, že se povedlo udržet anaerobní prostředí, procentní zastoupení kyslíku v systému se snížilo z 1 % na 0,3 %.

Jelikož se výzkum prováděl pomocí několika různých čipů s anaerobními a aerobními podmínkami uvnitř systému, autoři zjistili, že obligátní anaerobní kultura pokračovala v růstu i po třech dnech kultivace v anaerobních podmínkách, zatímco za přístupu kyslíku bakterie začaly umírat už po dvou dnech kultivace.

Když se nakonec začalo testování modulačního systému s izolovaným střevním mikrobiomem, bylo pozorováno, že se zastoupení mikrobiot po třech dnech změnilo a bylo různé v čípech reprezentujících aerobní nebo anaerobní podmínky. Bylo uvedeno, že bakteriální oddělení, které mají dominantní zastoupení v lidském GIT, jako jsou *Bacteroidetes* (rody *Bacteroides*, *Parabacteroides*) a *Firmicutes* (rody *Enterococcus*, *Ruminococcus*) byly detekovány v čípech s anaerobním prostředím ve větším množství, než v aerobním. Navíc některé rody (*Blautia* a *Oscillospira*) v aerobních podmínkách úplně chyběly.



Kromě toho výsledky pokusu ukázaly snížení procentního zastoupení kyslíku v aerobních modelovacích systémech, a to se shoduje s výsledky při výše zmíněném experimentu s *Bacteroides fragilis*. Podle názoru autorů publikace snížení kyslíku je následkem zvýšeného vertikálního růstu mikrokloků epiteliálních buněk ve spojení se vzrůstající intenzitou bakteriálního využití kyslíku.

Zajímavým výsledkem práce se stalo pozorování, že bakterie z rodů *Akkermansia* a *Enterococcus* ukázaly, že v podmínkách, zajištěných danými anaerobními kultivačními systémy, mají lepší tendenci k růstu, než ve fekálních vzorcích. Z tohoto porozumění lze usoudit, že některé bakteriální druhy rostou lépe za podmínek živého lidského střeva, než za podmínek fekálního prostředí.

Autorům práce se podařilo udělat modulační systém, který nejen velmi dobře napodobuje rozhraní mezi střevním mikrobiomem a hostitelem uvnitř zažívacího traktu, ale i dovoluje kontrolovat a měnit koncentrace kyslíku v soustavě. Vzhledem k tomu, že zatím neexistuje žádný model trávicího traktu, který by věrně napodoboval komplexní interakce mezi mikrobiomem a epitelem, navržené modulační zařízení je pravděpodobně jedním z nejlepších moderních přístrojů například pro *in vitro* výzkum anaerobního metabolismu léčiv střevními bakteriemi.

I když se práce nezabývala modulováním metabolismu v žádném z konkrétních úseků GIT, existuje možnost vytvoření čipů, které by obsahovaly kultivované buňky specifických oddílů trávicího traktu a měly by patřičný obsah kyslíku. Kromě toho, tato metoda je rovněž vhodná k modulování podmínek jiných orgánů (např. plíce, kůže, vagina) a tím pádem je dobrá i ke zkoumání interakcí mezi hostitelem a mikrobiomem.

## 5 Závěr

Anaerobní metabolismus léčiv a potravních doplňků probíhající v lidském GIT je zajištěn střevním mikrobiomem. Rozsah účinků, které mají střevní bakterie na léčiva a naopak, má zjevné důsledky pro testování toxicity a efektivity léčiv. Jelikož se u většiny pokusů testování metabolismu léčiv provádělo za využití pokusných zvířat, tedy s výrazně odlišným mikrobiomem, je zřejmé, že podávání léčiv lidem může vyvolat neočekávanou a potenciálně i nevíтанou reakci. Oživení zájmu o tento již «zapomenutý orgán» je slibné. Podle mého názoru hlubší porozumění komplexním interakcím mikrobiálních komunit a organismu člověka by mohlo poskytnout nové impulsy v oblasti vývoje nových léčiv a přinést významné poznatky pro farmakologii, toxikologii a medicínu. Ve své práci jsem se pokusil shrnout moderní údaje o anaerobním metabolismu sloučenin v tlustém střevě a ukázat, že střevní mikrobiom nepochybně představuje «drugable target» a jeho složení a metabolická aktivita může být modulována. Pořád není ale úplně jasné, co přesně představuje ten vhodný léčivý cíl a jaké účinky by mohly mít léky na složení střevní mikrobioty a jaké následky může mít změna mikrobiomu na hostitele. Dané téma je podle mého názoru velmi zajímavé a důležité a zaslouží zvýšenou pozornost ze strany vědecké komunity. Nabízejí se četné otázky k řešení: Jaké jsou molekulární mechanismy metabolických pochodů a jaké bakteriální druhy jsou do nich zapojeny? Jak velký je vliv genotypu hostitele? Jak vnější prostředí, strava a medikace ovlivňuje složení a funkce střevní mikrobioty, do jaké míry je bakteriální složení stabilní, přenosné a odolné vůči změnám vnějších podmínek? Odpovědi na tyto otázky by měly velký význam nejen pro farmaceutický výzkum, ale i obecně prohloubit pochopení lidské fyziologie a patofyziologie.

## 6 Literatura

- Auchtung, J. M.; Robinson, C. D.; Britton, R. A.: Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs). *Microbiome*, **3**, 42 (2015).
- Bednar, M.; Frankova, V.: *Lekarska Mikrobiologie*. Praha, Marvil, 1996
- Belenguer, A.; Duncan, S.H.; Calder, A.G.; Holtrop, G.; Louis, P.; Lobley, G.; Flint, H.: Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* **72**:5, 3593-9 (2014).
- Bhatia, M.: Role of Hydrogen Sulfide in the Pathology of Inflammation. *Scientifica (Cairo)*. DOI: 10.6064/2012/159680. (2012).
- Bhattacharya, T.; Ghosh, T.S.; Mande, S.S.: Global profiling of carbohydrate active enzymes in human gut microbiome. *Plos One.* **10**. DOI: 10.1371/journal.pone.0142038 (2015).
- Biasucci, G.; Rubini, M.; Riboni, S.; Morelli, L.; Bessi, E.; Retetangos, C.: Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*, **86**:1, 13–5 (2010).
- Bjerrum, J. T.; Wang, Y.; Hao, F.; Coskun, M.; Ludwig, C.; Günther, U.; Nielsen, O. H. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. *Metabolomics.* **11**, 122–133 (2015).
- Braune, A.; Engst, W.; Blaut, M.: Identification and functional expression of genes encoding flavonoid O- and C-glycosidases in intestinal bacteria. *Environ Microbiol.* **18**:7, 2117-29 (2015).
- Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G.: XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* **78**:3. 779-87 (2006).
- Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille G.; Abagyan R.; Siuzdak G.; Qin, C.; Trauger, S.A.; Brandon, T.R.; Custodio D.E.: METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit.* **27**:6, 747-51 (2005).
- Caldwell, J.; Hawksworth, G.M.: The demethylation of methamphetamine by intestinal microflora. *J Pharm Pharmacol.* **25**:5 422-4 (1973).

Cândido, F.G.; Valente, F.X.; Grześkowiak, Ł.M.; Moreira, A.P.B.; Rocha, D.M.U.P.; Alfnas R.C.G.: Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr.* **69**:2, 125-43 (2018).

Carabotti, M.; Scirocco, A.; Maselli, M.A.; Severi, C.: The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* **28**:2, 203-9 (2015).

Claesson, M.J.; Cusack, S.; O'Sullivan, O.; Greene-Diniz, R.; de Weerd, H.; Flannery, E.; Marchesi, J.R.; Falush, D.; Dinan, T.; Fitzgerald, G.; Stanton, C.; van Sinderen, D.; O'Connor, M.; Harnedy, N.; O'Connor, K.; Henry, C.; O'Mahony, D.; Fitzgerald, A.P.; Shanahan, F.; Twomey, C.; Hill, C.; Ross, R.P.; O'Toole, P.W.: Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **108**:1, 4586-91 (2011).

Clark, H.: Milestones: Culturing Anaerobes. Dostupné z URL: <<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d42859-019-00007-1/d42859-019-00007-1.pdf>> [cit. 23. 5. 2020].

Cleusix, V.; Lacroix, C.; Vollenweider, S.; Duboux, M.; Le Blay, G.: Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* **7**, 101.

Cremin, J. D. Jr.; Fitch, M. D.; Fleming, S. E.: Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **285**:1,105–14 (2003).

Cummings, J. H.; Englyst, H. N.: Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr.* **45**:5, 1243–55 (1987).

Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol.* **70**:6, 443–59 (1991).

Dai, Z. L.; Li, X. L.; Xi, P. B.; Zhang, J.; Wu, G.; Zhu, W. Y.: L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. *Amino acids.* **45**:3, 501–12 (2013).

Das, K. M.; Eastwood, M. A.; McManus, J. P.; Sircus, W.: The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis. I. The relationship between metabolites and the response to treatment in inpatients. *Gut*. **14**:8, 631–41 (1973).

De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Goncalves, D.; Vinera, J.; Zitoun, C.; Duchamp, A.; Bäckhed, F.; Mithieux, G.: Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. **156**:1-2, 84–96 (2014).

De Weirdt, R.; Possemiers, S.; Vermeulen, G.; Moerdijk-Poortvliet, T. C.; Boschker, H. T.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T.: Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism. *FEMS Microbiol Ecol*. **74**:3, 601–11 (2010).

Dostálek, M.: *Farmakokinetika*. Praha, Grada, 2006.

Duetz, W.: Microtiter plates as mini-bioreactors: Miniaturization of fermentation methods. *Trends Microbiol*. **15**, 469-75 (2007).

Duncan, S. H.; Holtrop, G.; Lobley, G. E.; Calder, A. G.; Stewart, C. S.; Flint, H. J.: Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr*. **9**:6, 915–23 (2004).

Eberl, C.; Ring, D.; Münch, P. C.; Beutler, M.; Basic, M.; Slack, E. C.; Schwarzer, M.; Srutkova, D.; Lange, A.; Frick, J. S.; Bleich, A.; Stecher, B.: Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities. *Front Microbiol*. **10**, 2999 (2020).

Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S. R.; Nelson, K. E.; Relman, D. A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. **308**:5728, 1635–8 (2005).

Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G. S.; Kauvar, A. J.: Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. **44**:5, 854–9 (1958).

Eklou-Lawson, M.; Bernard, F.; Neveux, N.; Chaumontet, C.; Bos, C.; Davila-Gay, A. M.; Tomé, D.; Cynober, L.; Blachier, F.: Colonic luminal ammonia and portal blood L-glutamine and L-arginine concentrations: a possible link between colon mucosa and liver ureagenesis. *Amino acids*, **37**:4, 751–60 (2009).

- Elmer, G. W.; Rimmel, R. P.: Role of the intestinal microflora in clonazepam metabolism in the rat. *Xenobiotica*. **14**:11, 829–40 (1984).
- Elzinga, J.; van der Oost, J.; de Vos, W.M.; Smidt, H.: The Use of Defined Microbial Communities To Model Host-Microbe Interactions in the Human Gut. *Microbiol Mol Biol Rev*. **83**:2, e00054-18 (2019).
- Eyice, Ö.; Namura, M.; Chen, Y.; Mead, A.; Samavedam, S.; Schäfer, H.: SIP metagenomics identifies uncultivated Methylophilaceae as dimethylsulphide degrading bacteria in soil and lake sediment. *ISME J*. **9**:11, 2336–48 (2015).
- Falony, G.; Lazidou, K.; Verschaeren, A.; Weckx, S.; Maes, D.; De Vuyst, L.: In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by Bifidobacterium species reveals four different phenotypes. *Appl Environ Microbiol*. **75**:2, 454–61 (2009).
- Flick, J. A.; Hamilton, S. R.; Rosales, F. J.; Perman, J. A.: Methane excretion and experimental colonic carcinogenesis. *Dig Dis Sci*. **35**:2, 221–4 (1990).
- Plant Phenolics and Human Health*. Fraga Cesar, G. (ed.). New York, John Wiley & Sons, 2009.
- Fransen, F.; van Beek, A. A.; Borghuis, T.; Meijer, B.; Hugenholtz, F.; van der Gaast-de Jongh, C.; Savelkoul, H. F.; de Jonge, M. I.; Faas, M. M.; Boekschoten, M. V.; Smidt, H.; El Aidy, S.; de Vos, P.: The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. *Front Immunol*. **8**, 754 (2017).
- Frick, P. G.; Riedler, G.; Brögli, H.: Dose response and minimal daily requirement for vitamin K in man. *J Appl Physiol*. **23**:3, 387–9 (1967).
- Frost, G.; Sleeth, M. L.; Sahuri-Arisoylu, M.; Lizarbe, B.; Cerdan, S.; Brody, L.; Anastasovska, J.; Ghourab, S.; Hankir, M.; Zhang, S.; Carling, D.; Swann, J. R.; Gibson, G.; Viardot, A.; Morrison, D.; Louise Thomas, E.; Bell, J. D.: The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. **5**, 3611 (2014).
- Fujii, J.; Inotsume, N.; Nakano, M.: Degradation of bromazepam by the intestinal microflora. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **35**:10, 4338–41 (1987).

Fuller, A.T.: Is p-aminobenzenesulphonamide the active agent in prontosil therapy? *Lancet*. **229**:5917 194-8 (1937).

Gibson, G. R.; Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T.: Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol*. **54**:11, 2750–5 (1988).

Gibson, S. A.; McFarlan, C.; Hay, S.; MacFarlane, G. T.: Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Appl Environ Microbiol*. **55**:3, 679–83, (1989).

Gingell, R.; Bridges, J. W.; Williams, R. T.: The role of the gut flora in the metabolism of prontosil and neoprontosil in the rat. *Xenobiotica*. **1**:2, 143–56, (1971).

Goldin, B. R.; Peppercorn, M. A.; Goldman, P.: Contributions of host and intestinal microflora in the metabolism of L-dopa by the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. **186**:1, 160–6 (1973).

Gustafsson, B. E.; Angelin, B.; Einarsson, K.; Gustafsson, J. A.: Effects of cholesterol feeding on synthesis and metabolism of cholesterol and bile acids in germfree rats. *J Lipid Res*. **18**:6, 717–21 (1977).

Gustafsson, B.E.; Daft, F.S.; McDaniel, E.G.: Effects of vitamin K-active compounds and intestinal micro-organisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J Nutr*. **78**:4, 461-8 (1968).

Hayashi, H.; Takahashi, R.; Nishi, T.; Sakamoto, M.; Benno, Y.: Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*. **54**:11, 1093–101

Hermanussen, M.; Gonder, U.; Jakobs, C.; Stegemann, D.; Hoffmann, G.: Patterns of free amino acids in German convenience food products: marked mismatch between label information and composition. *Eur J Clin Nutr*. **64**:1 88–98 (2010).

Hill M. J.: Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev.*, **6**:1, 43–5 (1997).

Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.: MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom.* **45**:7, 703–14 (2010).

Hu, C.; Yuan, Y. V.; Kitts, D. D.: Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. *Food Chem Toxicol.* **45**:11, 2219–27 (2007).

Hughes, R.; Kurth, M. J.; McGilligan, V.; McGlynn, H.; Rowland, I.: Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. *Nutr Cancer.* **60**:2, 259–66 (2008).

Hussaini, S. H.; Pereira, S. P.; Murphy, G. M.; Dowling, R. H. Deoxycholic acid influences cholesterol solubilization and microcrystal nucleation time in gallbladder bile. *Hepatology.* **22**:6, 1735–44 (1995).

Chan, R.P.; Pope, D.J.; Gilbert, A.P.; Sacra, P.J.; Baron, J.H.; Lennard-Jones, J.E.: Studies of two novel sulfasalazine analogs, ispsalazide and balsalazide. *Dig Dis Sci.* **28**, 609–15 (1983).

Christl, S. U.; Gibson, G. R.; Murgatroyd, P. R.; Scheppach, W.; Cummings, J. H.: Impaired hydrogen metabolism in pneumatosis cystoides intestinalis. *Gastroenterology.* **104**:2, 392–7 (1993).

Christl, S. U.; Murgatroyd, P. R.; Gibson, G. R.; Cummings, J. H.: Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology.* **102**:4, 1269–1277 (1992).

Iqbal, J.; Hussain, M. M.: Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **296**:6, 1183–94 (2009).

Ivanisevic, J.; Zhu, Z. J.; Plate, L.; Tautenhahn, R.; Chen, S.; O'Brien, P. J.; Johnson, C. H.; Marletta, M. A.; Patti, G. J.; Siuzdak, G.: Toward 'omic scale metabolite profiling: a dual separation-mass spectrometry approach for coverage of lipid and central carbon metabolism. *Anal Chem.* **85**:14, 6876–84 (2013).

Neufeld, J. D.; Wagner, M.; Murrell, J. C.: Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. *ISME J.* **1**:2, 103–10 (2007).



Marchesi, J. R., & Ravel, J.: The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **3**, 31 (2015).

Jalili-Firoozinezhad, S.; Gazzaniga, F. S.; Calamari, E. L.; Camacho, D. M.; Fadel, C. W.; Bein, A.; Swenor, B.; Nestor, B.; Cronce, M. J.; Tovaglieri, A.; Levy, O.; Gregory, K. E.; Breault, D. T.; Cabral, J.; Kasper, D. L.; Novak, R.; Ingber, D. E.: A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng.* **3**:7, 520–31 (2019).

Jaskiewicz, J.; Zhao, Y.; Hawes, J. W.; Shimomura, Y.; Crabb, D. W.; Harris, R. A.: Catabolism of isobutyrate by colonocytes. *Arch Biochem Biophys.* **327**:2, 265–70 (1996).

Johnson K.: Gut microbiome composition and diversity are related to human personality traits. *Hum Microbiol J.* **15**. DOI: 10.1016/j.humic.2019.100069 (2020).

Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., & Marchesi, J. R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**:36, 13580–5 (2008).

Wissenbach, D. K.; Oliphant, K.; Rolle-Kampczyk, U.; Yen, S.; Höke, H.; Baumann, S.; Haange, S. B.; Verdu, E. F.; Allen-Vercoe, E.; von Bergen, M.: Optimization of metabolomics of defined in vitro gut microbial ecosystems. *International journal of medical microbiology: Int J Med Microbiol.* **306**:5, 280–9 (2016).

Kamo, T.; Akazawa, H.; Suzuki, J. I.; Komuro, I.: Novel Concept of a Heart-Gut Axis in the Pathophysiology of Heart Failure. *Korean circulation journal,* **47**:5, 663–9 (2017).

Kanehisa, M.; Goto, S.: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research,* **28**:1, 27–30 (2000).

Kim, H. J.; Li, H.; Collins, J. J.; Ingber, D. E.: Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **113**:1, 7–15 (2016).

Koch, R. L.; Beaulieu, B. B., Jr.; Goldman, P.: Role of the intestinal flora in the metabolism of misonidazole. *Biochem Pharmacol.* **29**:24, 3281–4 (1980).

Kurdi, P.; Kawanishi, K.; Mizutani, K.; Yokota, A.: Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J Bacteriol.* **188**:5, 1979–86 (2006).

Lajoie, S. F.; Bank, S.; Miller, T. L.; Wolin, M. J.: Acetate production from hydrogen and [13C]carbon dioxide by the microflora of human feces. *App Environ Microbiol.* **54**:11, 2723–7 (1988).

Lederberg, J.; McCray, A.T.: Ome sweet omics: a genealogical treasury of words. *Scientist.* **15**:7, 8 (2001).

Levitt, M. D.; Bond, J. H., Jr.: Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology.* **59**:6, 921–9 (1970).

Li, G.; Young, K. D.: Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology.* **159**:2, 402–10 (2013).

Lin, R.; Liu, W.; Piao, M.; Zhu, H.: A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino acids.* **49**:12, 2083–90 (2017).

Louis, P.; Young, P.; Holtrop, G.; Flint, H. J.: Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ microbiol.* **12**:2, 304–14 (2010).

Louis, P.; Flint, H. J.: Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ microbiol.* **19**:1 29–41 (2017).

Louis, P.; Hold, G. L.; Flint, H. J.: The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* **12**:10, 661–72 (2014).

Dumas, M. E.; Kinross, J.; Nicholson, J. K.: Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. *Gastroenterology,* **146**:1, 46–62 (2014).

Wang MH, Achkar JP. Gene-environment interactions in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* **31**:4, 277-82 (2015).

Macfarlane, G. T.; Cummings, J. H.; Allison, C.: Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol.* **132**:6, 1647–56 (1986).

Macfarlane, G. T.; Gibson, G. R.; Cummings, J. H.: Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol.* **72**:1, 57–64 (1992).

Macfarlane, S.; Macfarlane, G. T.: Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environ Microbiol.* **72**:9, 6204–11 (2006).

Magnúsdóttir, S.; Ravcheev, D.; de Crécy-Lagard, V.; Thiele, I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet.* **6**, 148 (2015).

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**:5, 727–47 (2004).

Marcobal, A.; De las Rivas, B.; Landete, J. M.; Tabera, L.; Muñoz, R.: Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **52**:5, 448–67 (2012).

Marín, L.; Miguélez, E. M.; Villar, C. J.; Lombó, F.: Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* **2015**, 905215 (2015).

Marteau, P.; Pochart, P.; Doré, J.; Béra-Maillet, C.; Bernalier, A.; Corthier, G.: Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* **67**:10, 4939–42 (2001).

Marzorati, M.; Van de Wiele, T.: An Advanced In Vitro Technology Platform to Study the Mechanism of Action of Prebiotics and Probiotics in the Gastrointestinal Tract. *J Clin Gastroenterol.* **50**:2, 124–5 (2016).

Meijers, B. K.; Evenepoel, P.: The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol Dial Transplant.* **26**:3, 759–61 (2011).

Merkunová, A.; Orel M.: *Anatomie a fyziologie člověka*. Praha, Nakladatelství Grada, 2008.

Oliphant, K.; Allen-Vercoe, E.: Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*. **7**:1, 91 (2019).

Pabst, O.: Correlation, consequence, and functionality in microbiome-immune interplay. *Immunol Rev*. **279**:1, 4–7 (2017).

Pariente, N.: Milestones: *A field is born*. Dostupné z URL: <<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d42859-019-00006-2/d42859-019-00006-2.pdf>> [cit. 23. 5. 2020].

Peppercorn M.A.; Goldman P.: The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *J Pharmacol Exp Ther*. **181**, 151–62 (1972).

Peppercorn, M. A.; Goldman, P.: Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. *Gastroenterology*. **64**:2, 240–5 (1973).

Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A.: Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr*. **93**:6, 1220–8 (2011).

Pugin, B.; Barcik, W.; Westermann, P.; Heider, A.; Wawrzyniak, M.; Hellings, P.; Akdis, C. A.; O'Mahony, L. A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microb Ecol Health Dis*. **28**:1, 1353881 (2017).

Purohit, H. J.: Gut-Bioreactor and Human Health in Future. *Ind J Microbiol*. **58**:1, 3–7 (2018).

Quartieri, A.; García-Villalba, R.; Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A.; Rossi, M.; Tomàs-Barberà, F.: Detection of novel metabolites of flaxseed lignans in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*. **60**:7, 1590–1601 (2016).

Rafii, F.; Cerniglia, C. E.: Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environ Health Perspect*. **103**:5, 17–9 (1995).

Rodríguez, J. M.; Murphy, K.; Stanton, C.; Ross, R. P.; Kober, O. I.; Juge, N.; Avershina, E.; Rudi, K.; Narbad, A.; Jenmalm, M. C.; Marchesi, J. R.; Collado, M. C.: The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. **26**, 26050 (2015).

- Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K.: Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* **57**:1, 1–24 (2018).
- Russell, W. R.; Duncan, S. H.; Scobbie, L.; Duncan, G.; Cantlay, L.; Calder, A. G.; Anderson, S. E.; Flint, H. J.: Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol Nutr Food Res.* **57**:3, 523–35 (2013).
- Russell, W. R.; Scobbie, L.; Chesson, A.; Richardson, A. J.; Stewart, C. S.; Duncan, S. H.; Drew, J. E.; Duthie, G. G.: Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds. *Nut Cancer.* **60**:5, 636–42 (2008).
- Saeidnia, S.; Manayi, A.; Abdollahi, M.: From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Curr Drug Discov Technol.* **12**:4, 218–24 (2015).
- Said, H.M.: Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. *J Nutr.* **139**:1, 158–62 (2009).
- Scott, K.P.; Duncan, S.H.; Flint, H.J.: Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutr Bull.* **33**, 201–11 (2008).
- Shah, P.; Fritz, J. V.; Glaab, E.; Desai, M. S.; Greenhalgh, K.; Frachet, A.; Niegowska, M.; Estes, M.; Jäger, C.; Seguin-Devaux, C.; Zenhausem, F.; Wilmes, P.: A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat Commun.* **7**, 11535 (2016).
- Shimazu, S.; Miklya, I.: Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: beta-phenylethylamine, tryptamine, and their synthetic derivatives. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **28**:3 421–7 (2004).
- Shu, Y. Z.; Kingston, D. G.; Van Tassell, R. L.; Wilkins, T. D.: Metabolism of levamisole, an anti-colon cancer drug, by human intestinal bacteria. *Xenobiotica.* **21**:6, 737–750 (1991).

Sheldon, P.W.; Clarke, C.; Dawson, K.B.; Simpson, W.; Simmons, D.J.C.: Intestinal microflora as potential modifiers of sensitizer activity in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **10**, 1371–5 (1984).

Scheline R. R.: Drug metabolism by intestinal microorganisms. *J Pharm Sci.* **57**:12, 2021–37 (1968).

Scheline R. R.: Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol Rev.* **25**:4, 451–523 (1973).

Smith, E. A.; Macfarlane, G. T.: Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol.* **81**:3, 288–302 (1996).

Smith, G. E.; Griffiths, L. A.: Metabolism of N-acylated and O-alkylated drugs by the intestinal microflora during anaerobic incubation in vitro. *Xenobiotica.* **4**:8, 477–87 (1974).

Steliou, K.; Boosalis, M. S.; Perrine, S. P.; Sangerman, J.; Faller, D. V.: Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access.* **1**:4, 192–8 (2012).

Suarez, F.; Furne, J.; Springfield, J.; Levitt, M.: Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. *Am J Physiol.* **272**, 1028–33 (1997).

Sweeny, D. J.; Li, W.; Clough, J.; Bhamidipati, S.; Singh, R.; Park, G.; Baluom, M.; Grossbard, E.; Lau, D. T.: Metabolism of fostamatinib, the oral methylene phosphate prodrug of the spleen tyrosine kinase inhibitor R406 in humans: contribution of hepatic and gut bacterial processes to the overall biotransformation. *Drug Metab Dispos.* **38**:7, 1166–76 (2010).

Szilagyi, A.; Ishayek, N.: Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients.* **10**:12, 1994 (2018).

Takeo, S.; Sakai, T.: Involvement of the intestinal microflora in nitrazepam-induced teratogenicity in rats and its relationship to nitroreduction. *Teratology.* **44**:2, 209–14 (1991).

- Tazoe, H.; Otomo, Y.; Kaji, I.; Tanaka, R.; Karaki, S. I.; Kuwahara, A.: Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol.* **59**:2, 251–62 (2008).
- Tomasova, L.; Konopelski, P.; Ufnal, M.: Gut bacteria and hydrogen sulfide: the new old players in circulatory system homeostasis. *Molecules.* **21**:11, 1558 (2016).
- Tramontano, M.; Andrejev, S.; Pruteanu, M.; Klünemann, M.; Kuhn, M.; Galardini, M.; Jouhten, P.; Zelezniak, A.; Zeller, G.; Bork, P.; Typas, A.; Patil, K. R.: Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. *Nat Microbiol.* **3**:4 514–22 (2018).
- Tripathi, A.; Debelius, J.; Brenner, D. A.; Karin, M.; Loomba, R.; Schnabl, B.; Knight, R.: The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **15**:7, 397–411 (2018).
- Truelove, S.C.: Evolution of olsalazine. *Scand J Gastroenterol.* **148**, 3–6 (1988).
- Vanhaecke, L.; Vercruyse, F.; Boon, N.; Verstraete, W.; Cleenwerck, I.; De Wachter, M.; De Vos, P.; Van de Wiele, T.: Isolation and characterization of human intestinal bacteria capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Appl Environ Microbiol.* **74**:5 1469–77 (2008).
- Vecka M., Žák A., Staňková B., Fojtíková Š., Tomášová P., Kutová, S.: Žlučové kyseliny – malé molekuly velkých možností. *Chem Listy.* **113**:2, 82–9 (2019).
- Venturelli, O. S.; Carr, A. C.; Fisher, G.; Hsu, R. H.; Lau, R.; Bowen, B. P.; Hromada, S.; Northen, T.; Arkin, A. P.: Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities. *Mol Sys Biol.* **14**:6, e8157 (2018).
- Vergnolle, N.: Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut.* **65**:7, 1215-24 (2016).
- Vital, M.; Howe, A.; Tiedje, J.M.: Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio.* **5**. DOI:10.1128/mBio.00889-14 (2014).
- de Vlardar, H.P.: Amino acid fermentation at the origin of the genetic code. *Biol Direct.* **7**:6. DOI: 10.1186/1745-6150-7-6 (2012).

- Whipps, J. M.; Lewis, K.; Cooke, R.C.: *Fungi in biological control systems*. Manchester, Manchester University Press, 1988, s.161-87
- Williams, B. B.; Van Benschoten, A. H.; Cimermancic, P.; Donia, M. S.; Zimmermann, M.; Taketani, M.; Ishihara, A.; Kashyap, P. C.; Fraser, J. S.; Fischbach, M. A.: Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe*. **16**:4, 495-503 (2014).
- Wilmes, P.; Calatayurd, M.; Van de Wiele, Tom.: Resolving host-microbe interactions in the gut: the promise of in vitro models to complement in vivo research. *Curr Opin Microbiol*. **44**, 28-33 (2018).
- Wissenbach, D. K.; Oliphant, K.; Rolle-Kampczyk, U.; Yen, S.; Höke, H.; Baumann, S.; Haange, S. B.; Verdu, E. F.; Allen-Vercoe, E.; von Bergen, M.: Optimization of metabolomics of defined in vitro gut microbial ecosystems. *Int J Med Microbiol Suppl*. **306**:5, 280–9 (2016).
- Woese, C.R.; Stackebrandt, E.; Macke, T.J.; Fox, G.E.: A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol*. **6**, 143-51 (1985).
- Woese, C. R.: Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. **51**:2, 221-71 (1987).
- Wolf, P.G.; Biswas, A.; Morales, S.E.; Greening, C.; Gaskins, H.R.: H<sub>2</sub> metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes. *Gut Microbes*. **7**:3, 235-45. (2016).
- Wolfe A.J. Glycolysis for the microbiome generation. *Microbiol Spectr*. **3**:3. DOI: 10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014 (2015).
- Woollett, L. A.; Buckley, D. D.; Yao, L.; Jones, P. J.; Granholm, N. A.; Tolley, E. A.; Heubi, J. E.: Effect of ursodeoxycholic acid on cholesterol absorption and metabolism in humans. *J Lipid Res*. **44**:5, 935–42 (2003).
- Wu, G.: Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*. **128**:2, 1249-52 (1998).
- Xu, J.; Bjursell, M. K.; Himrod, J.; Deng, S.; Carmichael, L. K.; Chiang, H. C.; Hooper, L. V.; Gordon, J. I.: A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*. **299**:5615, 2074–76 (2003).



Yadav, M.; Verma, M.K.; Chauhan, N.S.: A Review of Metabolic Potential of Human Gut Microbiome in Human Nutrition. *Arch Microbiol.* **200**:2, 203-217 (2018).

Yao, C.K.; Muir, J.; Gibson, P.R.: Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther.* **43**:2, 181-96 (2016).

Yoo, D.H.; Kim, I.S.; Van Le, T.K.; Jung, I.H.; Yoo, H.H.; Kim, D.H.: Gut microbiota-mediated drug interactions between lovastatin and antibiotics. *Drug Metab Dispos.* **42**:9, 1508-13 (2014).

Yunis, A.A.: Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Amer J Med* **87**:3N, 44-8 (1989).

Zoetendal, E.G.; Raes, J.; van den Bogert, B.; Arumugam, M.; Booijink, C.; Troost, F.G.; Bork, P.; Wels, M.; de Vos, W.M.; Kleerebezem, M.: The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates, *ISME J.* **6**:7, 1415–26 (2012).