

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Bianka Mičke

**Střevní mikrobiom a fekální markery metabolismu potkana během morfinového
abstinenčního syndromu**
**Rat gut microbiome composition and metabolic faecal markers upon morphine
withdrawal**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 10.8. 2022

Bianka Mičke

Poděkování

V první řadě patří velké poděkování mému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za cenné rady a příležitost zabývat se studiem mikrobiomu a metabolomu na katedře fyziologie. Když jsem za ním přišla v únoru 2020 s tím, že mě toto téma zajímá a ráda bych ho studovala, tak prakticky do druhého dne vše potřebné zajistil a obeznámil mě o možnostech proveditelných experimentů. I přestože má na starosti mnoho jiných věcí, vždy mi ochotně kdykoliv během dne poskytl odpovědi na všechny moje dotazy ohledně sepisování práce i samotného výzkumu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petře Procházkové, PhD. za opravdu detailní uvedení do problematiky analýzy mikrobiomu. Díky ní jsem se naučila nové postupy datové analýzy, které budu moci využít i v nadcházející práci.

Taktéž musím poděkovat Petru Žáčkovi, PhD. za pomoc s navržením experimentu metabolomické analýzy a za všechny konzultace a připomínky týkající se zpracování dat i samotné metabolomiky.

Nakonec děkuji svému příteli, rodině, kamarádům a kolegům za podporu ve studiu a vědecké činnosti. Zejména poslední víkendový výlet na veslařské závody do Švédska mi dodal elán pro dokončení této práce.

Abstrakt

Primárním účelem této pilotní studie bylo dlouhodobě sledovat složení střevního mikrobiomu a fekálních markerů metabolismu u potkanů po ukončení desetidenního intraperitoneálního podávání stoupajících dávek morfinu (od 10 do 50 mg/kg/den) a u odpovídajících kontrolních skupin potkanů, kterým morfin podáván nebyl. S tím bylo spojeno zavedení nových metod pro výzkum mikrobiomu a metabolomu, statistické vyhodnocení výsledků a interpretace dat, popř. vytvoření hypotézy vysvětlující následky působení morfinu na složení střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu v porovnání s výslednými daty podobně orientovaných studií. Vlastní experiment byl proveden na samcích potkanů z kmene Wistar ve staří dvou měsíců a hmotnosti cca 300 g, kteří byli chováni na standardní krmné dietě.

Z provedené analýzy a vyhodnocení výsledných dat vyplývá, že ve sledovaném období došlo ke změnám ve složení střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu u pokusné skupiny oproti kontrolní skupině, avšak vyvolané změny měly spíše dočasný charakter. Další studie by měly být provedeny za použití podstatně rozsáhlejší pokusné i kontrolní skupiny a také vyšší granularitě časové řady.

Klíčová slova: morfin, opioidy, abstinenční syndrom, střevní mikrobiom, fekální metabolom

Abstract

The primary purpose of this pilot study was a long-term monitoring of the gut microbiome composition and fecal markers of metabolism in rats following the completion of 10-day intraperitoneal administration of increasing morphine doses (from 10 to 50 mg/kg/day) and in the corresponding control groups of rats that didn't administrate morphine. This study involved the introduction of new methods for microbiome and metabolome research, statistical evaluation of results and interpretation of data, or hypothesis to explain the effects of morphine on the gut microbiome and fecal metabolome composition compared to the resulting data of similarly oriented studies. The actual experiment was conducted on male Wistar rats aged 2 months and weighing approximately 300 g, which were maintained on a standard chow diet.

The analysis and evaluation of the resulting data showed that there were changes in the composition of the gut microbiome and fecal metabolome in the experimental group compared to the control group during the reporting period but the induced changes were rather temporary. Further studies should be performed using a significantly larger experimental and control group as well as higher time series granularity.

Keywords: morphine, opioids, withdrawal, gut microbiome, faecal metabolome

Obsah

1. Seznam zkratk	1
2. Úvod	3
3. Literární přehled	4
3.1. Morfín	4
3.1.1. Stručná historie využití morfinu a dalších opioidů	4
3.1.2. Chemické vlastnosti morfinu	6
3.1.3. Farmakokinetika a metabolismus morfinu	7
3.1.4. Opioidní receptory	9
3.1.5. Molekulární mechanismus působení morfinu a jeho metabolitů	13
3.1.6. Terapeutické využití morfinu	13
3.1.7. Vedlejší účinky při morfinové léčbě	14
3.2. Tolerance a závislost k opioidním látkám	16
3.2.1. Tolerance	16
3.2.2. Závislost	17
3.2.3. Abstinence a abstinční syndrom	19
3.3. Mikrobiom	21
3.3.1. Střevní mikrobiom	23
3.3.2. Změny ve složení střevního mikrobiomu v průběhu života	25
3.3.3. Komunikace střevního mikrobiomu s hostitelským organismem	27
3.4. Metabolom	31
3.4.1. Fekální metabolom	31
4. Cíle diplomové práce	34
5. Experimentální část	35
5.1. Experimentální model	35
5.2. Analýza střevního mikrobiomu	35
5.2.1. Chemikálie a přístrojové vybavení	35
5.2.2. Příprava vzorků	36
5.2.3. Sekvenování nové generace	38

5.2.4. Zpracování dat.....	40
5.3. Analýza fekálního metabolomu	41
5.3.1. Chemikálie a přístrojové vybavení.....	41
5.3.2. Příprava vzorků	41
5.3.3. Komprehensivní dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	42
5.3.4. Zpracování dat.....	45
6. Výsledky	46
6.1. Grafické znázornění relativního zastoupení jednotlivých bakteriálních rodů ve střevním mikrobiomu ve všech vzorcích	46
6.2. Grafické znázornění rozdílů ve složení střevního mikrobiomu mezi sledovanými skupinami..	49
6.3 Stanovení poměru <i>Firmicutes</i> ku <i>Bacteroidetes</i> u sledovaných skupin.....	54
6.4. Stanovení alfa diverzity v rámci jednotlivých skupin	56
6.4.1. Chao1 index	56
6.4.2. Shannon-Wiener index.....	57
6.4.2. Pielou's evenness index.....	59
6.5. Rozdíly v beta diverzitě mezi jednotlivými skupinami.....	60
6.5.1. Grafické znázornění beta diverzity pomocí NMDS.....	61
6.5.2. Statistická analýza rozdílů v beta diverzitě pomocí PERMANOVA testu	61
6.6. Vizualizace rozdílů ve složení střevního mikrobiomu kontrolní a pokusné skupiny v prvním a posledním intervalu odběru.....	63
6.7. Vizualizace rozdílů ve složení metabolomu kontrolní a pokusné skupiny v prvním a posledním intervalu odběru na základě necílené metabolomické analýzy	64
6.8. Monitorování výskytu SCFA u sledovaných skupin.....	65
7. Diskuse	67
8. Závěr.....	73
9. Seznam použité literatury	74
Příloha 1 – Tabulka s počty readů identifikovaných taxonomických jednotek ve vzorcích trusu potkanů	81
Příloha 2 – tabulka s množstvím detekovaného signálu jednotlivých SCFA ve vzorcích trusu potkanů	85

1. Seznam zkratk

5-HT – 5-hydroxytryptamin, serotonin

16S rRNA – 16S ribozomální ribonukleová kyselina

AhR – aryl uhlovodíkový receptor (aryl hydrocarbon receptor)

ANOVA – analýza rozptylu (analysis of variance)

ANS – autonomní nervový systém

BDNF – mozkový neurotrofický faktor (brain-derived neurotrophic factor)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CGRP – calcitonin gene-related peptide

CNS – centrální nervový systém

CREB – cAMP response element-binding protein

CYP – cytochrom

DADLE – delta-alanin-delta-leucin-enkefalin

DC – dendritická buňka

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DOR – delta opioidní receptory

EB – promývací pufr (elution buffer)

EC – enterochromafinní buňka

ENS – enterický nervový systém

HDAC -histondeacetyláza

GABA – kyselina γ -aminomáselná

GCxGC-TOF/MS – komprehensivní dvourozměrná plynová chromatografie s time-of-flight hmotnostní detekcí

GDP – guanosindifosfát

G_i proteiny – rodina inhibičních G proteinů

GIRK kanál – G proteiny aktivovaný dovnitř usměrňující K⁺ kanál (G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel)

GIT – gastrointestinální trakt

GRK – kináza receptorů spřažených s G proteiny (G protein-coupled receptor kinase)

GTP – guanosintrifosfát

HMP – Human Microbiome Project

IL – interleukin

KOR – kappa opioidní receptory

M3G – morfin-3-glukuronid

M6G – morfin-6-glukuronid

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy

MOR – morfinové opioidní receptory

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

NGS – sekvenování nové generace (next generation sequencing)

NK buňky – přirození zabíječi (natural killer cells)

NMDA receptor – N-metyl-D-aspartátový receptor

NMDS – nemetrické multidimenzionální škálování (non-metric multi-dimensional scaling)

NMR – nukleární magnetická rezonance

OR – opioidní receptor

OTU – operační taxonomická jednotka (operational taxonomic unit)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PERMANOVA – permutační vícerozměrná analýza rozptylu (permutational multivariate analysis of variance)

pK_a – disociační konstanta

PCA – analýza hlavních komponent (principal component analysis)

PLC – fosfolipáza C

RNA – ribonukleová kyselina

SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acids)

sPLS-DA – částečná diskriminační analýza nejmenších čtverců (sparse partial least squares regression discriminant analysis)

TBDMS – tertbutyl-dimethyl-silylové-čínidlo

TLR4/MD-2 – heterodimer Toll-like receptor 4/myeloidní diferenciací protein-2

TMSIL – trimethyl-silylové-čínidlo

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α

UGT – uridindifosfát-glukuronyltransferáza

2. Úvod

Analgetické a anestetické účinky morfinu na organismus jsou lidstvu odedávna známy. Dnes je morfin považován za zlatý standard pro léčbu bolesti. Je využíván zejména v klinické medicíně pro tlášení chronických středně silných a velmi intenzivních bolestí. Čím dál častěji jsou opioidní látky, včetně morfinu, zneužívány jako drogy, protože jejich užití vyvolává mimo jiné narkotické a euforické účinky. Popularitu zneužívání opioidů podporuje jejich snadná dostupnost. S užíváním morfinu jsou ovšem spojeny méně vážné, ale i velice závažné vedlejší účinky, jako jsou např. nevolnost, zácpa, únava, útlum dechového centra, postupný vznik tolerance a fyzické i psychické závislosti. Po vysazení užívání morfinu dochází k rozvoji nepříjemných prožitků spojených s abstinenčním syndromem.

V relativně nedávné době bylo u zvířat objeveno, že je užívání morfinu spojeno s narušením složení střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu (Banerjee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Střevní mikrobiom přímo ovlivňuje metabolické procesy ve střevě, jeho propustnost a interaguje s imunitním, endokrinním a centrálním nervovým systémem svého hostitele (Bello *et al.*, 2018). Dysbióza ve střevním mikrobiomu vede k narušení střevní bariéry a bakteriální translokaci, což iniciuje lokální zánět střev (Zhang *et al.*, 2019) a v neposlední řadě je mikrobiální dysbióza spojena se vznikem mnoha onemocnění zahrnující obezitu, diabetes, astma, alergie, idiopatické střevní záněty a mnoho dalších (Bello *et al.*, 2018). Fekální metabolom přímo reflektuje funkční stav střevního mikrobiomu (Zierer *et al.*, 2018) a posun v jeho složení po užití morfinu může přispět k systémovému zánětu (Banerjee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Doposud studie, zabývající se vlivem užívání morfinu na střevní mikrobiom a fekální metabolom, sledovaly změny ve složení střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu pouze krátkodobě, proto byly v této studii vzniklé změny monitorovány v dlouhodobém horizontu, a to zhruba během desetiny života laboratorního potkana po ukončení aplikace morfinu.

3. Literární přehled

3.1. Morfin

Morfin je přírodní alkaloid, který se vyskytuje v mléčné míze nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Tato mléčná míza se nazývá opium a společně s morfinem obsahuje alkaloidy kodein, tebain, papaverin, noscapin (dříve nazývaný narkotin) a další. Opiové alkaloidy a látky, které jsou schopné vázat se na opioidní receptory (OR), se označují jako opioidy

Morfin, kodein a tebain působí na centrální nervový systém (CNS). Vykazují analgetický a narkotický účinek a jsou to potenciálně návykové látky. Papaverin a noscapin spolu s většinou dalších opiových alkaloidů působí pouze na uvolnění hladkého svalstva (Schiff, 2002).

3.1.1. Stručná historie využití morfinu a dalších opioidů

Mák setý je jednou z nejstarších rostlin využívaných v lékařství. Předpokládá se, že rostlina má svůj původ v Malé Asii, protože první písemná zmínka o pěstování máku setého a používání opia pochází z období okolo 3000 před naším letopočtem z Mezopotámie. Záznamy jsou psané v sumerštině klínovým písmem a dochovaly se na hliněných destičkách, které byly nalezeny ve městě Nippur, kde se nacházelo duchovní centrum tehdy velmi vyspělé sumerské civilizace. Na destičkách je popsáno pěstování a sběr máku, ale také brzký ranní sběr mléčné makové mízy s následnou výrobou opia. Sumerové označovali opium termínem „gil“, což znamená štěstí. Termín se v určitých kulturách ve světě dochoval dodnes, mák setý je označován „gil hul“ – rostlina štěstí. Podobně jako Sumerové, tak i Asyřané sbírali mléčnou makovou mízu brzy ráno a nazývali ji „atrapa pal“, což je pravděpodobně základ pro latinské označení rodu máku „*Papaver*“. Poté, co Asýrii a Babylonii dobyli Peršané, se zmínka o pěstování máku a výrobě opia objevuje ještě v 6. století před naším letopočtem (Schiff, 2002).

Slovo „opium“ je ovšem řeckého původu. Je odvozené od slov „opos“ – šťáva a „opion“ – makový džus. Opium se pravděpodobně dostalo do Řecka z Malé Asie. Řekové si s opiem spojovali různá božstva a často bylo zmiňováno v řecké mytologii. Opium považovali za symbol útěchy, zapomnění a všechny své noční bohy korunovali věncem z makových květů, protože věřili, že spánek je nejlepší lékař a utěšovatel lidstva. Řekové používali opium k utišení plačících dětí, ale v kombinaci s bolehlavem plamatým (*Conium maculatum*) se používalo jako prudký jed k popravám odsouzených. Homér počátkem 8. století před naším letopočtem popisuje v eposech Ilias a Odysseia opium jako opojnou, bolest potlačující a spánek navozující látku. O makové šťávě v opiovém víně se ve svých spisech zmínil také Hippokrates (460-377 př. n. l.) (Brownstein, 1993; Schiff, 2002).

Římané užívali opium v lékařství a jako jed, např. císař Nero v 1. století našeho letopočtu hojně využíval rostlinné jedy včetně opia k likvidaci svých nepřátel a Dioscorides popisuje účinky opia ve své encyklopedii (Schiff, 2002).

Arabové nazývali opium slovním spojením „Abou-el-noum“ – otec spánku. Známy arabský lékař a filozof Avicenna sepsal o opiu slavnou tezi, ale později zemřel na předávkování opiem. Arabští obchodníci rozšířili opium do celého světa (Schiff, 2002).

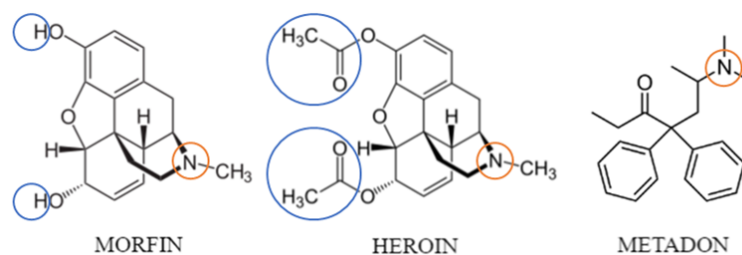
Lidé nejčastěji inhalovali páry opia anebo opium kouřili společně s tabákem. Zejména v Číně bylo populární kouření čistého opia ve speciálních dýmkách k dosažení euforických stavů. V Evropě se ve středověku opium tolik nevyužívalo kvůli jeho toxicitě, ale švýcarský alchymista Paracelsus využívání opia, zejména pro jeho analgetický efekt, v 16. století opět zpopularizoval. Rozpustil opium v alkoholu, a vytvořil tak nápoj zvaný „laudanum“. V Británii v 17. století bylo „laudanum“ užitečné při léčbě morové epidemie (Schiff, 2002).

Začátkem 19. století německý lékárník Friedrich Wilhelm Sertürn izoloval z opia látku z většiny odpovědnou za jeho účinky a nazval ji morfin podle řeckého boha snů Morfea (Schmitz, 1985). Poté, co roku 1953 vynalezl Charles Gabriel Pravaz podkožní injekční jehlu (Schmitz, 1985), začal se morfin aplikovat při drobných chirurgických výkonech, pro utišení pooperační nebo chronické bolesti a jako doplněk k celkovým anestetikům (Brownstein, 1993).

Dnes je morfin nejpoužívanějším lékem pro tlumení středně těžkých a těžkých akutních nebo chronických bolestí (Murphy *et al.*, 2022). Vzhledem k rychlému vzniku závislosti a možnostem zneužití existují snahy vyvinout více účinný a nenávykový opioid.

Od roku 1898 začala farmaceutická společnost Bayer komerčně prodávat heroin, který vykazoval vyšší účinnost v potlačení bolesti než morfin a byl efektivnější při léčbě respiračních chorob než kodein, ale pacienti se na heroinu stali velmi rychle závislí. Od používání heroinu se v klinické medicíně velmi rychle upustilo (Brownstein, 1993; Hosztafi, 2001).

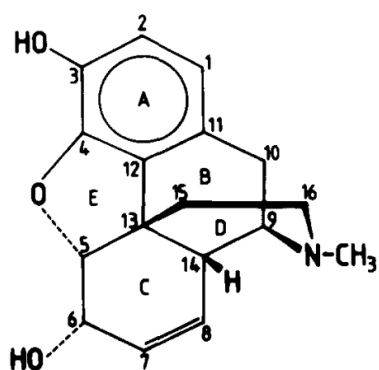
V roce 1939 poprvé syntetizovala německá farmaceutická společnost I.G. Farben metadon. Metadon v klinické medicíně a během II. světové války rychle nahradil morfin, jeho výroba je také levnější. Metadon má podobné léčivé účinky jako morfin, ale odlišnou strukturu (obrázek 1). Je prokázáno, že podávání metadonu namísto morfinu má pro pacienty výhody: má vyšší analgetický účinek, je efektivní při orálním podání. Jeho účinek trvá déle a působí také proti kašli, ale především k metadonu nevzniká tak intenzivní rychlá závislost a tolerance, jako na jiné opioidy. Léčbu metadonem je možné jednoduše ukončit, metadonový abstinenci syndrom je méně intenzivní na rozdíl od morfinového abstinenci syndromu (Defalque & Wright, 2007).



Obrázek 1. Srovnání struktury morfinu, heroinu a metadonu. Modře jsou zvýrazněny alkoholové skupiny (OH-) morfinu a jejich přeměna na acetylové skupiny (CH₃CO-) heroinu. Heroin je chemicky 3,6-diacetyl ester morfinu. Oranžově jsou zvýrazněny terciární aminy v každé molekule, protože právě ony jsou zodpovědné za afinitu těchto molekul v biologických systémech. Molekula metadonu je na rozdíl od morfinu a heroinu odlišná, ale dobře se vstřebává z gastrointestinálního traktu (GIT), proto může být metadon podán perorálně. Poté se hromadí ve všech tkáních, nejen v mozku. Kdykoliv poklesne hladina metadonu v plazmě, uvolňuje se z tkání a udržuje svou konstantní hladinu v plazmě po delší dobu. Právě proto jsou abstinenci příznaky po vysazení metadonu mírné. Upraveno podle Lugo *et al.*, 2005.

3.1.2. Chemické vlastnosti morfinu

Morfin je morfinanový alkaloid, jehož kostra je odvozena od fenantrenu a skládá se z pěti kondenzovaných kruhů (obrázek 2). Tato kostra je spíše rigidní struktura, ale fenolová skupina na C3 uhlíku, sekundární alkoholová skupina na C6 uhlíku a terciární dusík v piperidinovém kruhu mohou být chemicky aktivní (Benyhe, 1994; Trescot *et al.*, 2008). Čistý morfin vypadá jako bílý krystalický prášek.



Obrázek 2. Detailní pohled na strukturu morfinu skládající se z pěti kondenzovaných cyklů: A) fenol, B) cyklohexan, C) cyklohexenol, D) N-metyl-piperidin, E) částečně nasycený furanový kruh. Převzato z Benyhe, 1994.

V důsledku toho, že je morfin tvořen piperidinovým kruhem, má charakter slabé báze. Obecný název „alkaloid“, který označuje přírodní rostlinné sloučeniny mající atom dusíku ve své struktuře, odráží tuto vlastnost (Benyhe, 1994). Disociační konstanta (pK_a) morfinu má hodnotu 7,9 a při fyziologickém pH je 76 % molekul ionizovaných. Morfin je, kvůli přítomnosti dvou hydrofilních hydroxylových skupin na uhlících C3 a C6, relativně dobře rozpustný ve vodě a špatně rozpustný v tucích (Andersen *et al.*, 2003).

Hydroxylové skupiny na C3 a C6 mohou být konvertovány na ethery nebo estery, např. kodein je O-metylovaný morfin na pozici C3 (metylmorfin) a heroin je O-acetylovaný morfin na pozici C3 a C6

(diacetylmorfin). Terciární dusík v piperidinovém kruhu je stěžejní pro morfinový analgetický účinek. Pokud by byl dusík kvartérní, došlo by ke snížení analgezie, protože by morfin nemohl projít přes hematoencefalickou bariéru a působit v CNS. Změny na metylové skupině na terciárním dusíku také snižují analgetický efekt vytvářením antagonistů, jako je nalorfin (Trescot *et al.*, 2008).

Molekula morfinu je opticky aktivní, pouze levotočivý izomer vykazuje analgetický účinek. Přírodní morfin je levotočivá molekula, jeho syntetický pravotočivý protějšek vykazuje zcela odlišné biologické účinky (Benyhe, 1994; Trescot *et al.*, 2008). Molekula morfinu obsahuje šest chirálních center včetně jednoho na atomu dusíku. Absolutní konfigurace asymetrických atomů uhlíku přírodního morfinu je 5R6S9R13S14R. Početné farmakologické účinky morfinu jsou připisovány pouze této stereochemické struktuře přírodního morfinu (Benyhe, 1994).

3.1.3. Farmakokinetika a metabolismus morfinu

Morfin se nejčastěji podává ve formě sulfátové nebo hydrochloridové soli orálně, intravenózně, intramuskulárně nebo subkutánně, ale orální podání opioidů není u pacientů vždy možné provést. Zejména u pacientů s nevolností, zvracením, dysfagií nebo neprůchodností střev je možné využít i alternativní cesty podávání, a to sublinguální, bukální nebo rektální (Lugo & Kern, 2002). Pro docílení optimálního uvolňování a tlumení bolesti se obvykle aplikuje v předem daných poměrech dvěma cestami, např. orálně a intravenózně.

Rychlé vstřebávání morfinu bylo pozorováno po intramuskulárním a subkutánním podání, společně s výrazně vyšším vrůstem plazmatické koncentrace morfinu po dobu 15 minut až 3 hodin než u intravenózního podání. Při intravenózním podávání morfinu je jeho koncentrace v plazmě zpočátku vyšší, ale zároveň je rychleji distribuován do tkání, metabolizován a vylučován (Brunk & Delle, 1974).

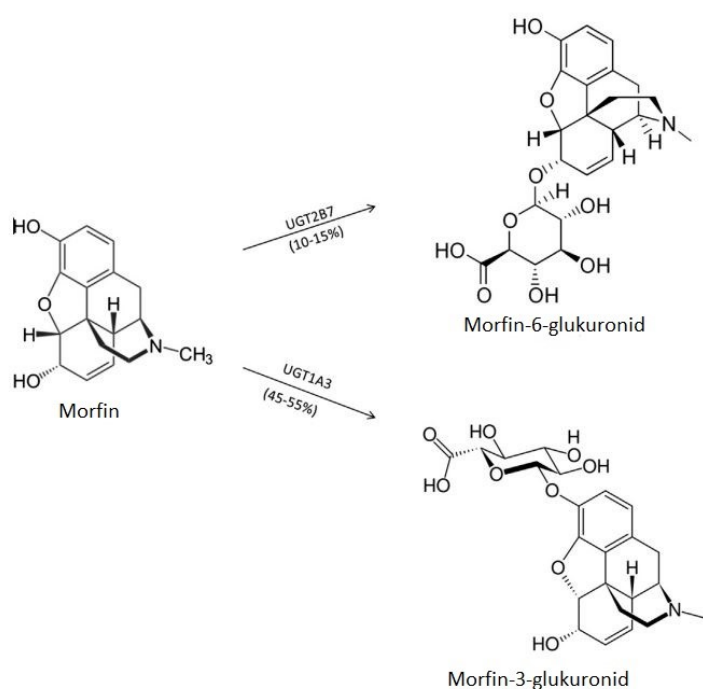
Po orálním podání je morfin téměř zcela absorbován z GIT, ale je rychle glukuronidován buňkami střevní sliznice a jater, a proto v plazmě nebo moči nenalezneme vysoké hladiny volného morfinu oproti hladinám glukuronidovaného morfinu (Brunk & Delle, 1974). Studie na potkanech prokázaly, že se morfin nejrychleji vstřebává v tenkém střevu v alkalickém prostředí jejunu a duodena, kde je většina morfinu v neionizované formě. V kyselém prostředí žaludku se morfin nachází v ionizované formě a vstřebává se omezeně (Tan *et al.*, 1989). Morfin je substrát pro membránový efluxní transportér P-glykoprotein, který je exprimován v epitelu tenkého střeva a v endotelu hematoencefalické bariéry (Sverrisdóttir *et al.*, 2015).

Kvůli významnému efektu prvního průchodu játry („first-pass effect“) se po orálním podání do systémového oběhu dostane pouze zlomek morfinu. Zhruba 20 až 50 % podané dávky dosáhne CNS a začíná účinkovat od 30 do 90 minut. Poločas eliminace morfinu je přibližně 120 minut (Andersen *et al.*, 2003; Trescot *et al.*, 2008; Sverrisdóttir *et al.*, 2015).

Důvodů, proč se dostane do CNS pouze část podaného morfinu, je několik: špatně se rozpouští v tucích, váže se na proteiny, rychle konjuguje s kyselinou glukuronovou a ionizuje ve fyziologickém pH. Neionizovaný morfin lépe prochází skrze hematoencefalickou bariéru. Během alkalózy se zvyšuje poměr neionizovaného morfinu v krvi. Je zajímavé poznamenat, že respirační acidóza zvyšuje koncentraci morfinu v mozku, protože krev zásobující mozek obsahuje více oxidu uhličitého a tehdy se v ní morfin vyskytuje v neionizované formě, takže lépe překonává hematoencefalickou bariéru (Trescot *et al.*, 2008).

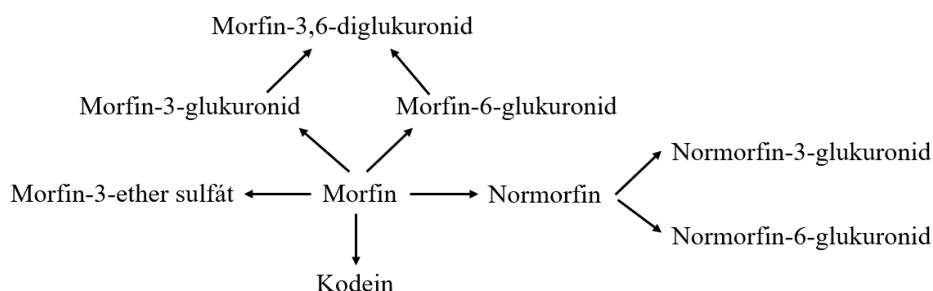
Dále se morfin rychle vstřebává do bohatě prokrvených tkání, jako jsou plíce, ledviny a játra. Přibližně 15 až 35 % morfinu je v krvi navázáno na plazmatické proteiny. Dominantně se váže k albuminu a v menší míře k α_1 -kyselému glykoproteinu (Leow *et al.*, 1993; Sverrisdóttir *et al.*, 2015). Kromě vazby na P-glykoprotein se morfin váže na transportéry spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí („multidrug resistance proteins“), které jsou exprimovány také v hematoencefalické bariéře. Společně s P-glykoproteinem se podílejí na vylučování morfinu z mozku (Tunblad *et al.*, 2003; Sverrisdóttir *et al.*, 2015).

Přibližně z 90 % je morfin metabolizován v játrech. Obecně se uvažuje, že metabolity jsou látky primárně určené k eliminaci z organismu, ale některé metabolity mohou být také biologicky aktivní. V případě morfinu se některé jeho metabolity podílí na analgezií. Morfin je primárně metabolizován glukuronidací. Je konjugován s kyselinou glukuronovou na morfin-3-glukuronid (M3G) a morfin-6-glukuronid (M6G) vykazující analgetický efekt. Z morfinu vzniká z 45 až 55 % M3G a z 10 až 15 % M6G (Benyhe, 1994; Sverrisdóttir *et al.*, 2015). Tyto reakce katalyzují enzymy zvané uridindifosfát-glukuronyltransferázy (UGT). Enzym UGT2B7 katalyzující tvorbu M6G a UGT13A se podílí na tvorbě M3G (obrázek 3) (Coffman *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1998).



Obrázek 3. Struktura morfinu a jeho hlavních metabolitů M3G a M6G. Upraveno podle Sverrisdóttir *et al.*, 2015.

Zhruba 5 % morfinu je N-demetylováno na piperidinovém kruhu enzymy CYP3A4 a CYP2C8 z rodiny cytochromu P450 (CYP) na normorfin. (Benyhe, 1994; Trescot *et al.*, 2008). V menším množství je morfin O-metylován na fenolové hydroxylové skupině na kodein. Normorfin vykazuje silnější antinociceptivní účinek než morfin a kodein je využíván jako středně silné analgetikum a silné antitusikum. Mezi další minoritní metabolity patří morfin-3,6-diglukuronid, morfin-3-ether sulfát, normorfin-6-glukuronid a normorfin-3-glukuronid (obrázek 4) (Hoskin & Hanks, 1990; Benyhe, 1994; Sverrisdóttir *et al.*, 2015).



Obrázek 4. Schéma morfinových metabolitů. Upraveno podle Andersen *et al.*, 2003.

Interakce morfinu s dalšími léčivy jsou považovány za vzácné, nicméně byly provedeny studie, které ukazují, že léčiva inhibující UGT mohou ovlivňovat produkci M3G a M6G (Armstrong & Cozza, 2003).

Co se týče exkrece, tak je přibližně 10 % z dávky morfinu vylučováno z těla v nezměněné formě, 45 až 55 % jako M3G, 10 až 15 % jako M6G a 5 % prostřednictvím minoritních metabolitů. Močí je vylučován M3G, M6G a normorfin se svými glukuronidovanými metabolity a v malé míře i morfin. Zbylé metabolity se vylučují žlučí společně s výkaly a do žluče se dostává velká část nezměněného morfinu, který může cirkulovat prostřednictvím enterohepatálního cyklu zpět do krevního řečiště (Hoskin & Hanks, 1990; Andersen *et al.*, 2003; Sverrisdóttir *et al.*, 2015).

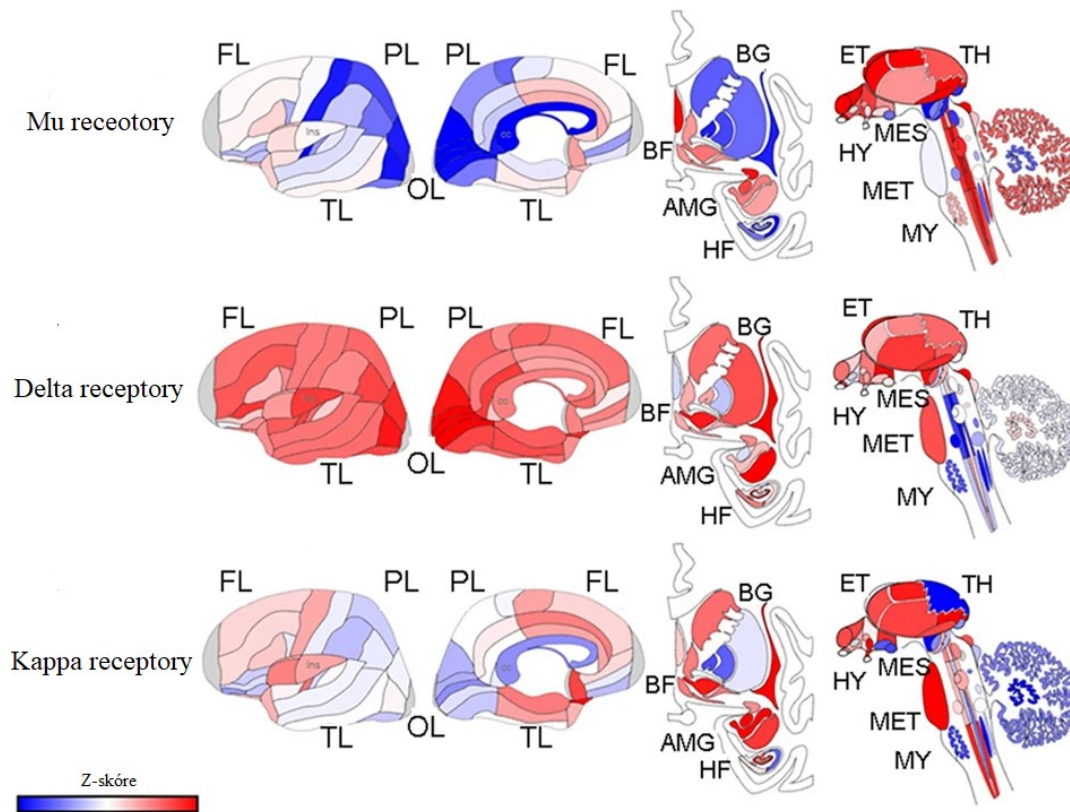
3.1.4. Opioidní receptory

Opioidní látky, včetně morfinu, působí analgeticky díky interakcím s OR. Tyto receptory, související s antinociceptivní kontrolou, jsou rozšířené v CNS i v periferních tkáních a dělíme je do tří hlavních tříd: mu (μ) – agonista morfin, kappa (κ) – agonista ketocyklazocin a delta (δ) – agonista delta-alanin-delta-leucin-enkefalin (DADLE). Názvy tříd OR jsou odvozeny od jejich hlavních agonistů a pojmenovány podle písmen řecké abecedy. Obvykle jsou OR stimulovány endogenními peptidy (endorfiny, enkefaliny a dynorfiny) produkovanými během reakcí na škodlivé situace v těle (Andersen *et al.*, 2003; Trescot *et al.*, 2008). Schéma distribuce OR v lidském mozku je zobrazeno na obrázku 5 a přehled látek interagujících s OR je uveden v tabulce 1.

Mu receptory, jinak nazývané morfinové opioidní receptory (MOR) nebo OP3, najdeme převážně v mozkovém kmeni a thalamu. Jsou odpovědné za supraspinální analgezií, útlum dýchání, euforii, sedaci, sníženou motilitu GIT a fyzickou závislost. Dále se dělí na podtypy mu1 související s analgezií, euforií, uklidněním a mu2 vztahující se k útlumu dýchání, pocitu svědění, uvolňování prolaktinu, sedaci, závislosti a anorexii (Trescot *et al.*, 2008).

Kappa receptory, označované jako kappa opioidní receptory (KOR) nebo OP2, se nacházejí v limbických a dalších oblastech mezimozku, v mozkovém kmeni a míše. Aktivace těchto receptorů způsobuje spinální analgezií, sedaci, dušnost, útlum dýchání, dysforii a závislost (Trescot *et al.*, 2008).

Delta receptory, pojmenované také jako delta opioidní receptory (DOR) nebo OP1, se vyskytují převážně v mozku a jsou pravděpodobně odpovědné za psychomimetické a dysforické účinky (Trescot *et al.*, 2008).

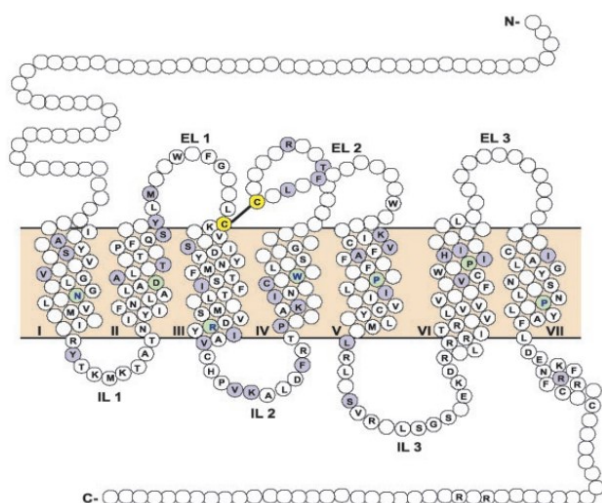


Obrázek 5. Distribuce OR v mozku 55 letého muže. V prvním a druhém sloupci je znázorněn vnější a vnitřní povrch levé mozkové hemisféry, ve třetím sloupci jsou z čelního pohledu vyobrazeny subkortikální struktury a ve čtvrtém sloupci jsou z bočního pohledu zobrazeny struktury mozku kmeny. Barevné spektrum znázorňuje expresi daných OR pomocí standardizovaných hodnot z-skóre. AMG (amygdala); BF (bazální přední mozek); BG (bazální ganglia); ET (epithalamus); FL (frontální lalok); HF (hipokampální formace); HY (hypotalamus); MES (mezencefalon – střední mozek); MET (metencefalon – zadní mozek); MY (myelencefalon – prodloužená mícha); OL (okcipitální lalok); PL (parietální lalok); TH (thalamus); TL (temporální lalok). Upraveno podle Valentino & Volkow, 2018.

Tabulka 1. Souhrnný přehled opioidů interagujících s OR. Převzato z Trescot *et al.*, 2008.

	Mu (μ)	Delta (δ)	Kappa (κ)
	• Mu 1 – Analgezie • Mu 2 – Sedace, zvracení, útlum dýchání, pocit svědění, euforie, anorexie, zadržování moči, fyzická závislost	• Analgezie, spinální analgezie	• Analgezie, sedace, dušnost, psychomimetické účinky, mioza, útlum dýchání, euforie, dysforie
Endogenní peptidy			
Enkefaliny	Agonista	Agonista	
β -Endorphin	Agonista	Agonista	
Dynorfin A	Agonista		Agonista
Agonisté			
Morfin	Agonista		Slabý agonista
Kodein	Slabý agonista	Slabý agonista	
Fentanyl	Agonista		
Meperidin	Agonista	Agonista	
Metadon	Agonista		
Antagonisté			
Naloxon	Antagonista	Slabý agonista	Antagonista
Naltrexon	Antagonista	Slabý agonista	Antagonista

Každý OR se skládá z extracelulárního N-konce, intracelulárního C-konce, sedmi transmembránových helixů, tří extracelulárních a tří intracelulárních smyček („loops“) (obrázek 6) (Waldhoer *et al.*, 2004).



Obrázek 6. Struktura OR. Římskými číslicemi jsou označeny transmembránové helixy, IL jsou intracelulární smyčky a EL extracelulární. Bílé prázdné kroužky značí unikátní aminokyseliny jednotlivých OR. Bílé kroužky s písmenem reprezentují identické aminokyseliny pro všechny tři typy OR. Fialové kroužky představují podobné aminokyseliny mezi OR. Zelené kroužky zvýrazňují vysoce konzervované motivy napříč OR. Žlutě jsou vybarveny dva konzervované cysteiny ve smyčkách EL1 a EL2, které pravděpodobně tvoří disulfidický můstek. Převzato z Waldhoer *et al.*, 2004).

Opioidní receptory jsou lokalizovány na presynaptických zakončeních nociceptivních C a A δ vláken a asociují primárně s příslušnými trimerními G_i proteiny (rodina inhibičních G proteinů). Aktivace OR vyvolává konformační změny v inhibičním G_i proteinu. Vede k výměně GDP (guanosindifosfátu) za GTP (guanosintrifosfát) na α podjednotce, která se uvolní od komplexu podjednotek β a γ . Podjednotka α inhibičního G_i proteinu může aktivovat či inhibovat různé iontové kanály nebo enzymy. V tomto případě dochází k inhibici adenylátcyklázy, což vede ke snížení produkce druhého posla cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu), který obvykle aktivuje proteinovou kinázu PKA. Dále podjednotka α vyvolá otevření draslíkových GIRK kanálů (G proteiny aktivovaných dovnitř usměřňujících K⁺ kanálů) vedoucí k hyperpolarizaci buněk a následné inhibici tonické neurální aktivity. Dimer podjednotek β a γ inhibičního G_i proteinu aktivuje PLC (fosfolipázu C), vlivem které se zvýší volná koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. Výsledkem těchto dějů je aktivace různých proteinkináz, např. MAPK (mitogenem aktivovaných proteinkináz) s následnou fosforylací a změnou funkce cílových proteinů, tedy krátkodobý efekt nebo aktivace transkripce různých genů přes vazebný protein CREB (cAMP response element-binding protein), tedy dlouhodobý efekt (Waldhoer *et al.*, 2004; Trescot *et al.*, 2008; Listos *et al.*, 2019).

Komplex utvořený z β a γ G proteinových podjednotek se navazuje na napětově závislé vápníkové kanály, které zneprůchodní a vápenaté ionty se nemohou dostávat do buněk, což inhibuje výlev neurotransmiterů (glutamát, substance P a CGRP (calcitonin gene-related peptide)) důležitých pro zprostředkování bolestivých vjemů. Opioidní látky, právě díky blokaci napětově závislých vápníkových kanálů, zastavují nebo zmírňují vedení bolesti (Jordan & Devi, 1998; Waldhoer *et al.*, 2004; McCleane, 2009).

Naopak chronická expozice morfinu indukuje fosforylaci OR pomocí serin/threoninové kinázy GRK (kinázy receptorů spřažených s G proteiny). Tato fosforylace připravuje OR pro vazbu β -arrestinu. Vazba β -arrestinu blokuje další signalizaci zprostředkovanou G_i proteinem, a tím vyvolává desenzitizaci OR. Výsledkem dlouhodobého adaptačního procesu může být také zvýšení exprese a funkce adenylátcyklázy (Allouche *et al.*, 2014; Listos *et al.*, 2019).

Exogenní i endogenní opioidy aktivují presynaptické OR na GABAergních neuronech (jejich primární neurotransmiter je kyselina γ -aminomáselná) ve ventrální tegmentální oblasti. Inhibice GABAergních neuronů umožňuje vyšší aktivitu dopaminergní dráhy odměny a vyšší množství dopaminu v nucleu accumbens vyvolává příjemné pocity. Opioidní látky mohou v různé míře antagonistovat také NMDA receptory, což opět vede k útlumu neuropatické bolesti a rozvoji tolerance. Endogenní opioidy, např. enkefaliny a endorfiny, se účastní neurotransmise, termoregulace, regulace sekrece hormonů a kardiovaskulárního systému (Trescot *et al.*, 2008).

3.1.5. Molekulární mechanismus působení morfinu a jeho metabolitů

Morfin je úplný agonista MOR. Vazebná afinita morfinu k MOR u lidí dosáhla hodnoty 14 nM a zdá se, že je tato hodnota podobná napříč organismy. Vazba k mu receptoru je 3,4 krát silnější oproti vazbě na KOR a 10 krát silnější na rozdíl od vazby na DOR (Kilpatrick & Smith, 2005). V rámci vazby na MOR má morfin vyšší afinitu k receptoru mu1 spojeném s analgezií než k receptoru mu2, který se podílí na útlumu dýchání (Kristensen *et al.*, 1994).

Nejčtenější metabolit morfinu M3G vykazuje velmi nízkou afinitu k OR, a proto nevyvolává analgezií (Pasternak *et al.*, 1987). Zvýšené množství M3G nebo zvýšený poměr M3G/M6G vyvolává hyperalgezií, alodynii, hyperaktivitu, rozvoj svalových spasmů a potlačuje útlum dýchání vyvolaný morfinem (Smith, 2000). Bolest v CNS je vyvolána prostřednictvím vazby M3G k heterodimeru Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloidní diferenciační protein-2 (MD-2) a biofyzikálními vlastnostmi napětově ovládaných sodných kanálů citlivých a rezistentních k tetrodotoxinu (Due *et al.*, 2012). Pro vyvolání hyperalgezií je nutná vazba M3G na MOR, přičemž M3G se k tomuto receptoru váže slabě a je jeho parciálním agonistou. Bylo zjištěno, že opakované podávání morfinu vedlo k analgetické toleranci a hyperalgezií u normálních (wild-type) myši, ale ne u myši s knockoutovaným MOR (Roedel *et al.*, 2017).

Na rozdíl od M3G je M6G aktivní morfinový metabolit. K lidskému MOR se váže s afinitou 23 nM a jeho vazebná selektivita je 177 krát silnější ke KOR a 7 krát silnější k DOR. Oproti morfinu má M6G 6 krát nižší afinitu k MOR, 86 krát nižší afinitu ke KOR a zhruba stejnou afinitu k DOR. Co se týče podtypů MOR, morfin a M6G vykazují stejnou afinitu k mu1 receptoru, ale M6G vykazuje nižší afinitu k mu2 receptoru (Kilpatrick & Smith, 2005). Podtyp mu2 receptorů tvoří většinu populace MOR, proto je celková afinita M6G k mu receptorům definována afinitou k mu2 (Chang & Cuatrecasas, 1979). Pokud porovnáme analgetický účinek morfinu a M6G, tak analgetický účinek vyvolán dávkou 0,1 µg M6G je srovnatelný s 20 krát vyšší dávkou morfinu (Pasternak *et al.*, 1987). Pokud podáváme M6G do CNS nebo systémově, analgetický účinek trvá déle než při podání morfinu. Dále byly elektrofyzilogicky měřeny škodlivé reakce po intratektálním podání M6G a prokázalo se, že M6G je 22 krát a více než 90 krát účinnější na úrovni páteře a thalamu oproti morfinu (Jurna *et al.*, 1996).

3.1.6. Terapeutické využití morfinu

Dnes je morfin nejvyužívanějším léčivem ze skupiny narkotických analgetik a považujeme ho za zlatý standard pro porovnání účinků jiných látek s analgetickými účinky. Právě pro své analgetické účinky se často používá v klinické medicíně, velmi často při tlumení bolestí během onkologické léčby, při chronických bolestech pohybového aparátu nebo v paliativní medicíně.

Opioidní analgetika obecně působí lépe na zmírnění těžké chronické bolesti a jejich analgetický účinek je selektivní, nedochází tedy k oslabení jiných senzitivních podnětů (Lincová *et al.*, 2007). Výhodou použití opioidních analgetik je skutečnost, že informaci o bolestivém vjemu tlumí na třech úrovních – na úrovni periferních nervů, páteře a mozku, kde ovlivňují limbický systém. Samotný bolestivý vjem je méně intenzivní a vstupuje pacientovi do života s mnohem menší razancí. Pro potlačení bolesti onkologických pacientů je bezpečnější užívání opioidů oproti nesteroidním antirevmatikům, protože jejich dlouhodobé konzumace s sebou nese závažnější vedlejší účinky – způsobují krvácení, poškozují ledviny, játra a způsobují žaludeční potíže (Pasternak, 2014).

Opioidy snižují přenos bolesti a její další zpracování v mozku, proto analgezií vyvolanou aplikací morfinu provází sedace, odstranění napětí a strachu, emoční zklidnění, pacienti dosahují pocitu spokojenosti a dobré nálady, která může vyústit až v euforii, ale někdy může dojít naopak k vyvolání dysforie. Se zvýšeným dávkováním morfinu nastupuje ospalost až obluzení, velmi vysoké dávky působí hypnoticky a pokud dojde k předávkování, tak narkoticky nebo může dojít i ke smrti vlivem útlumu dýchacího centra. Útlum dýchacího centra se klinicky uplatňuje při zmírnění dušnosti pacientů s plicním edémem a srdečním astmatem (Lincová *et al.*, 2007).

Terapeutická dávka při subkutánní nebo intramuskulární aplikaci je 10 mg sulfátu nebo hydrochloridu morfinu, přičemž působí zhruba 4 až 5 hodin. Pacienti s velmi intenzivními bolestmi dobře tolerují vyšší než terapeutické dávky opioidních analgetik, aniž by se u nich objevily výrazné nežádoucí účinky, které se ovšem mohou projevit až po odeznění bolesti (Lincová *et al.*, 2007). Při perorálním podávání se úvodní dávka hydrochloridu morfinu pohybuje mezi 30 až 600 mg v časových intervalech 4 až 72 hodin. Lékaři množství a metody dávkování individuálně upravují. Pacienti v domácím prostředí a pacienti, kteří nemohou morfin přijmout perorálně, aplikují morfin transdermálně prostřednictvím morfinových náplastí s pomalým uvolňováním po delší dobu, ideálně v kombinaci s jiným opioidem, což je výhodné např. ke zmírnění nočních bolestí (Gregorová & Holečková, 2016).

V Česku je pro předepsání opioidů potřeba recept s modrým pruhem, který musí lékař vyzvednout na městském úřadě a uchovat v uzamykatelném trezoru. Pokud lékař aplikuje opioidy injekčně, musí vést opioidovou knihu. U nás může opioidy předepsat nejen onkolog a specialista, ale i praktický lékař (I).

3.1.7 Vedlejší účinky při morfinové léčbě

Z počátku léčby bývá u pacientů častá nevolnost a dále je nejvíce obtěžují zdánlivě triviální komplikace, jako je zácpa. Oba negativní účinky se řeší předepsáním léčiv proti zácpě a nevolnosti souběžně k léčbě opioidy. Společně s úlevou od bolesti může část pacientů pociťovat únavu a ospalost. Pro pacienty, kteří potřebují intelektuálně pracovat, lékaři hledají kompromis mezi mírou snášené bolesti a mírou útlumu.

Útlum dechového centra je považován za hlavní nežádoucí účinek a upozorňuje na něj většina příbalových letáků, ale v praxi během léčby chronické bolesti je velice vzácný (Rosenblum *et al.*, 2008).

Útlum dýchání způsobuje navázání morfinu na μ_2 receptory, KOR a DOR. Dochází ke snížení citlivosti pneumotaktického a dechového centra na tenzi oxidu uhličitého a vyvolání dávkově závislé dechové deprese. Při toxických dávkách klesá dechová frekvence na několik dechů za minutu a předávkování může způsobit smrt paralýzou dechového centra s edémem mozku a plic. Morfin dobře proniká skrze placentu, proto je nebezpečné podávat morfin v průběhu porodu, novorozeně by mohlo umřít na zástavu dechu. Podávání morfinu je rizikové i během těhotenství, novorozeně může pak vykazovat příznaky abstinčního syndromu (Lincová *et al.*, 2007; Trescot *et al.*, 2008).

Častou nevolnost a zvracení způsobuje stimulace chemorecepční spouštěcí zóny v area postrema mozkového kmene. Zvracení je časté u ambulantních pacientů, protože se na něm zřejmě podílí také vestibulární složka. Při dlouhodobém podávání může zvracení vymizet, opioidy působí inhibičně na centrum zvracení (Lincová *et al.*, 2007).

Intoxikace morfinem vyvolává miózu, která vzniká drážděním parasympatické části nervus oculomotorius a projevuje se zúžením zornic. Morfin a příbuzné opioidy inhibují v hypotalamu uvolňování gonadoliberinu a kortikotropin uvolňujícího hormonu, čímž snižují koncentraci cirkulujícího folikulstimulačního, luteinizačního, adrenokortikotropního hormonu, testosteronu a kortizolu. Morfin zvyšuje koncentraci prolaktinu a antidiuretického hormonu, jenž snižuje diurézu (Lincová *et al.*, 2007).

Na periférii zvyšuje morfin tonus hladkého svalstva a snižuje motilitu GIT, a tím vzniká silná zácpa. Morfin vykazuje také spazmogenní účinky. Vyvolává spasmy žlučnickového a Oppiho svěrače a mnohonásobně zvýšený tlak může způsobit rupturu žlučnicku. Další nežádoucí účinky zahrnují únik moči díky zvýšení tonu hladkého svalstva močového měchýře a potlačení pocitu plného močového měchýře, prodloužení porodu snížením děložní motility nebo vazodilataci, posturální hypotenzi a bronchokonstrikci vyvolanou vyplavením histaminu (Lincová *et al.*, 2007; Trescot *et al.*, 2008).

Morfinová léčba je v neposlední řadě spojována s možnými modulačními a supresivními účinky na imunitní systém. Morfin asociuje s OR exprimovanými na povrchu imunitních buněk a má negativní vlivy na stimulaci, proliferaci, následné dělení a funkci T i B lymfocytů, razantně snižuje aktivitu NK buněk (přirozených zabíječů), makrofágy zprostředkovanou fagocytózu a produkci protilátek (Chang *et al.*, 2011).

Pro svůj narkotický účinek a pocit euforie jsou opioidy zneužívány jako drogy, jejichž užívání vede ke vzniku psychické i fyzické závislosti a k rozvoji abstinčního syndromu po vysazení.

3.2. Tolerance a závislost k opioidním látkám

Rozvoj tolerance, závislosti a abstinčního syndromu neodmyslitelně patří k rizikům léčby opioidy.

3.2.1. Tolerance

Tolerance je stav, kdy dochází ke snižování odpovědi na podávané léčivo a pro dosažení původního účinku, vyžaduje podávání vyšší dávky účinné látky. Lze ji rozdělit na vrozenou nebo získanou. Vrozená tolerance je predispozice k projevům citlivosti nebo necitlivosti k léčivu v důsledku individuálního farmakogenetického nastavení. Ve většině situací je vrozená tolerance stanovena po podání počáteční dávky. Naproti tomu získaná tolerance je důsledkem opakované expozice léčivu a můžeme ji rozdělovat do tří obecných typů, na základě převažujícího mechanismu tolerance: farmakokinetická, farmakodynamická nebo naučená (Dumas & Pollack, 2008).

Farmakokinetická tolerance vzniká, když se dostupnost nebo metabolismus léčiva mění s časem, často v důsledku toho, že léčivo indukuje nebo inhibuje specifický metabolický enzym nebo transportního systém, což má za následek časově závislé snížení prezentace aktivní části receptorů v cílových strukturách. Farmakodynamická tolerance nastává, když se časem snižuje vnitřní citlivost receptorového systému. Naučená tolerance je navozena behaviorálně nebo podmíněně. Behaviorální tolerance se rozvíjí, pokud se jedinec naučí fungovat navzdory opakované expozici látky, např. u chronických alkoholiků nepozorujeme příznaky opilosti po dávkách alkoholu, které by běžného jedince značně intoxikovaly. Podmíněná tolerance se řídí Pavlovovými principy, kdy jsou situační podněty spojeny s podáním látky. Odstranění těchto environmentálních podnětů vede ke zvýšení farmakologického efektu (Dumas & Pollack, 2008). Toto můžeme pozorovat právě u morfinové tolerance. Potkani, kteří vykazovali toleranci k morfinu, byli umístěni do nového prostředí a když jim byl v novém prostředí podán morfin, snížila se u nich antinociceptivní tolerance (Siegel, 1976).

Chronické a opakované užívání opioidů vede k rychlému rozvoji analgetické tolerance, ale pomalejšímu nástupu farmakokinetické tolerance na periferních receptorech. Se zvyšujícím dávkováním opioidů pomalejší periferní tolerance způsobuje pacientům ve vyšší míře negativní vedlejší účinky, jako je zácpa, útlum dýchání, nevolnost a modulace imunity (Dumas & Pollack, 2008). Přesný mechanismus vzniku morfinové tolerance dodnes není zcela znám, ale pravděpodobně tolerance vzniká na několika úrovních. Jedná se např. o desenzitizaci MOR způsobenou zvýšenou aktivitou adenylátcyklázy, zvýšenou hladinou cAMP a β -arrestinu (Allouche *et al.*, 2014; Listos *et al.*, 2019), o genetickou rozmanitost a s ní spojenou rychlost biotransformace morfinu a jeho metabolitů danou polymorfismy CYP450 a UGT (Desmeules *et al.*, 1991), dále o uvolnění a navázání glutamátu na NMDA receptory aktivující syntézu oxidu dusnatého, který zvyšuje aktivitu cyklooxygenáz a následnou produkci prostaglandinů, což také vede k vývoji tolerance (Powell, *et al.*, 1999), aj.

Nicméně nedávné studie prokázaly, že na navození opioidové tolerance se podílí i střevní mikrobiota. Chronické užívání opioidů u zvířat i závislých lidí je spojeno se změnou střevního mikrobiomu oproti

zdravým kontrolám, a proto se předpokládá, že se osa střevo-mozek-střevní mikrobiom podílí na morfinové toleranci (Banerjee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

Ukázalo se, že morfinová analgetická tolerance byla zeslabena u bezmikrobních nebo myši léčených antibiotiky. Pokud byl u myši léčených morfinem obnoven přirozený střevní mikrobiom, tolerance se znovu navodila. Dále bylo prokázáno, že deplece bakterií z rodů *Bifidobacteria* a *Lactobacillaeae* snížila morfinovou analgetickou toleranci (Zhang *et al.*, 2019), ale infekce *E. faecalis* naopak analgetickou toleranci k morfinu zvýšila (Wang *et al.*, 2018). Předpokládá se, že střevní mikrobiální dysbióza vede k narušení střevní bariéry a bakteriální translokaci, která iniciuje lokální zánět střev prostřednictvím aktivace heterodimeru TLR4/MD-2, což vede k aktivaci prozánětlivých cytokinů, které ovlivňují morfinovou toleranci. (Zhang *et al.*, 2019). Skutečně bylo prokázáno, že zánět ve střevě podporuje vznik morfinové analgetické tolerance během jeho dlouhodobého užívání (Komla *et al.*, 2019).

3.2.2. Závislost

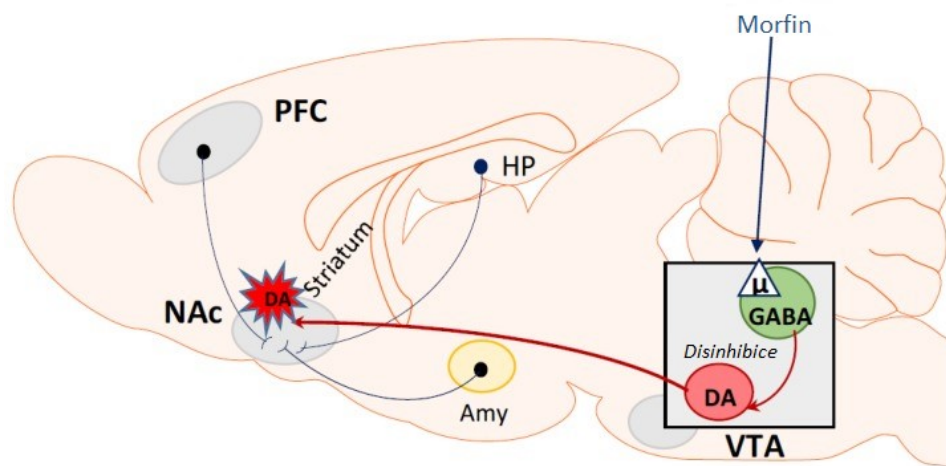
Závislost lze charakterizovat jako trvalý vztah k něčemu, vycházející z pocitu silné touhy nebo potřeby uspokojení. Takovýto stav ovlivňuje jednání a svobodu závislého jedince, který postupně ztrácí schopnost rozumně zvažovat přínosy a rizika užívání drogy nebo jiné závislosti, což je spjato s výraznými škodami na zdraví a společenských vztazích. Obecně rozlišujeme závislosti na látkové a nelátkové. Lidé mohou být tedy závislí na látkách (léčiva, drogy, alkohol, aj.), činnostech (práce – workoholismus, hry – gamblerství, trávení času na internetu – netolismus, aj.), určitých osobách, věcech nebo chování přinášejícím uspokojení (II).

Návykové látky rozlišujeme podle působení na psychiku na stimulační, tlumivé a halucinogenní. Morfin a další opioidy zařazujeme do skupiny tlumivých návykových látek (II). Za návykové látky nebo drogy považujeme látky, u kterých je jejich užití spojené s rizikem vzniku závislosti, ale je třeba si uvědomit, že za určitých okolností může závislost vzniknout na každou farmakologicky účinnou látku, dokonce i na placebo. V Česku se návykovou látkou právně rozumí alkohol, omamné látky, psychotropní látky a ostatní látky způsobivé nepříznivě ovlivnit psychiku člověka, jeho ovládací a rozpoznávací schopnosti nebo sociální chování (Lincová *et al.*, 2007).

Opioidová závislost je chronické dlouhotrvající onemocnění, které může způsobit vážné zdravotní, sociální a ekonomické problémy. Projevuje se silným nutkáním užít opioidy opakovaně, přestože nejsou indikovány lékařem. Ne každý člověk, který opioidy užije, se stane silně závislým, pouze malé procento lidí pociťuje nutkavou trvalou potřebu podání další dávky opioidů (III). Celosvětově v roce 2019 užilo drogy alespoň jednou přibližně 275 milionů lidí (5,5 % světové populace ve věku 15 až 64 let), z toho 62 milionů lidí užilo opioidy (IV).

Velkým rizikem spojeným se závislostí a tolerancí je předávkování, k němuž dochází tehdy, když vysoké dávky opioidů utlumí dýchání vedoucí k bezvědomí, a pokud není předávkování okamžitě léčeno podáním opioidního antagonisty naloxonu, tak může dojít k úmrtí předávkovaného. Nebezpečné je obzvláště nelegální užití opioidů v kombinaci s dalšími léky, zejména zklidňujícími trankvilizéry, mezi které patří zejména benzodiazepiny (III). Mezi lety 1999 a 2019 zemřelo v USA na předávkování opioidy skoro 247 000 lidí (V). V roce 2017 zemřelo celosvětově díky předávkování opioidy 115 000 lidí (IV).

Návykové látky primárně působí na nervové okruhy v mozku, které jsou zodpovědné za aktivaci motivovaného adaptivního chování. Z těchto drah je velmi důležitá mezolimbická dopaminergní dráha, nazývaná také dráha odměny, větvící se z dopaminergních neuronů do perfrontálního kortexu, amygdaly a nucleus accumbens. Běžně dráha odměny slouží k udržování evolučně prospěšných dějů, jako je např. vyhledávání potravy. Perfrontální kůra je hlavním regulátorem motivace a při závislosti určuje motivační hodnotu a intenzitu chování ve prospěch zisku další dávky návykové látky vyvolávající odměňující vjem. (Mistry *et al.*, 2014). Odměňující účinek morfinu a opioidů je spojen se stimulací MOR na GABAergních nervových zakončeních ve ventrální tegmentální oblasti, což má za následek inhibici uvolňování GABA a disinhibici uvolňování dopaminu dopaminergními neurony v nucleus accumbens, který podporuje euforii a rozvoj závislosti (obrázek 7) (Johnson & North, 1992; Listos *et al.*, 2019). Časem se dopaminergní dráhy spojené s chováním při vyhledávání a užívání drog dostávají pod kontrolu dorzálního striata, což se projevuje konečnou ztrátou kontroly závislého člověka (Everitt *et al.*, 2008). Závislí se hůře rozhodují a jsou impulzivní, což je spojeno také s aktivací glutamátového systému v mezolimbické dráze. V konečném důsledku užívání opioidů mění neuroplasticitu mozku podílející se na učení podmíněných reakcí, čímž vyvolává u závislého posedlost nebo touhu po droze a po vysazení nastupují nepříjemné abstinční příznaky (Guillin *et al.*, 2001; Mistry *et al.*, 2014).



Obrázek 7. Mechanismus morfinem indukovaného odměňovacího efektu. Morfinový odměňovací efekt je spojen se stimulací MOR lokalizovaných na GABAergních nervových zakončeních ve VTA (ventrální tegmentální oblasti). Dochází k inhibici uvolňování GABA (kyseliny γ -aminomáselné) a disinhibici dopaminergních neuronů v NAc (nucleu accumbens). Amy (amygdala); DA (dopamin); HP (hypotalamus); PFC (perfrontální kortex). Upraveno podle Listos *et al.*, 2019.

Závislost, která je nejprve spojená s narušivostí po další dávce, nazýváme psychickou závislostí. Později se rozvíjí tzv. fyzická závislost spojená s neuroadaptačními změnami v mozku a celou řadou změn mimo CNS, např. poškození srdce, parenchymatických orgánů a dalších (Lincová *et al.*, 2007).

3.2.3. Abstinence a abstinencií syndrom

Právě fyzická závislost na morfinu se projevuje charakteristickými abstinenciími příznaky, které se mohou rozvinout po náhlém ukončení podávání morfinu. U lidí se abstinencií příznaky projevují kýcháním, rýmou, kašlem, bolestmi břicha, průjmem, anorexií, úzkostí, atd. a u zvířat zahrnují abstinencií příznaky skákání, třes tlapek, drkotání zubů, chvění a průjem. V experimentálních studiích jsou abstinencií příznaky vyvolány přerušením chronického podávání morfinu nebo jeho antagonistů, zejména naloxonem (Listos *et al.*, 2013; Listos *et al.*, 2019).

Někteří vědci se domnívají, že kritickou roli v projevech abstinenciího syndromu při morfinové abstinenci hraje snížení koncentrace dopaminu v mezolimbické dráze odměny (Acquas & Di Chiara, 1992; Diana *et al.*, 1995). Abstinenci provází i změny koncentrací neurotransmiterů a neuropeptidů, jako je adrenalin (Fox *et al.*, 2017), glutamát (Sepulveda *et al.*, 1998), serotonin (Zhang *et al.*, 2016), orexin (Zhou *et al.*, 2006) a kortizol (Matinfar *et al.*, 2013). Tyto změny jsou následovány změnami v buněčných signalizačních drahách, např. výrazným navýšením hladiny cAMP a deregulací MAPK dráhy (Bilecki *et al.*, 2005; Meye *et al.*, 2012; Listos *et al.*, 2019).

Nedávná studie se zabývala složením střevního mikrobiomu v souvislosti s abstinencií syndromem. Závislé myši, kterým byl morfin podáván opakovaně intraperitoneálně, obdržely fekální transplantát od

myši léčených morfinem nebo od myši, jimž byl podáván fyziologický roztok. Abstinenci syndrom byl vyvolán aplikací naloxonu. Myši, které dostávaly fekální transplantát od myši ovlivněných morfinem, vykazovaly menší abstinenci příznaky, ve srovnání se zvířaty, která dostala transplantát od myši, kterým byl podán fyziologický roztok. Mikrobiom slepého střeva myši byl změněn působením morfinu, ale nebyl rozdílně ovlivněn provedením fekální transplantace. U myši, kterým byla aplikována širokospektrá antibiotika, se počet bakterií ve střevě razantně zmenšil a tato intervence také zmírnila morfinové abstinenci příznaky vyvolané naloxonem u myši závislých na morfinu, zatímco aplikace probiotik abstinenci příznaky spolehlivě nepozměnila (Thomaz *et al.*, 2021).

Autoři jiné studie sledovali, jak přerušované intraperitoneální nebo kontinuální subkutánní užívání morfinu a morfinová abstinence u myši ovlivňuje složení střevního mikrobiomu. Následně byla zkoumána souvislost ve změnách střevního mikrobiomu spojených s neurozánětem a maladaptivním chováním spojeným se závislostí nebo abstinenci syndromem (Lee *et al.*, 2018). Dříve bylo zjištěno, že morfin a další opioidy aktivují mikrogliu ve ventrální tegmentální oblasti prostřednictvím zvýšené exprese mozkového nerotrofičského faktoru (BDNF) a ve výsledku dochází k útlumu dopaminové dráhy odměny (Taylor *et al.*, 2016). Během aplikace morfinu myším došlo ke zpomalení střevní motility a k narušení složení střevního mikrobiomu, což vyústilo v neurozánět mediovaný mikrogliemi a v inhibici aktivity dopaminergní dráhy. Takto způsobený deficit dopaminergní signalizace přispívá ke zhoršení odměňovaného chování a může být klíčový pro prožití anhedonické nálady během abstinence. Opakovaná přerušovaná aplikace morfinu zhoršila anhedonické a hyperalgetické účinky pravděpodobně v důsledku změn střevní mikroflóry (Lee *et al.*, 2018). Mechanismus, kterým narušená střevní mikroflóra ovlivňuje neurozánět a chování, není zcela objasněn. Mezi možné mechanismy ovlivnění patří signalizace přes nervus vagus, hormonální signalizace a změny v propustnosti střev, kdy může dojít k translokaci bakterií přes střevní stěnu a k rozvoji zánětu (Foster *et al.*, 2017).

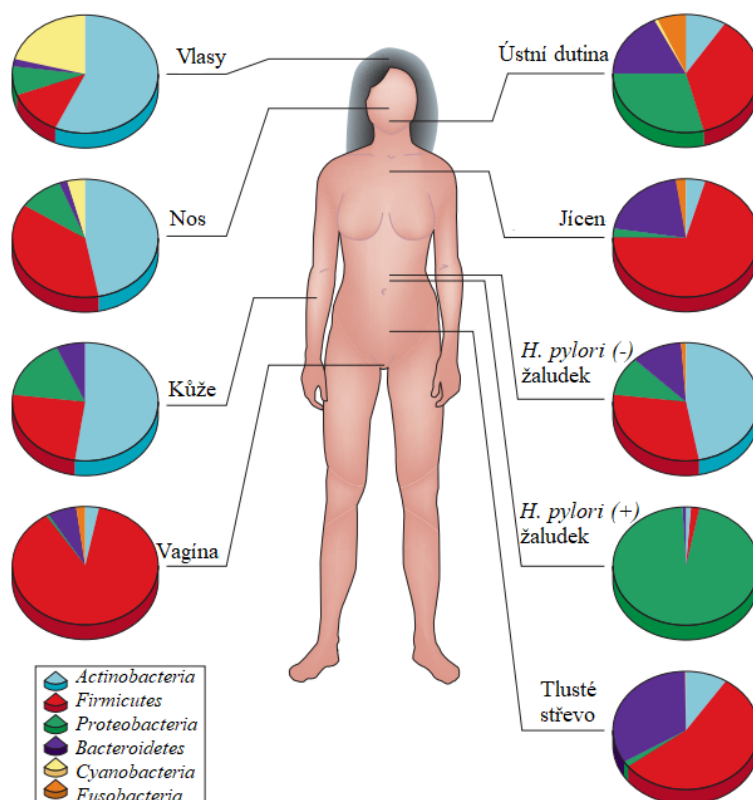
Během výzkumu došlo také ke změnám střevního mikrobiomu v rámci rozdílných režimů aplikace. Ukázalo se, že chronické podávání morfinu zpomaluje střevní motilitu vedoucí k zácpě, zatímco vysazení opioidů vede ke zvýšené motilitě střeva a průjmu (Listos *et al.*, 2013). Intermitentní podávání morfinu významně snížilo relativní množství bakterií rodu *Lactobacillus* a zvýšilo množství rodu *Ruminococcus*, ale tyto taxony nebyly po dlouhodobé aplikaci morfinu ovlivněny. Naproti tomu permanentní aplikace morfinu vedla k významnému nárůstu bakterií rodu *Clostridium* a čeledi *Rikenellaceae* a taková změna nebyla pozorována při intermitentní aplikaci (Lee *et al.*, 2018).

3.3. Mikrobiom

Nejprve je nutné definovat, co je to mikrobiom, ale přesné vymezení definice mikrobiomu je dodnes problematické a v literatuře není jednotné. V prvním případě se mikrobiomem rozumí celý biotop včetně mikroorganismů (bakterie, archea, viry, nižší a vyšší eukaryota), jejich genomů (tj. genů) a podmínek okolního prostředí. Tato definice je založena na pojmu „biom“ – prostředí charakterizované určitými biotickými a abiotickými faktory. V druhém případě je termín mikrobiom omezen na soubor genů a genomů všech mikroorganismů přítomných v určitém vymezeném prostředí. Podle této definice je tedy mikrobiom definován metagenomem (souborem genomů a genů společenství mikrobioty), který v kombinaci s prostředím tvoří mikrobiom a často je zaměňován nebo splývá s pojmem mikrobiota (dříve mikroflóra), což je soubor všech mikroorganismů v daném vymezeném prostředí (Marchesi & Ravel, 2015; Berg *et al.*, 2020; (VI)).

Mikrobiom je charakterizován pomocí jedné nebo kombinací metod využívajících prostředků metagenomiky (studium a sekvenování genomů mikroorganismů), metabonomiky (varianta metabolického přístupu zaměřující se na měření metabolitů přímo souvisejících s aktivitou celého systému, metabolické profily jsou určovány geneticky i environmentálně), metatranskriptomiky (analýza exprimovaných RNA (ribonukleových kyselin)) a metaproteomiky (charakterizace a identifikace proteinů vytvářených hostitelem a mikroorganismy v konkrétním prostředí) společně s klinickými nebo environmentálními metadaty prostředí (Marchesi & Ravel, 2015).

Složení mikrobiomu se liší mezidruhově, mezi jedinci jednoho druhu, ale i v rámci jednotlivých tělních nik jednoho jedince (Benson *et al.*, 2010). Co se týče lidského mikrobiomu, tak má každý člověk svůj unikátní mikrobiom, který se ovšem v čase mění v důsledku mnoha faktorů, jako je např. věk, genotyp, fyziologický stav, životní styl, onemocnění, strava, užívání léků a mnoho dalších. Podle charakteristického složení mikrobiomu v různých tělních biotopech rozlišujeme mikrobiom na kožní, vlasový, nosní, ústní dutiny, jícnový, žaludeční, střevní, vaginální, aj. (obrázek 8). Krom toho můžeme rozlišovat mikrobiomy konkrétního tělního biotopu, např. u mikrobiomu ústní dutiny a hltanu lze rozlišit mikrobiom slin, bukální sliznice, dásně, patra, mandlí, zubního plaku, měkkých tkání krku a jazyka (Turnbaugh *et al.*, 2007; Huttenhower *et al.*, 2012).



Obrázek 8. Rozdíly v distribuci šesti nejhojnějších bakteriálních kmenů v různých nikách lidského těla. Legenda je umístěna v levé dolní části obrázku. Rozdílné složení mikrobiomu mezi lidskými hostiteli a místně specifické rozdíly poskytují důležitý náhled na biologický nebo patologický význam jednotlivých mikrobiomů. Přítomnost nebo nepřítomnost určitých mikroorganismů v tomto případě *Helicobacter pylori* může vést k trvalým a výrazným poruchám ve složení mikrobiální komunity (Andersson *et al.*, 2008). Upraveno podle Cho & Blaser, 2012.

Vzhledem k vysoké citlivosti mikroorganismů na různé podněty, komplexitě mikrobiomu a náročnosti molekulárně-biochemických metod, je složité analyzovat, popsat a definovat přirozený lidský mikrobiom. Proto byl v roce 2007 spuštěn interdisciplinární projekt, na kterém se podílí mnoho vědeckých týmů ze Spojených států amerických, Evropy a Asie, s cílem charakterizovat diverzitu zdravého lidského mikrobiomu a dále zkoumat faktory ovlivňující distribuci a evoluci mikroorganismů, které mikrobiom člověka tvoří. Tento projekt se nazývá Human Microbiome Project (HMP) a stále pokračuje. Data získaná z HMP také poskytují pohled na současnou lidskou evoluci, zejména na vliv rychlého technologického rozvoje, následovaného transformací životního stylu a biosféry, jež ovlivňuje „mikroevoluci“ lidí, a tím i jejich zdraví a predispozici k různým nemocem. V dnešní době však stále nejsme schopni prokázat kauzální vztah určitého mikroorganismu, skupiny mikroorganismů nebo jejich absence ke konkrétnímu onemocnění (Turnbaugh *et al.*, 2007; Proctor *et al.*, 2019).

Dnes je známo, že narušení nebo ztráta mikrobiální diverzity a následné změněné složení mikrobioty – mikrobiální dysbióza, může zapříčinit vznik různých onemocnění, od metabolických přes autoimunitní onemocnění a onemocnění spojená s narušením kognitivních funkcí, zahrnující např. obezitu, diabetes,

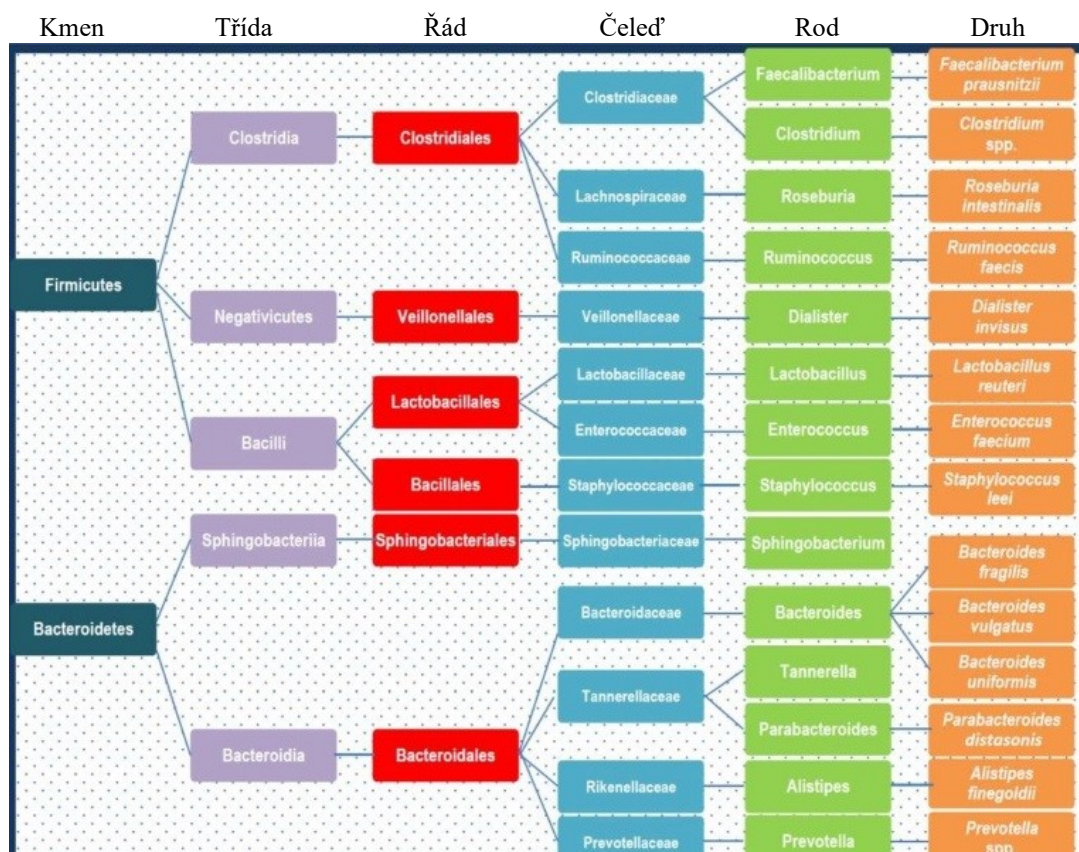
astma, alergie, idiopatické střevní záněty nebo autismus. Mikrobiom, zejména střevní, ovlivňuje metabolické procesy a propustnost střeva hostitele, také vzájemně interaguje s jeho imunitním systémem, endokrinním systémem a CNS (Bello *et al.*, 2018). Mikrobiom obecně se z velké části předává z generace na generaci, matky mikrobiom předávají svým dětem v raném věku (Yassour *et al.*, 2018).

3.3.1. Střevní mikrobiom

Lidský GIT představuje největší rozhraní mezi naším tělem a okolním prostředím. Velikost povrchu GIT se pohybuje mezi 250 až 400 m² a je srovnatelná s rozlohou tenisového kurtu. Během života tudy projde přibližně 60 tun potravy, spolu s velkým množstvím cizorodých a potenciálně škodlivých látek nebo mikroorganismů, které mohou poškodit integritu střeva. Proto se povrchové buňky GIT rychle obnovují, jsou na povrchu kryté hlenem a osídleny prospěšnými mikroorganismy (Bengmark, 1998).

Dříve se uvažovalo, že se střevní mikrobiota skládá z 10¹³ až 10¹⁴ mikroorganismů, což je zhruba 10 krát více než je počet lidských buněk a dále se uvádělo, že genom střevního mikrobiomu obsahuje minimálně 100 krát více genů než náš vlastní genom (Gill *et al.*, 2006). Novější studie naznačila, že počet lidských a bakteriálních buněk je ve skutečnosti stejného řádu, ale hmotnost bakteriálních buněk je asi 0,2 kg. Celkový počet bakteriálních buněk je u 70 kg vážícího, 170 cm vysokého muže ve věku 20 až 30 let odhadován na 3,8·10¹³ a celkový počet lidských buněk na 3,0·10¹³ (Sender *et al.*, 2016). Naprostá většina z celkového počtu bakterií osidluje střevo (Gill *et al.*, 2006), následuje kůže, která je útočištěm asi pro 10¹² bakterií (Sender *et al.*, 2016). Většina mikrobiálního genomu (99,1 %) je bakteriálního původu, zbytek tvoří archea a pouze 0,1 % genomu je eukaryotického a virového původu (Qin *et al.*, 2010).

Nejhojněji jsou v lidském GIT zastoupeny bakteriální kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, a *Verrucomicrobia*, které společně s dalšími minoritními kmeny přispívají k udržení zdravého střevního mikrobiomu. Kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes* jsou zastoupeny nejhojněji (obrázek 9), utvářejí zhruba 90 % střevní mikroflóry (Schroeder & Bäckhed, 2016; Rinninella *et al.*, 2019). *Firmicutes* se skládá z více než 200 rodů, jako jsou *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Ruminococcus*. Rod *Clostridium* představuje 95 % kmene *Firmicutes*. Kmen *Bacteroidetes* sestává převážně z rodů *Bacteroides* a *Prevotella*. Rod *Bifidobacterium* je nejzastoupenější v kmeni *Actinobacteria* (Arumugam *et al.*, 2011; Rinninella *et al.*, 2019). Poměr *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* se často používá jako indikátor změn ve složení lidské mikroflóry (Mariat *et al.*, 2009).



Obrázek 9. Příklady a taxonomické zařazení bakterií z nejhojněji zastoupených kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* v lidském střevě. Upraveno podle Rinninella *et al.*, 2019.

Potkani mají podobný mikrobiom GIT jako lidé. Pro blízkou podobnost složení potkaního mikrobiomu s lidským jsou potkani vhodná zvířata pro studium mikrobiomů a s nimi spojených patologií. V trusu potkanů byly nejhojněji identifikovány kmeny *Bacteroidetes* (53,9 %), následovány kmeny *Firmicutes* (39,8 %) a *Proteobacteria* (4 %) (Ferrario *et al.*, 2017). Při zkoumání mikrobiální diverzity napříč GIT potkana bylo zjištěno, že druhová bohatost a fylogenetická diverzita se postupně zvyšuje od počátečních segmentů GIT ke konečným segmentům. Nejvyšší bohatost a rozmanitost vykázaly vzorky hlenu tlustého střeva. U potkanů bylo na úrovni kmene identifikováno 21 taxonomických skupin, ale intraindividuální variabilita byla u nich mnohem menší než u lidí, což bylo připisováno podobnému genetickému profilu laboratorních potkanů, jednotné stravě, prostředí a koprofágii (Li *et al.*, 2017). Jiná studie poukázala na rozdílné složení střevní mikroflóry během života potkanů. V každém věku bylo přítomno jádrových 46 bakteriálních druhů, ale jejich relativní četnost se s věkem snižovala, což bylo doprovázeno zvýšením alfa diverzity mikrobioty (počtu různých druhů ve vzorku), pravděpodobně v důsledku setkávání se s novými mikroorganismy během života (Flemer *et al.*, 2017).

3.3.2. Změny ve složení střevního mikrobiomu v průběhu života

Složení střevního mikrobiomu se mění nejenom s věkem také u člověka. Raný vývoj mikrobiomu je ovlivněn maternálními faktory, které zahrnují způsob porodu, složení mikrobiomu matky a případné užívání antibiotik, způsob výživy (přirozené kojení nebo kojenecká výživa) a gestační věk narození dítěte. Mikrobiom novorozence vykazuje nízkou alfa diverzitu a vysokou interindividuální variabilitu. S přechodem od kojení k pevné stravě se obohacuje mikrobiální diverzita a mikrobiální profil se více podobá jádrovému mikrobiomu dospělých (Schroeder & Bäckhed, 2016; Piggott & Tuddenham, 2020).

V dospělosti je jádro střevního mikrobiomu zdravého člověka relativně stabilní, změna nastává až v pozdním věku, dochází ke snížení alfa diverzity a zvýšení interindividuální variability. Pravděpodobně je to zapříčiněno změnou ve stravovacím návyku a dodáváním živin do organismu. Staří lidé mají menší chuť k jídlu, sníženou produkci slin, změny ve složení chrupu, sníženou schopnost dobře rozžvýkat potravu, dochází ke změnám v produkci střevních enzymů a zpomaluje se průchod potravy střevem (An *et al.*, 2018). Celkově se u starších lidí posunuje mikrobiální fenotyp k prozánětlivému typu. V GIT se zmenšuje počet komenzálních mikroorganismů, u kterých se předpokládá, že se podílejí na udržení integrity slizniční bariéry. Současně byl ale pozorován zvýšený výskyt potenciálně patogenních bakterií, jež jsou za normálních okolností symbiotické, ale mohou zmnožit při dysbióze, kdy se stanou patogenními, a urychlí tak vznik chronického systémového zánětu (Piggott & Tuddenham, 2020). U dlouhověkých stoletých lidí byl ovšem pozorován prospěšný rozmanitý mikrobiom podporující protizánětlivou aktivitu a udržující metabolickou homeostázu. Také bylo zjištěno, že jejich sourozenci jsou méně náchylní k onemocněním spojeným s vysokým věkem, mezi něž patří kardiovaskulární choroby, cukrovka nebo rakovina (Terry *et al.*, 2003; Dato *et al.*, 2017).

Střevní mikrobiom je výrazně ovlivněn i genetickými predispozicemi hostitele a lze v jeho kompozici pozorovat dědičné vloh. V rámci členů rodiny je mikrobiom podobnější než v porovnání s nepříbuznými jedinci a jednovaječná dvojčata mají podobnější mikrobiom než dvojvaječná (Goodrich *et al.*, 2014). Předpokládá se, že geny podílející se na vývoji vrozené a získané imunity ovlivňují také skladbu střevního mikrobiomu (Dato *et al.*, 2017; Piggott & Tuddenham, 2020). Dále je střevní mikrobiom modifikován prostředím, kde se narodíme a žijeme. Nejde jen o to, zda-li člověk pochází z města nebo z vesnice, rozdíly byly pozorovány i mezi lidmi z různých států a kontinentů. Děti z afrického venkova se stravují podobně, jako lidé v době zrodu zemědělství a jejich strava obsahuje vysoký obsah vlákniny. Oproti tomu evropské děti mají ve své stravě hodně masa, cukrů, tuků, pocházejících převážně z průmyslově zpracovaných výrobků a nevyhledávají tolik potřebné ovoce a zeleninu. Tento styl stravování se nazývá tzv. „moderní západní strava“. U dětí z Afriky se střevní mikroflóra vyvíjela v koevoluci se stravou bohatou na polysacharidy, což jim umožňuje maximalizovat energetický příjem z vlákniny a zároveň je ochránit před záněty a neinfekčními onemocněními tlustého střeva. Africké děti měly signifikantně sníženou diverzitu mikrobiomu v rámci kmene *Firmicutes*, ale výrazně obohacenou u *Bacteroidetes* s unikátními bakteriemi z rodů *Prevotella* a *Xylanibacter*, které

hydrolyzují celulózu, xylany a u evropských dětí zcela chybí. Zároveň bylo ve střevě dětí z Afriky nalezeno významně více SCFA (mastných kyselin s krátkým řetězcem) (De Filippo, 2010).

Podle rozdílných stravovacích návyků a genetických predispozic pozorujeme v lidské populaci tři enterotypy s odlišnou skladbou střevního mikrobiomu. Jednotlivé enterotypy nejsou v populaci ostře ohraničeny, jako např. krevní skupiny, a významně nekorelují s národností, pohlavím, věkem nebo BMI (indexem tělesné hmotnosti) hostitele. Jsou většinou určeny druhovým složením a zdá se, že se neliší ve funkční bohatosti, ale určité molekulární funkce nejsou nezbytně poskytovány hojnými druhy (Arumugam *et al.*, 2011). V enterotypu 1 (B) se vyznačuje nadměrným zastoupením rod *Bacteroides* z kmene *Bacteroidetes*. Tento enterotyp je asociován s dietou obohacenou o živočišné bílkoviny a nasycené tuky. Dále bakterie z rodu *Bacteroides* produkují specializované enzymy na štěpení živočišných sacharidů a celkově jsou zde sacharolytické enzymy nadměrně zastoupeny. U enterotypu 2 (P) převažuje rod *Prevotella* taktéž z kmene *Bacteroidetes*, jehož četnost nepřímo koreluje s rodem *Bacteroides* a vyskytuje se u jedinců nestravujících se tzv. „moderní západní stravou“, ale stravou bohatou na vlákninu (Costea *et al.*, 2018). Bakterie z rodu *Prevotella* produkují hydrolázy degradující rostlinná vlákna a celkově je v rámci tohoto enterotypu snížen lipolytický a fermentační potenciál (De Filippo, 2010; Vieira-Silva *et al.*, 2016). Pro enterotyp 3 (F) je dominantní kmen *Firmicutes*, ve kterém je nejvýrazněji zastoupen rod *Ruminococcus*. Tento enterotyp má nejvyšší taxonomickou a funkční bohatost. Výzkum byl proveden na skupině probandů, kterým byly odebrány vzorky trusu v průběhu více než 6 měsíců. U většiny byly jejich původně identifikované enterotypy stabilní, ale 16 % jedinců změnilo domnělé enterotypy. To naznačuje, že enterotypy nemají striktní hranice a mění se (Costea *et al.*, 2018). Posun k jinému typu enterotypu mohou způsobit dietní intervence. Enterotypizace má potenciál pro kliniku, lze ji využít např. při diagnostice chorobného stavu člověka. Jednotlivé enterotypy jsou asociovány s vyšším rizikem propuknutí určitých chorob a bakterie v rámci enterotypů mohou odlišně metabolizovat léčiva (Arumugam *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2015; Costea *et al.*, 2018).

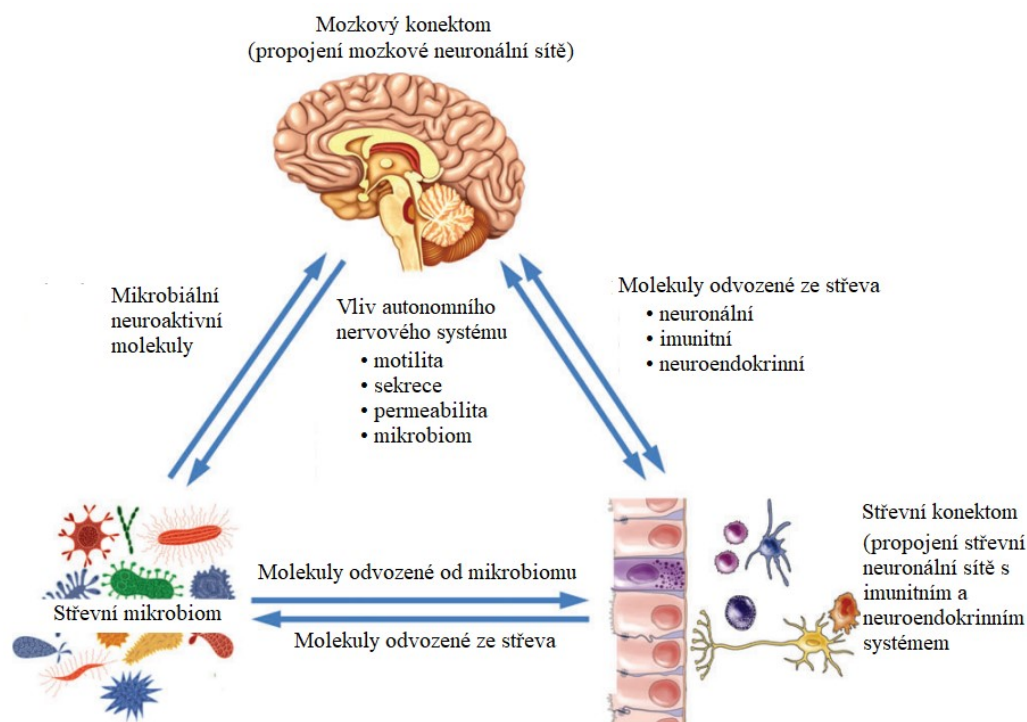
Přestože jádro střevního mikrobiomu dospělého člověka je většinou poměrně stabilní, může dojít ke změnám v jeho skladbě, které mohou mít razantní dopad na kvalitu života. V posledních letech jsou v souvislosti s razantními změnami mikrobiomu diskutována antibiotika, antiseptika, nadměrná čistota a celkově procesy spojené s industrializací společnosti. Strmý nárůst moderních civilizačních, autoimunitních a duševních onemocnění je dáván do souvislosti s úpadkem mikrobiální diverzity a je signifikantní od dob 2. světové války, kdy začalo docházet k velmi rychlému technologickému rozvoji společnosti (Bello *et al.*, 2018). Obzvláště používání širokospektrých antibiotik, která jsou nenahraditelná v léčbě bakteriálních infekcí, má závažné vedlejší účinky, jmenovitě vznik antibiotické rezistence, její rozšíření napříč bakteriálními druhy a dále škodlivý účinek na hostitelský mikrobiom. Jestliže bude rezistence k antibiotikům nadále stoupat současným tempem, odhaduje se, že do roku 2050 budou rezistentní patogenní bakterie způsobovat více než 10 milionů úmrtí za rok a roční náklady spojené s léčbou nemocných se vyšplhají až k 100 bilionům dolarů. Klinicky významné multirezistentní

patogeny způsobující úmrtí jsou např. *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium tuberculosis* (Goff *et al.*, 2017). Ve vztahu ke střevnímu mikrobiomu bylo prokázáno, že škodlivý účinek nezávisí na trvání antibiotické léčby. Krátkodobá (sedmidenní) expozice antibiotikům vede ke ztrátě mikrobiální diverzity, zejména snížení druhové diverzity v kmeni *Bacteroidetes*, až dva roky po léčbě (Jernberg *et al.*, 2007). Obézní lidé mají ve střevech více *Firmicutes* právě na úkor *Bacteroidetes* a jejich mikrobiom dokáže ve zvýšené míře získávat energii ze stravy (Ley *et al.*, 2006). Střevní mikroflóra je, co se týče výživy, zcela závislá na svém hostiteli a přes produkci bioaktivních metabolitů v GIT, které mají vliv nejen na střevo, ale i na periferní orgány včetně mozku, působí pozitivně nebo negativně na fyziologii hostitele (Boscaini *et al.*, 2021).

Na skladbu střevního mikrobiomu mají také vliv návykové látky nevyjímaje těch opioidních, což přispívá k negativním důsledkům jejich užití. Morfinová terapie vyvolává snížení diverzity střevní mikrobioty, vede k výraznému shlukování a profilování střevního mikrobiomu a metabolomu ve srovnání s kontrolami. Takto vyvolaná dysbióza přispívá k dysfunkci střev a náchylnosti ke střevním infekcím (Wang *et al.*, 2018). Prokázalo se, že pacienti užívající morfin v nízkých nebo vysokých dávkách, jsou vystaveni vyššímu riziku infekce *Clostridium difficile* (Mora *et al.*, 2012). Se zvýšenou náchylností k infekci *Clostridium difficile* je spojena také porucha metabolismu žlučových kyselin vyvolaná změnou mikrobiomu (Buffie *et al.*, 2015).

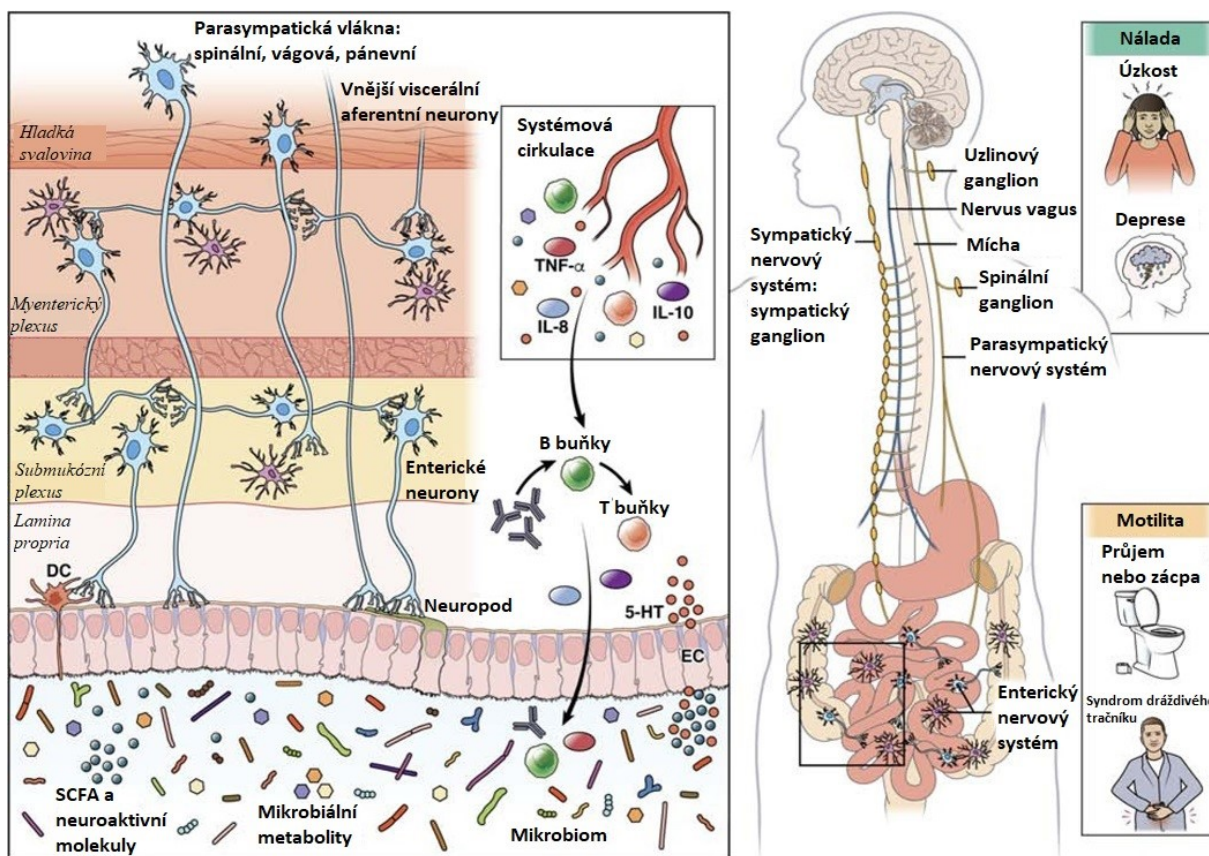
3.3.3. Komunikace střevního mikrobiomu s hostitelským organismem

Mikrobiom ve střevě, hostitelské orgány a systémy vzájemně oboustranně komunikují. Nedávné výzkumy prokázaly oboustranné interakce střevního mikrobiomu a střeva s mozkem, játry a plícemi, díky čemuž je střevo považováno za centrální orgán pro lidské zdraví. V současnosti se hojně diskutuje a zkoumá reciproký vztah střevní mikrobioty, střeva a mozku, který nazýváme osa mikrobiom – střevo – mozek (obrázek 10) (Berg *et al.*, 2020).



Obrázek 10. Schématické znázornění komunikace osy mikrobiom – střevo – mozek. Střevní mikrobiom komunikuje s neuronálními, gliovými, endokrinními a imunitními buňkami ve střevě, které interagují s CNS nebo prostřednictvím bioaktivních molekul působících na aferentní vágová a míšní nervová zakončení. Naopak mozek reguluje autonomní nervový systém, který moduluje střevní prostředí, čímž má nepřímý vliv na složení a funkci mikrobiomu. Upraveno podle Osadchiy *et al.*, 2019).

Většina GIT je pod nervovou kontrolou rozsáhlé sítě vnitřních střevních neuronů a glií rozprostírajících se po celém ENS (enterickém nervovém systému), hladkém svalstvu GIT a slizničním vazivu, ale je také inervována z vnějšku prostřednictvím primárních aferentních a autonomních vláken, jež propojují GIT s míchou a mozkem. Přestože ENS může regulovat peristaltiku GIT poněkud nezávisle na CNS, je regulace modulována dalšími systémy, jako je ANS (autonomní nervový systém), imunitní systém a střevní mikrobiom. Zároveň jsou všechny tyto systémy ovlivňovány složitými drahami vedoucími z GIT (obrázek 11). Správná funkce střev je nezbytná pro dlouhodobé přežívání a rovněž pro udržení homeostázy ve střevě a mozku (Margolis *et al.*, 2021).



Obrázek 11. Detailnější pohled na komunikaci mezi mikrobiomem a mozkem ve vztahu k poruchám nálady a střevní motility. Existuje mnoho přímých a nepřímých (prostřednictvím systémové cirkulace) cest, kterými může být komunikace modulována. Zahrnují endokrinní (kortizol), imunitní (cytokiny: interleukiny (IL), tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a nervové (nervus vagus, ENS, míšní nervy) dráhy. Někteří střevní mikrobi dokáží lokálně syntetizovat neurotransmitery (GABA, noradrenalin a dopamin), jež mohou působit na cílové buňky ve střevě a být důležitou součástí komunikační cesty. Neuroaktivní mikrobiální metabolity mohou ovlivnit mozek a chování řadou způsobů, které se stále objasňují. Patří mezi ně ovlivnění epiteliálních buněk spojených s funkcí střevní bariéry, enteroendokrinních buněk spjatých s uvolňováním gastrointestinálních hormonů a dendritických buněk (DC) modulujících imunitní funkce. Specializované struktury enteroendokrinních buněk, zvané neuropody, přenášejí sensorické signály ze střeva do mozku prostřednictvím tvorby spojení podobných synapsím s aferentními nervy, včetně nervu vagu. Střevní bakterie produkují SCFA přímo stimulující tryptofan hydroxylázu 1, což vede k syntéze a sekreci serotoninu (5-HT) ze střevních enterochromafinních buněk (EC). Serotonin uvolňovaný z bazální membrány EC buněk interaguje s neurony ENS, moduluje tak střevní motilitu, vývoj a diferenciaci neuronů během vývoje nebo náladu prostřednictvím aferentních vláken nervu vagu vedoucích do nucleus solitarius a nuclei raphe, které interagují s mozkovými strukturami zpracovávajícími emoce. Dále mohou motilitu, sekreci a komunikaci osy regulovat přítomné SCFA.

Enterický nervový systém je integrálním centrem pro mikrobiální signály a komunikaci s mozkem prostřednictvím vágových a míšních drah. Zbývá však přesně definovat všechny zahrnuté signální dráhy na molekulární úrovni. Upraveno podle Margolis *et al.*, 2021.

Procesy v komunikaci osy mikrobiom – střevo – mozek jsou dnes aktivně zkoumány. Tyto komunikační dráhy se vyvíjejí během prvních třech let života a dále zůstávají relativně stabilní, navzdory různým narušením, po celý život. Střevní mikroby komunikují s CNS pomocí neuronálních, endokrinních a imunitních signálních drah. Naopak CNS má vliv na složení a funkci střevní mikrobioty přímo přes produkci katecholaminů pod vlivem stresu, spojenou s následným zvýšeným růstem bakterií, popř. zvýšením exprese virulentních genů nebo nepřímo přes ANS prostřednictvím regulace střevní motility, sekrece a imunitních interakcí. S CNS sdílí mnoho podobností ENS, který je často nazýván „druhým mozkiem“, ENS přímo působí na střevní mikrobiom změnou motility, sekrece, permeability a imunitní ochrany. Regulace komunikace osy mikrobiom – střevo – mozek probíhá na úrovni kritických bariér, mezi které patří střevní epitel a hematoencefalická bariéra. Komplexní propojení střevních neuronů a glií se někdy označuje termínem střevní konektom, analogicky k mozkovému konektomu (Osadchiy *et al.*, 2019; Margolis *et al.*, 2021).

Vzrůstající množství studií u lidí poukazuje na rozdíly ve složení střevního mikrobiomu zdravých jedinců a lidí, kteří trpí nemocemi, jako jsou např. deprese, Parkinsonova choroba, obezita nebo syndrom dráždivého tračníku. U zvířecích modelů prokázaná korelace střevního mikrobiomu s rozvojem fenotypů souvisejících s onemocněními CNS nebyla prozatím přesvědčivě prokázána u lidských organismů. Hlubší poznání vzájemných vztahů mozku, střeva a mikrobiomu a exaktní příčinný popis definovaných cílených mechanismů omezení translačního dopadu jsou navzdory jejich velkému terapeutickému potenciálu stále nedostatečně prozkoumány (Osadchiy *et al.*, 2019).

3.4. Metabolom

Metabolity jsou malé molekuly, které jsou chemicky přeměňovány během metabolismu, a poskytují tak informace o buněčném stavu. Na rozdíl od genů a proteinů, jejichž funkce podléhá epigenetické regulaci a posttranslačním modifikacím, metabolity slouží jako přímí ukazatelé biochemické aktivity, a proto je lze snáze spojit s daným fenotypem. Samostatná vědní disciplína zabývající se profilováním metabolitů se nazývá metabolomika a je široce uplatňována v klinické diagnostice (Patti *et al.*, 2012).

Pojmem metabolom je označován soubor malých molekul (metabolitů) produkovaných danými buňkami (vlastními, ale i např. mikrobiálními), který nabízí možnosti zkoumat propojení buněčného, tělesného nebo mikrobiálního metabolismu ve vztahu k danému fenotypu. Metabolom je možné analyzovat pomocí metod nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) nebo nověji využívanou kapalinovou či plynovou chromatografií s následnou hmotnostní spektrometrií. Provádí se cílené nebo necílené analýzy metabolomu. Při cílené analýze se sledují specifické metabolity se zaměřením na konkrétní biochemickou dráhu nebo hypotézu, např. sledování metabolismu léčiv ve farmakokinetických studiích. Oproti tomu cílem necílené metabolomické analýzy je detekovat co nejvíce metabolitů. V obou případech je nejvhodnější využít kapalinovou nebo plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. (Want *et al.*, 2006; Patti *et al.*, 2012, Tranchida *et al.*, 2016).

3.4.1. Fekální metabolom

Fekální metabolom poskytuje funkční údaje o aktivitě střevního mikrobiomu a může být použit jako mezistupeň fenotypu zprostředkujícího interakce mezi hostitelem a střevním mikrobiomem (Marcobal *et al.*, 2013; Zierer *et al.*, 2018). Metabolom je úzce spjat se střevním mikrobiomem, protože střevní mikrobiota produkuje mnoho chemických látek a pomáhá udržovat homeostázu metabolismu hostitele (Zierer *et al.*, 2018; Margolis *et al.*, 2021).

Samotná analýza mikrobiomu poskytuje primárně informace o možných mikrobiálních entitách než o jejich skutečné aktivitě, protože nedokáže indikovat transkripční aktivitu genů v rámci bakteriálního genomu ani rozlišit živé a mrtvé mikroby (Zierer *et al.*, 2018). Fekální metabolomika podává souhrnné informace o propojení mezi hostitelem, stravou a jeho střevním mikrobiomem, a doplňuje tak sekvenční údaje poskytnutím funkčních údajů o mikrobiomu (Marcobal *et al.*, 2013).

U lidí bylo zjištěno, že fekální metabolom do určité míry odráží složení střevního mikrobiomu, je silně spjat s věkem, pohlavím nebo obezitou, ale je pouze mírně ovlivněn genetickými vlivy hostitele (Zierer *et al.*, 2018).

V souvislosti se střevním mikrobiomem je často diskutována produkce SCFA a její vliv na hostitelský organismus. V tlustém střevě vznikají SCFA, zejména acetát, butyrát a propoinát, jako vedlejší produkt mikrobiální fermentace potravy (Sun & Chang, 2014; Meckel & Kiraly, 2019). Většina SCFA je využita

kolonocyty jako zdroj energie, ale také přispívají ke stabilitě a bariérové funkci střevního epitelu. Některé SCFA jsou transportovány portální žilou do jater a odtud uvolňovány do oběhu. (Sun & Chang, 2014; Joseph *et al.*, 2017; Meckel & Kiraly, 2019). Zejména butyrát, v menší míře acetát a propionát, prostupují skrz hematoencefalickou bariéru, mohou měnit její propustnost, zraní i funkci mikroglií a vykazují rozsáhlé účinky na funkci mozku (Braniste *et al.*, 2014; Erny *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2017). Pravděpodobně SCFA fungují v organismu také jako inhibitory histonacetylázy (HDAC), která odebírá acetylový zbytek z lysinu na histonech a tím činí DNA (kyselinu deoxyribonukleovou) lépe kondenzovanou, tudíž transkripčně neaktivní. Inhibitory HDAC mohou potenciálně zvýšit transkripci neaktivních genů (Koh *et al.*, 2016). Myším, kterým byl po dobu 3 dnů orálně podáván butyrát sodný, se zvýšil počet těsných spojů v mozku a probíhala zde také vyšší míra acetylace histonů (Sun *et al.*, 2016). Ve spojitosti s podáváním návykových látek a změnou exprese určitých genů byly také pozorovány behaviorální změny u zkoumaných zvířat (Meckel & Kiraly, 2019).

Klíčovými metabolity ve střevě jsou také žlučové kyseliny vznikající oxidací cholesterolu. Jsou obsaženy ve žluči a slouží ke žlučové sekreci lipidů, toxických metabolitů a xenobiotik, působí jako důležité signální molekuly, mají vliv na imunitu, vstřebávání a metabolismus živin ve střevě. Žlučové kyseliny rozlišujeme na primární a sekundární. Primární (kyselina cholová a chenodeoxycholová) jsou produkovány hepatocyty v játrech, skladovány ve žlučníku a vylučovány do duodena po jídle (Chiang, 2013; Meckel & Kiraly, 2019). V tenkém střevu jsou primární žlučové kyseliny dekonjugovány mikroorganismy, čímž se zabrání jejich zpětnému vstřebávání a vstupují do tlustého střeva. Zde jsou mikrobiomem metabolizovány na sekundární žlučové kyseliny (deoxycholová a lithocholová) (Staels & Fonseca, 2009). Mikrobiom se se žlučovými kyselinami vzájemně oboustranně ovlivňuje. Složení mikrobiomu a metabolitů může mít vliv na syntézu primárních žlučových kyselin v játrech, jejich reabsorpci z tenkého střeva a konverzi na sekundární žlučové kyseliny v tlustém střevě. Oproti tomu signalizace žlučových kyselin může ovlivnit složení mikrobiomu (Meckel & Kiraly, 2019; Boscaini *et al.*, 2021).

Důležitým metabolitem ve střevě je tryptofan a jeho metabolity, včetně již zmiňovaného serotoninu (Meckel & Kiraly, 2019). Tryptofan je esenciální aminokyselina, která se získává především z bílkovin obsažených v potravě. Poté, co se vstřebá ze střeva do oběhu, může projít hematoencefalickou bariérou do mozku, kde slouží jako prekurzor pro syntézu serotoninu. Metabolismus tryptofanu probíhá ve střevě třemi hlavními metabolickými drahami (Agus *et al.*, 2018), jejichž rovnováha řídí biologickou dostupnost cirkulujícího tryptofanu v oběhu i jeho metabolitů, které regulují imunitní funkce a zánětlivou odpověď ve střevě a CNS (Waclawiková & El Aidy 2018; Meckel & Kiraly, 2019). Většina přijatého tryptofanu (90-95 %) je metabolizována hostitelskými buňkami ve střevě na kynurenin, který může projít hematoencefalickou bariérou (Waclawiková & El Aidy 2018). Ve střevě a CNS dochází dále k metabolismu kynureninu na dva hlavní metabolity: kyselinu kynurenovou s neuroprotektivními účinky a kyselinu chinolinovou s excitotoxickými účinky (Agus *et al.*, 2018; Meckel & Kiraly, 2019).

Přibližně 4-6 % tryptofanu metabolizuje střevní mikrobiom na několik metabolitů, např. tryptamin a indol, které jsou ligandy pro aryl uhlovodíkový receptor (AhR) (Agus *et al.*, 2018). U myší ligandy AhR snížily jaterní i střevní zánět a zlepšily funkce střevní bariéry (Krishnan *et al.*, 2018, Meckel & Kiraly, 2019). V CNS ligandy aktivují AhR na astrocytech, čímž regulují jejich aktivitu a potlačují zánět při autoimunitních encefalomyelitidách (Rothhammer *et al.*, 2016). Zbylé 1-3 % přijatého tryptofanu jsou konvertovány EC na serotonin, jehož syntéza je ovlivněna mikrobiální a vágovou aktivitou (Agus *et al.*, 2018; Waclawiková & El Aidy 2018; Margolis *et al.*, 2021).

Ve studiích zabývajících se vlivem morfinu na metabolom u myší byly pozorovány výrazné změny v metabolomickém profilu po krátkodobém podání morfinových pelet. To může narušit střevní bariéru a vyvolat systémový zánět. Fekální metabolom pokusných myší obsahoval méně primárních i sekundárních žlučových kyselin, naopak více nasycených mastných kyselin a fosfatidylethanolaminů oproti kontrolám. Společně s tím bylo zjištěno, že fekální transplantace od zdravého jedince zvrátila negativní efekt morfinové léčby na mikrobiom a metabolom, což by potenciálně mohlo být využito v klinické praxi (Banerjee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

4. Cíle diplomové práce

1. Zavést metody pro výzkum střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu potkana.
2. Sledovat složení střevního mikrobiomu a fekálních markerů metabolismu potkanů ve vybraných časových intervalech po ukončení 10 denního podávání morfinu.
3. Sledovat složení střevního mikrobiomu a fekálních markerů metabolismu v odpovídajících kontrolních skupinách potkanů, kterým morfin podáván nebyl.
4. Analyzovat data a porovnat hodnoty z obou skupin.

5. Experimentální část

5.1. Experimentální model

Experimenty byly provedeny na samcích potkanů z kmene Wistar, kteří byli staří 2 měsíce a vážili cca 300 g a byly chováni na standardní krmné dietě. Celkem byl odebrán trus od 6 potkanů po desetidenním intraperitoneálním podávání stoupajících dávek morfinu (od 10 do 50 mg/kg/den) a od 6 potkanů z kontrolní skupiny, kterým byl aplikován fyziologický roztok. U těchto 6 pokusných a 6 kontrolních potkanů probíhal odběr vzorků trusu v časovém intervalu: 1, 5, 15, 35, 60 dní po ukončení aplikace morfinu nebo fyziologického roztoku. Poté byly vzorky zmrazeny při - 80 °C. Následně byly tyto vzorky zpracovány pro analýzu mikrobiomu a metabolomickou analýzu.

K dalšímu zpracování vzorků pro analýzu mikrobiomu byly použity vzorky trusu od 4 pokusných a 4 kontrolních zvířat z časových intervalů 1, 5, 15, 35, 60 dní po vysazení morfinu nebo ukončení aplikace fyziologického roztoku (40 vzorků). Pro metabolomickou analýzu byly použity vzorky trusu od 5 pokusných a 5 kontrolních zvířat z časových intervalů 1 a 60 dnů po ukončení aplikace morfinu nebo fyziologického roztoku (20 vzorků).

5.2. Analýza střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom byl analyzován z trusu potkanů. Odebraný trus byl vložen do 1,5 ml mikrozkuvkavy a uchován v mrazicím boxu o teplotě - 80 °C, dokud nebyly odebrány všechny vzorky potřebné pro další zpracování.

5.2.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

Odebraný potkaní trus byl uchován v nezměněné podobě při teplotě - 80 °C v 1,5 ml mikrozkuvkách. Následná izolace mikrobiální DNA z trusu byla provedena pomocí QIAGEN QIAamp Fast DNA Stool Mini kitu. K roztokům AW1 a AW2 z kitu byl přidán 96 % ethanol Penta Chemicals. Při izolaci DNA byl použit led, laboratorní váha Scaltec, vortex Ika Vortex 1, centrifuga Hettich mikro 200R, termoblok Techne Dri-Block DB-2A a automatické pipety Finnpipette. Izolovaná DNA byla skladována v EB pufu (promývacím pufu), k jehož přípravě byl použit tris-Cl Sigma-Aldrich a jeho pH bylo měřeno pH metrem Mettler Toledo. Koncentrace izolované DNA byla měřena na DeNovix QFX fluorometru s využitím DeNovix dsDNA High Sensitivity Assay kitu. Naředěná izolovaná DNA byla uskladněna v 1,5 ml mikrozkuvkách a při transportu do firmy SEQme v 0,5 ml zkuvkách pro PCR (polymerázovou řetězovou reakci) na suchém ledu v polystyrénové krabičce. Pipetovací špičky, 1,5 ml

mikrozkumavky, alobal a skalpel, které nebyly originálně vysterilizované a neprodyšně uzavřené, byly vysterilizovány v autoklávu (Classic Prestige Medical).

5.2.2. Příprava vzorků

Ve výše zmíněných časových intervalech (kapitola 8.1. Experimentální model) byly od pokusných a kontrolních zvířat odebrány vzorky trusu do 1,5 ml mikrozkumavek, které byly označeny a zmrazeny na teplotu - 80 °C. Jakmile byly všechny vzorky odebrány, byla zahájena izolace DNA pomocí kitu QIAGEN QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit. Následně byla měřena koncentrace izolované DNA pomocí kitu DeNovix dsDNA High Sensitivity Assay a poté byla koncentrace DNA upravena pro potřeby mikrobiomové analýzy.

Před samotnou izolací DNA:

1. Byly vysterilizovány (při teplotě 125 °C po dobu 15 minut) všechny nevysterilizované neoriginálně zabalené pipetovací špičky a 1,5 ml mikrozkumavky + alobal a skalpel, které byly použity při odvažování trusu.
2. Byl připraven EB pufr pro promytí a skladování izolované DNA.
3. Byl vytemperován termoblok na teplotu 70 °C.
4. Centrifuga byla nastavena na 20 000 g (14 000 rpm) a teplotu v rozmezí 15-25 °C.
5. Bylo jednorázově přidáno 19 ml ethanolu k pufru AW1 a 30 ml ethanolu k pufru AW2 před první izolací.
6. Bezprostředně před izolací byly všechny pufrы protřepány pro zajištění homogenity.
7. V posledním kroku byla připravena ledová lázeň nutná pro chlazení vzorků v prvních fázích izolace a během prodlevy před měřením koncentrace izolované DNA.

Postup přípravy EB pufru:

EB pufr se skládá z 10 mM tris-Cl, destilované vody, jeho pH je 8,5 a celkem stačilo připravit 0,5 l pufru. Množství tris-Cl bylo vypočteno podle rovnice:

$$m_{tris-cl} = c \cdot m \cdot v = 0,01M \cdot 121,14 \frac{g}{mol} \cdot 0,5 l = 0,6057 g$$

Poté bylo pH pufru změřeno a upraveno na hodnotu 8,5. Pufr byl skladován v lednici v teplotě (7 °C).

Postup izolace DNA z potkaního trusu:

1. Byly provedeny všechny úkony nutné před izolací a zkontrolována kvalita používaných chemikálií i nastavení přístrojů.
2. 180-220 mg trusu bylo vloženo do 1,5 ml mikrozkumavky a uloženo na led.
3. K trusu bylo přidáno 1 ml Inhibit EX Buffer, suspenze se vortexovala 1 min nebo do homogenní konzistence.
4. Suspenze se zahřívala v termobloku při teplotě 70 °C po dobu 5 min. Pokud se materiál hůře lyzoval, bylo možné zvýšit teplotu na 95 °C, a poté se suspenze vortexovala 15 s.
5. Suspenze se centrifugovala 1 min, aby došlo k usazení částic trusu.
6. Do nové 1,5 ml mikrozkumavky bylo napipetováno 15 µl proteinázy K.

7. Do nové 1,5 ml mikrozkušavky s proteinázou K bylo napipetováno 200 μ l supernatantu, který vznikl v kroku 5.
8. Do 1,5 ml mikrozkušavky s proteinázou K a supernatantem bylo napipetováno 200 μ l Buffer AL a lyzát byl 15 s vortexován.
9. Lyzát byl vložen do termobloku o teplotě 70 °C na 10 min.
10. K lyzátu bylo přidáno 200 μ l 96 % ethanolu a byl vortexován.
11. Opatrně bylo přidáno 600 μ l lyzátu z kroku 9 do centrifugační kolonky (spin column), kolonka se uzavřela a lyzát byl 1 min centrifugován. Pak byla vložena centrifugační kolonka do nové sběrné zkumavky (collecting tube) a filtrát se vylil.
12. Opatrně byla otevřena centrifugační kolonka a přidalo se do ní 500 μ l roztoku AW1, lyzát byl centrifugován 1 min, sběrná zkumavka s filtrátem se vyhodila a centrifugační kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky.
13. Opatrně byla otevřena centrifugační kolonka a přidalo se do ní 500 μ l roztoku AW2, lyzát byl centrifugován 3 min, sběrná zkumavka s filtrátem se vyhodila, centrifugační kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky a opět centrifugována 3 min.
14. Centrifugační kolonka byla vložena do nové 1,5 ml mikrozkušavky, přímo na membránu v centrifugační kolonce bylo napipetováno 200 μ l EB pufru a lyzát byl ponechán 1 min odstát v pokojové teplotě. Poté byl centrifugován 1 min na promytí DNA.
15. Izolovaná DNA se promyla do 1,5 ml mikrozkušavky a byla měřena její koncentrace. Takto izolovaná byla DNA vhodná pro skladování při teplotě -80 °C.

Postup měření koncentrace DNA:

1. Před použitím se všechny roztoky vytemperovaly na pokojovou teplotu.
2. Roztoky byly vortexovány, zkumavky s barvivem a standardy krátce centrifugovány, aby nezůstala část ve víčku.
3. Byl připraven pracovní roztok smícháním Assay Buffer a Dye v poměru 100:1 v dostatečném objemu potřebném pro měření koncentrace daného počtu vzorků. Pro jeden vzorek nebo standard bylo třeba 190 μ l pracovního roztoku. Pracovní roztok byl důkladně promíchán.
4. Pro každý vzorek nebo standard bylo do 0,5 ml mikrozkušavky přeneseno 190 μ l pracovního roztoku.
5. Do každé 0,5 ml mikrozkušavky bylo k pracovnímu roztoku přidáno 10 μ l neznámého vzorku DNA nebo 10 μ l 0 ng/ μ l standardu dsDNA nebo 10 μ l 25 ng/ μ l standardu dsDNA.
6. Vzorky a standardy byly opatrně promíchány a nechány odstát 5 min v pokojové teplotě.
7. Na fluorometru byl vybrán program pro měření koncentrace dsDNA. Nejprve byly měřeny koncentrace standardů a byla tak stanovena standardní křivka. Dále byly měřeny a zapsány koncentrace vzorků.

Úprava koncentrace izolované DNA pro analýzu mikrobiomu:

Izolované vzorky obsahovaly koncentraci DNA okolo 20 ng/ μ l. Ovšem pro analýzu mikrobiomu bylo nutné koncentraci DNA snížit zhruba na 5-6 ng/ μ l. Výsledná koncentrace DNA ve všech vzorcích připravených na sekvenaci je v tabulce 2, koncentrace byla opět měřena na fluorometru.

Tabulka 2. Přehled vzorků pro sekvenační analýzu mikrobiomu.

vzorek	finální koncentrace ng/ul	vzorek	finální koncentrace ng/ul
CI 1	5,73	MI 1	5,51
CI 2	5,55	MI 2	5,42
CI 3	5,91	MI 3	5,42
CI 4	5,58	MI 4	5,34
CII 1	5,63	MII 1	5,58
CII 2	5,82	MII 2	5,07
CII 3	6,04	MII 3	5,36
CII 4	5,96	MII 4	5,22
CIII 1	5,81	MIII 1	5,51
CIII 2	5,93	MIII 2	5,36
CIII 3	5,95	MIII 3	5,11
CIII 4	5,86	MIII 4	5,97
CIV 1	6,01	MIV 1	5,18
CIV 2	6,33	MIV 2	5,43
CIV 3	6,01	MIV 3	5,39
CIV 4	5,74	MIV 4	5,22
CV 1	5,41	MV 1	5,47
CV 2	5,49	MV 2	5,39
CV 3	5,41	MV 3	5,33
CV 4	5,43	MV 4	5,25

Vzorky značené počátečním písmenem C jsou kontrolní vzorky a M pokusné. Následující římská čísllice I-V znázorňuje 1.-5. časový interval odběru. Poslední čísllice 1-4 za podtržítkem označuje konkrétního potkana.

Poté bylo 25 µl roztoku s izolovanou DNA o přesné koncentraci přesunuto do 0,5 ml PCR zkumavky. Celkem 48 vzorků bylo připraveno na transport do sekvenační firmy SEQme. Do transportu byly všechny vzorky uchovány v teplotě -80 °C a během transportu byly uloženy v polystyrénové krabici na suchém ledu.

5.2.3. Sekvenování nové generace

Sekvenační metody umožňují určit přesné pořadí nukleotidů v daném úseku DNA nebo RNA. Technologie NGS (sekvenování nové generace) velice obohatila dosavadní znalosti o mikrobiomech, protože dokáže objevit a charakterizovat nekultivovatelné mikroorganismy a předpovědět jejich funkci. Mezi klíčové metody NGS patří 16S rRNA (16S ribozomální ribonukleová kyselina) genomové sekvenování, shotgun metagenomové sekvenování a RNA sekvenování. Velkou výhodou NGS je právě schopnost identifikace většího množství unikátních druhů než za použití tradičních kultivačních metod a schopnost provádět paralelní sekvenování více vzorků, což u dřívějšího Sangerova sekvenování nebylo

možné provést. Mikrobiální DNA určenou pro analýzu získáváme např. ze vzorku trusu, krve nebo tkáně (Wensel *et al.*, 2022).

Nejběžnější metodou NGS pro identifikaci a charakterizaci bakterií je sekvenování amplikonů, kdy se nejprve amplifikují oblasti DNA pomocí PCR a výsledný produkt je následně osekvenován. Nejčastěji je PCR amplifikován bakteriální gen pro 16S rRNA, proto se sekvenování amplikonů jinak nazývá také sekvenování 16S rRNA (Wensel *et al.*, 2022). Poprvé byl gen pro 16S rRNA popsán k charakterizaci nekultivovatelných mikrobů již v roce 1985. Tento gen je pro amplifikaci ideální, protože je mezi bakteriemi všudypřítomný a vysoce konzervovaný (Lane *et al.*, 1985). Dále obsahuje 9 hypervariabilních oblastí (V1-V9), které se liší mezi bakteriálními rody a druhy. Během analýz se většinou zaměřuje na vybrané podmnožiny variabilních oblastí, což šetří čas a náklady na sekvenování, ale může přinést rozdílnou interpretaci dat nebo zkreslit výsledky (Chakravorty *et al.*, 2007; Wensel *et al.*, 2022).

Z izolované DNA ze vzorků je vytvořena dvojité indexovaná sekvenační knihovna amplifikací vybrané hypervariabilní oblasti metodou PCR a dále se výsledné amplikony sekvenují. Poté následuje čištění dat, které zahrnuje několik kroků včetně ořezání sekvencí adaptéru a primeru, odstranění nekvalitních bází, sekvencí z readů a sekvencí odpovídajících kontrolní knihovně, chimerických sekvencí a lidských, potažmo chloroplastových a mikrochondriálních kontaminantů (Wensel *et al.*, 2022). Následně se sekvenační data uspořádávají do OTU (operačních taxonomických jednotek) používajících se ke klasifikaci skupin blíže příbuzných jedinců. Sekvenační identita OTU vyšší než 97 % (nebo s nepodobností do 3 %) definuje druh, zatímco OTU s podobností sekvencí 95 % a 80 % se používají k definici rodu (Xia *et al.*, 2018). Taxonomická identifikace se odvozuje na základě výpočetního alignmentu podle sekvence 16S rRNA v referenčních databázích (Wensel *et al.*, 2022).

Nejčastěji využívaný přístup sekvenování amplikonů použila také firma SEQme, kde byly tyto vzorky analyzovány.

Postup zpracování vzorků v SEQme:

1. Amplifikovaly se vybrané hypervariabilní oblasti. Pro amplifikaci byly použity určité primerové kombinace uvedené v tabulce 3, jejichž výběr reflektuje mimo jiné i kompatibilitu s projekty typu Earth Microbiome project apod.
2. Proběhla kontrola produktů na agarózovém gelu.
3. Z izolované DNA ze vzorků trusu se vytvořila dvojité indexovaná sekvenační knihovna amplifikací vybrané hypervariabilní oblasti metodou PCR (Nextera technology).
4. Knihovny se kvantifikovaly pomocí qPCR pro dosažení maximálně vyrovnaného sekvenačního výtěžku.
5. Sekvenovalo se na systémech MiSeq (Illumina) a chemií v2 (tj. 2 × 250-bp párových čtení).
6. Sekvenační data byla zpracována do formátu FASTQ (VII).

Tabulka 3. Primery použité pro taxonomickou analýzu (VII).

Říše	Gen	Cílová oblast	Oficiální název primeru	Sekvence	Produkt (bp)
Bakterie	16S rRNA	V4	V4 515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	252
			V4 806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	

5.2.4. Zpracování dat

Sekvenační data byla vyhodnocena pomocí FastQC (v0.11.9) a MultiQC. (v1.10.1). Trimming adaptérů a nekvalitních bází (phred skóre < 25, délka readů \geq 34 nt) bylo provedeno programem TrimGalore (v0.6.4_dev), který je obalovacím nástrojem programu Cutadapt (v2.8). Metataxonomická analýza byla provedena pomocí Qiime2 (v2021.8.0) pipeline s využitím databáze RDP. Denoising byl proveden pomocí Dada2 v Qiime2 s kódujícím (forward) a antikódujícím (reverse) primerovým trimming faktorem 13 a s truncation faktorem 0. Klastrování jednotlivých prvků bylo provedeno pomocí Vsearch v Qiime2 s identitou 0,99 (v rozmezí 0-1). Data s taxonomickými četnostmi jednotlivých kategorií pro každý vzorek byla zpracována do formátu Excel a specifických formátů pro Qiime2 s příponou .qza a .qzv.

Sloupcový graf relativního zastoupení jednotlivých bakteriálních rodů ve střevním mikrobiomu ve všech vzorcích byl zhotoven v programu Qiime2. Koláčové grafy zobrazující rozdíly ve složení střevního mikrobiomu mezi sledovanými skupinami byly vytvořeny v programu Krona. Změny v procentuálním zastoupení kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a jejich vzájemném poměru mezi studovanými skupinami byly analyzovány prostřednictvím two-way repeated measures ANOVA (analýzy rozptylu) a Bonferroniho testu nebo Tukeyho testu v programu GraphPad Prism. Parametry alfa diverzity (Chao1, Shannon-Wiener a Pielou's evenness) byly spočítány v programu Qiime2, statisticky byly jednotlivé parametry analyzovány pomocí one-way ordinary ANOVA s Tukeyho testem a one-way repeated measures ANOVA s Tukeyho testem v programu GraphPad Prism. Beta diverzita byla vizualizována prostřednictvím NMDS (nemetrického multidimenzionálního škálování) a vypočtena za použití Bray-Curtis a Jaccard indexů odlišnosti v programu Past. Statistické porovnání beta diverzity mezi studovanými skupinami bylo provedeno taktéž v programu Past pomocí one-way PERMANOVA (permutační vícerozměrné analýzy rozptylu) s Bonferroni korekcí na základě hodnot Bray-Curtis a Jaccard indexu. Vizualizace rozdílů ve složení střevního mikrobiomu byla provedena metodou sPLS-DA (částečnou diskriminační analýzou nejmenších čtverců) v aplikaci MetaboAnalyst 5.0.

5.3. Analýza fekálního metabolomu

Fekální metabolom byl analyzován v trusu potkanů. Odebraný trus byl vložen do 1,5 ml mikrozkuřavky, zamražen v tekutém dusíku a uchován v mrazicím boxu o teplotě - 80 °C. Všechny pokusné vzorky, včetně několika cvičných vzorků, na kterých se předem stanovil přesný postup analýzy, byly transportovány na suchém ledu do laboratoře OMICS Proteomika v Biocevu, kde byly vzorky před provedením metabolomické analýzy uschovány v mrazicím boxu při teplotě - 80 °C.

5.3.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

Odebraný potkaní trus jsem uchovávala v nezměněné podobě při teplotě - 80 °C v 1,5 ml mikrozkuřavkách. Během transportu vzorků byl využit suchý led a polystyrénová krabička. Pro přípravu vzorků v Biocevu byly použity tyto chemikálie: led, 300 µl vychlazené destilované vody, cca 0,5 l destilované vody na omývání sonikační tyče, pyridin Sigma-Aldrich, oximační činidlo – roztok methoxyaminu hydrochloridu Sigma-Aldrich v bezvodém pyridinu Sigma-Aldrich o koncentraci 25 mg/ml, interní standardy adonitol a norvalin Sigma-Aldrich, silylační činidla trimethyl-silylové činidlo (TMSIL): N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamid + 1 % trimethylchlorosilan Sigma-Aldrich a tertbutyl-dimethyl-silylové činidlo (TBDMS): N-tert-butyl-dimethylsilyl-N-methyl-trifluoroacetamid Sigma-Aldrich. Z laboratorního vybavení byly při přípravě využity: 1,5 ml mikrozkuřavky, automatické pipety Labnet, skleněná stříkačka Hamilton, skalpel, teflonová páska, papírové ubrousky, vortex Labnet, váha A&D Company, vakuová odparka Hanil Modul 4080C, tyčový sonikátor Bandelin Sonoplus, termomixér Eppendorf ThermiMixer C, centrifuga Beckman Coulter Microcentrifuge 20R, 120 malých skleněných vialek označených číslem vzorku + jedním z označení: TBDMS, TMSIL, ZBYTEK, QC MIX, QC SAMPLE TBDMS nebo QC SAMPLE TMSIL. Zpracované vzorky byly analyzované komprehensivním dvourozměrným plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí Pegasus 4D od firmy Leco Corporation vybaveným kryomodulátorem na kapalný dusík a robotickým autosamplerm MPS od firmy Gerstel.

5.3.2. Příprava vzorků

Ve výše zmíněných časových intervalech (kapitola 8.1. Experimentální model) byly od pokusných a kontrolních zvířat odebrány vzorky trusu do 1,5 ml mikrozkuřavek, který byly označeny, zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány v mrazicím boxu o teplotě - 80 °C.

Postup přípravy vzorku pro metabolomickou analýzu:

1. Bylo odváženo 60 mg trusu do označené 1,5 ml mikrozkuřavky a ta byla umístěna do ledové lázně.
2. Do každé 1,5 ml mikrozkuřavky se vzorkem trusu bylo automatickou pipetou přidáno 300 µl vychlazené destilované vody.

3. Automatickou pipetou byly do každé 1,5 ml mikrozkušavky přidány interní standardy: 10 µl adonitolu (0,5 mg/ml) a 10 µl norvalinu (0,5 mg/ml). Zkušavka se krátce vortexovala při vysokých otáčkách a následně krátce centrifugovala na vakuové odparce.
4. Poté byly všechny vzorky uskladněny do ledové lázně a jeden po druhém sonikován tyčovým sonikátorem (intenzita 80 %, 20 s). Sonikační trn byl po každém vzorku opláchnut destilovanou vodou a očištěn papírovým ubrouskem.
5. Sonikované vzorky byly vloženy a protřepávány po dobu 15 min v termomixéru při teplotě 4 °C a otáčkách 2000 rpm, pak byly centrifugovány po dobu 20 min při teplotě 4 °C a otáčkách 16 000 g.
6. Bylo odebráno 2 x 50 µl supernatantu do dvou samostatných malých skleněných vialek označených daným číslem vzorku s nápisy TBDMS a TMSIL. Poté bylo odebráno 100 µl supernatantu do skleněné vialky označené daným číslem vzorku a ZBYTEK. Po manipulaci se vialky skladovaly na ledu, ale nebyly uzavřeny víčkem.
7. Z každé vialky označené jako ZBYTEK bylo odebráno a přeneseno 10 µl supernatantu do skleněné vialky označené odpovídajícím číslem vzorku s nápisem QC MIX. Potom byla vialka uzavřena, vortexována. Následně se z ní odebralo 2 x 50 µl supernatantu a vložilo do vialek s odpovídajícími čísly vzorku a nápisy QC SAMPLE TBDMS a QC SAMPLE TMSIL.
8. Všechny vialky byly naskládány do zásobníku vakuové odparky a ponechaly se odpařovat 1 hod při laboratorní teplotě. Následně bylo do všech odpařených vialek přidáno skleněnou stříkačkou 50 µl pyridinu, obsah byl lehce v rukou promíchán a vialky byly opět vloženy do vakuové odparky na 15 min.
9. Do odpařených vialek bylo opět přidáno skleněnou stříkačkou 50 µl pyridinu a následně 30 µl oximačního činidla. Víčka vialek byla důkladně zašroubována, zatěsněna teflonovou páskou, a pak byly vialky krátce, ale silně vortexovány a inkubovány v termomixéru na 2 h, při teplotě 40 °C a otáčkách 1500 rpm. Po inkubaci byly na noc vzorky uloženy do mrazicího boxu při teplotě - 20 °C.
10. Druhý den byly vialky krátce centrifugovány na vakuové odparce. Následně byly odšroubovány a bylo přidáno 40 µl TMSIL činidla do příslušných vzorků označených nápisem TMSIL a do příslušných vzorků označených TBDMS bylo přidáno 30 µl TBDMS činidla. Víčka vialek byla důkladně zašroubována, zatěsněna teflonovou páskou, a pak byly vialky krátce, ale silně vortexovány a inkubovány 30 min v termomixéru při teplotě 100 °C a otáčkách 1500 rpm.
11. Vialky byly vyjmuty z termomixéru a krátce centrifugovány na vakuové odparce. Poté byly odšroubovány, do každého vzorku s nápisem TMSIL bylo skleněnou stříkačkou přidáno 400 µl hexanu a do každého vzorku s nápisem TBDMS 500 µl hexanu. Vzorky byly krátce, ale silně vortexovány a centrifugovány na vakuové odparce na 10 min. Takto připravené vzorky byly opatrně vyjmuty, aby se nerozvířila sraženina na dně, naskládány do zásobníku a přešlo se k samotnému měření, které bylo provedeno na komprehensivním dvourozměrném plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

5.3.3. Komprehensivní dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

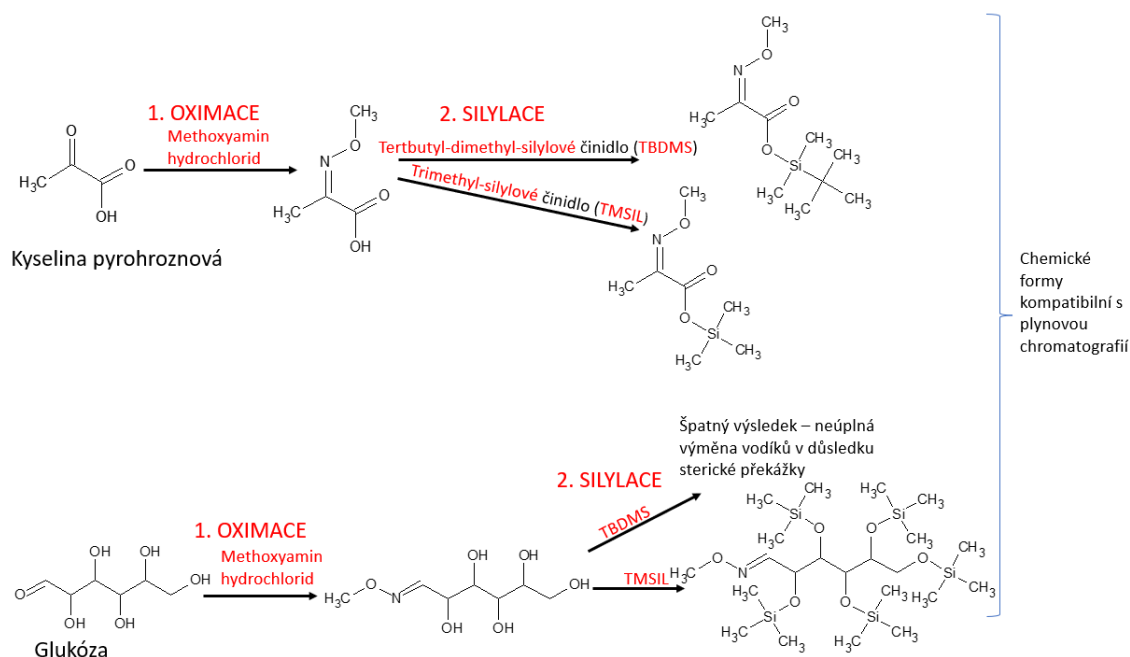
Kompletní analýza nejen fekálního metabolomu se provádí pomocí necílených metabolomických metod založených na plynové nebo kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií, kdy je možné z biologických vzorků rutinně detekovat tisíce chromatografických peaků (signálů) a každý z těchto peaků označuje určitý metabolit (Want *et al.*, 2006; Patti *et al.*, 2012; Tranchida *et al.*, 2016).

Na rozdíl od cílených metabolomických výsledků jsou necílené metabolomické datové soubory mimořádně složité a u některých nových přístrojů s vysokým rozlišením dosahují velikosti souborů v

řádu gigabajtů na vzorek (Patti *et al.*, 2012). Proto, abychom dokázali v neznámém vzorku stanovit konkrétní metabolit, je nutné změřit jeho standard. Právě dokonalá shoda retenčního chování analyzované látky a jejího hmotnostního spektra se standardem umožňuje jeho identifikaci a stanovení koncentrace (Want *et al.*, 2006). Moderní analytické metody jsou schopné detekovat v biologických vzorcích obrovské množství metabolitů. Velká část jich však zůstává nepopsaných z hlediska jejich struktury. Nejistá identifikace metabolitů ztěžuje následné biologické interpretace (Patti *et al.*, 2012).

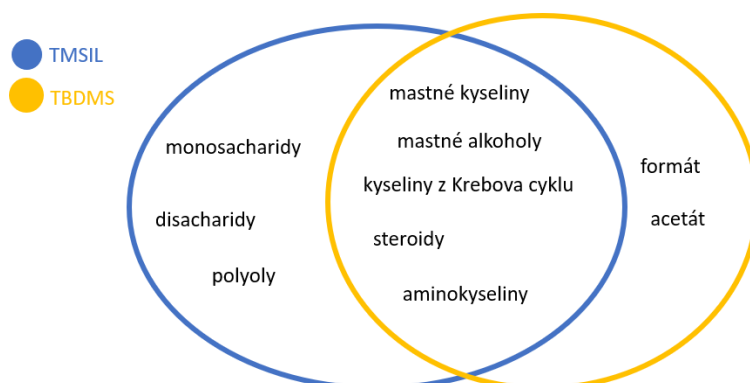
V Biocevu byla provedena necílená metabolomická analýza malých polárních molekul s využitím komprehensivní dvourozměrné plynové chromatografie s time-of-flight hmotnostním spektrometrem (GCxGC-TOF/MS). Při tomto postupu byly metabolity nejprve extrahovány ze vzorků trusu a prošly dvoustupňovým derivatizačním postupem (obrázek 12):

1. Krok oximace – cílem této reakce byla ochrana keto skupiny. Zabránila cyklizaci sacharidů a také dekarboxylaci α -keto skupin molekul. Tato derivatizace zvýšila stabilitu metabolitů a měla za následek menší počet chromatografických peaků pro stejnou sloučeninu.
Derivatizační činidlo: roztok methoxyaminu hydrochloridu v bezvodém pyridinu o koncentraci 25mg/ml.
2. Krok silylace – cílem této reakce bylo zamaskovat -OH skupiny karboxylových a hydroxylových skupin. Tato derivatizace zvýšila těkavost, termostabilitu a snížila nežádoucí interakce se separační kolonou.
Derivatizační činidla: N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamid + 1% trimethylchlorosilan; N-tert-butyl-dimethylsilyl-N-methyl-trifluoroacetamid



Obrázek 12. Grafické znázornění dvoustupňového derivatizačního postupu na příkladu molekuly pyrohroznové a glukózy.

Mezi oběma derivatizačními činidly jsou rozdíly zejména v použití pro analýzu jednotlivých metabolitů (obrázek 13). Trimethyl-silylové činidlo umožňuje analýzu cukrů nebo polyolů a sloučenin s více sousedními -OH skupinami obecně. Není vhodný pro velmi malé analyty (mravenčany, acetát, aj.) z důvodu koeluce s rozpouštědlem a zároveň jsou derivatizované látky méně stabilní vůči vlhkosti. Tertbutyl-dimethyl-silylové činidlo je vhodné pro velmi malé analyty (mravenčany, acetát, aj.), ale ne pro sloučeniny s blízkými -OH skupinami z důvodů sterického bránění. Derivatizované látky jsou stabilnější vůči vlhkosti.



Obrázek 13. Rozdělení analytů při GCxGC-TOF/MS podle derivatizačního činidla umožňujícího jejich detekci. Převážnou většinu jich lze analyzovat pomocí obou silylačních činidel.

Vybrané metabolity byly poté analyzovány metodou GCxGC-TOF/MS. Byl použit přístroj Pegasus 4D vybavený kryomodulátorem na kapalný dusík a robotickým autosamplerem MPS. Separace probíhala v režimu dvourozměrné separace na kolonách Rxi-5Sil o délce 27,7 m, (primární kolona, Restek) a BPX-50 o délce 1,57m (sekundární kolona, SGE). Analýza probíhala za následujících podmínek: teplota nástřikového prostoru 290 °C, nástřikový mód – splitless, rychlost nosného plynu (helium) 1 ml/min. Obě kolony byly umístěné každá v nezávisle vyhřívané peci (primární a sekundární). Teplotní program na primární peci byl nastaven následovně: 50 °C (1 min) – 8 °C/min do 320 °C (5 min). Teplota na sekundární peci byla nastavena tak, aby byla po celou dobu analýzy o 5 °C vyšší než teplota na primární peci. Teplota na modulátoru byla nastavena o 15 °C výše než teplota na sekundární peci. Modulační perioda trvala 3 s, přičemž horký pulz byl nastaven na 1 a chladný pulz na 0,5 s.

Teplota transferline do hmotnostního detektoru byla nastavena na teplotu 280 °C. Hmotnostní detektor byl vybaven elektronovou ionizací a time-of-flight hmotnostním analyzátozem. Přístroj byl ovládán programem ChromaTOF 4.52 a stejný program byl použitý i pro vyhodnocení naměřených dat. Látky byly detekované jako oximované a silylované (TMSIL a TBDMS) deriváty a identifikované srovnáním hmotnostního spektra analytů s knihovnou hmotnostních spekter NIST 2.2 2014.

5.3.4. Zpracování dat

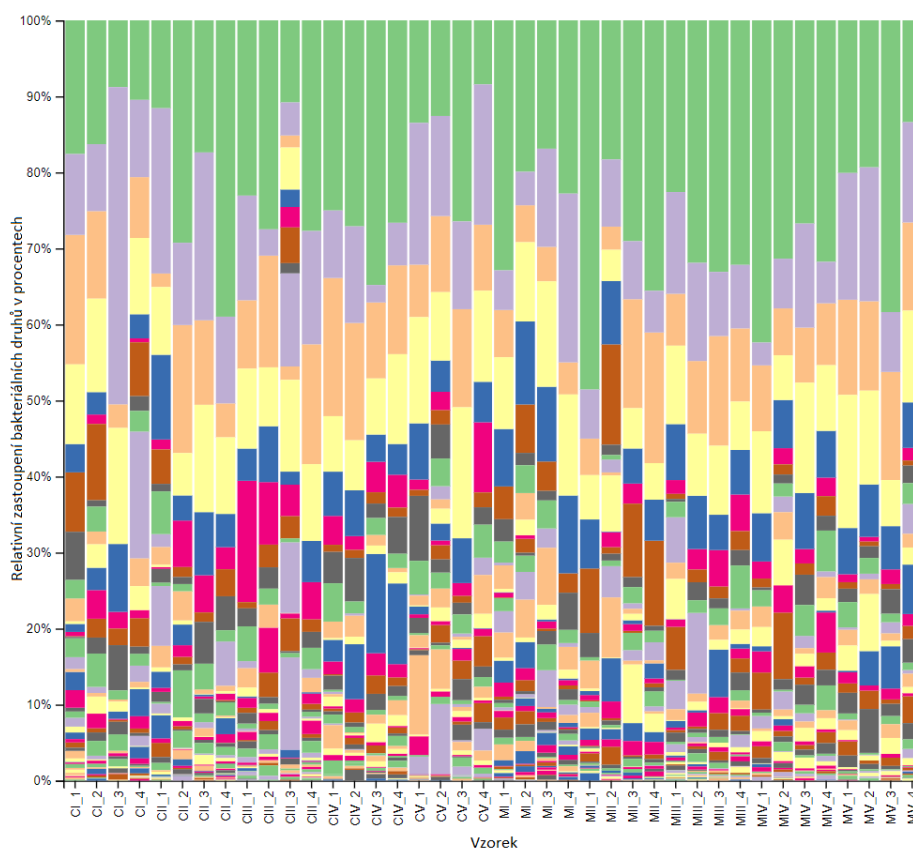
Výstupem necílené metabolomické analýzy byly dva datové soubory ve formátu Excel s metabolity detekovanými pomocí TBDMS nebo TMSIL. Data byla normalizována vůči interním standardům a škálována pomocí Pareto scaling. Následná datová analýza byla zpracována v aplikaci MetaboAnalyst 5.0., kde byla provedena sPLS-DA. Heat mapa odrážející koncentraci SCFA byla taktéž vytvořena v aplikaci MetaboAnalyst. Grafy sumace síly signálu detekovaných SCFA v jednotlivých skupinách byly vytvořeny v programu GraphPad Prism.

6. Výsledky

V následujících kapitolách jsou nejdříve uvedeny výsledky první části studie, kdy byl sledován vliv desetidenního podávání morfinu na složení střevního mikrobiomu potkana. V dalších kapitolách jsou uvedeny výsledky druhé části studie, která byla zaměřena na sledování dlouhodobých změn v metabolickém profilu potkana po desetidenním podávání morfinu. V příloze 1 jsou uvedena výchozí data z NGS pro analýzu mikrobiomu. Výchozí data pro analýzu metabolomu na základě necílené metabolické analýzy jsou značně rozsáhlá, a proto jsou v příloze 2 uvedena alespoň data pro analýzu SCFA.

6.1. Grafické znázornění relativního zastoupení jednotlivých bakteriálních rodů ve střevním mikrobiomu ve všech vzorcích

Sloupcový graf na obrázku 14 schematicky zobrazuje rozdíly ve složení střevního mikrobiomu v rámci všech 40 zkoumaných vzorků trusu. Legenda s označením identifikovaných bakteriálních rodů je vyobrazena na další stránce.



Obrázek 14. Sloupcový graf ilustrující distribuci jednotlivých bakteriálních rodů střevního mikrobiomu ve všech 40 zkoumaných vzorcích trusu potkanů. Vzorky značené počátečním písmenem C jsou kontrolní vzorky a M pokusné. Následující římská číslice I-V znázorňuje interval odběru: I – 1. den, II – 5. den, III – 15. den, IV – 35. den, V – 60. den. Poslední číslice 1-4 za podtržítkem označuje konkrétního potkana.

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Porphyrmonadaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Prevotellaceae, genus_Prevotella

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_unclassified

Unassigned

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Porphyrmonadaceae, genus_Barnesiella

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Bacteroidaceae, genus_Bacteroides

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Oscillibacter

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Roseburia

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Lactobacillales, family_Lactobacillaceae, genus_Lactobacillus

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Peptostreptococcaceae, genus_Romboutsia

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Prevotellaceae, genus_Alloprevotella

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Betaproteobacteria, order_Burkholderiales, family_Sutterellaceae, genus_Parasutterella

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_Turicibacter

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Ruminococcus

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Rikenellaceae, genus_Alistipes

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Blautia

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Lachnospiraceae_incertae_sedis

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Deltaproteobacteria, order_Bdellovibrionales, family_Bdellovibrionaceae, genus_Vampirovibrio

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Betaproteobacteria, order_Burkholderiales, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Porphyrmonadaceae, genus_Parabacteroides

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Clostridiaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Peptococcaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Clostridium

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Gammaproteobacteria, order_Enterobacteriales, family_Enterobacteriaceae, genus_Escherichia/Shigella

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Prevotellaceae, genus_Paraprevotella

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_unclassified, order_unclassified, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Fusicatenibacter

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Clostridium

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Faecalibacterium

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Butyricoccus

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Deltaproteobacteria, order_unclassified, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Epsilonproteobacteria, order_Campylobacteriales, family_Helicobacteraceae, genus_Helicobacter

domain_Bacteria, phylum_Verrucomicrobia, class_Verrucomicrobiae, order_Verrucomicrobiales, family_Verrucomicrobiaceae, genus_Akkermansia

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Subdoligranulum

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Alphaproteobacteria, order_Rhodospirillales, family_Rhodospirillaceae, genus_Aestuariaispira

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Actinobacteria, class_Actinobacteria, order_Bifidobacteriales, family_Bifidobacteriaceae, genus_Bifidobacterium

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Eisenbergiella

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Deltaproteobacteria, order_Desulfovibrionales, family_Desulfovibrionaceae, genus_Desulfovibrio

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_Allobaculum

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Deltaproteobacteria, order_Desulfovibrionales, family_Desulfovibrionaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Eubacteriaceae, genus_Eubacterium

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Alphaproteobacteria, order_unclassified, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Coproccocus

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Acetatifactor

domain_Bacteria, phylum_Elusimicrobia, class_Elusimicrobia, order_Elusimicrobiales, family_Elusimicrobiaceae, genus_Elusimicrobium

domain_Bacteria, phylum_Actinobacteria, class_Actinobacteria, order_Actinomycetales, family_Corynebacteriaceae, genus_Corynebacterium

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Gammaproteobacteria, order_Pasteurellales, family_Pasteurellaceae, genus_Pasteurella

domain_Bacteria, phylum_Deferribacteres, class_Deferribacteres, order_Deferribacterales, family_Deferribacteraceae, genus_Mucispirillum

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Anaerostipes

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Pseudoflavonifractor

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_Clostridium

domain_Bacteria, phylum_Actinobacteria, class_Actinobacteria, order_Coribacteriales, family_Coribacteriaceae, genus_Collinsella

domain_Bacteria, phylum_Tenericutes, class_Mollicutes, order_Anaeroplasmatales, family_Anaeroplasmataceae, genus_Anaeroplasma

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Gammaproteobacteria, order_Pseudomonadales, family_Moraxellaceae, genus_Psychrobacter

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Alphaproteobacteria, order_Rhodospirillales, family_Rhodospirillaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Clostridiales, genus_incertae_sedis

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_unclassified, order_unclassified, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Negativicutes, order_Selenomonadales, family_Acidaminococcaceae, genus_Phascolorctobacterium

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Bacillales, family_unclassified, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Lactobacillales, family_Streptococcaceae, genus_Lactococcus

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Betaproteobacteria, order_Burkholderiales, family_Alcaligenaceae, genus_Paenacaligenes

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_incertae_sedis

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_unclassified

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Ruminococcaceae, genus_Anaerobacterium

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Lactobacillales, family_Aerococcaceae, genus_Aerococcus

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Lactobacillales, family_Aerococcaceae, genus_Facklamia

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Clostridia, order_Clostridiales, family_Lachnospiraceae, genus_Dorea

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Rikenellaceae, genus_Rikenella

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Betaproteobacteria, order_Burkholderiales, family_Oxalobacteraceae, genus_Oxalobacter

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Lactobacillales, family_Streptococcaceae, genus_Streptococcus

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Betaproteobacteria, order_Burkholderiales, family_Alcaligenaceae, genus_Oligella

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_Coprobacillus

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Porphyrmonadaceae, genus_Odoribacter

domain_Bacteria, phylum_Bacteroidetes, class_Bacteroidia, order_Bacteroidales, family_Porphyrmonadaceae, genus_Butyricomonas

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Bacillales, family_Planococcaceae, genus_Sporosarcina

domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Erysipelotrichia, order_Erysipelotrichales, family_Erysipelotrichaceae, genus_Holdemania

domain_Bacteria, phylum_Proteobacteria, class_Alphaproteobacteria, order_Rhizobiales, family_Bradyrhizobiaceae, genus_Bradyrhizobium

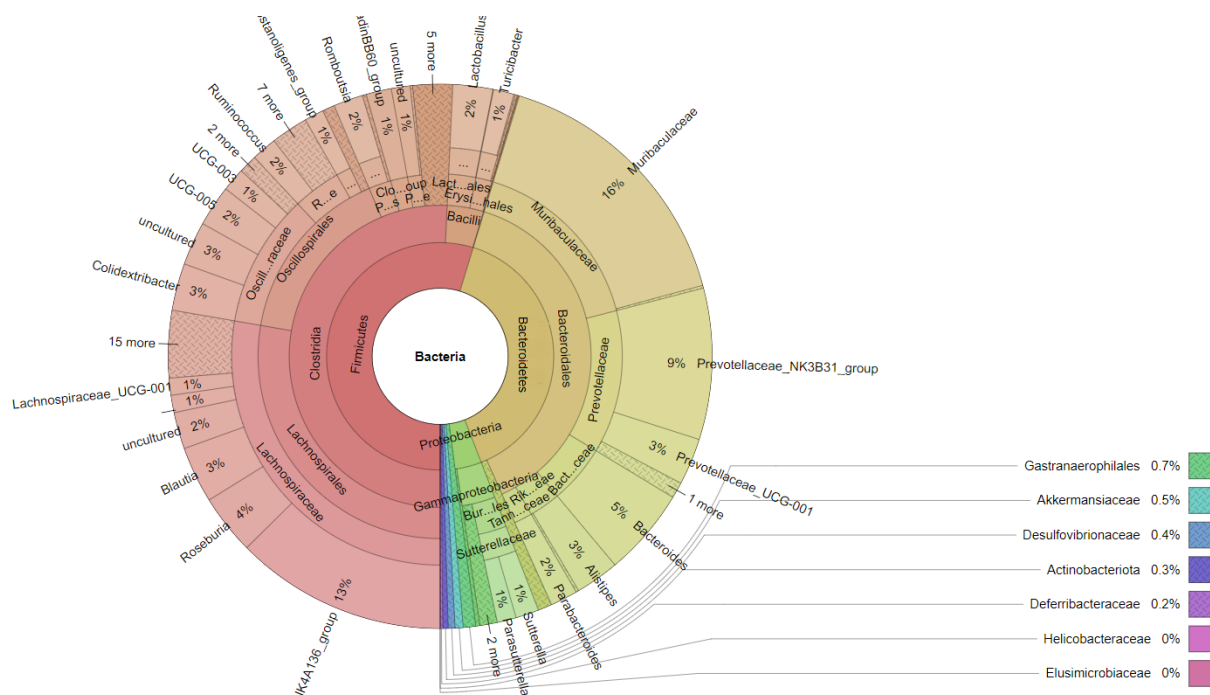
domain_Bacteria, phylum_Firmicutes, class_Bacilli, order_Bacillales, family_Bacillaceae, genus_unclassified

Označení identifikovaných bakteriálních rodů a jejich taxonomické zařazení. Anglické slovo domain v překladu znamená doména, phylum kmen, class třída, order řád, family čeleď a genus rod. Bohužel nebyly všechny bakteriální čeledi nebo rody přesně identifikovány, v tomto případě je v legendě uveden výraz unclassified (neklasifikováno). Sekvence, které se nepodařilo přiřadit, jsou označeny výrazem unassigned (nepřiřazeno).

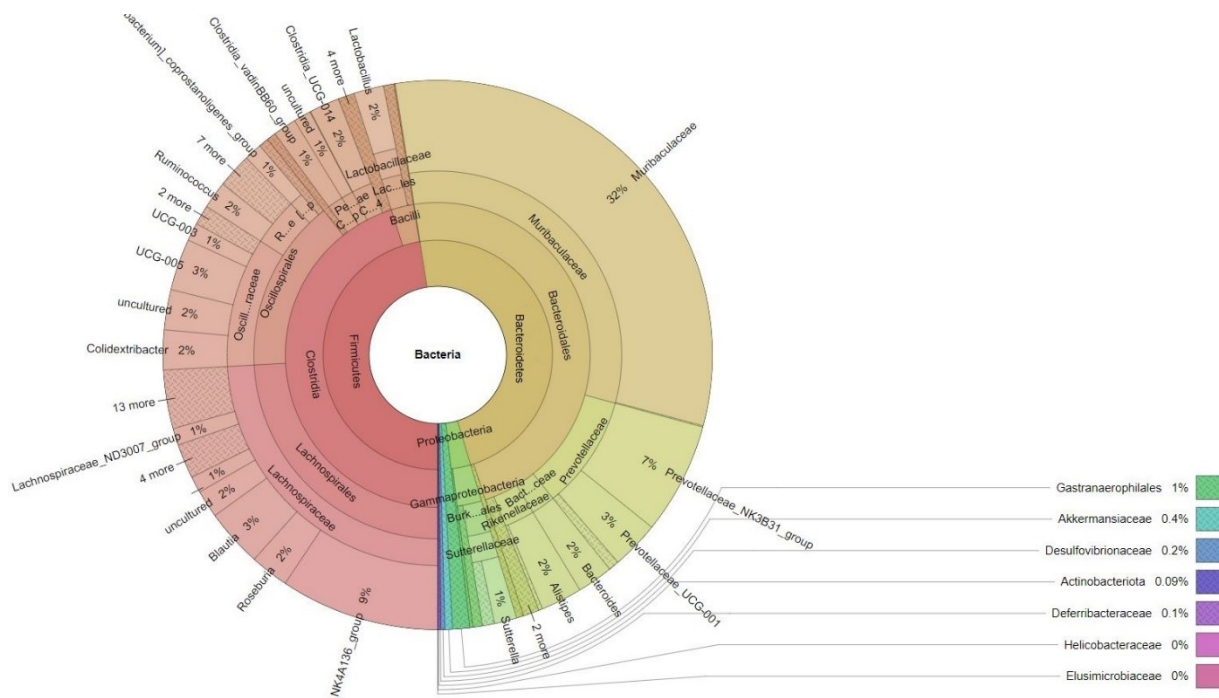
Celkem bylo napříč všemi vzorky přesně identifikováno 80 unikátních bakteriálních rodů, ale bohužel některé se nepodařilo přesně taxonomicky zařadit. Z čeledí patřící do kmene *Firmicutes* byly nejhojněji zastoupeny čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* patřící do třídy *Clostridia*. Z kmene *Bacteroidetes* byly relativně nejvíce zastoupeny druhy patřící do třídy *Bacteroidia* a do čeledí *Porphyromonadaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* a *Bacteroidaceae*. Rozdíly v početnosti jednotlivých bakteriálních rodů mezi skupinami byly analyzovány na základě OTU tabulky s použitím two-way ANOVA s Tukeyho testem, ale nebyl detekován žádný rozdíl, což je způsobeno především malým počtem vzorků na skupinu.

6.2. Grafické znázornění rozdílů ve složení střevního mikrobiomu mezi sledovanými skupinami

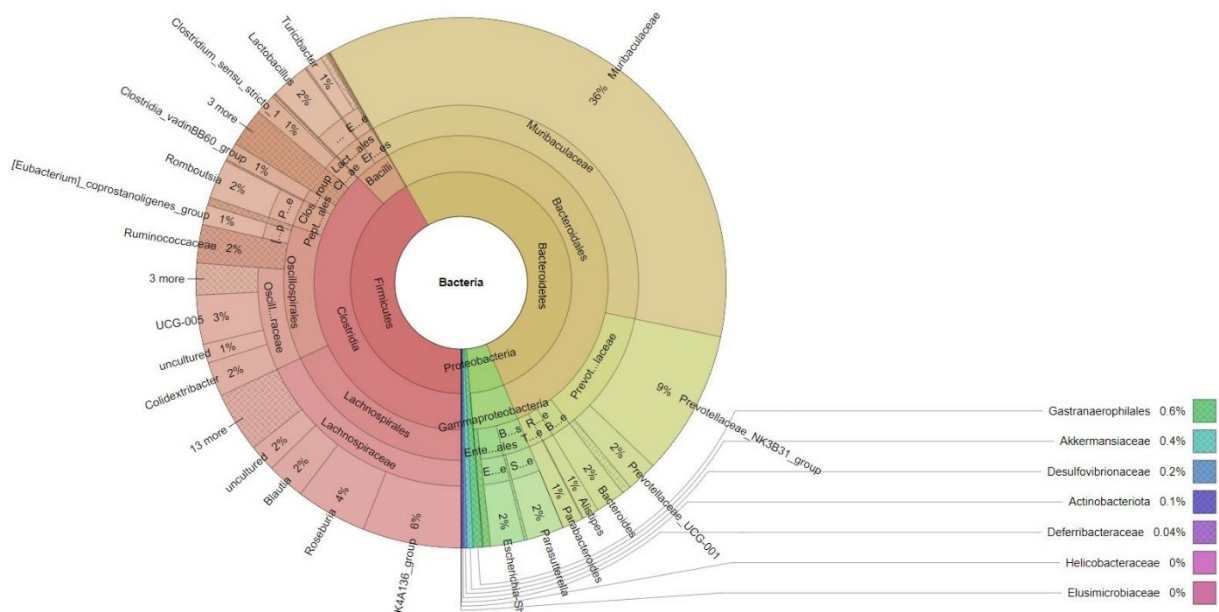
V následujících koláčových grafech na obrázcích 15-24 je ilustrováno složení střevního mikrobiomu potkanů v rámci 10 sledovaných skupin. U tohoto zobrazení je kladen důraz zejména na procentuální zastoupení bakteriálních kmenů, které jsou popsány v okruží uprostřed grafu, dále jsou směrem od středu grafu popsány třídy, řády, čeledi a rody, pokud došlo ke správnému zařazení bakterií. U některých hojněji zastoupených rodů jsou k dispozici také jejich procentuální zastoupení ve skupině.



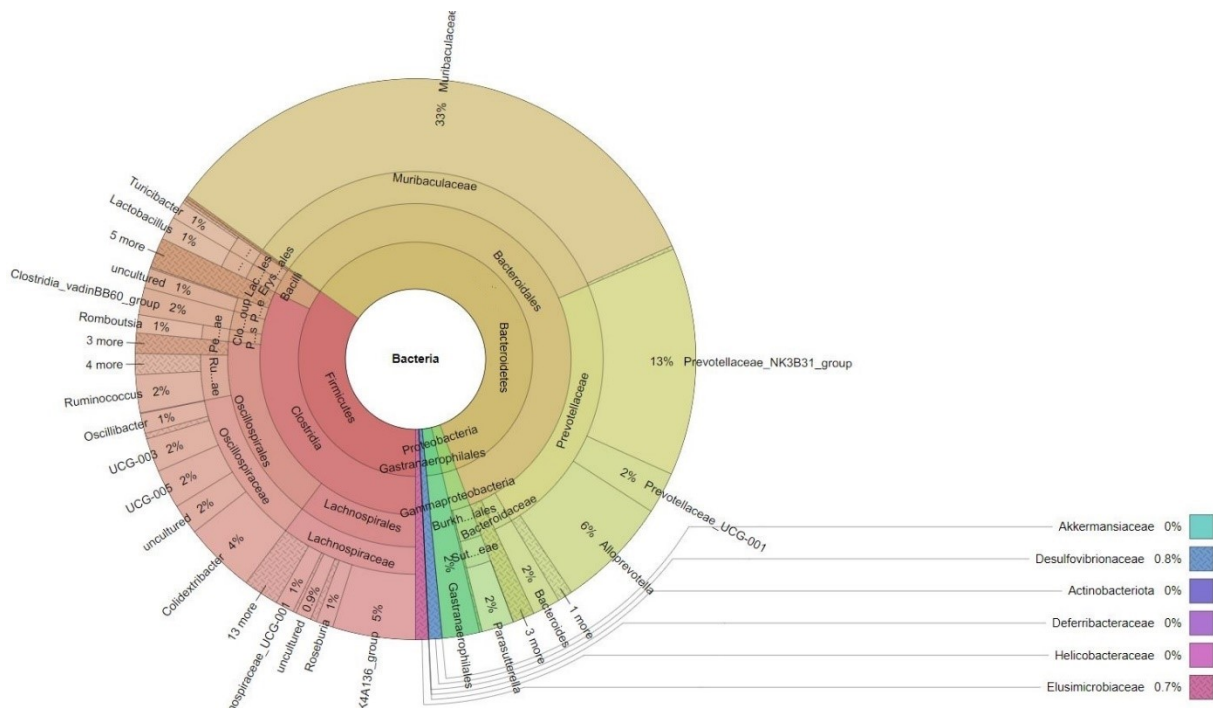
Obrázek 15. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny CI – kontrolní skupiny 1. den po ukončení aplikace morfinu u pokusné skupiny. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 55 %, kmen *Bacteroidetes* z 39 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 4 %.



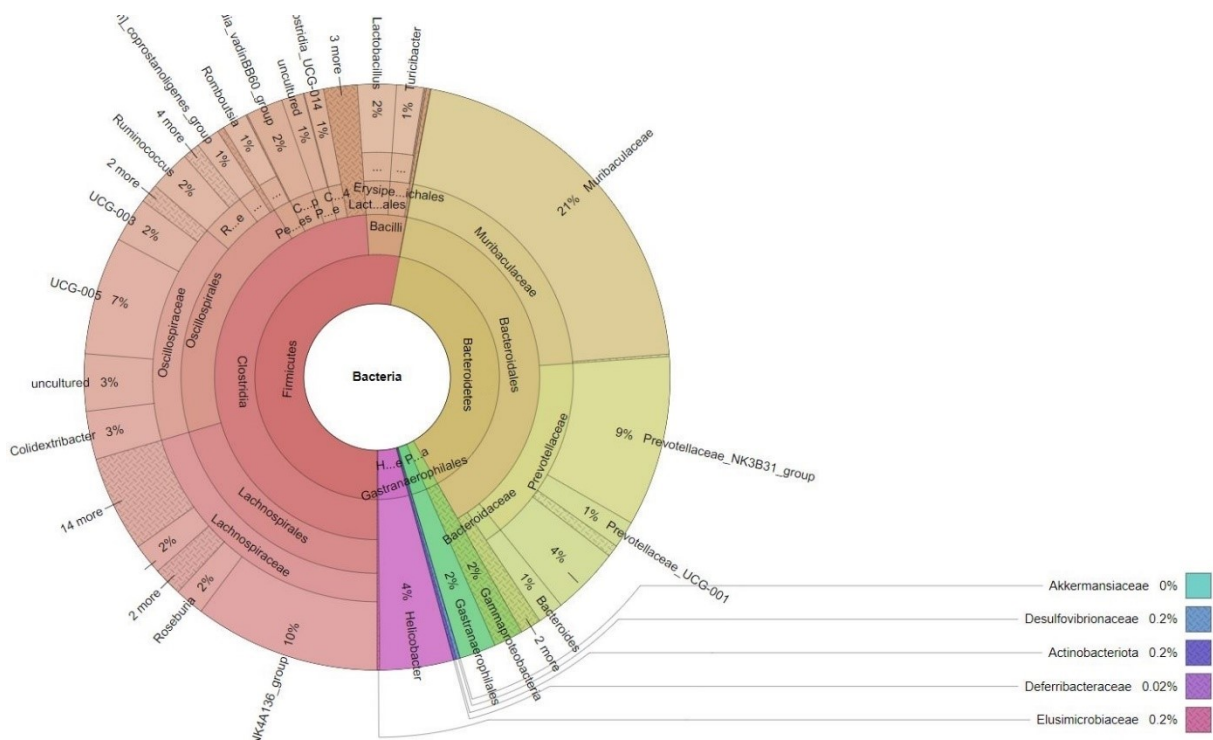
Obrázek 16. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny CII – kontrolní skupiny 5. den po ukončení aplikace morfinu u pokusné skupiny. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 48 %, kmen *Bacteroidetes* z 48 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 3 %.



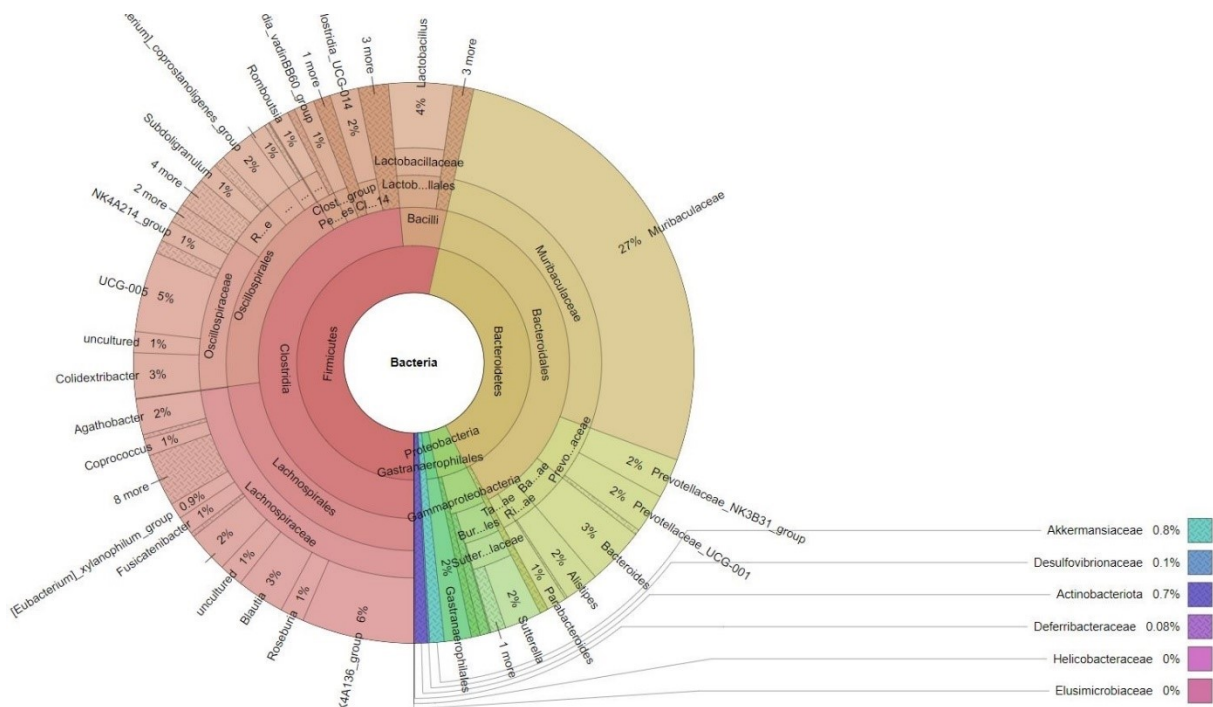
Obrázek 17. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny CIII – kontrolní skupiny 15. den po ukončení aplikace morfinu u pokusné skupiny. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 42 %, kmen *Bacteroidetes* z 52 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 5 %.



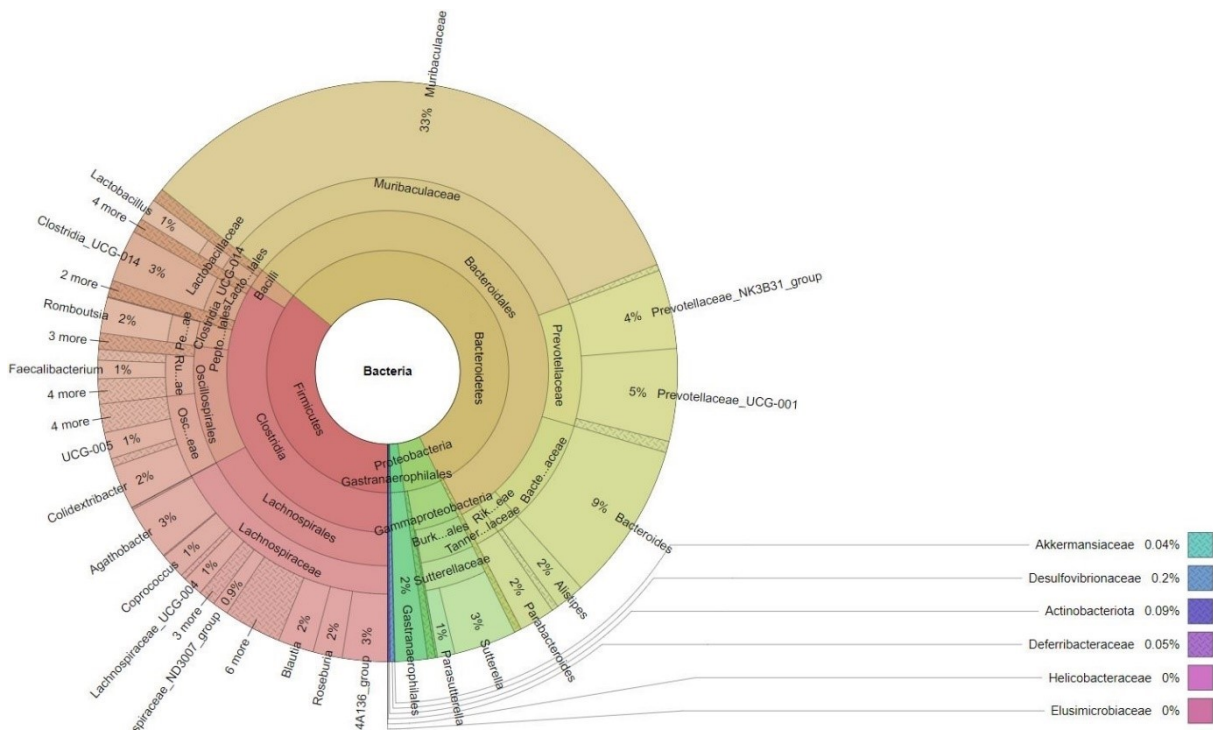
Obrázek 18. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny CIV – kontrolní skupiny 35. den po ukončení aplikace morfinu u pokusné skupiny. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 35 %, kmen *Bacteroidetes* z 59 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 2 %.



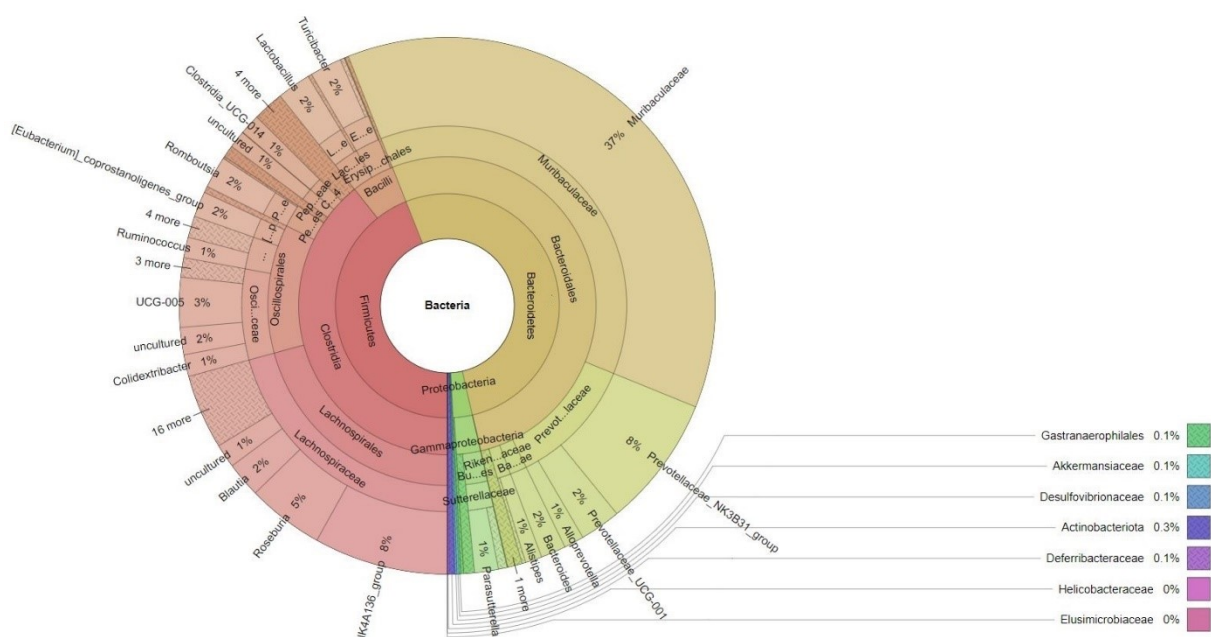
Obrázek 19. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny CV – kontrolní skupiny 60. den po ukončení aplikace morfinu u pokusné skupiny. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 53 %, kmen *Bacteroidetes* z 39 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 2 %.



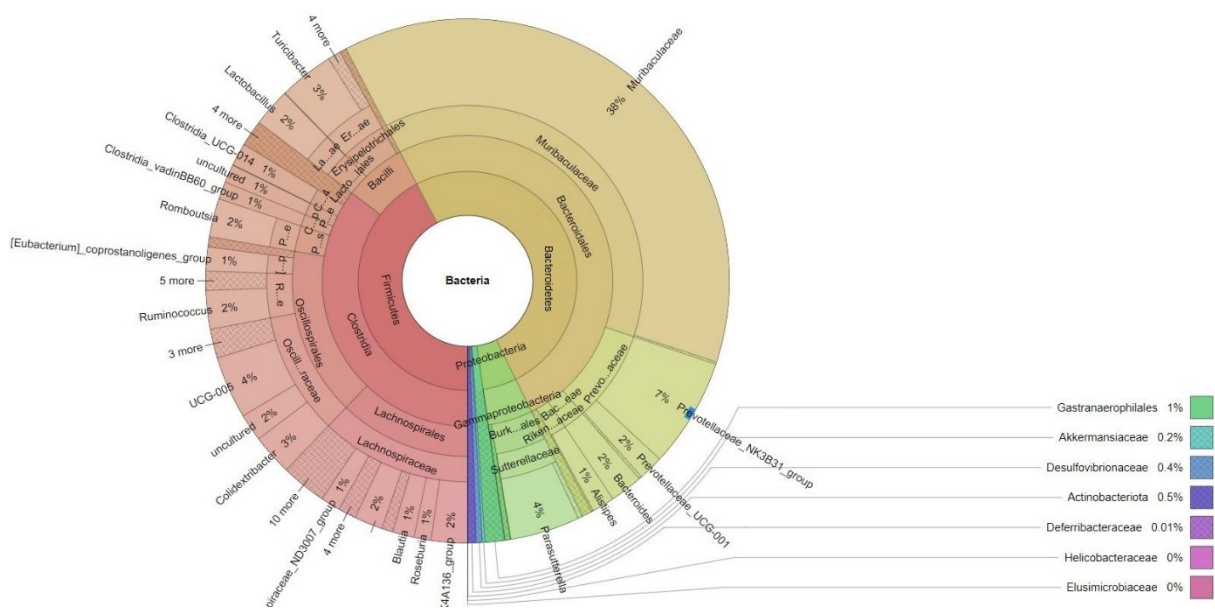
Obrázek 20. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny MI – pokusné skupiny 1. den po ukončení aplikace morfinu. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 53 %, kmen *Bacteroidetes* z 39 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 4 %.



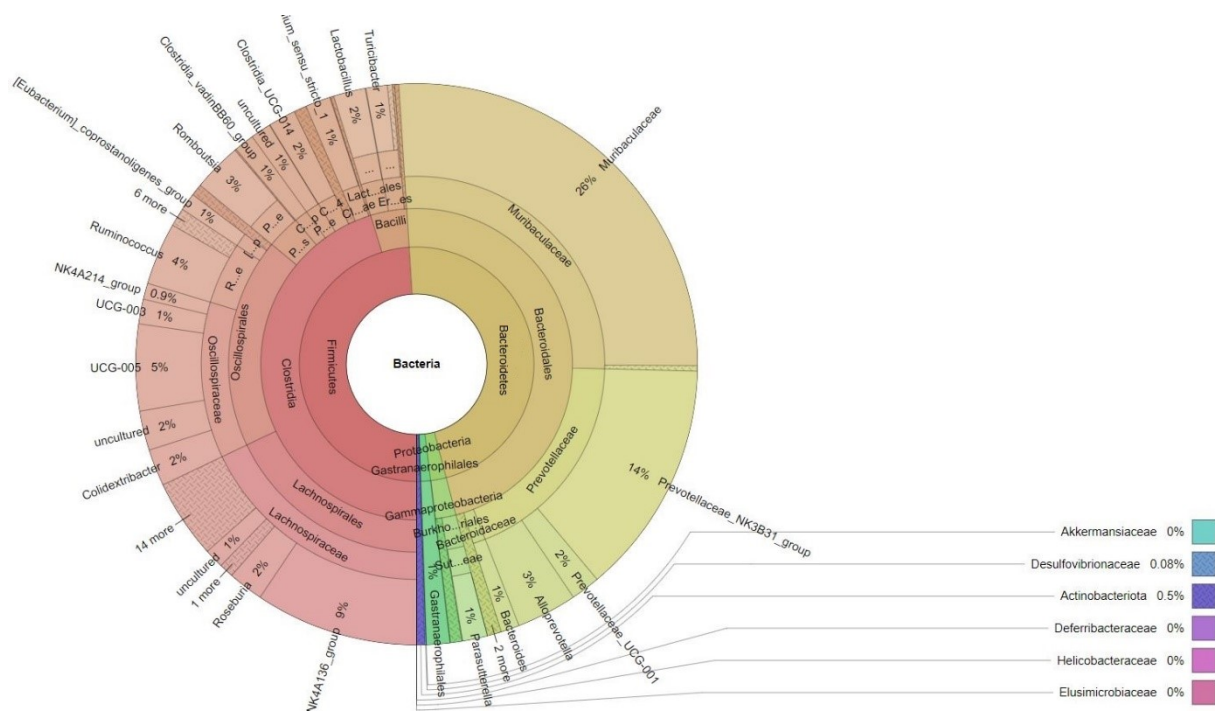
Obrázek 21. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny MII – pokusné skupiny 5. den po ukončení aplikace morfinu. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 36 %, kmen *Bacteroidetes* z 57 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 5 %.



Obrázek 22. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny MIII – pokusné skupiny 15. den po ukončení aplikace morfinu. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 44 %, kmen *Bacteroidetes* z 52 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 3 %.



Obrázek 23. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny MIV – pokusné skupiny 35. den po ukončení aplikace morfinu. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 42 %, kmen *Bacteroidetes* z 50 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 5 %.



Obrázek 24. Koláčový graf ilustruje složení střevního mikrobiomu potkanů ze skupiny MV – pokusné skupiny 60. den po ukončení aplikace morfinu. Kmen *Firmicutes* je zastoupen z 49 %, kmen *Bacteroidetes* z 47 % a kmen *Proteobacteria* tvoří 2 %.

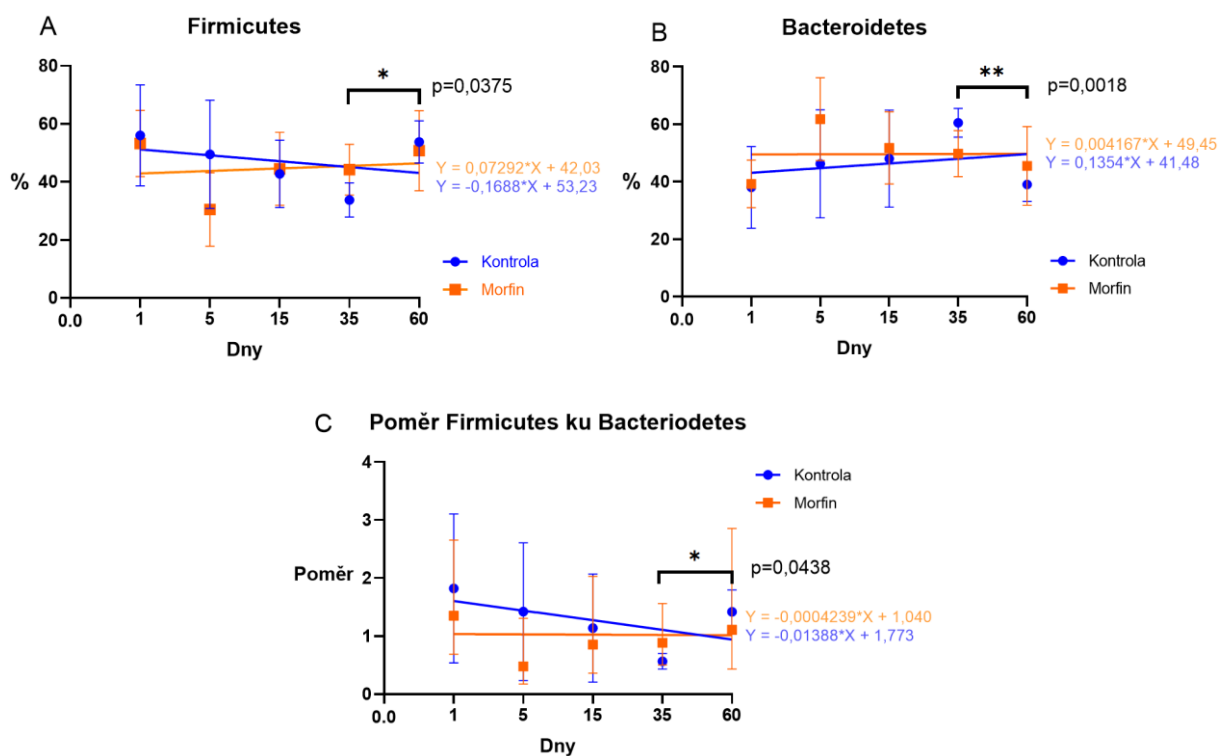
6.3 Stanovení poměru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* u sledovaných skupin

Z dat z výše uvedených grafů je zřejmé, že kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes* jsou zastoupeny nejhojněji a utvářejí většinu střevní mikroflóry potkanů. Poměr *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* se často používá jako indikátor změn složení střevní mikroflóry (Mariat *et al.*, 2009). Změny v procentuálním zastoupení obou kmenů ve vzorcích a jejich poměr jsou zaznamenány v tabulce 4 a obrázku 25.

Tabulka 4. Vynesení procentuálního zastoupení kmenů *Firmicutes* a *Bacteroides* ve sledovaných skupinách a medián jejich početnosti pro kontrolní a pokusné skupiny. Dále je v tabulce vypočten poměr *Firmicutes* ku *Bacteroides* pro každou skupinu a také medián pro kontrolní a pokusné skupiny.

	CI	CII	CIII	CIV	CV	Medián	MI	MII	MIII	MIV	MV	Medián
Firmicutes	55 %	48 %	42 %	35 %	53 %	48 %	53 %	36 %	44 %	42 %	49 %	44 %
Bacteroidetes	39 %	48 %	52 %	59 %	39 %	48 %	39 %	57 %	52 %	50 %	47 %	50 %
Poměr Firmicutes/Bacteroidetes	1,4	1	0,8	0,6	1,4	1	1,4	0,6	0,8	0,8	1	0,88

Statistická analýza změn v procentuálním zastoupení kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a jejich vzájemném poměru byla provedena pomocí two-way repeated measures ANOVA a Bonferroniho testu vícenásobného porovnání v případě porovnání hodnot u kontrolní a pokusné skupiny ve stejném intervalu. Pro srovnání hodnot v čase zvlášť mezi kontrolní a zvlášť mezi pokusnou skupinou byla použita two-way repeated measures ANOVA s Tukeyho testem.



Obrázek 25. Grafické znázornění změn A) v procentuálním zastoupení *Firmicutes*, B) v procentuálním zastoupení *Bacteroidetes* a C) jejich poměru u kontrol a pokusných potkanů v časových intervalech 1, 5, 15, 35, 60 dnů. Hodnoty pro kontrolní skupinu jsou vyznačeny modře, pro pokusnou oranžově a na základě těchto hodnot je v grafech pro obě skupiny sestrojena regresní přímka. Rovnice regresní přímky je společně s P-hodnotami pro signifikantní rozdíly uvedena v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

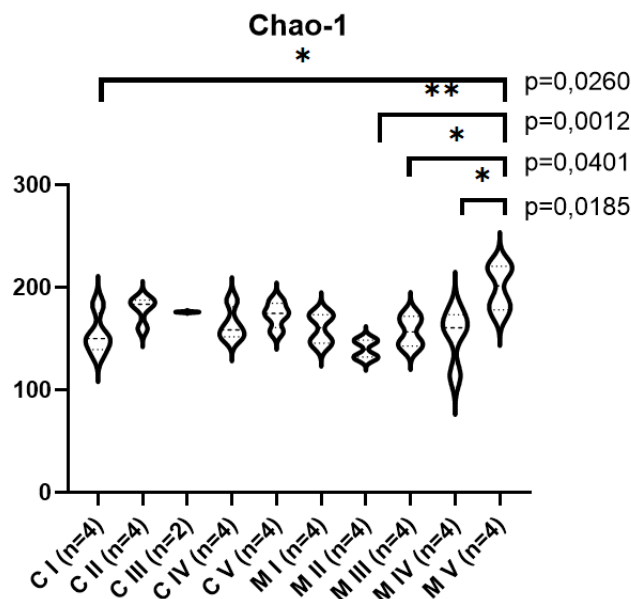
Z tohoto porovnání je viditelné, že se procentuální zastoupení kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* ani poměru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* u pokusné skupiny, ve sledovaném časovém intervalu, signifikantně neměnilo. Stejně tak při srovnání kontrol a pokusné skupiny ve stejném časovém intervalu nebyly zaznamenány signifikantní změny. Signifikantní změny ve všech třech parametrech byly zjištěny pouze u kontrolní skupiny mezi intervaly 35 a 60 dní po ukončení aplikace morfinu pokusným zvířatům. Největší rozdíl byl detekován v procentuálním zastoupení kmene *Bacteroidetes*. Co se týče poměru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes*, lze vypočítat jeho mírně snižující se tendenci s časem u obou zkoumaných skupin.

6.4. Stanovení alfa diverzity v rámci jednotlivých skupin

Alfa diverzita udává variabilitu mikrobů v jednom vzorku, tedy druhové bohatství a měla by zodpovědět otázku: „Kolik mikrobů je v přítomném vzorku?“ Alfa diverzita jednotlivých skupin je hodnocena pomocí indexů: Chao1, Shannon-Wiener a Pielou's evenness. Jejich hodnoty pro dané skupiny jsou interpretovány formou houslových grafů (violin plots), kdy širší houslí je přímo úměrná četnosti dané hodnoty v datovém souboru. Šrafovaná čára uvnitř houslí značí medián, dolní tečkovaná čára značí první kvartil a horní tečkovaná čára označuje třetí kvartil hodnot.

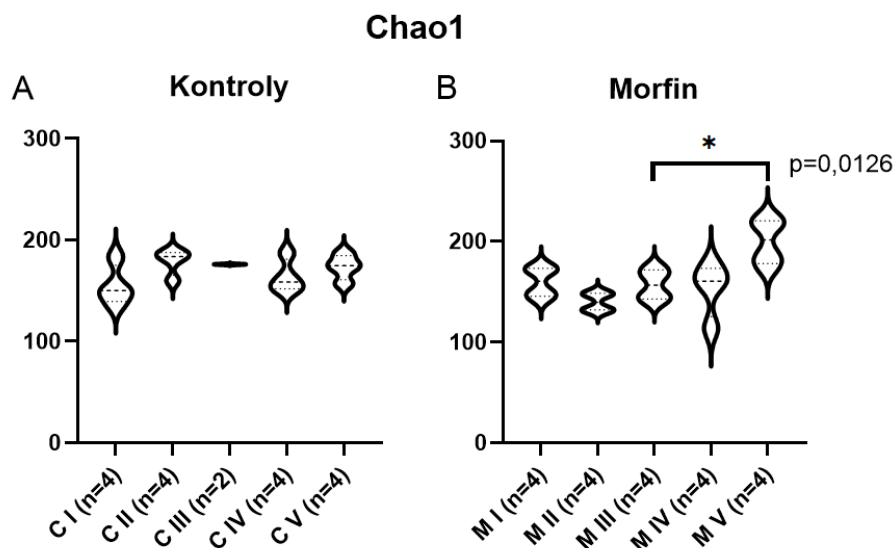
6.4.1. Chao1 index

Chao1 index je odhad založený na početnosti, stanovuje tedy celkovou bohatost druhů v rámci vzorku. Čím vyšší je hodnota Chao1, tím je vzorek druhově bohatší. Nejprve bylo provedeno srovnání hodnot Chao1 kontrolních a pokusných skupin najednou pomocí one-way ordinary ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 26) a následně srovnání hodnot Chao1 v rámci kontrolní a morfinové skupiny zvlášť pomocí one-way repeated measures ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 27).



Obrázek 26. Houslový graf zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Chao1 v rámci všech sledovaných skupin. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (CI-CV a MI-MV) a na ose y hodnoty Chao1 indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly ve skupinách jsou uvedeny v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin dohromady, byly podle Chao1 signifikantní rozdíly v alfa diverzitě mezi skupinami CI a MV, MII a MV, MIII a MV. Nejsignifikantnější rozdíl vykazovaly skupiny MIV a MV. Mezi kontrolami nebyl signifikantní rozdíl. Nejrozptýlenější hodnoty Chao1 byly naměřeny v rámci skupiny MIV, naopak nejméně rozptýlené hodnoty vykazovala skupina CIII. Nejvyšší druhové bohatosti v rámci skupin dosáhla skupina MV a nejnižší skupina MII.

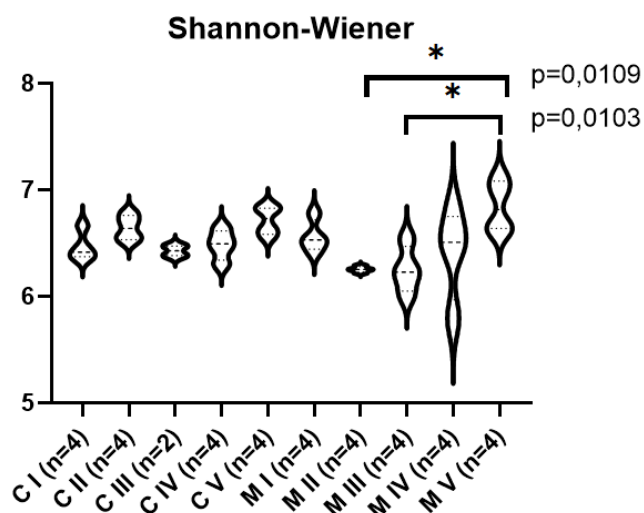


Obrázek 27. Houslové grafy zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Chao1 v rámci A) kontrolní skupiny a B) pokusné skupiny zvlášť. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (CI-CV a MI-MV) a na ose y hodnoty Chao1 indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly ve skupinách jsou uvedeny v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin zvlášť, byly podle Chao1 signifikantní rozdíly v alfa diverzitě pouze mezi pokusnými skupinami MIII a MV. Mezi kontrolami nebyl shledán signifikantní rozdíl.

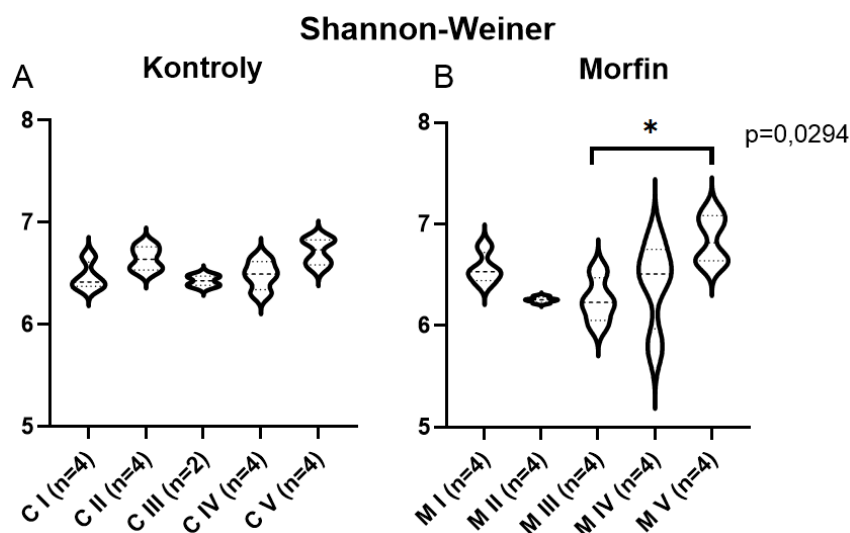
6.4.2. Shannon-Wiener index

Shannon-Wiener index kvantifikuje nejistotu (entropii) spojenou s touto předpovědí, tedy měří, jak počet druhů (bohatost), tak nerovnost mezi jejich početností (vyrovnanost). Čím vyšší je hodnota Shannon-Wiener, tím je vzorek druhově bohatší. Nejprve bylo provedeno srovnání hodnot Shannon-Wiener kontrolních a pokusných skupin najednou pomocí one-way ordinary ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 28) a následně srovnání hodnot Shannon-Wiener v rámci kontrolní a morfinové skupiny zvlášť pomocí one-way repeated measures ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 29).



Obrázek 28. Houslový graf zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Shannon-Wiener v rámci všech sledovaných skupin. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (CI-CV a MI-MV) a na ose y hodnoty Shannon-Wiener indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly ve skupinách jsou uvedeny v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin dohromady byly, podle Shannon-Wiener signifikantní rozdíly v alfa diverzitě mezi skupinami MII a MV, MIII a MV. Mezi kontrolami nebyl pozorován signifikantní rozdíl. Nejrozptýlenější hodnoty Shannon-Wiener vykazovala skupina MIV a nejméně rozptýlené MII. Nejvyšší alfa diverzity dle Shannon-Wiener dosáhla skupina MV a nejnižší MII.

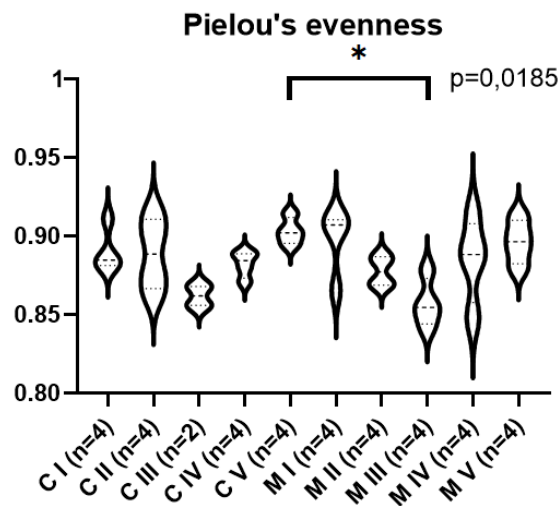


Obrázek 29. Houslové grafy zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Shannon-Wiener v rámci A) kontrolní skupiny a B) pokusné skupiny zvlášť. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (CI-CV a MI-MV) a na ose y hodnoty Shannon-Wiener indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly ve skupinách jsou uvedeny v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin zvlášť, byly podle Shannon-Wiener pozorovány signifikantní rozdíly v alfa diverzitě pouze mezi pokusnými skupinami MIII a MV. Mezi kontrolami nebyl signifikantní rozdíl.

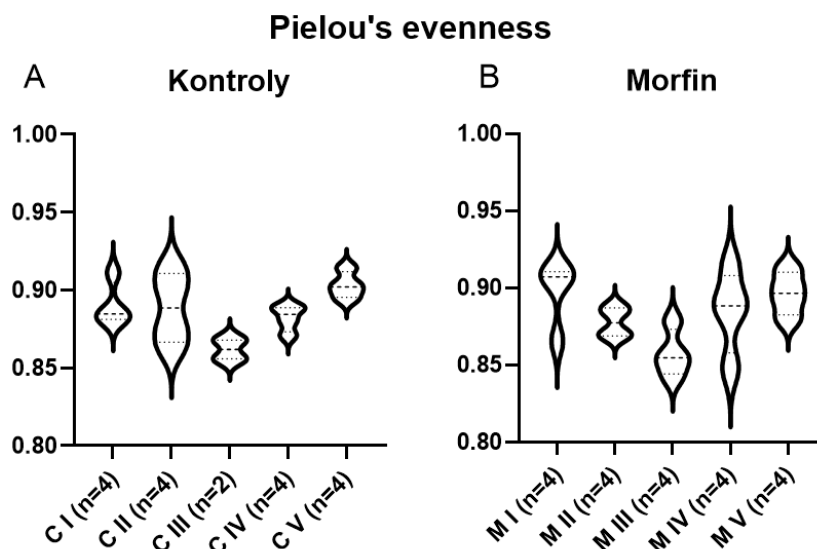
6.4.2. Pielou's evenness index

Pielou's evenness index měří diverzitu spolu s druhovou bohatostí. Zatímco druhové bohatství je počet různých druhů v dané oblasti, vyrovnanost je počet jedinců každého druhu v oblasti. Pielou's evenness se pohybuje v hodnotách od 0 – žádná vyrovnanost" do 1 – úplná vyrovnanost a nejvyšších hodnot tedy dosahuje při rovnoměrném zastoupení všech druhů v dané oblasti nebo vzorku. Nejprve bylo provedeno srovnání hodnot Pielou's evenness kontrolních a pokusných skupin najednou pomocí one-way ordinary ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 30) a následně srovnání hodnot Pielou's evenness v rámci kontrolní a morfinové skupiny zvlášť pomocí one-way repeated measures ANOVA s Tukeyho testem (obrázek 31).



Obrázek 30. Houslový graf zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Pielou's evenness v rámci všech sledovaných skupin. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (CI-CV a MI-MV) a na ose y hodnoty Pielou's evenness indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly ve skupinách jsou uvedeny v pravé části grafu, * $p \leq 0,05$.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin dohromady, byly podle Pielou's evenness signifikantní rozdíly v alfa diverzitě pouze mezi skupinami CV a MIII. Mezi kontrolami nebyl viděn signifikantní rozdíl. Nejvyšší rozptyl hodnot Pielou's evenness byl naměřen u skupiny MIV a nejmenší rozptyl u CIII. Nejvyšší hodnoty vyrovnanosti dosáhla skupina CV, kde byly přítomné bakterie zastoupeny nejrovnoměrněji a nejnižší MIII.



Obrázek 31. Houslové grafy zobrazující alfa diverzitu na základě indexu Pielou's evenness v rámci A) kontrolní skupiny a B) pokusné skupiny zvlášť. Na ose x jsou popsány sledované skupiny (C I-CV a M I-MV) a na ose y hodnoty Pielou's evenness.

Při analýze kontrolních a pokusných skupin zvlášť, nebyly zaznamenány podle Pielou's evenness signifikantní rozdíly v alfa diverzitě.

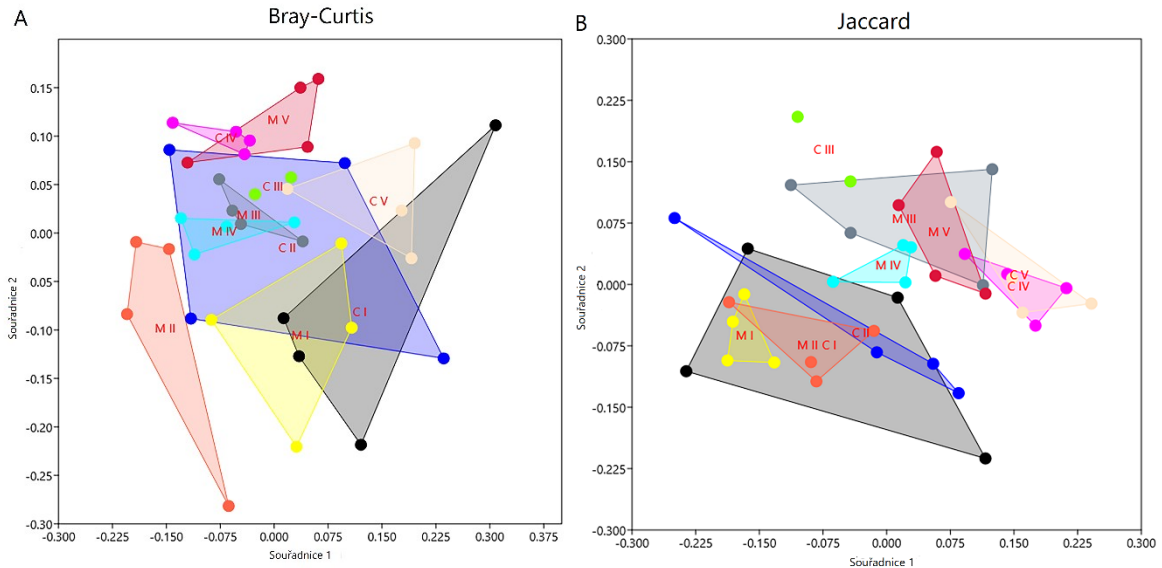
6.5. Rozdíly v beta diverzitě mezi jednotlivými skupinami

Beta diverzita udává variabilitu mikrobiálních společenstev mezi vzorky, ukazuje rozdílnost mikrobiálních společenstev z různých prostředí a odpovídá tedy na otázku: „Jak moc se liší mikrobiální složení v jednom prostředí ve srovnání s jiným?“ Hlavní důraz je v rámci beta diverzity kladen na rozdíly v profilech taxonomické početnosti z různých vzorků. Rozdíly ve skladbě mikrobiomu mezi studovanými skupinami byly vizualizovány pomocí NMDS (mnohorozměrné analýzy nemetrického multidimenzionálního škálování) a porovnány na základě one-way PERMANOVA. Obě analýzy byly provedeny s využitím odlišností založených na Bray-Curtis a Jaccard indexu, jež se používají pro stanovování kvalitativní míry rozdílnosti komunit.

Bray-Curtis index nepodobnosti se používá ke kvantifikaci rozdílnosti složení mezi dvěma různými skupinami na základě počtu druhů v každé skupině. Nabývá vždy hodnoty mezi 0 a 1. Pokud je 0, obě skupiny sdílejí všechny stejné druhy a pokud je 1, nesdílejí žádný druh. Jaccard index podobnosti porovnává druhy dvou skupin a zjišťuje, které jsou společné a které odlišné. Jedná se o míru podobnosti pro dvě skupiny dat s rozsahem hodnot od 0 % do 100 %. Čím více se jeho hodnota blíží 100 %, tím jsou si obě skupiny podobnější. Přes svou snadnou interpretaci je velice citlivý na malé velikosti vzorků nebo souborů dat s chybějícími pozorováními a může poskytovat chybné výsledky.

6.5.1. Grafické znázornění beta diverzity pomocí NMDS

Beta diverzita mezi jednotlivými skupinami je graficky zobrazena prostřednictvím NMDS a vypočtena za použití Bray-Curtis a Jaccard indexů odlišnosti (obrázek 32). Cílem NMDS je co nejpřesněji reprezentovat původní polohu společenstev ve vícerozměrném prostoru pomocí redukovaného počtu dimenzí, které lze snadno vizualizovat.



Obrázek 32. Vizualizace pomocí NMDS ukazuje rozdíly ve složení bakteriální mikrobioty mezi kontrolními (CI-CV) a pokusnými skupinami (MI-MV). Variabilita složení je hodnocena na základě A) Bray-Curtis indexu a B) Jaccard indexu. Čím blíže jsou barevné body k sobě, tím blíže je složení mikrobiomu jednotlivých jedinců ve skupinách podobnější.

Podle NMDS za použití Bray-Curtis indexu měli nejpodobnější složení mikrobiomu jedinci ze skupin CIV, MIII a MIV, naopak nejodlišnější složení mikrobiomu měli jedinci v kontrolních skupinách CI a CII. Při vizualizaci variability pomocí NMDS na základě Jaccard indexu vykazovali nejpodobnější složení mikrobiomu jedinci ze skupin CIV, MI a MIV, nejvíce se odlišili jedinci ve skupinách CI a CII.

6.5.2. Statistická analýza rozdílů v beta diverzitě pomocí PERMANOVA testu

Za účelem stanovení rozdílů ve složení střevního mikrobiomu mezi sledovanými skupinami byla provedena one-way PERMANOVA s Bonferroni korekcí na základě hodnot Bray-Curtis a Jaccard indexu (obrázek 33).

A PERMANOVA - Bray-Curtis					
	CI	CII	CIII	CIV	CV
CI		0.4091	0.1323	0.0283	0.2321
CII			0.9341	0.0281	0.198
CIII				0.0704	0.1987
CIV					0.031

B PERMANOVA - Jaccard					
	CI	CII	CIII	CIV	CV
CI		0.6756	0.2017	0.0258	0.0277
CII			0.2696	0.0287	0.0296
CIII				0.0646	0.0654
CIV					0.0288

C PERMANOVA - Bray-Curtis					
	MI	MII	MIII	MIV	MV
MI		0.0549	0.0274	0.0576	0.03
MII	0.0549		0.03	0.033	0.0247
MIII	0.0274	0.03		0.4863	0.0565
MIV	0.0576	0.033	0.4863		0.0601

D PERMANOVA - Jaccard					
	MI	MII	MIII	MIV	MV
MI		0.0858	0.0254	0.0291	0.0287
MII	0.0858		0.0284	0.028	0.0296
MIII	0.0254	0.0284		0.199	0.1973
MIV	0.0291	0.028	0.199		0.3115

E PERMANOVA - Bray-Curtis					
	MI	MII	MIII	MIV	MV
CI	0.2583				
CII		0.0819			
CIII			0.2646		
CIV				0.055	
CV					0.0311

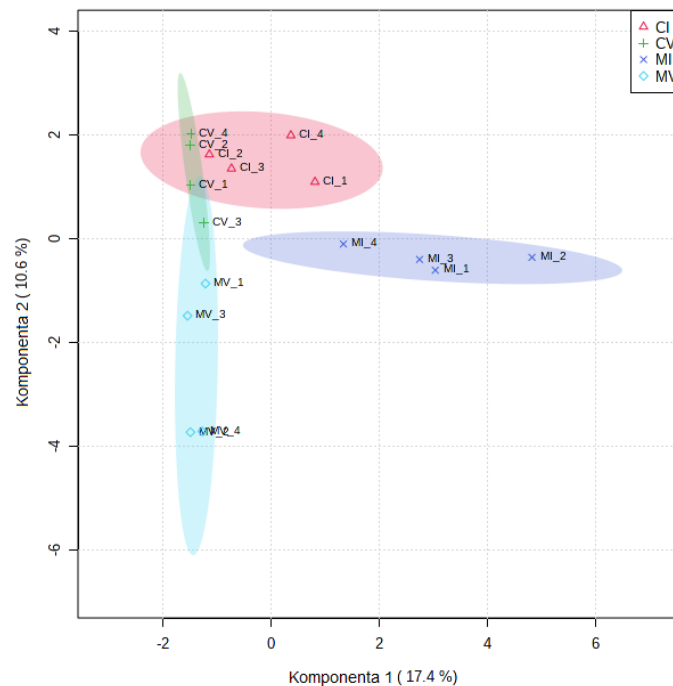
F PERMANOVA - Jaccard					
	MI	MII	MIII	MIV	MV
CI	0.2319				
CII		0.0587			
CIII			0.2588		
CIV				0.0279	
CV					0.0259

Obrázek 33. Šest tabulek interpretujících rozdíly ve složení střevního mikrobiomu mezi sledovanými skupinami podle one-way PERMANOVA s Bonferroni korekcí provedené na základě hodnot Bray-Curtis a Jaccard indexu. P-hodnoty pro signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou v tabulkách vybarveny, * $p \leq 0,05$. Horní tabulky interpretují rozdílnou skladbu mikrobiomu mezi kontrolami A) podle PERMANOVA založenou na Bray-Curtis, B) podle PERMANOVA založenou na Jaccard. Tabulky uprostřed interpretují rozdílnou skladbu mikrobiomu mezi pokusnými skupinami C) podle PERMANOVA založenou na Bray-Curtis, D) podle PERMANOVA založenou na Jaccard. V dolních tabulkách je srovnání mikrobiomového složení mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném intervalu odběru E) podle PERMANOVA založenou na Bray-Curtis, F) podle PERMANOVA založenou na Jaccard.

V případě srovnání kontrol se lišilo složení střevního mikrobiomu skupiny CIV od skupin CI, CII a CV podle Bray-Curtis, složení skupiny CIV od skupin CI, CII, CV a skupina CV od skupin CI a CII podle Jaccard. U pokusných skupin bylo nalezeno více signifikantních odlišností, podle Bray-Curtis se lišilo složení střevního mikrobiomu skupiny MII od skupin MIII, MIV, MV a skupina MI od skupin MIII a MV, signifikantní rozdíly podle Jaccard byly také mezi těmito pokusnými skupinami, ale navíc byl sledován rozdíl mezi skupinami MI a MIV. Při porovnávání kontroly s pokusnou skupinou ve stejném intervalu byl zaznamenán rozdíl mezi skupinou CV a MV u Bray-Curtis a u Jaccard byly rozdíly mezi skupinami CIV a MIV, CV a MV.

6.6. Vizualizace rozdílů ve složení střevního mikrobiomu kontrolní a pokusné skupiny v prvním a posledním intervalu odběru

Rozdíly ve složení mikrobiálního společenství kontrol a pokusné skupiny mezi 1. a 60. dnem po vysazení morfinu jsou vizualizovány, na základě dat z OTU tabulky, prostřednictvím sPLS-DA (obrázek 34), což je metoda, která hledá rozdíly v získaných datech z jednotlivých skupin. Podobně, jako PCA (analýza hlavních komponent), počítá vektory z jednotlivých proměnných dá jim určitou váhu. Principem metody sPLS-DA je, že maximalizuje kovarianci mezi naměřenými daty a porovnávanými skupinami.

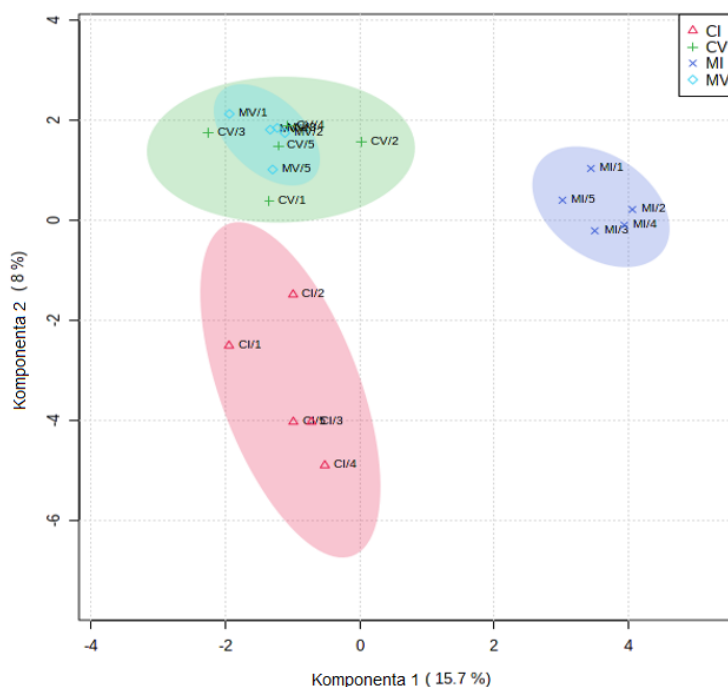


Obrázek 34. Model analýzy hlavních komponent porovnávající složení střevního mikrobiomu mezi čtyřmi sledovanými skupinami: CI (červeně), CV (zeleně), MI (tmavě modře), MV (tyrkysově). Množství vysvětlené variance je uvedeno v závorkách na každé ose. Komponenta 1 vysvětluje 17,4 % variance mezi vzorky, komponenta 2 přidává dalších 10,6 %.

Analýza dvou hlavních komponent ukázala zřetelné oddělení skupiny MI od zbylých skupin MV, CI a CV, což naznačuje její odlišné složení střevního mikrobiomu. Skladby střevních mikrobiomů jednotlivých vzorků v rámci skupiny klastrovaly spolu. Čím jsou si skupiny nebo jednotlivé vzorky v rámci skupiny vzdálenější, tím více se odlišuje jejich mikrobiální složení.

6.7. Vizualizace rozdílů ve složení metabolomu kontrolní a pokusné skupiny v prvním a posledním intervalu odběru na základě necílené metabolomické analýzy

Napříč všemi analyzovanými dvaceti vzorky bylo při derivatizaci TMSIL detekováno 587 metabolitů a při derivatizaci TBDMS detekováno 669 metabolitů. Většinu z nich ovšem lze detekovat oběma derivatizačními činidly (obrázek 13). Některé metabolity bylo možné díky knihovně hmotnostních spekter NIST 2.2 2014 a retenčnímu chování přesně identifikovat. Pomocí interních standardů byly identifikovány některé SCFA a morfin. Morfin byl ovšem detekován pouze po derivatizaci TMSIL v metabolomu skupiny MI. Rozdíly v metabolomických profilech zkoumaných skupin po derivatizaci TMSIL jsou zobrazeny pomocí sPLS-DA (obrázek 35).

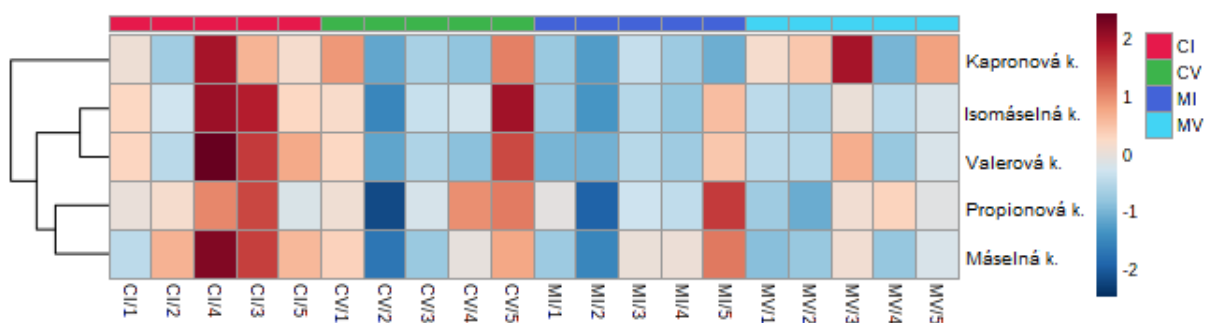


Obrázek 35. Model analýzy hlavních komponent porovnávající metabolomické profily mezi čtyřmi sledovanými skupinami po derivatizaci TMSIL: CI (červeně), CV (zeleně), MI (tmavě modře) MV (tyrkysově). Každá skupina se skládá ze vzorků od pěti potkanů. Velikost vysvětleného rozptylu je uvedena v závorkách na každé ose. Komponenta 1 vysvětluje 15,7 % variability mezi vzorky, komponenta 2 přidává dalších 8 % variability.

Analýza dvou hlavních komponent opět ukázala výrazné oddělení skupiny MI od zbylých skupin MV, CI a CV, což naznačuje její specifický metabolomický profil. Metabolomické profily jednotlivých vzorků v rámci skupiny klastrovaly spolu. Čím jsou si skupiny nebo jednotlivé vzorky v rámci skupiny vzdálenější, tím více se odlišuje složení jejich metabolomu. Nejvíce se od sebe lišila MI a CI skupina.

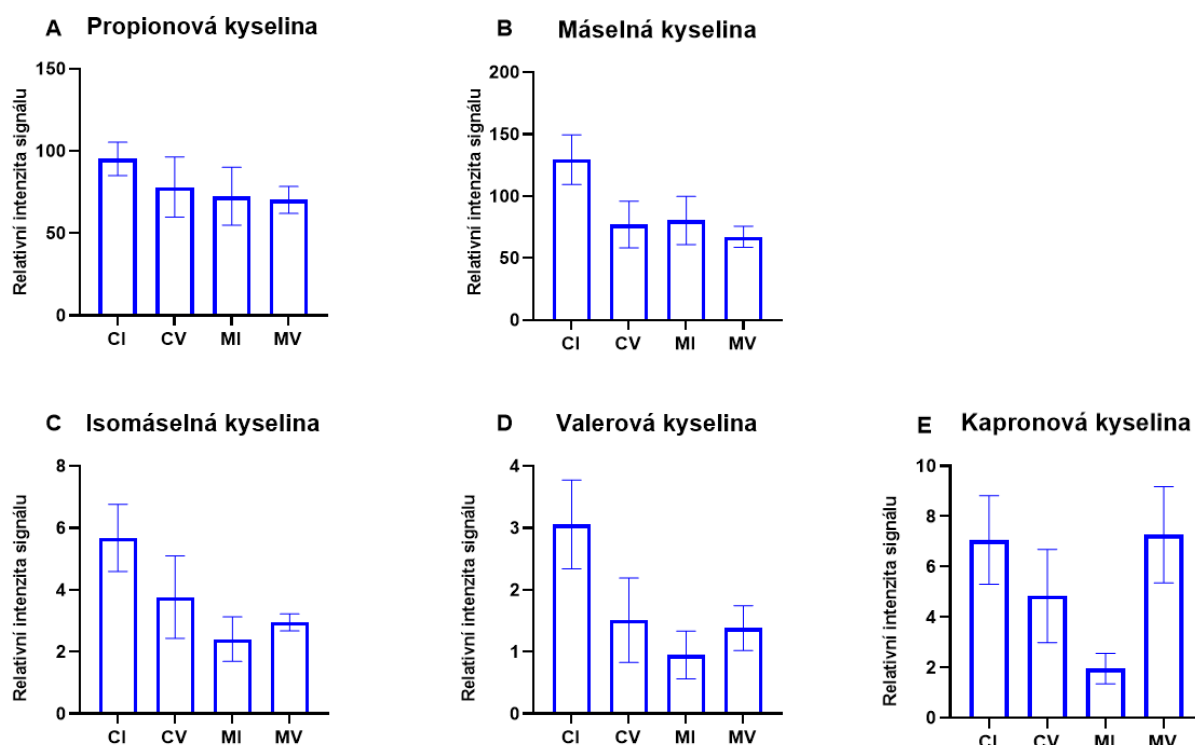
6.8. Monitorování výskytu SCFA u sledovaných skupin

Během derivatizace TBDMS a následně s použitím interních standardů, bylo mezi analyty identifikováno pět SCFA: kyselina propionová (propanová), máselná (butanová), isomáselná (isobutanová), valerová (pentanová) a kapronová (hexanová). Nejprve je prostřednictvím heat mapy vyobrazen výskyt SCFA mezi jednotlivými skupinami (obrázek 36) a na následující stránce jsou graficky vyneseny sumy detekovaného signálu dílčích SCFA pro každou skupinu (obrázek 37).



Obrázek 36. Heat mapa zobrazující výskyt vybraných pěti SCFA ve čtyřech sledovaných skupinách: CI (červeně), CV (zeleně), MI (tmavě modře) MV (tyrkysově). Každá skupina se skládá ze vzorků od pěti potkanů. Klastrování SCFA podle korelace výskytu ve skupinách je vyneseno v levé části heat mapy. Barevná škála v pravé části heat mapy odpovídá relativnímu množství signálu detekované SCFA.

Z heat mapy je zřejmé, že spolu nejvíce koreloval výskyt isomáselné a valerové kyseliny mezi sledovanými skupinami, dále výskyt propionové kyseliny koreloval s výskytem máselné kyseliny. Výskyt kapronové kyseliny s ostatními SCFA koreloval nejméně, připojuje se až nakonec. Nejvyšší přítomnost SCFA je v kontrolní skupině CI následovanou skupinou CV. Nejméně SCFA obsahovaly vzorky z pokusné MI skupiny.



Obrázek 37. Grafické vynesení průměru detekovaného signálu dílčích SCFA pro každou ze čtyř sledovaných skupin. A) propionová kyselina, B) máselná kyselina, C) isomáselná kyselina, D) valerová kyselina, E) kapronová kyselina. Na ose x jsou vyznačeny sledované skupiny a na ose y množství detekovaného signálu odpovídající ploše peaku analytu ku ploše peaku standardu.

Podle průměrů detekovaných signálů bylo množství všech SCFA nižší u pokusné skupiny MI oproti její kontrole ve stejném čase CI. Průběh signálů u propionové a máselné kyseliny byl srovnatelný, detekované hodnoty jejich signálů byly řádově stejné, ale máselné kyseliny bylo v kontrolní skupině CI oproti pokusné MI detekováno výrazně více. Nejslabší signály pro propionovou a máselnou kyselinu byly zjištěny u pokusné skupiny MV. Vzájemně podobný trend v průběhu intenzity signálu vykazovaly kyseliny isomáselná, valerová a kapronová, kdy byl jejich nejmenší signál měřen u pokusné skupiny MI. V případě kapronové kyseliny průměrný signál u pokusné skupiny MV dorovnal hodnotu kontroly CI, a dokonce ji mírně překonal. Všech pět SCFA dosáhlo nejvyššího signálu u kontroly CI.

7. Diskuse

Skutečnost, že krátkodobé i chronické užívání morfinu u zvířat i lidí mění složení střevního mikrobiomu i fekálního metabolomu je již známa (Banerjee *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Barengolts *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). Tyto studie byly ovšem zaměřeny na sledování změn v mikrobiomu nebo metabolomu již během užívání morfinu a nebo v krátkodobém horizontu po jeho vysazení. Proto bylo v této studii hlavním cílem sledovat změny ve složení střevního mikrobiomu dlouhodobě v intervalech 1, 5, 15, 35 až 60 dnů a fekálního metabolomu v intervalech 1 až 60 dnů po ukončení aplikace morfinu pokusným potkanům, která probíhala po dobu 10 dnů. Paralelně byly ve stejných časových intervalech monitorováni věkově odpovídající kontrolní potkani, kterým byl aplikován fyziologický roztok. Medián průměrné doby dožití samce laboratorního potkana Wistar se pohybuje mezi 1,8-2,1 lety (Ghasemi *et al.*, 2021), 60 denní interval tedy monitoroval změny ve zhruba desetině doby života laboratorního potkana.

Analýza střevního mikrobiomu ze vzorků trusu byla provedena pomocí NGS, při kterém proběhlo cílené sekvenování variabilních oblastí genu pro bakteriální 16S rRNA. Bohužel dva vzorky z kontrolní skupiny v intervalu odběru 15 dní (vzorky CIII_2 a CII_3) obsahovaly nízký počet readů z důvodu jejich poškození během transportu, a proto nebyly začleněny do některých analýz. Jednalo se o analýzy spojené se stanovením alfa a beta diverzity. Celkem bylo napříč všemi vzorky přesně identifikováno 80 unikátních bakteriálních rodů, ale některé se nepodařilo přesně taxonomicky zařadit (obrázek 14). V početnosti jednotlivých identifikovaných rodů nebyl detekován mezi skupinami žádný rozdíl. Důvodem pro nenalezení signifikantních rozdílů může být použití poměrně malého počtu vzorků na skupinu. V budoucích studiích by bylo žádoucí analyzovat početnější skupiny jedinců, aby byly případné rozdíly v kompozici mikrobiomu patrnější (statisticky průkazné) a zaměřit se na změny konkrétních bakteriálních rodů, popř. kmenů mezi kontrolami a pokusnou skupinou. Takováto detailní studie přesahuje rozsah této diplomové práce.

Co se týče sledování procentuálních zastoupení kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* nebo jejich vzájemného poměru ve studovaných skupinách, signifikantní změny ve všech třech parametrech byly objeveny pouze u kontrolní skupiny mezi intervaly 35 a 60 dní (CIV a CV) (obrázek 25). Očekávali jsme, že by se mohla objevit signifikantní změna spíše mezi pokusnou skupinou a její kontrolou nebo v průběhu času u pokusné skupiny. Je obtížné spekulovat, proč nastala změna jen u kontrol mezi 35. a 60. dnem. Vzorky v těchto intervalech byly odebrány na podzim roku 2020, v té době probíhaly v budově stavební práce (zvuk a otřesy mohly dolehnout do chovu laboratorních zvířat) a zároveň se rozšiřovala vlna nálezů Covid-19, při které se mnoho lidí dostalo do karantény, a změnil se tak pohyb lidí v chovech. Možná některý z těchto potenciálně stresujících faktorů mohl mít vliv na potkany. Medián procentuálního zastoupení *Firmicutes* u kontrol tvořil 48 %, *Bacteroidetes* 48 % a medián jejich poměru měl hodnotu 1. V rámci pokusné skupiny medián *Firmicutes* tvořil 44 %, *Bacteroidetes* 50 % a

medián jejich poměru dosahoval hodnoty 0,88. Tyto hodnoty odpovídají hodnotám u potkanů se standardní krmnou dietou podle Ferrario *et al.*, 2017. Kdežto u myší, kterým byly podávány morfinové pelety po dobu 5-6 dní, došlo po 72 hodinách od ukončení aplikace morfinových pelet k vyvolání preferenční expanze grampozitivních *Firmicutes* a redukcí gramnegativních *Bacteroidetes* (Banerjee *et al.*, 2016). Bylo zjištěno, že podobné změny v poměru *Firmicutes* ku *Bacteroidetes* korelují se zvýšeným systémovým zánětem a stárnutím (Mariat *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2016).

V případě stanovování alfa diverzity byly analyzovány hodnoty tří parametrů popisujících bakteriální alfa diverzitu (Chao1 index, Shannon-Wiener index a Pielou's evenness index) nejprve u kontrolních i pokusných skupin najednou. Bylo zde zřejmých více signifikantních rozdílů, protože byly hodnoty daného indexu pro konkrétní vzorek přepočítány nepárovým testem. V tomto případě, při analýze kontrolních i pokusných skupin současně, kontrolní skupiny tvořili jiní čtyři potkani než pokusné skupiny a všechny hodnoty tedy neodpovídaly jednomu a tomu samému zvířeti. Oproti tomu, při určování alfa diverzity u kontrolní a pokusné skupiny odděleně, byly hodnoty tří indexů přepočítány párovým testem. Kontrolní skupiny byly tvořeny stejnými čtyřmi potkany v čase a pokusné skupiny také. Vzhledem k této skutečnosti oba testy přepočítávaly hodnoty trochu jinak a párový test je přísnější.

Při měření Chao1 indexu u všech sledovaných skupin (obrázek 26) se celková bohatost druhů v rámci pokusné skupiny v čase měnila, kdežto u kontrolní skupiny zůstala stejná. Pokusná skupina v 60. dni (MV) vykazovala signifikantně vyšší alfa diverzitu než kontrolní skupina v 1. dni (CI). Po aplikaci morfinu došlo u pokusné skupiny k nesignifikantnímu snížení alfa diverzity, poté se alfa diverzita postupně zvyšovala a byla vyšší než u kontrol. V rámci pokusné skupiny se alfa diverzita nejsignifikantněji měnila mezi odběry v 5. a 60. dni (MII vs. MV), následované odběry v 35. a 60. dni (MIV vs. MV) a v 15. a 60. dni (MIII vs. MV). Nejrozptýlenější hodnoty Chao1 byly naměřeny v rámci pokusné skupiny 35. den (MIV), naopak nejméně rozptýlené hodnoty vykazovala kontrolní skupina v 15. dni (CIII), ve které byly analyzovány pouze dva vzorky, kvůli poškození zbylých dvou vzorků během transportu. Nejvyšší druhové bohatosti v rámci všech skupin dosáhla pokusná skupina 60. den (MV) a nejnižší pokusná skupina 5. den (MII). Dále při měření Chao1 indexu, zvláště mezi kontrolní skupinou a zvláště mezi pokusnou skupinou (obrázek 27), nebyl mezi kontrolami naměřen signifikantní rozdíl. U pokusné skupiny byl naměřen signifikantní rozdíl pouze mezi odběry z 15. a 60. dne (MIII vs. MV), což bylo pravděpodobně způsobeno analýzou menšího počtu vzorků najednou a parametry přísnějšího párového testu.

Podobně jako při stanovení alfa diverzity pomocí Chao1, tak i v případě měření Shannon-Wiener indexu u všech sledovaných skupin (obrázek 28), se v případě kontrolní skupiny alfa diverzita neměnila a v případě pokusné skupiny se alfa diverzita signifikantně zvýšila 60. den (MV) oproti odběrům z 15. a 35. dne (MII a MIII). Nejrozptýlenější hodnoty Shannon-Wiener vykazovala pokusná skupina v 35. dni (MIV) a nejméně rozptýlené pokusná skupina během 15. dne (MII). Nejvyšší alfa diverzity dle Shannon-

Wiener dosáhla pokusná skupina 60. den (MV) a nejnižší pokusná skupina v 5. dni (MII). Když byl měřen Shannon-Wiener odděleně pro kontrolní a pokusnou skupinu (obrázek 29), mezi kontrolami nebyl opět naměřen signifikantní rozdíl, u pokusné skupiny došlo k signifikantnímu vzrůstu alfa diverzity v 60. dni (MV) oproti odběru z 15. dne (MIII). Menší signifikance v čase u jednotlivých skupin je pravděpodobně způsobena analýzou menšího počtu vzorků najednou a parametry přísnějšího párového testu.

V případě měření indexu Pielou's evenness v rámci kontrolní i pokusné skupiny (obrázek 30) se jeho hodnota mezi kontrolami v čase neměnila a došlo k signifikantnímu snížení vyrovnanosti v pokusné skupině 15. den (MIII) oproti kontrolní skupině z 60. dne (CV). Nejvyšší rozptyl hodnot Pielou's evenness byl naměřen u pokusné skupiny v 35. dni (MIV) a nejmenší rozptyl u kontroly z 15. dne (CIII), za což byla pravděpodobně odpovědná analýza pouze dvou vzorků ve skupině, jelikož zbylé dva byly poškozeny během transportu a jejich hodnoty by zkreslily výsledek. Nejvyšší hodnoty vyrovnanosti dosáhla kontrolní skupina v 60. dni (CV), kde byly přítomné bakterie zastoupeny nejrovnoměrněji a nejnižší pokusná skupina v 15. dni (MIII). Během odděleného měření Pielou's evenness pro kontrolní a pokusnou skupinu (obrázek 31) nedošlo k signifikantním změnám vyrovnanosti mezi kontrolami ani mezi pokusnými skupinami v čase, což je opětovně pravděpodobně zapříčiněno analýzou menšího počtu vzorků najednou a přísnějšími parametry párového testu.

Ze získaných dat hodnocení alfa diverzity vyplývá, že se celkově mezi kontrolami alfa diverzita v čase neměnila, ale došlo k signifikantním změnám v čase v rámci pokusné skupiny. Nejnižší hodnotu alfa diverzity vykazovaly vzorky trusu potkanů v časovém intervalu 5 a 15 dní od vysazení morfinu (MII a MIII), tedy v době, kdy se u potkanů projevil abstinenci syndrom. V následujícím intervalu 35 dní a 60 dní od ukončení aplikace morfinu (MIV a MV) se alfa diverzita vrátila na úroveň srovnatelnou s kontrolami. Zjištění, že nástup abstinenciho syndromu po užívání morfinu snižuje alfa diverzitu, společně se skutečností, že se v horizontu 7-10 týdnů po vysazení morfinu alfa diverzita zvýšila na úroveň kontrol, je užitečné. Obecně snížení bakteriální diverzity a následná reorganizace střevního mikrobiomu může korelovat s pozdějším vznikem různých chorob (Bello *et al.*, 2018). Wang *et al.*, 2018 ve své studii zabývající vlivem morfinu na složení střevního mikrobiomu sledovali změny ve složení mikrobioty v horizontu šesti dnů po aplikaci morfinu a prokázali, že během této doby také došlo ke snížení alfa diverzity bakterií ve střevě myši. Nicméně nepodařilo se nalézt studii, která by se věnovala dlouhodobému monitorování alfa diverzity mikrobiomu po ukončení morfinové aplikace.

Beta diverzita byla stanovována na základě indexů Bray-Curtis a Jaccard (obrázek 33). Přičemž při hodnocení beta diverzity, na základě obou těchto indexů zároveň, byly pozorovány rozdíly u kontrol, kdy se složení střevního mikrobiomu z 35. dne odběru (CIV), signifikantně odlišovalo od složení z 1., 5. a 60. dne odběru (CI, CII a CV). Rozdíl v beta diverzitě v průběhu času u kontrolní skupiny mohl být zapříčiněn změnou podmínek v chovu laboratorních zvířat během podzimu 2020. U pokusné skupiny

bylo na základě hodnot obou indexů pozorováno v průběhu času mnohem více odlišností. V obou případech zároveň, se statisticky významně odlišovala beta diverzita v rámci pokusné skupiny v čase. Odběr z 1. dne (MI) vůči odběrům z 15. a 60. dne (MIII a MV) a odběr z 5. dne (MII) vůči 15., 35. a 60. dni (MIII, MIV a MV). Tyto signifikantní odlišnosti u pokusné skupiny v čase byly s vysokou pravděpodobností způsobeny aplikací morfinu. Nicméně srovnání stejných intervalů odběru vzorku z kontrolní a pokusné skupiny poskytlo, podle Bray-Curtis i Jaccard indexu, pouze jeden významný statistický rozdíl v posledním intervalu po uplynutí 60 dnů od ukončení aplikace morfinu pokusným zvířatům (CV vs. MV). V předchozí studii se Wang *et al.*, 2018 také zaměřili na porovnání beta diverzity a zjistili, že beta diverzita u myši, kterým byly podány podkožní morfinové pelety, výrazně klastrovala hned od 1. dne po jednorázové aplikaci morfinu ve srovnání s beta diverzitou po podání placeba. Tento trend byl pozorován až do 6. dne, kdy pozorování bylo ukončeno.

Podobná tendence byla pozorována také s použitím sPLS-DA (obrázek 34) při porovnání složení střevního mikrobiomu kontrolní a pokusné skupiny v 1. a 60. dni. Taktéž došlo ke zřetelnému oddělení pokusné skupiny z 1. dne (MI) po ukončení aplikace morfinu oproti zbylým třem skupinám (CI, CV a MV). V 60. dni se složení mikrobiomu pokusné skupiny (MV) již blíže podobalo složení mikrobiomu kontrol (CI a CV). Z toho lze usoudit, že posun ve složení mikrobiomu potkana vyvolaný užitím morfinu, by nemusel být dlouhodobý a přirozeně nevratný.

Fekální metabolom byl zanalyzován prostřednictvím necílené metabolomické analýzy malých polárních molekul s využitím metody GCxGC-TOF/MS. Při tomto postupu byly metabolity nejprve extrahovány ze vzorků trusu a prošly dvoustupňovým derivatizačním postupem: oximací pomocí činidla methoxamin hydrochloridu a silylací pomocí činidel TBDMS a TMSIL. Co se týče samotné derivatizace při přípravě vzorků pro metabolickou analýzu, tak pro komplexnější detekci analytů bylo vhodnější použít derivatizaci TMSIL, jelikož dokáže zahrnout cukry i velké molekuly, jako je např. morfin. Morfin se pomocí derivatizace TBDMS nepodařilo detekovat, protože je jeho molekula sama o sobě velká a po přidání větší silylové skupiny ho nebylo možné zplynit. Zplynění metabolitů je přitom stěžejní krok pro úspěšný výsledek GCxGC-TOF/MS. Celkem se pomocí derivatizace TMSIL podařilo detekovat 587 metabolitů a při derivatizaci TBDMS bylo detekováno 669 metabolitů napříč všemi dvaceti analyzovanými vzorky potkaního trusu. Některé metabolity byly identifikovány porovnáním naměřených hmotnostních spekter s komerčně dostupnou knihovnou hmotnostních spekter NIST 2.2 2014 a retenčnímu chování. Podle interních standardů byl identifikován morfin a pět SCFA: kyselina propionová (propanová), máselná (butanová), isomáselná (isobutanová), valerová (pentanová) a kapronová (hexanová).

Zajímavé srovnání ve složení fekálních metabolomických profilů mezi kontrolní a pokusnou skupinou v rozmezí 1. a 60. dne po ukončení podávání morfinu poskytla stejně jako v případě složení mikrobiomu sPLS-DA (obrázek 35). Srovnání bylo provedeno na základě dat z derivatizace TMSIL. A opět bylo i

v případě metabolomu prokázáno výrazné oddělení pokusné skupiny z 1. dne (MI) po ukončení podávání morfinu od zbylých třech zkoumaných skupin (CI, CV, MV). Metabolomy kontrolní a pokusné skupiny v časovém intervalu 60 dní se velmi podobaly. Přestože složení metabolomů bylo velmi variabilní i mezi potkany z jedné skupiny, tak jejich metabolomické profily v rámci konkrétní skupiny klastrovaly spolu. Za vysokou míru interindividuální variability je pravděpodobně zodpovědný jedinečný metabolismus každého potkana. Také je možné, že se jednotlivé exkrementy lišily obsahem vody, což by vedlo ke zkreslení koncentrace, kdy se metabolity v trusu s větším obsahem vody budou jevit jako méně koncentrované. Z tohoto důvodu se někdy trus analyzuje až po lyofilizaci. Morfin byl detekován pouze v metabolomu pokusné skupiny během 1. dne po vysazení morfinu, kdy ještě nebyl zcela eliminován. Taktéž Wang *et al.*, 2018 sledovali ve své studii rozdíly v metabolomu potkanů, kteří jednorázově dostali morfin nebo placebo. Monitorování metabolomu probíhalo tři dny a výsledky ukázaly, že podání morfinu vyvolalo odlišný fekální metabolomický profil ve srovnání s profilem pozorovaným u skupiny, která dostala placebo. Dále Banerjee *et al.*, 2016 prokázali, že chronické užívání morfinu, střevní mikrobiální dysbióza, narušení metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin lineárně koreluje se střevním zánětem. Další studie zabývající se vlivem morfinu na kompozici metabolomu se nepodařilo v dostupné literatuře dohledat.

Detekce SCFA proběhla pomocí derivatizace TBDMS, protože k SCFA a jiným malým molekulám přidala větší silylovou skupinu a tyto velmi malé molekuly mohly být detekovány. Nejvíce SCFA bylo detekováno u kontrolní skupiny v 1. dni (CI), následovala kontrolní skupina v 60. dni (CV) a pokusná skupina v 60. dni (MV). Nejméně SCFA obsahovaly vzorky z pokusné skupiny během 1. dne po vysazení morfinu (MI) (obrázek 36). Pokud jde o vzájemnou korelaci výskytu jednotlivých SCFA mezi studovanými skupinami, nejvyšší korelaci vykazovaly isomáselná a valerová kyselina, dále spolu koreloval výskyt propionové a máselné kyseliny. Výskyt kapronové kyseliny s ostatními kyselinami koreloval nejméně.

Nakonec byly porovnány průměry sum detekovaného signálu pro studované SCFA v jednotlivých skupinách (obrázek 37). V případě všech SCFA bylo jednoznačně nejméně signálu detekováno u pokusné skupiny hned 1. den po ukončení podávání morfinu (MI) oproti její kontrole (CI). Ve střevě jsou SCFA zdrojem energie pro kolonocyty, ale především pomáhají udržovat jeho stabilitu a bariérovou funkci. Zejména butyrát prostupuje hematoencefalickou bariérou a vykazuje rozsáhlé účinky na mozkové funkce (Braniste *et al.*, 2014; Erny *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2017). Srovnatelný průběh velikosti signálu v čase vykazovaly propionová a máselná kyselina. Vzájemnou podobnost v průběhu velikosti signálu vykazovaly také kyseliny isomáselná, valerová a kapronová. Mezi SCFA se obvykle začleňují mastné kyseliny o velikosti do pěti uhlíků včetně, ale jindy jsou mezi ně zařazovány i mastné kyseliny s vyšším počtem uhlíků. Kapronová kyselina se tedy ne vždy zařazuje mezi SCFA a průběh jejího signálu vykazoval mírně odlišné chování než průběh isomáselné a valerové kyseliny. Vliv užívání

morfinu na hladinu SCFA nebyl dosud studován, nebyly nalezeny žádné práce zabývající se touto problematikou.

8. Závěr

Primárním cílem této pilotní studie bylo monitorovat složení střevního mikrobiomu a fekálního metabolomu potkanů v dlouhodobém horizontu po desetidenním užívání morfinu. Markantní změny ve složení mikrobiomu a v metabolickém profilu potkanů, kterým byl aplikován morfin, se projevíly ihned 1. den po vysazení morfinu, ve srovnání s odpovídajícími kontrolami. Během abstinčního syndromu došlo u potkanů zejména ke značnému poklesu alfa diverzity a snížení produkce SCFA ve střevě. Nicméně ukázalo se, že změny pozorované v době abstinčního syndromu vyvolané vysazením morfinu měly spíše charakter dočasného trvání. Na toto téma je ovšem nutné provést další potvrzující a rozšiřující studie na vyšším počtu zvířat v jednotlivých skupinách a se zaměřením na konkrétní mikrobiální druhy a metabolity. Bylo by vhodné např. v čase kontrolovat množství patogenních bakterií nebo cíleně zaměřit metabolickou analýzu na určité látky, jako jsou žlučové kyseliny a neuropeptidy. V úvahu přichází také analýza metabolomu z krve. Nové informace by se v budoucnu mohly uplatnit v klinické medicíně při terapeutické indikaci užívání opioidů nebo při léčbě opioidové závislosti a jejich možných následků.

Složení mikrobiomu i metabolické profily jednotlivých potkanů vykazovaly velké rozdíly i v rámci zvířat ze stejné skupiny pravděpodobně kvůli individuální jedinečnosti organismu každého potkana nebo vzorkování. Metoda vzorkování by se do budoucna měla vyladit a optimalizovat, protože složení mikrobioty i metabolitů se mění s průchodem GIT, a také se může měnit i s aktivitou během dne. Každý potkan má svůj unikátní metabolismus, chování nebo psychiku a jednotlivé odběry trusu také nemusí proběhnout stejným způsobem. Tyto faktory by bylo možné eliminovat např. invazivním odběrem trusu v určeném segmentu GIT, ale na druhou stranu by nebylo možné sledovat vývoj složení mikrobiomu a metabolomu v čase u stejného jedince. Pro nadcházející výzkum bude potřeba samotné metody obou analýz hlouběji prozkoumat a zdokonalit. Během analýzy mikrobiomu by bylo žádoucí lépe provést přípravu dvojité indexované knihovny, vybrat více hypervariabilních oblastí genu pro 16S rRNA při sekvenování, důkladněji sekvenovat, provést více statistických testů a v případě analýzy metabolomu zkusit použít jiná rozpouštědla a chemikálie při zpracování vzorku, což nelze provést na malém množství vzorků a za krátký čas.

9. Seznam použité literatury

- Acquas, E., Di Chiara, G., 1992. Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem* 58, 1620–1625.
- Agus, A., Planchais, J., Sokol, H., 2018. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe* 23, 716–724.
- Allouche, S., Noble, F., Marie, N., 2014. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol* 5, 280.
- An, R., Wilms, E., Masclee, A.A.M., Smidt, H., Zoetendal, E.G., Jonkers, D., 2018. Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: time to reconsider? *Gut* 67, 2213–2222.
- Andersen, G., Christrup, L., Sjøgren, P., 2003. Relationships Among Morphine Metabolism, Pain and Side Effects During Long-Term Treatment. *Journal of Pain and Symptom Management* 25, 74–91.
- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L., 2008. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLOS ONE* 3, e2836.
- Armstrong, S.C., Cozza, K.L., 2003. Pharmacokinetic Drug Interactions of Morphine, Codeine, and Their Derivatives: Theory and Clinical Reality, Part I. *Psychosomatics* 44, 167–171.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende *et al.*, 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
- Banerjee, S., Sindberg, G., Wang, F., Meng, J., Sharma, U., Zhang *et al.*, 2016. Opioid-induced gut microbial disruption and bile dysregulation leads to gut barrier compromise and sustained systemic inflammation. *Mucosal Immunol* 9, 1418–1428.
- Barengolts, E., Green, S.J., Eisenberg, Y., Akbar, A., Reddivari, B., Layden, B.T. *et al.*, 2018. Gut microbiota varies by opioid use, circulating leptin and oxytocin in African American men with diabetes and high burden of chronic disease. *PLoS One* 13, e0194171.
- Bello, M.G.D., Knight, R., Gilbert, J.A., Blaser, M.J., 2018. Preserving microbial diversity. *Science* 362, 33–34.
- Bengmark, S., 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2–7.
- Benson, A.K., Kelly, S.A., Legge, R., Ma, F., Low, S.J., Kim, J. *et al.*, 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18933–18938.
- Benyhe, S., 1994. Morphine: New aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences* 55, 969–979.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C. *et al.*, 2020. Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103.
- Bilecki, W., Zapart, G., Ligeza, A., Wawrzczak-Bargiela, A., Urbański, M.J., Przewłocki, R., 2005. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci* 62, 2369–2375.
- Boscaini, S., Leigh, S.-J., Lavelle, A., García-Cabrero, R., Lipuma, T., Clarke, G. *et al.*, 2021. Microbiota and body weight control: Weight watchers within? *Mol Metab* 57, 101427.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M. *et al.*, 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine* 6, 263ra158-263ra158.

- Brownstein, M.J., 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5391–5393.
- Brunk, S.F., Delle, M., 1974. Morphine metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther* 16, 51–57.
- Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., McKenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A. *et al.*, 2015. Precision microbiome restoration of bile acid-mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205–208.
- Coffman, B.L., Rios, G.R., King, C.D., Tephly, T.R., 1997. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metabolism and Disposition* 25, 1–4.
- Costea, P.I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M.J., Bushman, F.D. *et al.*, 2018. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 3, 8–16.
- Dato, S., Rose, G., Crocco, P., Monti, D., Garagnani, P., Franceschi, C., Passarino, G., 2017. The genetics of human longevity: an intricacy of genes, environment, culture and microbiome. *Mechanisms of Ageing and Development, SI:Centenarians* 165, 147–155.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., *et al.*, 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14691–14696.
- Defalque, R.J., Wright, A.J., 2007. The Early History of Methadone. Myths and Facts. *Bulletin of Anesthesia History* 25, 13–16.
- Desmeules, J., Gascon, M.P., Dayer, P., Magistris, M., 1991. Impact of environmental and genetic factors on codeine analgesia. *Eur J Clin Pharmacol* 41, 23–26.
- Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A., Gessa, G., 1995. Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272, 781–785.
- Due, M.R., Piekarz, A.D., Wilson, N., Feldman, P., Ripsch, M.S., Chavez, S. *et al.*, 2012. Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation* 9, 200.
- Dumas, E.O., Pollack, G.M., 2008. Opioid Tolerance Development: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Perspective. *AAPS J* 10, 537.
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E. *et al.*, 2015. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18, 965–977.
- Everitt, B.J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J.W., Robbins, T.W., 2008. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3125–3135.
- Ferrario, C., Statello, R., Carnevali, L., Mancabelli, L., Milani, C., Mangifesta, M. *et al.*, 2017. How to Feed the Mammalian Gut Microbiota: Bacterial and Metabolic Modulation by Dietary Fibers. *Front Microbiol* 8, 1749.
- Flemer, B., Gaci, N., Borrel, G., Sanderson, I.R., Chaudhary, P.P., Tottey, W. *et al.*, 2017. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes* 8, 428–439.
- Foster, J.A., Rinaman, L., Cryan, J.F., 2017. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress* 7, 124–136.
- Fox, M.E., Rodeberg, N.T., Wightman, R.M., 2017. Reciprocal Catecholamine Changes during Opiate Exposure and Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 42, 671–681.

- Ghasemi, A., Jeddi, S., Kashfi, K., 2021. The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI J* 20, 1431–1445.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S. *et al.*, 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Goff, D.A., Kullar, R., Goldstein, E.J.C., Gilchrist, M., Nathwani, D., Cheng, A.C. *et al.*, 2017. A global call from five countries to collaborate in antibiotic stewardship: united we succeed, divided we might fail. *The Lancet Infectious Diseases* 17, e56–e63.
- Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blehman, R. *et al.*, 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799.
- Green, M.D., King, C.D., Mojarrabi, B., Mackenzie, P.I., Tephly, T.R., 1998. Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 507–512.
- Gregorová, J., Holečková, P., 2016. Pitfalls opioids in clinical practice. *Prakt. Lékař. 12*, 47–49.
- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.-C., Sokoloff, P., 2001. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411, 86–89.
- Hoskin, P.J., Hanks, G.W., 1990. Morphine: pharmacokinetics and clinical practice. *Br J Cancer* 62, 705–707.
- Hosztafi, S., 2001. The history of heroin. *Acta Pharm Hung* 71, 233–242.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T. *et al.*, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 69, 330–339.
- Chang, K.J., Cuatrecasas, P., 1979. Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *Journal of Biological Chemistry* 254, 2610–2618.
- Chang, M.-C., Fan, S.-Z., Hsiao, P.-N., Cheng, W.-F., Sun, W.-Z., 2011. Influence of morphine on host immunity. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 49, 105–108.
- Chiang, J.Y.L., 2013. Bile Acid Metabolism and Signaling, in: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1191–1212.
- Cho, I., Blaser, M.J., 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13, 260–270.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., Jansson, J.K., 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 1, 56–66.
- Johnson, S., North, R., 1992. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12, 483–488.
- Jordan, B., Devi, L.A., 1998. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *BJA: British Journal of Anaesthesia* 81, 12–19.
- Joseph, J., Depp, C., Shih, P.B., Cadenhead, K.S., Schmid-Schönbein, G., 2017. Modified Mediterranean Diet for Enrichment of Short Chain Fatty Acids: Potential Adjunctive Therapeutic to Target Immune and Metabolic Dysfunction in Schizophrenia? *Frontiers in Neuroscience* 11.

- Jurna, I., Baldauf, J., Fleischer, W., 1996. Depression by morphine-6-glucuronide of nociceptive activity in rat thalamus neurons: comparison with morphine. *Brain Research* 722, 132–138.
- Kilpatrick, G.J., Smith, T.W., 2005. Morphine-6-glucuronide: Actions and mechanisms. *Med. Res. Rev.* 25, 521–544.
- Koh, A., Vadder, F.D., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F., 2016. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.
- Komla, E., Stevens, D.L., Zheng, Y., Zhang, Y., Dewey, W.L., Akbarali, H.I., 2019. Experimental Colitis Enhances the Rate of Antinociceptive Tolerance to Morphine via Peripheral Opioid Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 370, 504–513.
- Krishnan, S., Ding, Y., Saedi, N., Choi, M., Sridharan, G.V., Sherr, D.H. *et al.*, 2018. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Reports* 23, 1099–1111.
- Kristensen, K., Christensen, C.B., Christrup, L.L., 1994. The mu1, mu2, delta, kappa opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sciences* 56, 45–50.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6955–6959.
- Lee, K., Vuong, H.E., Nusbaum, D.J., Hsiao, E.Y., Evans, C.J., Taylor, A.M.W., 2018. The gut microbiota mediates reward and sensory responses associated with regimen-selective morphine dependence. *Neuropsychopharmacol* 43, 2606–2614.
- Leow, K.P., Wright, A.W.E., Cramond, T., Smith, M.T., 1993. Determination of the Serum Protein Binding of Oxycodone and Morphine Using Ultrafiltration. *Therapeutic Drug Monitoring* 15, 440–447.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z. *et al.*, 2017. Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. *Sci Rep* 7, 45840.
- Liang, X., Bittinger, K., Li, X., Abernethy, D.R., Bushman, F.D., FitzGerald, G.A., 2015. Bidirectional interactions between indomethacin and the murine intestinal microbiota. *eLife* 4, e08973.
- Lincová, D., Farghali, H., Votava M., Šustková M., D. Mišeková c2007. *Základní a aplikovaná farmakologie 2., dopl. a přeprac. vyd., Praha: Galén. pp. 207–211, 291–292.*
- Listos, J., Baranowska-Bosiacka, I., Talarek, S., Listos, P., Orzelska, J., Fidecka, S. *et al.*, 2013. The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology* 310, 73–83.
- Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., Kotlińska, J., 2019. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *Int J Mol Sci* 20, 4302.
- Lugo, R.A., Kern, S.E., 2002. Clinical Pharmacokinetics of Morphine. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 16, 5–18.
- Lugo, R.A., Satterfield, K.L., Kern, S.E., 2005. Pharmacokinetics of Methadone. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 19, 13–24.

- Marcobal, A., Kashyap, P.C., Nelson, T.A., Aronov, P.A., Donia, M.S., *et al.*, 2013. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J* 7, 1933–1943.
- Margolis, K.G., Cryan, J.F., Mayer, E.A., 2021. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology* 160, 1486–1501.
- Marchesi, J.R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J. *et al.*, 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9, 123.
- Matinfar, M., Esfahani, M.M., Aslany, N., Davoodi, S.H., Parsaei, P., Zarei, G., Reisi, P., 2013. Effect of repeated morphine withdrawal on spatial learning, memory and serum cortisol level in mice. *Adv Biomed Res* 2, 80.
- McCleane, G., 2009. Opioids for chronic noncancer pain. *Therapy* 6, 707–711.
- Meckel, K.R., Kiraly, D.D., 2019. A potential role for the gut microbiome in substance use disorders. *Psychopharmacology* 236, 1513–1530.
- Meye, F.J., van Zessen, R., Smidt, M.P., Adan, R.A.H., Ramakers, G.M.J., 2012. Morphine Withdrawal Enhances Constitutive μ -Opioid Receptor Activity in the Ventral Tegmental Area. *J Neurosci* 32, 16120–16128.
- Mistry, C.J., Bawor, M., Desai, D., Marsh, D.C., Samaan, Z., 2014. Genetics of Opioid Dependence: A Review of the Genetic Contribution to Opioid Dependence. *Curr Psychiatry Rev* 10, 156–167.
- Mora, A.L., Salazar, M., Pablo-Caeiro, J., Frost, C.P., Yadav, Y., DuPont, H.L., Garey, K.W., 2012. Moderate to High Use of Opioid Analgesics Are Associated With an Increased Risk of *Clostridium difficile* Infection. *The American Journal of the Medical Sciences* 343, 277–280.
- Murphy, P.B., Bechmann, S., Barrett, M.J., 2022. Morphine, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Osadchiy, V., Martin, C.R., Mayer, E.A., 2019. Gut Microbiome and Modulation of CNS Function. *Compr Physiol* 10, 57–72.
- Pasternak, G.W., 2014. Opiate Pharmacology and Relief of Pain. *J Clin Oncol* 32, 1655–1661.
- Pasternak, G.W., Bodnar, R.J., Clark, J.A., Inturrisi, C.E., 1987. Morphine-6-glucuronide, a potent μ agonist. *Life Sciences* 41, 2845–2849.
- Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G., 2012. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 263–269.
- Piggott, D.A., Tuddenham, S., 2020. The Gut Microbiome and Frailty. *Transl Res* 221, 23–43.
- Powell, K.J., Hosokawa, A., Bell, A., Sutak, M., Milne, B., Quirion, R., Jhamandas, K., 1999. Comparative effects of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibition on the development and reversal of spinal opioid tolerance. *Br J Pharmacol* 127, 631–644.
- Proctor, L.M., Creasy, H.H., Fettweis, J.M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W. *et al.*, 2019. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* 569, 641–648.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C. *et al.*, 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.

- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., Mele, M.C., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14.
- Roeckel, L.-A., Utard, V., Reiss, D., Mouheiche, J., Maurin, H., Robé, A. *et al.*, 2017. Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Sci Rep* 7, 10406.
- Rosenblum, A., Marsch, L.A., Joseph, H., Portenoy, R.K., 2008. Opioids and the Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. *Exp Clin Psychopharmacol* 16, 405–416.
- Rothhammer, V., Mascanfroni, I.D., Bunse, L., Takenaka, M.C., Kenison, J.E., Mayo, L., *et al.*, 2016. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* 22, 586–597.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533.
- Sepulveda, M.J., Hernandez, L., Rada, P., Tucci, S., Contreras, E., 1998. Effect of Precipitated Withdrawal on Extracellular Glutamate and Aspartate in the Nucleus Accumbens of Chronically Morphine-Treated Rats: An In Vivo Microdialysis Study. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 60, 255–262.
- Schiff, P.L., 2002. Opium and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education* 66, 188–196.
- Schmitz, R., 1985. Friedrich Wilhelm Sertürner and the Discovery of Morphine. *Pharmacy in History* 27, 61–74.
- Schroeder, B.O., Bäckhed, F., 2016. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 22, 1079–1089.
- Siegel, S., 1976. Morphine Analgesic Tolerance: Its Situation Specificity Supports a Pavlovian Conditioning Model. *Science* 193, 323–325.
- Smith, M.T., 2000. Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 524–528.
- Staels, B., Fonseca, V.A., 2009. Bile Acids and Metabolic Regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 32, S237–S245.
- Sun, J., Chang, E.B., 2014. Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. *Genes & Diseases* 1, 132–139.
- Sun, J., Wang, F., Hong, G., Pang, M., Xu, H., Li, H. *et al.*, 2016. Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neuroscience Letters* 618, 159–166.
- Sverrisdóttir, E., Lund, T.M., Olesen, A.E., Drewes, A.M., Christrup, L.L., Kreilgaard, M., 2015. A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 74, 45–62.
- Tan, T., Kuramoto, M., Takahashi, T., Nakamura, H., Nakanishi, Y., Imasato, Y., Yoshimura, H., 1989. Characteristics of the gastrointestinal absorption of morphine in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37, 168–173.
- Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Ghogha, A., Vayssiere, P., Pradhan, A.A.A., Xue, L. *et al.*, 2016. Neuroimmune Regulation of GABAergic Neurons Within the Ventral Tegmental Area During Withdrawal from Chronic Morphine. *Neuropsychopharmacology* 41, 949–959.

- Terry, D.F., Wilcox, M., McCormick, M.A., Lawler, E., Perls, T.T., 2003. Cardiovascular advantages among the offspring of centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, M425-431.
- Thomaz, A.C., Iyer, V., Woodward, T.J., Hohmann, A.G., 2021. Fecal microbiota transplantation and antibiotic treatment attenuate naloxone-precipitated opioid withdrawal in morphine-dependent mice. *Experimental Neurology* 343, 113787.
- Tranchida, P.Q., Franchina, F.A., Dugo, P., Mondello, L., 2016. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: Recent evolution and current trends: GC × GC-MS: RECENT EVOLUTION AND CURRENT TRENDS. *Mass Spec Rev* 35, 524–534.
- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H., 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.
- Tunblad, K., Jonsson, E.N., Hammarlund-Udenaes, M., 2003. Morphine blood-brain barrier transport is influenced by probenecid co-administration. *Pharmaceutical Research* 20, 618–623.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810.
- Valentino, R.J., Volkow, N.D., 2018. Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacol* 43, 2514–2520.
- Vieira-Silva, S., Falony, G., Darzi, Y., Lima-Mendez, G., Garcia Yunta, R., Okuda, S. *et al.*, 2016. Species–function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nat Microbiol* 1, 16088.
- Waclawiková, B., El Aidy, S., 2018. Role of Microbiota and Tryptophan Metabolites in the Remote Effect of Intestinal Inflammation on Brain and Depression. *Pharmaceuticals* 11, 63.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953–990.
- Wang, F., Meng, J., Zhang, L., Johnson, T., Chen, C., Roy, S., 2018. Morphine induces changes in the gut microbiome and metabolome in a morphine dependence model. *Sci Rep* 8, 3596.
- Want, E.J., O’Maille, G., Smith, C.A., Brandon, T.R., Uritboonthai, W., Qin, C. *et al.*, 2006. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 743–752.
- Wensel, C.R., Pluznick, J.L., Salzberg, S.L., Sears, C.L., 2022. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest* 132.
- Xia, Y., Sun, J., Chen, D.-G., 2018. Introductory Overview of Statistical Analysis of Microbiome Data, in: Xia, Y., Sun, J., Chen, D.-G. (Eds.), *Statistical Analysis of Microbiome Data with R*, ICSA Book Series in Statistics. Springer, Singapore, pp. 43–75.
- Yassour, M., Jason, E., Hogstrom, L.J., Arthur, T.D., Tripathi, S., Siljander, H. *et al.*, 2018. Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life. *Cell Host Microbe* 24, 146-154.e4.
- Zhang, G., Wu, X., Zhang, Y.-M., Liu, H., Jiang, Q., Pang, G. *et al.*, 2016. Activation of serotonin 5-HT_{2C} receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. *Neuropharmacology* 101, 246–254.
- Zhang, L., Meng, J., Ban, Y., Jalodia, R., Chupikova, I., Fernandez, *et al.*, 2019. Morphine tolerance is attenuated in germfree mice and reversed by probiotics, implicating the role of gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 13523–13532.

Zhou, Y., Bendor, J., Hofmann, L., Randesi, M., Ho, A., Kreek, M.J., 2006. Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *Journal of Endocrinology* 191, 137–145.

Zierer, J., Jackson, M.A., Kastenmüller, G., Mangino, M., Long, T., Telenti, A. *et al.*, 2018. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet* 50, 790–795.

Internetové zdroje:

I Sbíрка zákonů ČR, n.d. 123/2006 Sb. Vyhláška o evidenci a dokumentaci návykových látek a přípravků [WWW Document]. *Zákony pro lidi*. URL <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2006-123> (accessed 4.7.22).

II Státní zdravotní ústav, 2022. Závislost: co to je? [WWW Document]. NZIP.cz. URL <https://www.nzip.cz/clanek/320-zavislost-zakladni-informace> (accessed 3.31.22).

III National Library of Medicine, 2020. Opioid addiction [WWW Document]. URL <https://medlineplus.gov/genetics/condition/opioid-addiction/> (accessed 3.31.22).

IV World Health Organization, 2021. Opioid overdose [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose> (accessed 3.31.22).

V CDC Injury Center, 2021. Prescription Opioid Data | Drug Overdose [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/drugoverdose/deaths/prescription/index.html> (accessed 3.31.22).

VI Analýza mikrobiálního genomu [WWW Document], n.d. URL <https://www.seqme.eu/cs/next-gen-sekvenovani/clanek/taxonomicka-analyza-mikrobialnich-spolecenstev-pomoci-sekvenovani-amplikonu> (accessed 7.22.22).

VII Česká mikrobiomová společnost, 2021. Česká mikrobiomová společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [WWW Document]. URL <https://www.mikrobiom-cms.cz/> (accessed 4.5.22).

Příloha 1 – Tabulka s počty readů identifikovaných taxonomických jednotek ve vzorcích trusu potkanů

Na základě těchto dat byla provedena mikrobiomová analýza (kapitoly 6.1.-6.6.).

Klasifikace	Vzorky																			
	CI_1	CI_2	CI_3	CI_4	CI_1	CI_2	CI_3	CI_4	CI_1	CI_2	CI_3	CI_4	CIV_1	CIV_2	CIV_3	CIV_4	CV_1	CV_2	CV_3	CV_4
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyrimonadaceae,unclassified	2719	1808	1003	1277	1382	4987	2414	7057	3583	969	924	4149	2865	3438	4384	3642	1880	1491	3087	882
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Prevotella	2634	1278	355	977	213	2870	1545	809	1398	518	136	2360	2082	1958	1259	1598	962	1186	1506	908
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyrimonadaceae,Barnesiella	0	138	252	63	157	1043	680	525	2481	290	230	734	435	230	505	592	190	287	198	966
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Bacteroidaceae,Bacteroides	1209	1114	248	865	541	223	172	644	127	105	402	245	107	135	187	167	110	223	104	204
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Turicibacter	18	275	29	458	0	170	0	31	106	114	253	115	22	169	306	157	0	223	285	419
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Sutterellaceae,Parasutterella	84	418	17	130	30	260	47	150	201	208	352	201	192	222	367	238	66	72	178	100
Unassigned	576	327	1020	387	1332	563	1153	792	658	259	197	814	667	764	451	553	1030	487	688	557
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,unclassified	1620	1364	1743	1225	1065	950	1960	1823	1634	273	472	1511	836	835	929	1615	1947	1067	2010	1254
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,unclassified	1644	977	4766	1240	2599	1844	3066	2064	2139	122	371	2232	1017	1612	289	765	2599	1560	1347	1931
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Roseburia	0	0	0	2038	204	0	0	1056	145	0	1048	171	0	40	0	0	22	207	51	238
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter	980	93	680	237	118	158	765	809	368	99	114	314	473	727	240	663	1191	530	180	240
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Alloprevotella	162	326	109	0	0	463	34	5	31	0	147	28	326	917	1644	1452	143	264	15	9
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Lactobacillaceae,Lactobacillus	467	187	32	444	279	657	83	128	397	107	151	283	249	351	177	78	181	145	47	535
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptostreptococcaceae,Romboutsia	52	342	148	384	35	91	10	54	179	0	1032	0	26	124	139	199	18	231	124	197
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia	244	89	0	260	941	0	110	0	56	0	797	40	36	0	0	0	0	0	44	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,unclassified,unclassified	375	363	137	331	672	160	469	268	711	74	0	420	577	197	279	256	616	431	292	454
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiaceae,unclassified	0	62	0	72	0	75	0	12	30	42	370	75	43	109	130	107	23	276	50	263
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacteriales,Enterobacteriaceae,Escherichia/Shigella	181	54	0	164	155	21	28	69	116	21	1042	97	26	16	12	0	0	0	27	301
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Rikenellaceae,Alistipes	386	486	248	192	56	1057	161	317	102	26	43	96	31	91	80	80	41	251	61	134
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,unclassified,unclassified	370	0	0	435	257	0	0	380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptococcaceae,unclassified	79	124	45	46	159	34	57	93	148	19	22	64	49	77	0	45	89	42	238	90
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Fusicatenibacter	135	0	0	188	367	0	0	0	0	0	86	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium	108	0	0	0	224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Bdellovibrionales,Bdellovibrionaceae,Vampirovibrio	0	250	0	28	68	80	17	26	14	17	5	40	147	36	311	199	13	217	95	38
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Paraprevotella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	355	47	89	58	1457	619	133	138
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae incertae sedis	56	52	37	89	337	0	143	34	0	0	0	0	38	17	146	265	224	293	61	150
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyrimonadaceae,Parabacteroides	357	212	43	197	61	113	53	201	164	38	53	262	32	40	52	25	18	57	66	36
Bacteria,Proteobacteria,Epsilonproteobacteria,Campylobacteriales,Helicobacteriaceae,Helicobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	328	1096	135	51
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified	0	55	0	21	118	0	0	100	0	0	0	47	207	42	53	33	30	113	138	84
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcus	26	234	188	113	213	133	264	26	216	30	0	42	211	72	266	176	277	204	323	145
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium	126	216	111	0	26	376	192	192	170	70	48	229	133	0	32	177	0	61	0	0
Bacteria,Verrucomicrobia,Verrucomicrobiae,Verrucomicrobiales,Verrucomicrobiaceae,Akkermansia	155	22	9	22	24	213	97	14	33	13	47	45	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Butyricoccus	63	0	72	30	89	0	0	17	12	0	68	11	0	0	0	0	0	0	19	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium	68	44	0	87	67	17	19	52	46	16	8	15	82	82	16	40	343	84	20	36
Bacteria,Firmicutes,unclassified,unclassified,unclassified,unclassified	118	17	25	10	27	11	173	75	0	13	0	51	94	46	89	83	29	37	66	59
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum	73	0	0	0	44	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhodospirillales,Rhodospirillaceae,Aestuariespira	10	78	0	81	27	145	13	0	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,unclassified,unclassified	30	18	7	0	0	46	24	34	0	0	0	46	0	0	12	0	10	17	0	5
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Eubacteriaceae,Eubacterium	64	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	20	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified	0	0	0	0	0	24	0	34	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Klasifikace	CI_1	CI_2	CI_3	CI_4	CH_1	CH_2	CH_3	CH_4	CHH_1	CHH_2	CHH_3	CHH_4	CIV_1	CIV_2	CIV_3	CIV_4	CV_1	CV_2	CV_3	CV_4
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Eisenbergiella	0	0	0	0	0	117	43	69	0	0	0	0	0	0	20	56	0	0	0	0
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Bifidobacteriales,Bifidobacteriaceae,Bifidobacterium	0	32	0	32	0	26	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Desulfovibrionales,Desulfovibrionaceae,unclassified	35	0	0	0	0	9	25	17	0	0	35	14	42	45	21	65	18	8	0	3
Bacteria,Elusimicrobia,Elusimicrobia,Elusimicrobiales,Elusimicrobiaceae,Elusimicrobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	180	74	70	0	53	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Desulfovibrionales,Desulfovibrionaceae,Desulfovibrio	79	0	0	0	0	0	27	18	14	48	18	54	27	45	0	118	8	0	8	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Coproccoccus	0	0	0	0	0	0	0	31	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Pasteurellales,Pasteurellaceae,Pasteurella	0	0	0	13	18	0	0	0	15	0	12	9	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Actinomycetales,Corynebacteriaceae,Corynebacterium	0	15	0	0	8	0	0	0	0	5	0	6	0	0	0	0	0	0	32	22
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Pseudo flavonifractor	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Anaerostipes	21	0	0	14	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Allobaculum	0	0	0	0	0	6	0	0	58	17	0	33	3	0	0	4	0	0	14	0
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Collinsella	11	0	0	16	0	0	0	0	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Deferribacteres,Deferribacteres,Deferribacterales,Deferribacteraceae,Mucispirillum	48	0	9	0	0	8	15	29	0	0	0	9	0	0	0	0	4	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Pseudomonadales,Moraxellaceae,Psychrobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	61	0	28	32	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Tenericutes,Mollicutes,Anaeroplasmatales,Anaeroplasmataceae,Anaeroplasma	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	6
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhodospirillales,Rhodospirillaceae,unclassified	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Clostridium	22	0	0	0	0	0	20	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Acetatifactor	0	0	83	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	23	0	57	8	13	0	9
Bacteria,Proteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified,unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Anaerobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	25	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales,incertae sedis	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Negativicutes,Selenomonadales,Acidaminococcaceae,Phascolarctobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	17	11	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Streptococcaceae,Lactococcus	0	0	0	0	10	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,unclassified,unclassified	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Dorea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Alcaligenaceae,Oligella	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Alcaligenaceae,Paenacaligenes	0	0	0	0	0	0	0	14	0	6	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Coprobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Odoribacter	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Streptococcaceae,Streptococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,unclassified	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,incertae sedis	21	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Aerococcaceae,Facklamia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Aerococcaceae,Aerococcus	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Butyrivimonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Oxalobacteraceae,Oxalobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Rikenellaceae,Rikenella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Holdemania	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,Planococcaceae,Sporosarcina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Bradyrhizobiaceae,Bradyrhizobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,Bacillaceae,unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Klasifikace	Vzorky																			
	MI_1	MI_2	MI_3	MI_4	MI1_1	MI1_2	MI1_3	MI1_4	MI11_1	MI11_2	MI11_3	MI11_4	MI1V_1	MI1V_2	MI1V_3	MI1V_4	MV_1	MV_2	MV_3	MV_4
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,unclassified	4542	2120	2216	2802	6180	2906	4466	5021	3821	4132	4210	4098	4737	4508	2907	4378	3386	3610	6229	2839
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Prevotella	858	517	595	519	611	483	2204	2425	1155	1239	1836	1226	968	887	788	1122	2110	2196	2309	2457
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Barnesiella	0	0	0	0	0	0	406	0	308	350	612	614	251	306	207	336	177	116	314	351
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Bacteroidaceae,Bacteroides	596	678	508	314	1079	2096	1485	1581	113	216	197	318	131	192	161	356	144	115	110	142
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Turicibacter	13	196	44	62	20	139	41	76	960	41	281	236	545	1259	102	312	209	451	96	372
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Sutterellaceae,Parasutterella	86	50	122	86	88	311	137	89	164	238	267	166	312	516	163	727	245	127	232	328
Unassigned	1043	1162	1290	1258	821	1323	709	761	1245	908	591	746	710	911	801	847	1025	1287	923	1269
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,unclassified	1304	1109	1820	1634	742	652	815	679	1745	1056	1155	811	1205	846	1578	1191	2953	2305	984	2557
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,unclassified	720	469	1693	2729	821	1403	1173	774	2264	1672	1073	1064	335	940	1488	751	2811	3290	1278	2794
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Roseburia	50	0	335	62	0	269	113	335	1013	1376	0	38	0	297	176	104	55	138	239	834
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter	406	173	164	601	406	216	202	92	64	307	167	258	42	170	433	269	297	287	524	489
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Alloprevotella	9	0	34	26	68	15	77	280	7	40	795	78	74	0	0	34	37	844	902	1378
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Lactobacillaceae,Lactobacillus	428	374	985	370	471	63	102	57	361	139	248	317	303	520	81	383	347	362	157	381
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptostreptococcaceae,Romboutsia	59	216	251	141	39	1170	129	0	894	143	162	239	282	862	176	224	558	1401	117	476
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia	389	389	635	169	96	654	215	94	633	87	0	0	184	342	118	0	24	22	0	104
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,unclassified,unclassified	382	389	483	213	55	94	327	213	342	215	279	719	237	246	442	739	561	387	181	579
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiaceae,unclassified	56	155	67	18	17	48	31	85	59	48	145	257	174	107	67	200	315	88	176	751
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacteriales,Enterobacteriaceae,Escherichia/Shigella	58	53	36	72	0	0	0	14	176	9	17	206	0	16	0	99	0	50	25	259
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Rikenellaceae,Alistipes	237	229	446	76	93	117	348	280	22	74	97	174	49	34	123	451	132	45	178	206
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,unclassified,unclassified	399	367	63	72	192	903	364	185	150	0	0	0	0	124	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptococcaceae,unclassified	61	41	139	68	22	95	44	65	205	72	43	55	78	106	82	193	260	128	71	453
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Fusicatenibacter	0	107	216	137	0	219	0	0	46	42	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium	221	186	0	0	138	378	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Bdellovibrionales,Bdellovibrionaceae,Vampirovibrio	56	64	0	0	24	16	1187	341	18	0	76	21	153	55	196	204	223	119	341	181
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Prevotellaceae,Paraprevotella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_incertae_sedis	454	529	31	127	237	1254	74	42	242	22	0	122	37	125	89	143	212	0	293	365
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Parabacteroides	255	165	97	20	98	349	285	232	51	48	75	109	71	99	50	49	28	0	81	79
Bacteria,Proteobacteria,Epsilonproteobacteria,Campylobacterales,Helicobacteraceae,Helicobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified	124	55	25	29	35	52	72	0	21	0	0	33	26	0	0	0	58	0	0	33
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcus	0	39	230	172	0	142	0	72	218	65	119	297	45	199	286	283	457	1077	256	654
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium	77	0	0	105	10	56	156	50	54	145	88	11	0	171	32	38	0	42	16	266
Bacteria,Verrucomicrobia,Verrucomicrobiae,Verrucomicrobiales,Verrucomicrobiaceae,Akkermansia	289	144	50	80	11	0	0	0	0	17	35	0	29	0	12	22	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Butyricoccus	145	176	70	77	24	71	0	52	19	20	0	0	0	93	0	0	30	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium	120	71	129	79	30	150	40	51	64	50	20	36	63	39	31	57	17	0	0	22
Bacteria,Firmicutes,unclassified,unclassified,unclassified,unclassified	6	7	10	25	48	27	8	0	74	29	0	84	7	169	152	75	40	83	89	197
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum	0	0	0	19	0	0	0	0	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhodospirillales,Rhodospirillaceae,Aestuariuspira	103	178	0	21	36	42	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,unclassified,unclassified	11	12	24	0	13	0	57	89	0	0	0	84	0	31	0	24	11	0	26	20
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Eubacteriaceae,Eubacterium	47	0	0	0	36	0	0	12	34	15	0	97	0	0	7	0	0	9	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified	65	81	26	0	22	10	28	22	0	16	0	0	0	12	0	13	0	9	0	52

Klasifikace	Vzorky																			
	MI_1	MI_2	MI_3	MI_4	MI_1	MI_2	MI_3	MI_4	MI_1	MI_2	MI_3	MI_4	MIV_1	MIV_2	MIV_3	MIV_4	MV_1	MV_2	MV_3	MV_4
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Eisenbergiella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	105	0	0	79	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Bifidobacteriales,Bifidobacteriaceae,Bifidobacterium	44	21	60	10	0	0	0	10	23	5	29	0	25	50	0	42	13	0	12	72
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Desulfovibrionales,Desulfovibrionaceae,unclassified	11	0	0	0	5	5	0	0	9	28	17	8	0	17	23	0	19	0	19	0
Bacteria,Elusimicrobia,Elusimicrobia,Elusimicrobiales,Elusimicrobiaceae,Elusimicrobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Deltaproteobacteria,Desulfovibrionales,Desulfovibrionaceae,Desulfovibrio	16	0	0	0	36	31	0	16	7	31	19	0	0	0	38	32	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Coproccoccus	0	45	40	34	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Pasteurellales,Pasteurellaceae,Pasteurella	0	0	0	0	0	16	0	0	8	0	0	29	0	0	0	5	0	0	0	0
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Actinomycetales,Corynebacteriaceae,Corynebacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	24	18	13	23	0	0	0	0	59	54	0	86
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococaceae,Pseudoflavonifractor	0	0	0	52	101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Anaerostipes	0	0	15	0	0	50	0	0	34	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Allobaculum	0	0	0	0	0	0	0	0	53	20	14	8	54	86	34	72	0	33	9	32
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Collinsella	18	32	12	10	0	9	0	0	18	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Deferribacteres,Deferribacteres,Deferribacterales,Deferribacteraceae,Mucispirillum	0	27	0	5	0	0	0	13	0	0	16	31	0	0	3	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Psedomonadales,Moraxellaceae,Psychrobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0
Bacteria,Tenericutes,Mollicutes,Anaeroplasmatales,Anaeroplasmataceae,Anaeroplasma	0	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhodospirillales,Rhodospirillaceae,unclassified	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Clostridium	13	0	70	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Acetatifactor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	32	34
Bacteria,Proteobacteria,unclassified,unclassified,unclassified,unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococaceae,Anaerobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales,incertae_sedis	0	0	12	0	0	5	16	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0
Bacteria,Firmicutes,Negativicutes,Selenomonadales,Acidaminococaceae,Phascolarctobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Streptococaceae,Lactococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,unclassified,unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Dorea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Alcaligenaceae,Oligella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Alcaligenaceae,Paenalcigenes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Coprobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Odoribacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Streptococaceae,Streptococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,unclassified	5	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	7	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,incertae_sedis	0	5	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Aerococaceae,Facklamia	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Aerococaceae,Aerococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Butyrivimonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Betaproteobacteria,Burkholderiales,Oxalobacteraceae,Oxalobacter	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Rikenellaceae,Rikenella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Holdemania	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,Planococaceae,Sporosarcina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
Bacteria,Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Bradyrhizobiaceae,Bradyrhizobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Bacillales,Bacillaceae,unclassified	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha 2 – tabulka s množstvím detekovaného signálu jednotlivých SCFA ve vzorcích trusu potkanů

Na základě těchto dat byla provedena analýza SCFA v rámci metabolické analýzy (kapitola 6.8.).

Vzorky	SCFA				
	Propionová k.	Isomáselná k.	Máselná k.	Valerová k.	Kapronová k.
MV_1	57,52486447	2,642214363	50,47661251	1,060494055	5,977064574
MV_2	45,38643508	2,330527049	55,61974844	1,001477376	7,187392963
MV_3	82,78436057	3,832074651	93,97297419	2,736207283	13,17457184
MV_4	89,12018579	2,643519249	55,08847596	0,651017817	1,372281117
MV_5	76,48247367	3,300032628	80,93591285	1,467597478	8,623004728
MI_1	77,24168378	2,039740694	57,52579559	0,33068693	2,314075997
MI_2	19,57530284	0,614770209	22,90423574	0,268801645	0,25683762
MI_3	69,70029015	2,507266066	90,86584349	1,025614106	3,765944402
MI_4	66,02839141	1,870863697	91,22584205	0,742528872	2,392125957
MI_5	129,943464	5,017522739	139,2048666	2,389334376	1,048402104
CV_1	82,14627449	4,20877392	103,6800621	2,139552368	8,889699409
CV_2	11,91467813	0,225385357	15,12138342	0,094094343	0,756929638
CV_3	72,77444546	2,884365219	56,66743404	0,935566441	2,823058369
CV_4	109,4100308	3,126464055	88,19711826	0,515797142	2,032668812
CV_5	114,1370477	8,393886446	121,9220075	3,870471599	9,679117097
CI_1	79,80290222	4,407618774	69,02300833	2,181946988	5,58514239
CI_2	84,59425543	3,080548985	117,9200951	1,065691864	2,572571692
CI_3	111,1999051	8,482429751	186,6657528	5,195397789	13,17857176
CI_4	126,5166514	8,05083045	158,267033	4,035427299	7,940117941
CI_5	73,8097917	4,38891967	115,744211	2,809864899	5,992718675