

Zajednice mikroorganizama i njihova uloga u ljudskom životu

Ivankov, Ana-Maria

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:925425>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**ZAJEDNICE MIKROORGANIZAMA I NJIHOVA ULOGA U
LJUDSKOM ŽIVOTU**

**MICROBIAL COMMUNITIES AND THEIR ROLE IN HUMAN
LIFE**

SEMINARSKI RAD

Ana-Maria Ivankov
Preddiplomski studij molekularne biologija
Mentor: Doc. dr .sc. Ivana Ivan i Ba e
Zagreb, 2011

Sadržaj:

1. Uvod.....	2
2. Analiza ljudskih mikrobiota u crijevima: novi pristupi neovisni o kulturama.	4
3. Uloga mikrobnih zajednica i njihov utjecaj na doma ina.....	5
4. Utjecaj genotipa doma ina, mikrobnih me uodnosa i okoliša na kompoziciju mikrobnih zajednica.....	6
4.1. Genotip doma ina.....	8
4.2. Mikrobne interakcije	9
4.3. Prehrana i pretilost.....	10
5. Razvoj mikrobnih zajednica kod novorođene djece	12
6. Bolesti uzrokovane promjenom u kompoziciji mikrobnih zajednica.....	13
7. Utjecaj terapija i antibiotika u lijечenju bolesti na kompoziciju mikrobnih zajednica.....	15
8. Literatura.....	17
9. Sažetak.....	20
10.Summary.....	21

1. Uvod

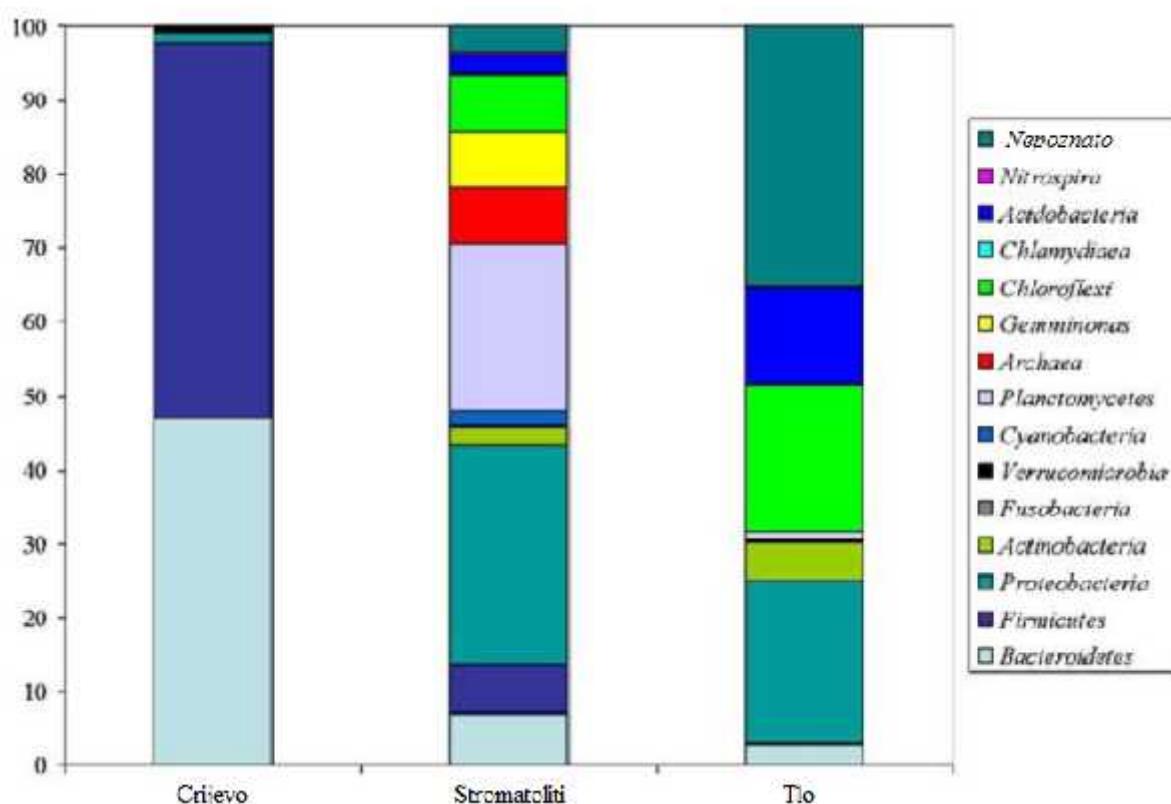
Mikroorganizmi imaju izrazito bitnu ulogu u evoluciji života na Zemlji i povezani su s evolucijom ljudi također (Turroni, 2008). Mikrobni ekosistemi pronađeni su diljem svijeta, a jedan od kompleksnijih nalazi se upravo u nama samima (Zoetendal, 2006). Nastanjuju kožu, mukozne površine i probavne cijevi svih sisavaca, a ne samo ovjeka. Nedavna istraživanja istaknula su veliku raznolikost ovih mikrobnih zajednica i njihovu važnost u fiziologiji doma ina (Dethlefsen, 2006).

Ljudsko tijelo doma in je mnogih kompleksnih zajednica mikroorganizama i može se smatrati ekosistemom sastavljenim od nekoliko različitih staništa i niša. Svako stanište ima svoje vlastite fizikalno-kemijske karakteristike, te vlastiti set mikroba. Mikrobne zajednice pronađene su na koži, u ustima, nosu, ušima, rodnici i probavnom traktu (Bik, 2009). Mikrobioti imaju sposobnost komuniciranja jedno s drugim i s doma inom. Konzumiraju, pohranjuju i raspoređuju energiju te služe kao posrednici u kemijskim transformacijama fiziološki važnima za doma ina. Imaju sposobnost vlastitog samoodržavanja i popravka kroz samoumnažanje.

Za ovjeka su jako bitni jer obavljaju dodatne funkcije koje on sam nije uspio steći kroz evoluciju. Odnos ovjeka kao doma ina i sastavnica mikrobiota najčešće se opisuje kao komenzalizam, a rjeđe kao mutualizam. Uzrok tome može biti u nedostaku znanja o doprinosu mikrobnih zajednica ovjeku ili zanemarivanju njihove važnosti u životu ovjeka. Osim što štite tijelo od napada različitih patogena, sudjeluju u razgradnji polisaharida i fermentaciji ugljikohidrata te na taj način opskrbljuju doma ina ugljikom i energijom. Zauzvrat dobivaju potrebne glikane i nalaze se u zaštiti enom, najčešće anoksimnom, okruženju (Bäckhed, 2005).

Samo u našem crijevu nalazi se ukupno oko 100 trilijuna (10^{14}) stanica mikroba, deset puta više nego ljudskih stanica, što znači da imaju 150 puta više jedinstvenih gena nego naš vlastiti genom. Zaliha gena mikroba sadrži 3.3 milijuna gena. Svaka osoba sadrži 536112 ± 12167 mikrobnih gena, što upućuje na to da se većina gena iz zalihe dijeli. Oko 99.1% tih gena pripadaju bakterijama, te ljudsko tijelo može nastanjivati između 1000 i 1150 bakterijskih vrsta, a svaka osoba sadrži ih najmanje 160 različitih vrsta. Ljudi većinom nastanjuju slike ili iste vrste. Ostatak gena uglavnom pripada arhejama, a samo 0.1% je eukariotskog (kvaci) i viralnog (bakteriofagi) podrijetla (Qin, 2010).

Prou avanjem mikrobne raznolikosti unutar ljudskih crijeva i crijeva drugih sisavaca, primije eno je da je ona puno manja u usporedbi s drugim mikrobnim okolišima. U ljudskim crijevima postoji samo 8 bakterijskih redova, dok se na primjer u tlu nalazi najmanje 20 bakterijskih redova (Sl. 1.). Pretpostavlja se da je to rezultat snažnog evolucijskog pritiska. Uzrok takođe može biti i u tome što crijevo sisavaca kao stanište postoji relativno kratko, oko 100 milijuna godina. U usporedbi sa postojanjem morskog okoliša (>3.85 bilijuna godina), to je jako malo (Turroni, 2007).



Slika 1. Usporedba bakterijske raznolikosti u ljudskom crijevu, stromatolitima i tlu (preuzeto iz: Turroni, 2008).

U ovom seminaru najviše će biti riječ o mikrobijskoj zajednici u crijevu ovjeka, a posebice debelom crijevu, zbog toga što je tu najveća i najraznolikija mikrobijska zajednica u tijelu ovjeka i ima najveći utjecaj na ovjekov život i zdravlje.

2. Analiza ljudskih mikrobiota u crijevima: novi pristupi neovisni o kulturama

Istraživanja koja proučavaju složenost ovih ekosistema donedavno su izvedena upotrebom tradicionalnih tehnika koje uključuju uzgajanje mikroba u kulturama i brojanjem kolonija koje su narasle na određenom hranjivom mediju. Dobivene kolonije su zatim identificirane upotrebom biokemijskih testova. Izolacija i kultivacija na specifičnom hranjivom mediju omogućava je identifikaciju samo onih mikroorganizama koji su bili sposobni rasti na određenom hranjivom mediju. Procijenjeno je da se samo 1%, pa i manje, bakterija u većini različitih staništa može uzgojiti standardnim kultivacijskim tehnikama i postalo je ovo to da je velika većina mikroba ostala neopisana. Upotreba standardnih metoda ipak ima svojih prednosti, kao što je ekonomičnost i mogućnost izvedenja biokemijskih i fizioloških pokusa.

Razvoj molekularnih metoda omogućuje upotrebu novih tehnologija u istraživanju mikrobnih zajednica bez potrebe za kultivacijom. Identificiran je veliki broj bakterijskih svojstava, od kojih većina još nije uspješno kultivirana na sintetskim medijima (Turroni, 2008).

Metode neovisne o bakterijskim kulturama koje se temelje na sekвencioniranju gena 16S rRNA revolucionirale su razumijevanje mikrobne raznolikosti. 16S rRNA gen rijetko sudjeluje u horizontalnom prijenosu gena, razvio se neovisno o ekološkoj diverzifikaciji i sadrži dijelove koji se brzo i dijelove koji se sporo razvijaju te se zato može upotrijebiti u razrješavanju odnosa između svojstava na različitim filogenetskim razinama (Zaneveld, 2010).

Danas se u bazama podataka dostupnim javnosti, kao što su GenBank i EMBL, nalazi 618337 prokariotskih 16S rRNA sekvenci, od kojih 482264 pripadaju prokariotima koji se ne mogu uzgojiti u kulturi (Turroni, 2008).

Metagenomika se bavi proučavanjem mikrobnih zajednica preko sekvenco-ovisnih kompozicijskih i/ili funkcionalnih analiza svih mikrobnih genoma pronađenih u uzorku uzetom sa određenog staništa. Za metagenomiku istraživanja mikrobnih zajednica crijeva, koriste se mukozni i fekalni uzorci (Ventura, 2009).

3. Uloga mikrobnih zajednica i njihov utjecaj na doma ina

Mikrobni ekosistem u crijevima pruža dodatne funkcije koje doma in ne posjeduje i zato je bitan za ovjekov život (Turroni, 2008).

Prisutnost mikrobiota nije nužna za opstanak doma ina. Međutim, miševi bez mikrobiota trebaju 30% više energije u svojoj prehrani. Sisavci mogu hidrolizirati samo određene disaharide i apsorbirati monosaharide, kao što su glukoza i galaktoza, ali ne mogu degradirati većinu polisaharida. Tu nastupaju mikrobioti sa genima koji kodiraju za enzime koje doma in nema (Bik, 2009). Posjeduju gene uključene u mehanizam ugljikohidrata ali ne posjeduju gene uključene u metabolizam masnih kiselina što nam govori da koriste samo polisaharide kao izvor energije (Turroni, 2008).

Mikrobioti crijeva imaju sposobnost degradiranja brojnih ksenobiotika. Zanimljiv primjer je benzoat, uobičajeni dodatak hrani (E211), kojeg bakterije pretvaraju u prekursor biotina. To znači da dodaci hrani mogu imati pozitivnu ulogu u doprinisu ljudskom zdravlju (Qin, 2010).

Primarni fermentatori degradiraju glikane u kratke lanci masnih kiselina koje onda koristi doma in. Bogati su uključeni genima odgovornim za proizvodnju acetata, butirata, laktata i sukcinata (Turroni, 2008). Uključeni su u anabolizam aminokiselina i vitamina, uključujući i vitamine B1, B6 i K, esencijalnim za ljudsko zdravlje (Turroni, 2008, Bik, 2009).

Utječe na skladištenje masti tako što povećava unos glukoze te se time povećava koncentracija glukoze i inzulina u serumu doma ina. Glukoza i inzulin induciraju lipogenezu u jetri. Kratki lanci masnih kiselina koje stvaraju mikrobi fermentacijom također induciraju lipogenezu (Bäckhed, 2005).

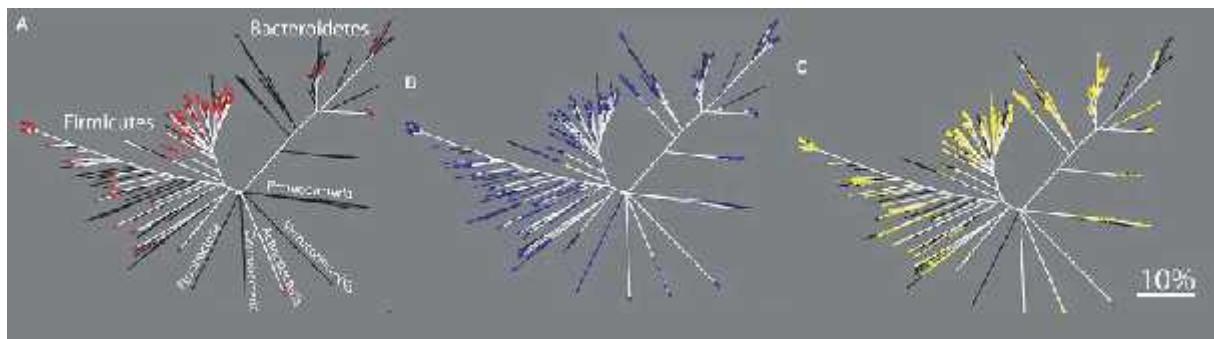
Metanogene arheje *M. smithii* predstavljaju posljednju kariku u metabolizmu lancu obrade polisaharida. Smanjuju parcijalni tlak vodika, tako što ga uklanjaju metanogenozom. Time povećavaju brzinu mikrobne fermentacije ugljikohidrata (Bäckhed, 2005, Turroni, 2008).

Mikrobioti stvaraju fizičku barijeru u obrani od patogena i proizvode antibakterijske peptide. Induciraju ekspresiju gena epitelnih stanica koje sudjeluju u proizvodnji mukoze, koja služi kao barijera i istovremeno pruža nutrijente za rast bakterija (Turroni, 2008). Utječe na postnatalno sazrijevanje epitela crijeva, povećavajući broj sekretornih žlijezda i endokrinih stanica i općenito ubrzavajući proliferaciju epitelnih stanica (Leser, 2009).

Osim na epitel, utječe i na imunološki sustav, sastav elektrolita, pH, jetru, endokrini sustav i ponašanje doma ina (Leser, 2009, Turroni, 2008)

4. Utjecaj genotipa doma ina, mikrobnih me uodnosa i okoliša na kompoziciju mikrobnih zajednica

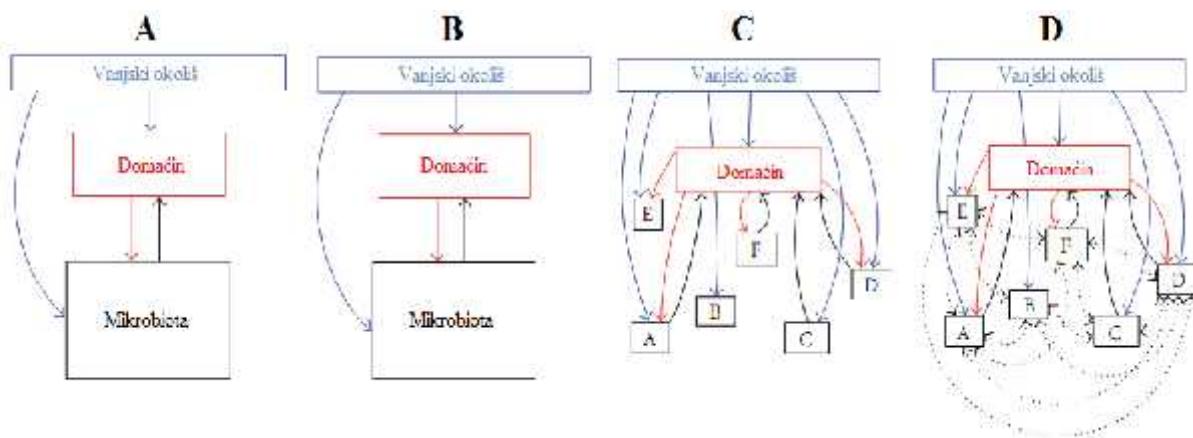
Kompozicija bakterijskih zajednica specifi na je za doma ina i stabilna kod zdravih odraslih pojedinaca. Primje ena je i velika varijabilnost izme u razli itih pojedinaca, koja se ne može povezati s geografski podrijetlom, dobi ili spolom (Zoetendal, 2006). Svaki ovjek ima zajednicu mikrobiota jedinstvenu po svom sastavu, isto kao što ima jedinstveni otisak prsta (Sl. 2.). Izme u zajednica razli itih ljudi postoje sli nosti i istraživanja u prošlosti su se uglavnom bavila tim sli nostima, u potpunosti zanemaruju i razlike (Dethlefsen, 2006).



Slika 2. Filogenetska stabla mikrobiota koji nastanjuju tri razli ite osobe napravljena pomo u 16S rRNA bakterijskih sekvenci. Crvena, plava i žuta boja predstavljaju raznolikost jedinstvenu za pojedinu osobu, bijela boja predstavlja bakterijske vrste zajedni ke ovim osobama, a crna boja predstavlja vrste koje nisu prona ene kod pojedine osobe. Osoba B posjeduje najve u raznolikost, a osoba A najmanju (preuzeto iz: Ley, 2006).

Odre ena struktura mikrobnih zajednica u ljudskim crijevima rezultat je prirodne selekcije koja djeluje na dvije razine. "Top-down" selekcija potje e od doma ina i prednost daje stabilnim zajednicama s mnogo suvišnih funkcija (Ley, 2006). Teži se sprje avanju toga da odre ena bakterijska vrsta ima esencijalnu ulogu jer bi njezin gubitak bio katastrofalan. Jedini izuzetak je arheja *M. smithii* jer jedina obavlja metanogenezu i zato se smatra klju nom vrstom u svim mikrobnim zajednicama crijeva (Turroni, 2008). "Bottom-up" selekcija potje e iz kompeticije me u lanovima zajednice, prisiljava mikrobiote da postanu funkcionalno specijalizirani. Dolazi do kompeticijskog isklju ivanja: neke vrste izumiru. Zato je cilj mikrobiota da prona u slobodnu nišu i specijaliziraju se za resurse koje nitko ne koristi.

Zajednice mikrobiota se mogu promatrati kroz etiri koncepta: zajednica mikrobiota je višestani ni organ koji je u interakciji s doma inom i okolišem (Sl. 3., pod A); složena od razli itih sojeva koji se ponašaju kao jedno u svojim interakcijama s doma inom i okolinom (Sl. 3., pod B); složena od razli itih sojeva koji svaki zasebno stupaju u interakciju s doma inom i okolinom (Sl. 3., pod C); dinami ka ekološka zajednica sastavljena od razli itih sojeva koji me usobno mogu stupiti u interakcije, a ne samo s doma inom i okolinom (Sl. 3., pod D). Svaki od ovih koncepata vodi do razli itih prepostavki i stoga svaki znanstvenik preferira druga iji koncept (Foxman, 2008).



Slika 3. etiri razli ita koncepta kroz koja je mogu e promatrati zajednice mikrobiota (preuzeto iz: Foxman, 2008).

Kad doma in nema koristi od zajednice mikrobiota, itava zajednica može izumrijeti ako doma in nakon smrti ne ostavi potomke. Ekološke teorije sugeriraju da je za selekciju u zajednici potrebno preseljenje zajednice na novo stanište. To se doga a kod kolonizacije tek ro enih doma ina. Tada se eliminiraju oni lanovi zajednice koji ne doprinose nekoj od funkcija koje zajednica obavlja. Na taj se na in zajednice rješavaju "varalica" (Ley, 2006).

Prvotno se mislilo da se zajednice mikrobiota sastoje od superiornijih vrsta koje zauzimaju stabilni set niša. Danas se smatra da jedinstvena povijest svake zajednice i unutrašnja dinamika imaju zna ajan utjecaj na njihovu strukturu u ljudskim crijevima.

Iako mnogo faktora utje e na sastav mikrobnih zajednica crijeva, u daljem tekstu objašnjen je utjecaj genotipa doma ina, mikrobne interakcije i prehrana. Ove tri kategorije su do sada najbolje objašnjene i najlakše za razumijevanje (Dethlefsen, 2006).

4.1. Genotip doma ina

Zajednice specifične za određene doma ina razvijaju se odmah nakon rođenja doma ina. Ova saznanja ukazuju da najvjerojatnije sam genotip doma ina utječe na strukturu zajednica. Uspoređivan je sastav mikrobnih zajednica crijeva između pojedinaca iz istih obitelji i onih koji nisu u srodstvu (Zoetendal, 2006). Pokazalo se da je sastav mikrobnih zajednica monozigotnih blizanaca vrlo sličan, ali opet ništa slično nije bilo u srodnicima s manjom genetskom podudarnošću.

Doma ina ima snažan utjecaj na kompoziciju mikrobnih zajednica koje ga nastanjuju preko vlastitog imunološkog sustava. Imunološki sustav ne eliminira određene vrste, već grupe koje spadaju u istu funkcionalnu skupinu (Ley, 2006).

Urođeni imunološki sustav doma ina stupa u kontakt s mikrobiom preko Toll-like (TLR) i Nod-like (NLR) receptora. TLR se uglavnom nalaze u transmembranskoj regiji stanice doma ina, dok su NLR proteini smješteni u citoplazmi. Obje grupe receptora sadrže ponavljanja bogata leucinom (LRR) koja su uključena u detekciju signala koji upućuju na opasnost, prisutnost bakterija ili bakterijskih produkata preko molekularnih uzoraka karakterističnih za patogene (PAMP, "pathogen associated molecular patterns"). Signaliziranje pomoći u PAMP-a nije bitno samo za prepoznavanje patogenih bakterija, već i za održavanje homeostaze epitela crijeva i za zaštitu od ozljeda (Khachatriyan, 2008).

Mukozna barijera ne sprječava imunološki sustav ovjeka da dođe u kontakt s mikrobnim organizmima. Ipak, neki smatraju da imunološki sustav ne utječe toliko na sastav zajednica, već ima ulogu u održavanju imunološke tolerancije na normalne mikrobe koji nastanjuju crijeva jer ne dopušta penetraciju tih organizama u tkivo doma ina.

Genotip doma ina takođe utječe i na broj mesta dostupnih za prihvatanje mikrobiota (Dethlefsen, 2006). Doma ina posjeduje mehanizme pomoći u kojih prepoznaje vlastite mikrobiote od patogenih. Epitelne i dendritičke stanice prepoznaju lipoproteine (Gram negativne bakterije) i lipopolisaharide (Gram pozitivne bakterije) na površini bakterija preko veznih mesta (Turroni, 2008).

4.2. Mikrobne interakcije

Prvotno se mislilo da se zajednice mikrobiota sastoje od superiornijih vrsta koje zauzimaju stabilni set niša. Danas se smatra da jedinstvena povijest svake zajednice i unutrašnja dinamika imaju značajan utjecaj na strukturu zajednica u ljudskim crijevima.

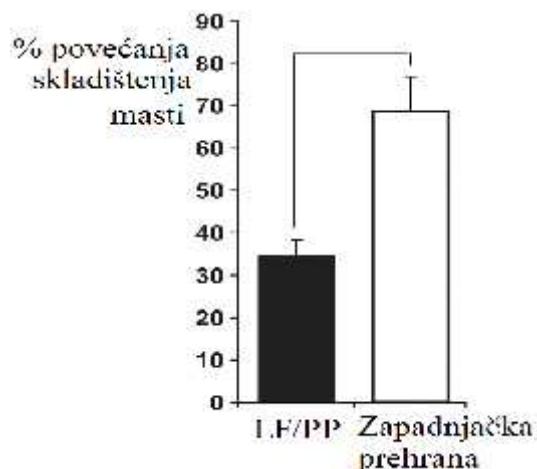
Mikrobioti svojim djelovanjem imaju sposobnost utjecati na uvjete u svom staništu i na taj način formiraju različite niše za sebe, ali i druge mikrobiote. Prisutna je i interspecijska kompeticija koja uključuje natjecanje za resurse i mesta za prihvatanje. Različite vrste koriste i interferencijske mehanizme kojima se bore za opstanak u vlastitim nišama. U te mehanizme spada proizvodnja toksičnih metabolita i specifičnih antimikrobnih komponenti, kao što su bakteriocini. Utjecaj bakteriofaga takođe nije zanemariv.

Na sastav zajednica utječe i specifični uvjeti u crijevima, u kojima postoji mnoštvo odjeljaka sa posebnim fizikalno-kemijskim faktorima, kao što su vrijeme zadržavanja, dostupnost kisika i pH (Dethlefsen, 2006). Mikrobioti posjeduju sve potrebne karakteristike koje im omogućuju život na ovako posebnom staništu: enzime za upotrebu dostupnih nutrijenata, molekule na površini koje im omogućuju prihvatanje, sposobnost za brzi rast kako bi izbjegli ispiranje, te otpornost na stresne uvjete vanjskog okoliša koje moraju preživjeti kako bi uspjeli prije i s jednog doma u drugog (Ley, 2006).

Postoji i interspecijska suradnja koja se održava tijekom hidrolize kompleksnih ugljikohidrata i fermentacije dobivenih šehera, ali i u razmjeni faktora rasta (Dethlefsen, 2006). Mikrobioti stvaraju hranične mreže u kojima produkt jedne bakterije postaje supstrat druge (npr. metanogene arheje koje koriste vodik u stvaranju metana). Na taj način se sprjeavlja nakupljanje produkta i to djeluje termodinamički povoljno za bakteriju koja proizvodi taj produkt (Ley, 2006). Konkretni primjer je odnos *B. thetaiotaomicron* i *Eubacterium rectale*. *B. thetaiotaomicron* se prilagođava na prisutnost drugih bakterija tako što modificira ekspresiju vlastitih gena. U prisutnosti *E. rectale* regulira svoje gene tako da proširi svoju nišu kako bi mogao koristiti izvore energije koji su nepristupačni *E. rectale*. Takođe se pokazalo da *E. rectale* ima bolji pristup nutrijentima u prisutnosti *B. thetaiotaomicron*. *E. rectale* koristi acetat koji stvara *B. thetaiotaomicron* u stvaranju butirata (Mahowald, 2009).

4.3. Prehrana i pretilost

Prehrana i hranidbeni status su me u najvažnijim imbenicima koji utje u na ljudsko zdravlje. Na hranjivu vrijednost hrane dijelom utje e i crijevna mikrobna zajednica (mikrobiota) i njezini geni (mikrobiom). U istraživanju utjecaja prehrane na sastav mikrobiota korišteni su miševi bez vlastitih mikrobiota u koje je transplatirana svježa ili zamrznuta fekalna mikrobna zajednica ovjeka. Takvi miševi su stavljeni na prehranu siromašnu mastima i bogatu bilnjim polisaharidima (LF/PP, "low fat/plant polysaccharide") kroz odre en period. Zatim je polovica miševa preba ena na "zapadnja ku" prehranu, a ostatak je ostao na LF/PP prehrani. To je dovelo do promjene u strukturi mikrobiota, promjene u metabolizmom putovima i u ekspresiji gena mikrobioma miševa preba enih na "zapadnja ku" prehranu u samo jednom danu. Sastav mikrobiota miševa na LF/PP prehrani stabilizirao se nakon 28 dana, a sastav mikrobiota miševa na "zapadnja koj" prehrani stabilizirao se ve nakon 7 dana. U crijevu miševa na "zapadnja koj" prehrani pove ana je relativna gusto a razreda *Erysipelotrichi* i *Bacilli* iz reda *Firmicutes* te zna ajno smanjenje gusto e lanova reda *Bacteroidetes* u usporedbi s miševima na LF/PP prehrani. Pohrana masti tako er je pove ana kod miševa na "zapadnja koj" prehrani nego kod miševa na LF/PP prehrani (Sl. 4.) (Turnbaugh, 2010).



Slika 4. Prikaz pove anog skladištenja masti kod miševa na "zapadnja koj" prehrani (preuzeto iz: Turnbaugh, 2010).

Drugo istraživanje bavilo se uspore ivanjem fekalnih mikrobiota djece iz Europe (EU) i djece iz ruralnog afri kog sela Burkina Faso (BF), ija je prehrana bogata vlaknima te je stoga sli na prehrani u ranoj ovjekovoj povijesti u vrijeme pojave poljoprivrede. BF djeca imaju

ve u gusto u vrsta iz reda *Bacteroidetes*, a smanjen broj vrsta reda *Firmicutes* te obilje bakterija roda *Prevotella* i *Xylanibacter*. Ovi rodovi sadrže gene za hidrolizu celuloze i ksilana, koji nedostaju kod EU djece. Tako er, BF djeca imaju puno više kratkih lanaca masnih kiselina nego EU djeca. Pretpostavka je da su njihovi mikrobioti koevulirali zahvaljuju i prehrani bogatoj polisaharidima i zato imaju pove anu mogu nost pohrane energije i štite ih od upala i ostalih bolesti crijeva (De Filippo, 2010).

Bakterija *B. thetaiotaomicron* je primjer kako prehrana djeluje na ekspresiju gena mikrobiota. Kada u prehrani nedostaje biljnih polisaharida, bakterija *B. thetaiotaomicron* regulira vlastitu ekspresiju gena i po ine se hraniti glikanima doma ina (Mahowald, 2009).

Prebiotici su neprobavljni oligosaharidi koji služe za "fertilizaciju" mikrobiota, poti u i rast korisnih bakterija (npr. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*). Poznati prebiotici koji danas dobivaju sve više pažnje su inulin i oligofruktosa. Naj eš i izvori prebiotika su pšenica, luk, banana, ešnjak i poriluk. Konzumacija prebiotika pokazala je pozitivne u inke u sprje avanju upala, crijevnih infekcija i u smanjenju rizika za osteoporozu (zbog pove ane dostupnosti kalcija). Utje u i na miši nu masu, ne samo na kosti, smanjuju rizik od sr anih bolesti, pretilost te za dijabetes tipa 2.

Probiotici su nepatogeni živi mikroorganizmi koji, kada se unesu prehranom, doprinose zdravlju doma ina. Konzumacija probiotika preporu a se u preventivne svrhe za održavanje stabilnosti strukture mikrobiota. Nedavno je dokazano da probiotici poboljšavaju zdravlje jetre u bolestima koje nisu prouzro ene alkoholom, npr. kod bolesti masne jetre (NAFLD). Smatra se da mikrobioti imaju važnu ulogu u napredovanju ove bolesti prema cirozi jetre. Kada je zajednica bogata fakultativnim mikrobima (npr. *Enterobacteriaceae*) i siromašna anaerobnim vrstama (npr. *Bifidobacteria*), rezultat je pove ana koncentracija amonijaka i endotoksina. Probiotici doprinose pove anju broja anaerobnih vrsta (Furtado, 2009).

Kalorijska vrijednost hrane uvijek je ozna ena na ambalaži u koju je pakirana kao stalna i nepromjenjiva vrijednost. Ipak, ini se da kalorijska vrijednost hrane varira ovisno o osobi koja je konzumira ako se uzme u obzir utjecaj mikrobiota na efikasnost pohrane energije. Zajednice koje su efikasnije svojim e doma inima pove avati šansu za pretilost (Bäckhed, 2005). To je razlog zašto se pretilost ponekad javlja i kod ljudi koji se ne prejedaju. Istraživanja na miševima su pokazala da pretili miševi imaju i do 50% manje bakterija iz reda *Bacteroidetes* i više bakterija iz reda *Firmicutes*, nego njihovi vitki srodnici (Furtado, 2009).

5. Razvoj mikrobnih zajednica kod novorođene djece

Odmah nakon poroda svaki ovjek razvija složeni i aktivni crijevni ekosistem u prethodno sterilnom okolišu. U samo nekoliko dana gastrointestinalni trakt novorođene djece postaje dom velike zajednice bakterija, iji broj ubrzo dosegne broj stanica doma ina (Turroni, 2009). Formiranje mikrobiota kod novorođene djece bitno je zbog razvoja urođenog imunološkog sustava i razvoja probavne cijevi (Morowitz, 2011).

Vrsta poroda ima jak utjecaj na sastav mikrobiota novorođene djece, pogotovo u prva tri dana života. Djeca rođena normalnim putem kolonizirana su mikroorganizmima koji se nalaze u majčinoj rodnicici i crijevima, a ona rođena carskim rezom (CS, "Caesarean section") uglavnom su kolonizirana mikroorganizmima iz okoliša. Kao rezultat toga, sastav mikrobiota normalno porodjene djece i CS djece se uvelike razlikuje. CS djece imaju smanjenu gusto u *Bifidobacteria* sp., iako se kod nekih mogu pronaći dominantne vrste kao što su *B. longum* i *B. catenulatum*. Također, CS djece su još u kolonizirana s *Clostridium difficile*. Kod takve djece imunološki sustav se sporije razvija pa kasnije još u pate od alergija ili nekih drugih bolesti. Tek nakon 10 dana *Lactobacillus* bakterije koloniziraju crijeva CS djece, a *Bifidobacterium* nakon mjesec dana, pa tako i tada je njihova gusto a puno manja nego ona kod djece rođene normalnim putem. Pod pretpostavkom da kolonizacija mikrobioma ima dugorođeni utjecaj na zdravlje ovjeka, vrsta poroda igra bitnu ulogu za život ovjeka (Biasucci, 2010).

U jednom istraživanju proučavan je utjecaj majčinog mlijeka, umjetne hrane za novorođene, umjetne hrane s dodatkom prebiotika i majčinim mlijekom majki koje su se hranile probioticima. Promatran je utjecaj na sastav roda *Bifidobacterium*, koji je jedan od dominantnih rodova u crijevu novorođene djece. *B. infantis*, *B. longum* i *B. breve* su uglavnom vrste tog bakterijskog roda koje su pronađene u crijevu novorođene djece, a kod odraslog ovjeka su pronađene vrste *B. adolescentis* i *B. catenulatum*. Dokazan je pozitivan utjecaj majčinog mlijeka, jer djece hranjena njima kasnije imaju manje problema s alergijama, proljevom, astmom i gastrointestinalnim infekcijama nego one hranjena umjetnom hranom. Mikrobioti djece hranjene majčinim mlijekom posjeduju veću gusto u rodu *Bifidobacterium* s navedenim vrstama karakterističnim za novorođene, nego djece hranjena umjetnom hranom za novorođene. Isto tako, pokazan je i pozitivan u inak probiotika u majčinoj prehrani. Ipak, ako se u takvu komercijalnu hranu dodaju prebiotici, npr. neki oligosaharidi, oni stimuliraju rast bifidobakterija. Prebiotici mogu imati i negativni u inak na mukozu crijeva, tako da njihova korisnost još uvijek nije do kraja istražena (Rinne, 2004).

6. Bolesti uzrokovane promjenom u kompoziciji mikrobnih zajednica

Od kad je Robert Koch razvio teoriju klica u razvoju bolesti krajem 19. st., klinički mikrobiolozи svoju pažnju pridaju samo stranim patogenima. Svi ostali mikroorganizmi koji nastanjuju ljudsko tijelo bili su zanemarivani (Buchen, 2010). Danas se zna da cijela zajednica mikroorganizama koji normalno nastanjuju crijeva može biti patogena kada se kompozicija zajednice poremeti iz nekog razloga (Ley, 2006).

UPALE DEBELOG CRIJEVA

Upale debelog crijeva (IBD, "inflammatory bowel disease") javljaju se zbog poremećenog imunološkog odgovora koji tretira normalne stanovnike crijeva kao patogene (Dethlefsen, 2006). Istraživanja su pokazala da se kod bolesnika s IBD smanji bakterijska i metanogena raznolikost, a povećana količina gljivica. Vrste gljivica ili bakterija specifične za ovu bolest još nisu identificirane. Neke studije pokazuju da IBD bolesnici posjeduju povećanu količinu *Enterobacteria* (Reiff, 2010).

Chronova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC) dva su glavna oblika IBD. CD može pogoditi bilo koji dio gastrointestinalnog trakta, ali se pretežito javlja u donjem ileumu i debelom crijevu. UC je bolest slična CD, ali se javlja isključivo u distalnom dijelu crijeva.

Bolesnici sa CD imaju reducirani kompleksnost bakterijskog reda *Firmicutes* i preveliku prisutnost vrsta koja spadaju u *Porphyromonadaceae* (Turroni, 2010). To se događa zbog poremećene "komunikacije" između domaćina i mikrobiota te se javlja snažan i agresivan imunološki odgovor na antigene koji pripadaju normalnim mikroorganizmima u sastavu mikrobiota (Khachatrian, 2008).

Neki patogeni također mogu potencijalno biti uzročni CD, kao što su *Chlamydia pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycobacterium avium* i *E. coli* (Reiff, 2010).

DIJABETES TIPA 2

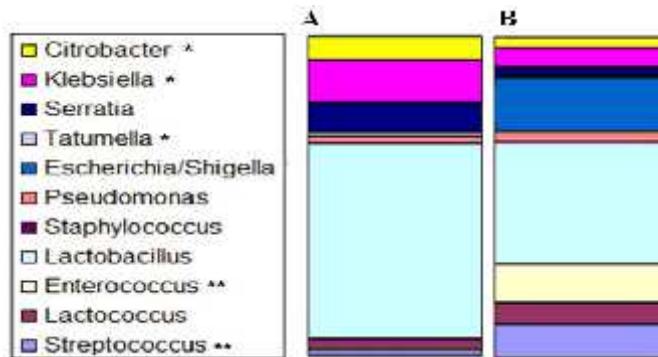
Dijabetes tipa 2 je također povezan s kompozicijskim promjenama mikrobiota. Relativna gustoća reda *Firmicutes* i pripadajućeg razreda *Clostridia* je znatno manja, a redova *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* i pripadajućeg razreda *Betaproteobacteria* veća u usporedbi s kompozicijom mikrobiota zdravih ljudi. Pretilost je jedan od uzroka dijabetesa tipa 2 (Larsen, 2010).

AUTIZAM

Djeca s autizmom imaju gastrointestinalne probleme koji uključuju bol u abdomenu, zatvorenost, proljev i napuhnutost. Ti simptomi su najvjerojatnije povezani s poremećajem u sastavu mikrobiota, koji dovodi do povećanog rasta potencijalno patogenih mikroorganizama. Roditelji djece s autizmom imaju napominju da se gastrointestinalni problemi i simptomi u ponašanju javljaju istovremeno, što znači da postoji povezanost. U fekalnim uzorcima djece s autizmom i njihovih zdravih srodnika pronađena je veća gustoća *Clostridium histolyticum* nego u fekalnim uzorcima zdrave djece. Poznato je da *C. histolyticum* proizvodi toksine i doprinosi lošem funkcioniranju crijeva (Parracho, 2005).

NEKROTIZIRAJUĆI ENTEROKOLITIS

Nekrotizirajući enterokolitis (NEC) je upalna nekroza crijeva koja pogradi 5 – 10% novorođenika s porođajnom težinom manjom od 1500 grama. NEC se uobičajeno otkriva u poodmaklom stadiju i zato rezultira velikom smrtnošću. Njegovo ranije otkrivanje omogućilo bi bolje razumijevanje same bolesti i njezinih uzroka. Otkriveno je da su *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Tatumella* (Gram negativne bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae*) povezane sa NEC (Sl. 5.). Istraživanja su rađena na miševima (Carlisle, 2011).



Slika 5. Usporedba mikrobiota miševa sa NEC-om (A) i zdravim miševima (B). Grupe bakterija označene * prisutne su u većem broju kod oboljelih miševa, a grupe označene s ** kod zdravih miševa (preuzeto iz: Carlisle, 2011).

OSTALE BOLESTI

Poremećaji u kompoziciji mikrobiota također utječu na sklonost alergijama, astmi i raku debelog crijeva. Alergije i astma se mogu pojaviti u odrasloj dobi zbog upotrebe antibiotika u djetinjstvu (Dethlefsen, 2006).

E. coli može metabolizirati neke vanjske toksine u toksi ne mikrometabolite, kojima se bavi metabolomika. Tako mogu nastati neurotoksini koji mogu rezultirati razvitkom hiperaktivnog poreme aja nedostatka koncentracije (ADHD, attention-deficity hyperactivity disorder) i Tourette-ovog sindroma (Jia, 2008).

7. Utjecaj terapija i antibiotika u lije enju bolesti na kompoziciju mikrobnih zajednica

Za razliku od ljudskog genoma, s kojim se slabo može manipulirati pomo u ksenobiotika, kompozicija mikrobiota se lako može mijenjati. Plasti nost mikrobioma omogu ava specifi nu ili sistemati nu manipulaciju. Nova saznanja bi mogla revolucionarizirati strategije za lije enje raznih bolesti.

Zajednica mikrobiota metaboli ki obra uje neke lijekove te toksi ne tvari koje unosimo u organizam. Na primjer, ginsenozid je osnovna bioaktivna komponenta lijeka Radix Ginseng. Ginsenozid Rb1, saponon propopanadoksadiola, biva metaboliziran pomo u -D-glukozidaze mikrobiota u 20-O- -D-glukopiranozil-20(S)-protopanaksadiol koji ima antitumorsko i antialergijsko djelovanje.

Cilj djelovanja lijeka trebala bi biti dobro poznata bakterija koja se nalazi u sastavu mikrobiota. Može se djelovati na bakterije ija pove ana koncentracija uzrokuje neke bolesti pomo u antibiotika ili cjepiva koja bi senzibilizirala imunološki sustav doma ina protiv te odre ene bakterije. Nedostaci su široki spektar djelovanja antibiotika i prilagodba bakterija na antibiotik.

Prema drugoj strategiji, prvo bi bilo potrebno prou iti simptome pojedinih bolesti i otkriti njihove uzro nike. Zatim, kombinacijom antibiotika, probiotika, prebiotika i laksativa djelovati na itavu zajednicu i pokušati povratiti homeostazu.

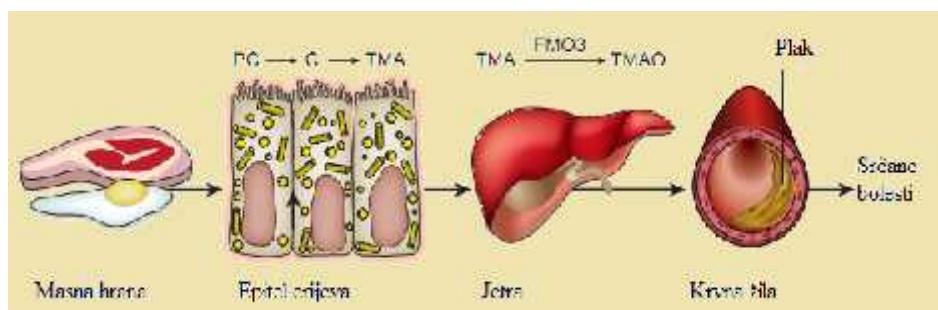
Važna je i injenica da se odre eni bioaktivni metaboliti mogu proizvoditi u životinjama i biljkama i služiti kao izvor novih lijekova. Npr., mikrobne zajednice nekih morskih spužvi proizvode metabolite protiv razvitka raka (Jia, 2008).

Antibiotici mogu imati negativan u inak na sastav zajednica i njihov odnos prema doma inu. Posljedice uzimanja antibiotika mogu biti dugotrajne i dovoditi do kroni nih stanja kao što je astma. U ve ini slu ajeva se kompozicija mikrobiota vrati u prvotno stanje unutar

nekoliko dana ili tjedana nakon prestanka uzimanja antibiotika. Nekad se to ne dogodi godinama.

Kompozicija mikrobiota tri zdrava ovjeka uspore ivana je prije i nakon uzimanja antibiotika ciprofloksacina. Zaklju eno je da ciprofloksacin djeluje na relativnu gusto u tre ine bakterijskih svojti mikrobiota te smanjuje bogatstvo zajednica i nekih svojti. Ja ina djelovanja antibiotika varirala je kod razli itih pojedinaca. Kompozicija mikrobiota se vratila u stanje sli no prvotnom ve etiri tjedna nakon prestanka uzimanja antibiotika, dok se neke svojte nisu oporavile niti nakon 6 mjeseci.

Možemo zaklju iti da promjene u kompoziciji mikrobiota ne moraju utjecati na funkcije crijeva. Na taj je na in dokazana hipoteza da su mikrobne zajednice raznolike kako bi imale više vrsta koje obavljaju iste funkcije. Tako se sprje ava nastajanje klju nih vrsta, iji bi gubitak bio fatalan za zajednicu i doma ina. Ipak, prisutnost dominantnih metabolikih funkcija ne mora zna iti prisutnost specijaliziranih aktivnosti kao što je utjecaj na imunološki sustav i sli no (Dethlefsen, 2008).



Slika 6. Shematski prikaz nastanka TMAO iz fosfatidilkolina (preuzeto iz: Rak, 2011).

Poznato je da hrana bogata zasi enim masnim kiselinama i ugljikohidratima dovodi do pojave sr anih bolesti. Tako er je kod bolesnika s aterosklerozom detektiran trimetilamin *N*-oksid (TMAO), metabolit koji nastane obradom fosfatidilkolina. Poznata su još dva metabolita nastala obradom fosfatidilkolina, a to su kolin i betain. Kolin je esencijalni nutrijent i koristi se u lije enju bolesti masne jetre koja nije uzrokovana alkoholom. Me utim, pokazalo se da se kolin otpušten iz fosfatidilkolina enzimom fosfolipazom u crijevu mikrobiotima metabolizira u trimetilamin (TMA). TMA dospijeva u jetru i tamo se pomo u flavin monooksigenaze (FMO3) pretvara u TMAO (Sl. 6.). Kolina ima puno u masnoj hrani, pa bi se takva prehrana trebala izbjegavati kako bi se smanjio rizik od sr anih bolesti. Ipak, kolin se ne smije potpuno izbaciti iz prehrane jer je esencijalan u nekim metabolikiim putovima. Ovaj primjer ukazuje nam na probleme koji mogu nastati ako se zanemare mikrobioti (Rak, 2011).

8. Literatura:

- Carlisle E. M., Poroyoko V., Caplan M. S., Alverdy J. A., Liu D., 2011. Gram negative bacteria are associated with the early stages of necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE* 6: 1 – 7
- Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A., Gordon J. I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915
- Biasucci G., Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos C., 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* 86: S13 – S15
- Bik E. M., 2009. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutrition Reviews* 67: S164 – S171
- Buchen L., 2010. The new germ theory. *Nature* 464: 492 – 495
- De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poulet J. B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P., 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS Early Edition* 1 – 6
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M. L., Relman D. A., 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology* 6: 1 – 18
- Dethlefsen L., Eckburg P. B., Bik E. M., Relman D. A., 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 517 – 523
- Foxman B., Goldberg D., Murdock C., Xi C., Gilsdorf J. R., 2008. Conceptualizing human microbiota: from multicelled organ to ecological community. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Article ID* 61739: 1 – 5
- Furtado M., 2009. Probiotics, prebiotics, gut microbiota, and obesity. *Bariatric Times* 6: 27 – 30
- Jia W., Li H., Zhao L., Nicholson J. K., 2008. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 123 – 131
- Khachatrian Z. A., Ktsoyan Z. A., Manukyan G. P., Kelly D., Ghazaryan K. A., Aminov R. I., 2008. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut

microbiota. *PLoS* 3: 1 – 16

- Larsen N., Vogensen F. K., van den Berg F. W. J., Nielsen D. S., Andreasen A. S., Pedersen B. K., Abu Al-Soud W., Sørensen S. J., Hansen L. H., Jakobsen M., 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE* 5: 1 – 10
- Leser T. D., Mølbak L., 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology* 11: 2194 – 2206
- Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124: 837 – 848
- Mahowald M. A., Rey F. E., Seedorf H., Turnbaugh P. J., Fulton R. S., Wollam A., Shah N., Wang C., Magrini V., Wilson R. K. i sur., 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *PNAS Early Edition* 1 - 6
- Morowitz M. J., Denef V. J., Costello E. K., Thomas B. C., Poroyoko V., Relman D. A., Banfield J. F., 2011. Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in premature infant. *PNAS* 108: 1128 – 1133
- Parracho H. M. R. T., Bingham M. O., Gibson G. R., McCartney A. L., 2005. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology* 54: 987 – 991
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Maninchanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T. i sur., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65
- Rak K., Rader D. J., 2011. The diet-microbe morbid union. *Nature* 472: 40 – 41
- Reiff C., Kelly D., 2010. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 25 – 33
- Rinne M. M., Gueimonde M., Kalliomäki M., Hoppu U., Salminen S. J., Isolauri E., 2004. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43: 59 – 65
- Turnbaugh P. J., Ridaura V.K., Faith J. J., Rey F. E., Knight R., Gordon J. I., 2010. The effect

on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice.
Sci Transl Med. 1: 1 – 19

Turroni F., Ribbera A., Foroni E., van Sinderen D., Venutra M., 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functioning. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 35 – 50

Ventura M., Turroni F., Canchaya C., Vaughan E. E., O'Toole P. W., van Sinderen D., 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Frontiers in Bioscience* 14: 3214 – 3221

Zaneveld J. R., Lozupone C., Gordon J. I., Knight R., 2010. Ribosomal RNA diversity predicts genome diversity in gut bacteria and their relatives. *Nucleic Acids Research* 38: 3869 – 3879

Zoetendal E. G., Vaughan E. E., de Vos W. M., 2006. A microbial world within us. *Molecular Microbiology* 59: 1689 – 1650

9. Sažetak

Jedan od kompleksnijih mikrobnih ekosistema na svijetu nalazi se upravo u nama samim. Mikrobioti su prona eni na koži, u ustima, nosu, ušima, rodnici i probavnom traktu. Svaki ovjek ima zajednicu mikrobiota jedinstvenu po svom sastavu. Bitni su jer obavljaju funkcije koje ovjek nije uspio ste i kroz evoluciju.

Istraživanja koja prou avaju složenost ovih ekosistema donedavno su izvo ena upotrebo tradicionalnih tehnika koje uklju uju uzgajanje mikroba u kulturama. Procijenjeno je da se manje od 1% bakterija može uzgojiti standardnim kultivacijskim tehnikama. Metagenomika i metode koje se zasnivaju na 16S rRNA sekvenci revolucionirale su razumijevanje mikrobne raznolikosti.

Mikrobioti doprinose prehrani doma ina pove avaju i efikasnost dobivanja energije i sintetiziraju i esencijalne vitamine. Utje u na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih stanica, pH i razvoj imunološkog sustava. Stvaraju fizi ku barijeru u obrani od patogena i proizvode antibakterijske peptide.

Odmah nakon poroda svaki ovjek razvija složeni i aktivni crijevni ekosistem u prethodno sterilnom okolišu. Sastav nastale zajednice ovisi o vrsti poroda i prehrani u prvim mjesecima života. Dokazana je prednost normalnog poroda pred carskim rezom i prehrana maj inim mlijekom pred komercijalnom dje jom hranom.

Kada se poremeti sastav mikrobiota, to može dovesti do razli itih bolesti: IBD, autizam, alergije, astma, dijabetes tipa 2 i sli no. Sastav mikrobiota može se poremetiti nepravilnom prehranom i uzimanjem antibiotika.

Kompozicijom mikrobiota može se manipulirati pomo u probiotika, prebiotika, antibiotika i nekih lijekova. Na taj se na in zajednica može vratiti u homeostazu i izlje iti bolesti koje nastupe kada se poremeti sastav mikrobiota.

10. Summary

The human body possesses one of the most complex microbial ecosystems. Microbiota have been found in the skin, mouth, nose, ears, vagina and intestinal tract. Each person has an unique composition of microbial community. They are important because they perform functions that humans failed to get through evolution.

Studies that examine the complexity of these ecosystems were recently performed using conventional techniques that involve breeding of microbes in culture. It is estimated that less than 1% of bacteria can breed standard cultivation techniques. Metagenomics and methods based on 16S rRNA sequences have revolutionized the understanding of microbial diversity.

Microbiota contribute to host nutrition by increasing the efficiency of harvesting energy and synthesizing essential vitamins. They affect proliferation and differentiation of epithelial cells, pH, and the development of the immune system. Create a physical barrier of defense against pathogens and produce antibacterial peptides.

Immediately after birth each person develops a complex and active intestinal ecosystem in the previously sterile environment. Compositions are dependent on the type of birth and diet in the first months of life. Proven advantage of vaginal delivery is better than Cesarean section and that breast-feeding is better than commercial baby food.

When the composition of the microbiota is disturbed, it can lead to various diseases: IBD, autism, allergies, asthma, type 2 diabetes, ect. Composition of the microbiota can be disrupted by inadequate diet and antibiotics.

Composition of the microbiota can be manipulated using probiotics, prebiotics, antibiotics and some drugs. In this way, communities can return to homeostasis.