

# Raznolikost i uloga mikroba u intestinalnom traktu čovjeka

---

**Bolf, Nikolina**

**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:217:462605>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**RAZNOLIKOST I ULOGA MIKROBA  
U INTESTINALNOM TRAKTU  
OVJEKA**

**DIVERSITY AND ROLE OF  
MICROBES IN THE HUMAN  
INTESTINAL TRACT**

**SEMINARSKI RAD**

Nikolina Bolf  
Preddiplomski studij biologije  
Mentor: prof.dr.sc. Dijana Škori

Zagreb, 2011.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	3
2. MIKROBIOM USNE ŠUPLJINE.....	4
2.1. MIKROORGANIZMI USNE ŠUPLJINE.....	4
2.2. BAZA PODATAKA USNOG MIKROBIOMA .....	5
2.2.1. ANALIZA KLONOVA .....	6
3. CRIJEVNA KOLONIZACIJA MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI .....	7
3.1. GENOMSKA ANALIZA CRIJEVNE KOLONIZACIJE MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI .....	7
3.2. METAGENOMI KA OBRADA PODATAKA.....	9
3.2.1. ANALIZA SOJEVA <i>CITROBACTER</i> .....	10
3.2.2. <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	10
4. UTJECAJ PREHRANE U OBLIKOVANJU CRIJEVNOG MIKROBIOMA KOD DJECE IZ EUROPE I AFRIKE.....	11
4.1. DOMINACIJA <i>BACTEROIDETES</i> U DJECE IZ BURKINE FASO U USPOREDBI S DJECOM IZ ITALIJE .....	11
4.2. OMJER <i>FIRMICUTES</i> / <i>BACTEROIDETES</i> ( F/B) .....	13
4.3. BOGATSTVO MIKROORGANIZAMA I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST .....	13
5. UTJECAJ CRIJEVNOG MIKROBIOMA NA RAZVOJ MOZGA I PONAŠANJE.....	14
5.1. UTJECAJ NORADRENALINA (NA), DOPAMINA (DA) I 5-HT-a U STRIJATUMU MIŠEVA.....	14
5.1.1. EKSPRESIJA SINAPTI KO-PLASTI NIH SRODNIH GENA U MIŠEVA ....	15
5.1.2. UTJECAJ MIKROBNE KOLONIZACIJE NA PROTEINSKU EKSPRESIJU U MIŠEVA.....	15
6. ZAKLJU AK .....	16
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY .....	18
9. LITERATURA.....	19

## **1. UVOD**

Bakterije su jednostani ni organizmi za koje se vjeruje da su bili prva živa bična na Zemlji. Prema sistematici, one zasebno čarstvo mikroskopskih jednostaničnih aranžmana. Budući da su jednostavne, građe te ne posjeduju jezgru i organele ubrajaju se među prokariote. I dok neke uzrokuju bolesti, druge bakterije se normalno razvijaju u našim tijelima, na primjer u probavnom traktu. Od 1500 opisanih vrsta bakterija, samo su stotinjak vrsta ljudski patogeni (<http://vijesti.gorila.hr/gorilopedia/lifestyle/zdravlje/bakterije>).

Pretpostavlja se da postoji preko 500 različitih vrsta bakterija u prosječnom ljudskom intestinalnom traktu. Budući da u intestinalnom traktu nema mnogo kisika, prevladavaju anaerobne bakterije. Procjenjuje se da postoji oko 10-100 trilijuna stanica bakterija u intestinalnom traktu, u tijelu koje nije pod antibioticima te da 10-50 % stanici nog volumena otpada na bakterije (<http://dira.forums-free.com/bakterije-mikroorganizmi-u-gastrointestinalnom-traktu-t493.html>).

U ovom radu je literaturno istraženo kako sve bakterije iz intestinalnog trakta mogu utjecati na organizam, koje vrste su zastupljene u organizmu s obzirom na način života te kakve promjene izazivaju. Proučavani su mikroorganizmi iz usne šupljine s ciljem da se svoje unesu u bazu podataka usnog mikrobioma pod nazivom HOMD (*Human Oral Microbiome Database*) te da se identificiraju i da im se odredi brojnost. Također, istraženo je kako bakterije iz intestinalnog trakta utječu na mozak i ponašanje u miševa, zatim koju ulogu imaju prehrambene navike u raznolikosti bakterija kod djece koja žive u različitim kulturama i koje se skupine bakterija uzetih iz fekalnih uzoraka javljaju kod nedonošadi u određene dane, ovisno kako je dijete tretirano.

## **2. MIKROBIOM USNE ŠUPLJINE**

Usna šupljina sadržava nekoliko različnih staništa uključujući i zube, jezik, gingivni sulkus, obraze, nepce te krajnike koje su nastanile bakterije. Usni mikrobiom sadržava više od 600 svojstava, a one prevladavaju na razini vrste (Dewhirst i sur., 2010).

Prvi cilj ovog istraživanja bio je prikupiti sekvene gena za 16S rRNA u bazu podataka usnog mikrobioma tzv. HOMD. HOMD obuhvaća 619 svojstava koje su raspoređena u 13 koljena: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SR1*, *Synergistetes*, *Tenericutes* i *TM7*. Drugi cilj je bio analizirati 36043 gena za 16S rRNA na kojima su provodena istraživanja te identificirati i odrediti relativnu brojnost svojstava (Dewhirst i sur., 2010).

Provodila se analiza 1179 svojstava, od kojih su 24% bile imenovane, 8% su bile neimenovane, a 68% ih je bilo neobraćeno. Većina tih svojstava su priznate prije svega po svojoj sekvenci gena za 16S rRNA. HOMD nudi "alat" za pretraživanje svih bakterija usnog genoma i javno je dostupan ([www.homd.org](http://www.homd.org)).

### **2.1. MIKROORGANIZMI USNE ŠUPLJINE**

Mikroorganizmi koji se nalaze u usnoj šupljini imaju naziv oralna mikroflora, oralni mikrobiota ili oralni mikrobiom. Pojam mikrobiom uveo je Joshua Lederberg, a označava ekološke zajednice u simbiozi te patogene mikroorganizme koji naseljavaju ljudsko tijelo (Dewhirst i sur., 2010).

Definiran je usni mikrobiom kao i svi mikroorganizmi koji se nalaze na ili u usnoj šupljini. Istraživanja su pokazala da su različite oralne strukture i tkiva naseljile različite mikrobne zajednice. Mikroorganizmi iz usne šupljine obuhvaćaju uzroke niza zaraznih bolesti, uključujući i karijes, parodontitis, endodontske infekcije, alveolarni osteitis te anginu (Dewhirst i sur., 2010).

## **2.2. BAZA PODATAKA USNOG MIKROBIOMA**

Dakle, u prvom dijelu istraživanja bilo je potrebno razviti privremenu taksonomsku shemu imenovanja za trenutno neimenovane vrste te staviti ove informacije u online-bazu podataka usnog mikrobioma (HOMD) koja će biti javno dostupna. Okosnicu HOMD-a ini set referentnih sekvenca gena za 16S rRNA koje se koriste za definiranje pojedinih svojstava u usnoj šupljini te stvaranje filogenetske strukture i taksonomske baze podataka. Po etni referentni skup 16S rDNA za HOMD se sastojao od više od 800 sekvenca. Nakon ulaska i usklajivanja tih sekvenca u bazu podataka DNA, bila su generirana filogenetska stabla. Ukupno 78 filotipova je identificirano i uklonjeno iz baze podataka (Dewhirst i sur., 2010).

Svaki takson dobio je broj usnog taksona (HOT). Postavljanje svojstava u više taksona bilo je važno zbog pozicije na filogenetskom stablu. Npr. *Eubacterium saburreum* smješten je u porodicu *Lachnospiraceae*, a ne *Eubacteriaceae*. *E. saburreum* nije usko povezana sa sojem rodom *Eubacterium* te će morati biti svrstana u novi rod i kasnije preimenovana (Dewhirst i sur., 2010).

Koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria* sadrže 96 % od svojstava, dok preostala koljena: *Euryarchaeota*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *SR1*, *Synergistetes*, *Tenericutes* i *TM7* sadrže ostalih 4 % od svojstava. Dakle, ukratko, HOMD sadrži svoje, opis za svaku svojtu, njen status, neimenovane ili neobraćene filotipove, referentni broj soja te linkove. Sadrži takođe i BLASTN "alat" za identifikaciju sekvenca 16S rDNA izolata klonova (Dewhirst i sur., 2010).

## **2.2.1. ANALIZA KLONOVA**

Za potvrivanje i proširivanje svojti uključnih u HOMD te bolje razumijevanje raznolikosti i raspodjele svojti usnog mikrobioma, analizirano je 36043 gena za 16S rRNA. Klonovi su pronađeni u 11 od 13 koljena bakterija uključnih u HOMD. Pronađeni su klonovi za bakterijska koljena: *Deinococcus* (3 kloni), *Acidobacteria* (1 klon) i *Cyanobacteria* (1 klon).

Klonovi ovih koljena mogu predstavljati prijelazno egzogene bakterije. Devetnaest klonova koji su otkriveni predstavljaju 4 biljke (kloroplasti). Kako ljudi jedu biljke, sekvene 16S rDNA biljnih kloroplasta otkriveni su i u usnoj šupljini. Identificirani su geni pšenice (*Triticum aestivum*) i manioke (*Manihot esculenta*). *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria* su mikrobiološke zajednice koje ine između 29% i 50 % svojti mikrobioma usne šupljine. Manje od 12 % svojti ine *Spirochaetes* i *Synergistetes*. *TM7*, *SR1* i *Chloroflexi* nisu zastupljeni ili je *SR1* prisutan u omjeru 1/5000 (Dewhirst i sur., 2010).

### **3. CRIJEVNA KOLONIZACIJA MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI**

Crijevni mikrobiom je kritična odrednica ljudskog zdravlja. Promjene u njegovom sastavu su rezultirale kroničnim bolestima kao npr. pretilost te upalne bolesti crijeva, a mogu biti povezane i s neonatalnim nekrotizirajućim enterokolitisom u nedonošadi. Iako je crijevni mikrobiom odraslih vrlo promjenjiv između pojedinaca, pokazuje ograničenu raznolikost na razini reda: tek dvije bakterijske skupine (*Bacteroidetes* i *Firmicutes*) čine oko 90% svih mikroorganizama u tom mikrobiomu. Kod dojenadi, skupine crijevnih mikrobioma povezane su s razvojem uročenog imunog odgovora i terminalne diferencijacije crijevne strukture. Tek nakon prvog tjedna života u crijevu novorođeneta uspostavi se stabilna bakterijska flora (Morowitz i sur., 2010).

Normalnu zdravu mikrofloru čine rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Takva mikroflora rijetko se nađe u nedonošadi, dapače, u njih je uobičajen nalaz opasnih-patogenih bakterija kao *Enterococcus*, *Staphylococcus* ili *Enterobacteriaceae* (<http://www.zdravivot.com.hr/index.php?cat=probiotici>).

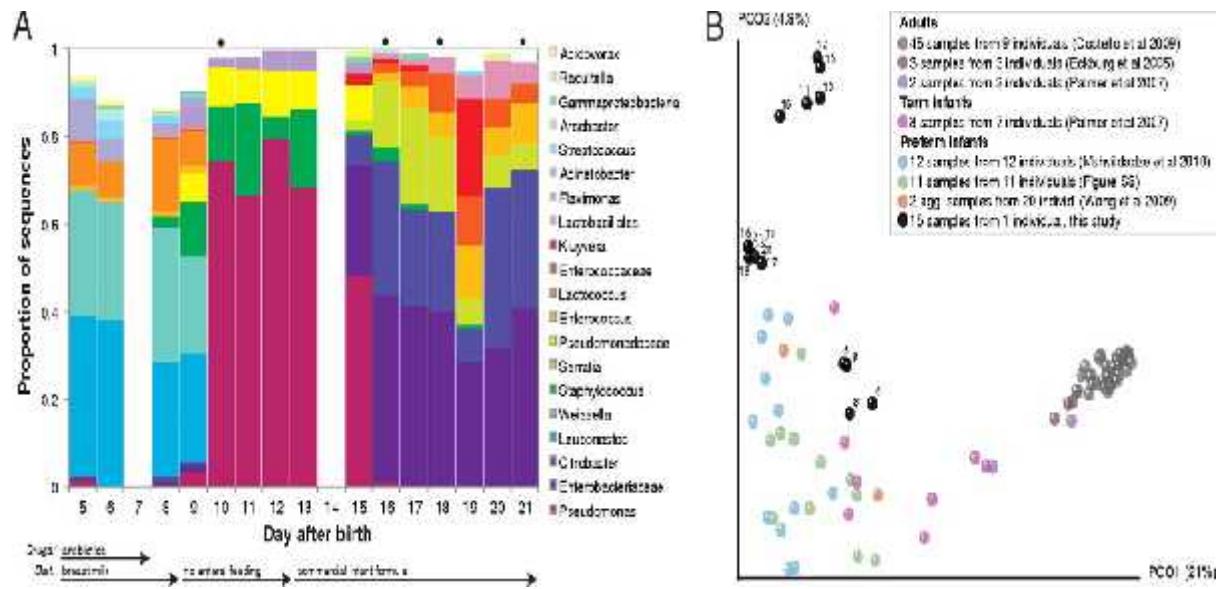
#### **3.1. GENOMSKA ANALIZA CRIJEVNE KOLONIZACIJE MIKROORGANIZAMA U NEDONOŠ ADI**

Istraženi su fekalni uzorci ženskog dojeneta rođenog carskim rezom u 28. tjednu trudnoće zbog prerane rupure membrane. Fekalni uzorci sakupljeni su od 5.-21. dana i tijekom tog perioda dijete je bilo različito tretirano. Sekvenciranjem bakterijskog 16S rRNA gena od prikupljenih 15 fekalnih uzoraka otkrivene su 3 različite zajednice (Morowitz i sur., 2010).

U razdoblju od 5.-9. dana, zajednica se u velikoj mjeri sastoji od robova *Leuconostoc*, *Weisella* i *Lactococcus* (Slika 1). Rodovi *Pseudomonas* i *Staphylococcus*, koji su rijetki 8. i 9. dan, postaju zastupljeniji 10. dan. U razdoblju od 10.-13. dana bogatstvo vrsta opada, a prevladava porodica *Pseudomonadaceae* (Morowitz i sur., 2010).

Nakon nastavka hranjenja djeteta, na 13. dan se pojavljuju svoje karakteristike za sljedeću fazu. Od 16.-21. dana dolazi do porasta bogatstva vrsta te većinu zauzima porodica

*Enterobacteriaceae* te rodovi *Citrobacter* i *Serattia*. Usporedbe sugeriraju da je dijete koje je istraživano imalo slične bakterije kao i druga nedonošad koja je istraživana jednakom metodom, osobito tijekom 1. i 3. kolonizacijske faze (Morowitz i sur., 2010).



**Slika 1.** (A) relativna brojnost 20 najdominantnijih bakterijskih vrsta u 15 fekalnih uzoraka prikupljenih od 5.-21. dana (sekvene su klasificirane na najvišu taksonomsku razinu koja bi mogla biti dodijeljena). To kice ukazuju na datume metagenomičkih istraživanja. Relevantne kliničke značajke prikazane su duž osi x. (B) glavne kordinatne analize UniFrac udaljenosti između fekalnih mikrobioma prikazane u nedavno objavljene ankete za odrasle (3,5,47), dojenadi (5) te nedonošadi (17,19). Svaki kružić prema boji odgovara sekvenci gena za 16S rRNA. Uzorci (crni krugovi) su označeni po danu. Postotci varijacija prikazani su na osima. U dojenadi se velika promjena crijevog mikrobioma dogodila između 9. i 15. dana (Morowitz i sur., 2010).

### **3.2. METAGENOMI KA OBRADA PODATAKA**

Pokušaji da se podudaraju crijevne mikrobne zajednice u nedonoš adi dale su proturje ne rezultate. Npr. u nekim istraživanjima, djeca sa i bez nekrotiziraju ih enterokolitisa su imala iste vrste bakterija, dok su ostali uzorci dojen adi s tom boleš u bili bogatiji pojedinim vrstama (npr. *Clostridium perfringens* ili red *Proteobacteria*).

Identificirane su 3 glavne sekvene za robove *Serattia*, *Citrobacter* i *Enterococcus* koji su definirani u 3. fazi kolonizacije. *Citrobacter* je otkriven u uzorcima iz fekalija u troje od etvero djece s nekrotiziraju im enterokolitisom, ali niti u jednom od 17 kontrolnih uzoraka. Iako postoji mogunost da je *Citrobacter* uzročnik nekrotizirajućeg enterokolitisa, njegova prisutnost u uzorcima bez ove bolesti daje poteškoće u povezivanju bakterija i bolesti (Morowitz i sur., 2010).

Genomi roda *Serattia* (soj UC1SER) dominiraju u zajednici genomske skupine podataka iz 3. faze. Otkrivene su iznimno niske razine sekveni nukleotida UC1SER. UC1SER je u usporedbi s genomima *Serattia proteamaculans* i *Serattia marcescens*, koje su patogene te su poznati uzrok bolesti kod nedonoš adi. *Serattia proteamaculans* je bakterija koja se rijetko nalazi u ljudskom uzorku. Unutar regije UC1SER postoje male skupine gena koje se javljaju i drugdje u *S. marcescens* i *S. proteamaculans*. Te nakupine kodiraju proteine koji su uključeni u biosintezu fimbrija, transport nitrata, opštito metabolizam, biosintezu aminokiselina i sljepo (Morowitz i sur., 2010). Dakle, ta područja mogu doprinijeti metabolizmu varijaciji kako bi se razlikovale ove vrste. Samo UC1SER sadrži operon gena PGA uključen u sintezu polisaharidaza, adhezijski biofilm te regulon za korištenje alantoina. Također sadrži i operon gena yjf-sga koji omogućuje nekim sojevima bakterija u crijevu upotrebu C vitamina kao izvora energije (Morowitz i sur., 2010).

### **3.2.1. ANALIZA SOJEVA CITROBACTER**

Na temelju sekvenci gena za 16S rRNA, *Citrobacter* u 3. fazi kolonizacije je usko povezan s *Citrobacter freundii*. Rod *Citrobacter* ine fakultativni anaerobi iz porodice *Enterobacteriaceae*. Kao i *Serattia*, esti su patogeni u nedonoš adi. *Citrobacter 30\_2* izoliran je u djeteta s meningitisom (Morowitz i sur., 2010).

UC1CIT soj je dominantan soj roda *Citrobacter 30\_2* izoliranog od djeteta s meningitisom. Soj UC1CIT ima brojne gene pogodne za rast na raznim podlogama. Na temelju relativne u stalosti soja, skup podataka za 10.,16.,18.,21. dan je pokazao da UC1CIT ini 77% udjela roda *Citrobacter*. Postoji i soj UC1CIT-II. Geni toga soja uklju uju mnoge fimbrijske gene te omogu uju transport fruktoze i drugih še era (Morowitz i sur., 2010).

### **3.2.2. ENTEROCOCCUS**

Brojnost roda *Enterococcus* jako raste tijekom 3. faze kolonizacije. Sekvence gena za 16S rRNA soja UC1ENC je identi na onima iz nekoliko izolata *Enterococcus faecalis*. Uspore ene su sekvence od 7 UC1ENC gena sa sekvencama gena koji se koriste u MLST (*multilocus sequence typing*) analizi izolata te je utvr eno da je soj UC1ENC bio identi an u svih 7 MLST lokusa sekvence tipa 179 (Morowitz i sur., 2010).

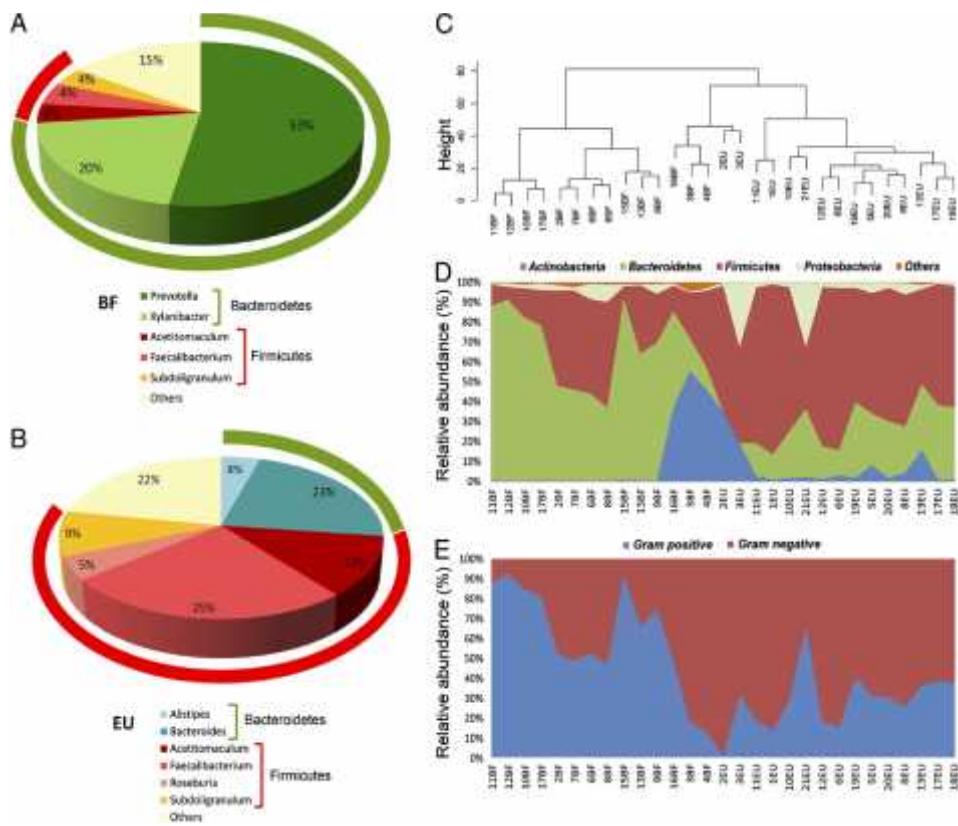
## **4. UTJECAJ PREHRANE U OBLIKOVANJU CRIJEVNOG MIKROBIOMA KOD DJECE IZ EUROPE I AFRIKE**

Crijevni mikrobnii sastav ovisi o razliitim prehrabnim navikama. U ovom istraživanju uzeti su fekalni uzorci 14 zdrave djece iz ruralnog afričkog mjesta u Burkini Faso (BF) te 15 uzoraka djece iz Firence, Italija (IT). Korištenjem visoko-proto ne 16S rDNA sekvensijske i biokemijske analize, utvrđene su znajne razlike u crijevnim mikrobiomima te dvije grupe. Prehrana djece iz Burkine Faso je siromašna masnoj i životinjskim proteinima, a bogata škrobom, vlaknima i biljnim polisaharidima. Nasuprot tome, djeca iz Firence imaju prehranu bogatu životinjskim bjelančevinama, škrobom, šeherima i masnoj, a siromašnu vlaknima (De Filippo i sur., 2010).

### **4.1. DOMINACIJA BACTEROIDETES U DJECE IZ BURKINE FASO U USPOREDBI S DJECOM IZ ITALIJE**

Kako bi se karakterizirale bakterijske skupine prisutne kod fekalnih uzoraka mikrobioma ovih 29 uzoraka, provedeno se višestruko sekvensiranje hipervariabilnih regija V5 i V6 u gena za 16S rRNA. U više od 94,2 % svih BF- i IT- uzoraka utvrđeno je da sadržavaju etiri najzastupljenija bakterijska koljena: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* (De Filippo i sur., 2010).

Znajne razlike pronađene su u omjerima tih četiri koljena bakterija u djece iz Afrike i Europe: *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* su više zastupljene u BF- nego u IT-djece, dok *Firmicutes* i *Proteobacteria* prevladavaju kod IT-djece. Statistička analiza, koristeći parametarski test (ANOVA) pokazuje da *Firmicutes* i *Bacteroidetes* znaju razlikuju djece iz Afrike i Europe. Dakle, *Firmicutes* prevladava dvaput više kod djece iz Europe u odnosu na djece iz Afrike što upućuje na razlike bakterijske kolonizacije ljudskog crijeva u dvije populacije. Zanimljivo, rodovi *Prevotella*, *Xylanibacter* (*Bacteroidetes*) i *Treponema* (*Spirochaetes*) su prisutni isključivo kod afričke djece iz Burkine Faso (Slika 2). Možemo pretpostaviti da bi prisutnost ova tri roda mogla biti posljedica uzimanja velike količine vlakana (De Filippo i sur., 2010).



**Slika 2.** Geni za 16S rRNA pokazuju jasno razdvajanje dviju populacija istraživane djece. (A i B)

Prikazane su srednje vrijednosti bakterijskih rodova prisutnih u fekalnim uzorcima djece iz Burkine Faso (BF) i Italije (IT). *Bacteroidetes* (zeleno) i *Firmicutes* (crveno) predstavljaju red za svaki od najviše zastupljenih rodova. (C) dendrogram sa hijerarhijskim grupiranjem uzoraka BF- i IT- populacije na temelju njihovih rodova. (D) postotak sekvenci od četiri najbrojnije bakterijske skupine između BF- i IT-djece. Plava područja u sredini pokazuju obilje *Actinobacteria*, uglavnom roda *Bifidobacterium*. (E) postotak sekvenci Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija u svakog pojedinca. Razlike u distribuciji Gram- i Gram+ bakterija u BF- i IT-populacije odražavaju razlike u dvije najzastupljenije skupine bakterija, *Bacteroidetes* i *Firmicutes* (De Filippo i sur., 2010).

#### **4.2. OMJER FIRMICUTES / BACTEROIDETES (F/B)**

Uzeti su uzorci 5 najmla e djece iz Afrike i Europe. BF-djeca su dojena do dobi od dvije godine, a IT-djeca do jedne godine starosti. U BF-djece je jako zastupljena skupina *Actinobacteria* i to uglavnom rod *Bifidobacterium*, koji je prona en i kod ispitanika IT-djece i poznato je da se strogo odnosi na dojenje dojen adi. Ovaj rezultat je jasan pokazatelj dominantne uloge prehrane u oblikovanju mikrobnog crijevnog sastava (De Filippo i sur., 2010).

Omjer F / B razlikuje pretile od mršavijih ljudi. Porast F / B omjera kod IT-djece vjerojatno je potaknut visoko kalori nom prehranom, pa se omjer može smatrati "biomarkerom pretilosti". Ljudski crijevni mikrobiomi prolaze faze sazrijevanja od ro enja do odrasle dobi i starenja, s posebnim naglaskom na F / B omjer, koji se razvija u razli itim fazama života. Kao posljedica razli itih F / B omjera u dvije populacije, na ene su Gram-negativne bakterije ( uglavnom *Bacteroidetes*) koje su više zastupljene od Gram-pozitivnih bakterija u BF-djece (58,5 % : 37,4 %), dok su Gram-pozitivne ( uglavnom *Firmicutes*) više zastupljene od Gram-negativnih u IT-djece (70,4 % : 29,1 %) (De Filippo i sur., 2010).

#### **4.3. BOGATSTVO MIKROORGANIZAMA I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST**

Koriste i se neparametrijskim testom za usporedbe Kruskal Wallis, prona ene su zna ajne razlike bogatstva i biološke raznolikosti u crijevu izme u BF- i IT-djece. BF-djeca imaju znatno ve i lanac masnih kiselina u usporedbi s IT-djecom. Posebice, propionska i masla na kiselina su gotovo etiri puta više zastupljene u uzorcima BF, nego IT, dok su octena i valerijanska kiselina usporedive u obje skupine (De Filippo i sur., 2010).

Rezultati ukazuju da prehrana bogata biljnim polisaharidima te siromašna še erima i masno ama utje e na sintezu kratkih lanaca masnih kiselina. Stoga možemo pretpostaviti da mikrobiom koevolvuira s prehranom BF-populacije. Rezultati sigeriraju da prehrana ima dominantnu ulogu te se može pretpostaviti kako potrošnja še era, masti, kalorija... u razvijenim zemljama ograni ava adaptivni potencijal mikrobioma (De Filippo i sur., 2010).

## **5. UTJECAJ CRIJEVNOG MIKROBIOMA NA RAZVOJ MOZGA I PONAŠANJE**

U ovom istraživanju testirana je hipoteza da je normalni crijevni mikrobiom sastavni dio vanjskih okolišnih signala koji moduliraju razvoj mozga i njegove funkcije. *Germ-free* (GF) i *patogen-free* (SPF) su miševi s normalnim crijevnim mikrobiomom i u ovom su eksperimentu podvrgnuti testu istraživanja njihove aktivnosti i anksioznosti ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

Miševi su bili smješteni u kutiji i pratilo se njihovo ponašanje. Nakon nekog vremena utvrđene su znatne razlike između ove dvije skupine miševa. GF-miš je pokazao ukupno veći prijevodi put te se znatno više kretao u odnosu na SPF-miša. Također, istraživana je hipoteza jesu li nepatogeni crijevni mikrobiomi utjecali na ponašanje poput anksioznosti. U tu svrhu su korištena dva testa anksioznosti: svijetlo-tamna kutija i povišeni plus-labirint test. U svijetlotamna kutija testu GF-miš je proveo znatno više vremena u svijetlom dijelu kutije nego SPF-miš. U testu povišeni plus labirint GF-miš je proveo više dijelova na otvorenom dijelu kutije od SPF-miša. Također su testirani i CON-miševi dobiveni od SPF-miševa. U svijetlotamna kutija testu ponašanje CON-miševa bilo je slično GF-miševima te različito od SPF-miševa. U povišenom plus-labirint testu CON-miševi su promijenili ponašanje ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

### **5.1. UTJECAJ NORADRENALINA (NA), DOPAMINA (DA) I 5-HT-a U STRIJATUMU MIŠEVA**

Istraživane su potencijalne promjene u neurokemiji novog seta GF-miševa. Koncentracije NA, DA i 5-HT-a te njihovih glavnih metabolita: 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG), dihidroksifeniloctene kiseline (DOPAC), homovanilne kiseline (HVA) i 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA) mjerene su u frontalnom korteksu, strijatumu i hipokampusu GF- i SPF-miševa. Koncentracije NA, DA i 5-HT-a su bile znatno veće u strijatumu GF-miševa u usporedbi sa SPF-miševima, dok u frontalnom korteksu i hipokampusu nisu znatno razlike ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

### **5.1.1. EKSPRESIJA SINAPTI KO-PLASTI NIH SRODNIH GENA U MIŠEVA**

S obzirom da je dopamin važan regulator motornih i kognitivnih funkcija, istražena je ekspresija dopaminskih receptora (D1 i D2) te unutarstani ni signalni mehanizmi (npr. DARPP-32) u strijatumu, frontalnom korteksu i hipokampusu. U GF-miševa DA D1 receptora mRNA bio je znatno viši u hipokampusu, a niži u strijatumu u usporedbi sa SPF-miševima. Nije bilo razlike u unutarstani nim signalnim mehanizmima npr.DARPP-32 ili DA D2 receptora izme u GF- i SPF-miševa ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

### **5.1.2. UTJECAJ MIKROBNE KOLONIZACIJE NA PROTEINSKU EKSPRESIJU U MIŠEVA**

Nakon što je utvr eno da normalni crijevni mikrobiom modificira ponašanje i ekspresiju gena u klju nim regijama mozga, istraženi su i neki drugi geni koji bi mogli imati važnu ulogu. Istražen je proteinski izraz PSD-95 i sinaptofisin u frontalnom korteksu, strijatumu i hipokampusu GF-, SPF- i CON-miševa ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

Ekspresija sinaptofisina i PSD-95 u strijatumu je znatno niža u SPF- i CON-miševa u usporedbi s GF-miševima. Me utim, nije bilo razlike u ekspresiji sinaptofisina ili PSD-95 u frontalnom korteksu i hipokampusu. Sinaptofisin i PSD-95 smatraju se neizravnim markerom u razvoju mozga. Modulacija hormona stresa (npr. ACTH i kortikosterona) je još jedan potencijalni mehanizam koji bi mogao objasniti sadašnje nalaze. Drugi mogu i mehanizam komunikacije izme u mozga i crijevne mikrobiote može biti uspostavljen putem neurona. Razlike koje su se promatrале izme u GF- i SPF-miševa posredovane su signalizacijom ubrzo nakon ro enja miševa, kada postaju izloženi crijevnom mikrobiomu ( Diaz Heijtz i sur., 2010).

## **6. ZAKLJUČAK**

Crijevni mikrobiom ima vrlo važnu ulogu u organizmu te može utjecati na razne faktore. Već po rođenju, ljudi su naseljeni raznim oblicima bakterija koji se kasnije tijekom razvoja modificiraju ovisno o životnim navikama, od kojih su najvažnije prehrambene navike, pa su ovisno o tome razne populacije naseljene različitim oblicima mikroorganizama jer upravo prehrana definira bakterijske vrste koje će biti zastupljene u organizmu. Najzastupljenije bakterijske skupine koje se javljaju kod ljudi jesu: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria* te se ovisno o navikama kod raznih populacija javljaju u različitim omjerima. Crijevni mikrobiom je povezan sa urođenim imunosnim odgovorom te tijekom diferencijacije utječe na razvoj mnogih struktura kao npr. na razvoj mozga i ponašanje miševa te na ekspresiju određenih gena koji imaju ulogu u ponašanju i razvoju. Može biti povezana i sa raznim bolestima kao što je npr. nekrotizirajući enterokolitis u dojenčadi pri čemu su neka djeca bila obogaćena za neke bakterijske vrste.

## **7. SAŽETAK**

Bakterije su jednostani ni organizmi koji nemaju jezgru i organele te se ubrajaju u prokariote. U intestinalnom traktu prevladavaju anaerobne bakterije s obzirom da nema mnogo kisika. U prvom dijelu navedenih istraživanja proučavan je mikrobiom usne šupljine. Provo ena je analiza 1179 svojti koje su identificirane po svojoj sekvenci za 16S rRNA s ciljem da se unesu u bazu podataka usnog mikrobioma pod nazivom HOMD. Zatim su prikazana istraživanja mikrobioma fekalnih uzoraka ženskog dojeneta. S obzirom na tretiranje djeteta, u različitim dane se pojavljuju različite skupine bakterija. Mikrobijni sastav u intestinalnom traktu takođe znatno ovisi o prehrabbenim navikama. U trećem dijelu prikazanih istraživanja analizirana je bakterijska raznolikost u fekalnim uzorcima djece iz ruralnog sela Afrike i urbanog središta Europe. S obzirom na razlike prehrabene navike pronađene su razlike u skupine bakterija u dvije populacije, no u obje populacije etiri najzastupljenije bakterijske skupine su: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. U zadnjem dijelu prikazanih istraživanja proučeno je kako crijevni mikrobiom utječe na razvoj mozga, njegove funkcije i ponašanje u dvije vrste miševa (GF i SPF). Pronađene su znatne razlike između dviju skupina miševa kao što je kretanje, zatim razlike u razini noradrenalina, dopamina, 5-HT-a, sinaptofisina, PSD-95 i slično.

## **8. SUMMARY**

Bacteria are single-celled organisms that do not have a nucleus and organelles and hence are classified as the prokaryotes. The human intestinal tract is dominated by anaerobic bacteria since there is not much oxygen. The first of the reviewed studies investigated the oral microbiomes. The analysis of 1179 species that are identified by their 16S rRNA sequences in order to be entered into a database called Human Oral Microbiome Database (HOMD). The second study presented here investigates fecal samples microbiomes of a female infant. Depending on a treatment of the child, different groups of bacteria appear sequentially on daily basis. The microbial composition of the intestinal tract is also highly dependent on dietary habits. In the third rewieved study fecal samples from children in rural villages in Africa and urban centers of Europe were comparated regarding the microbe diversity. Different dietary habits in two populations of children affected their microbe diversity, but both populations contain the four most common groups of bacteria, namely: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The last reviewed paper brings research on how intestinal microbiome affects the developing brain, its function and behavior in *germ-free* (GF) and *pathogen-free* (SPF) mice. Significant differences in motor abilities, noradrenaline, dopamine, 5-HT, synaptophysin and PSD-95 levels were found between the two groups of mice.

## **9. LITERATURA**

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. Proc Natl Acad Sci USA 107: 14691-14696

Dewhirst, E.F., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.H., Lakshmanan, A., Wade, W.G. (2010): The human oral microbiome. J Bacteriol 192: 5002-5017

Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., Pettersson, S. (2010): Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proc Natl Acad Sci USA 108: 3047-3052

Morowitz, M.J., Denef, V.J., Costello, E.K., Thomas, B.C., Poroyko, V., Relman, D.A., Banfield, J.F. (2010): Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant. Proc Natl Acad Sci USA 108: 1128-1133

<http://dira.forums-free.com/bakterije-mikroorganizmi-u-gastrointestinalnom-traktu-t493.html>

[www.homd.org](http://www.homd.org)

<http://vijesti.gorila.hr/gorilopedia/lifestyle/zdravlje/bakterije>

<http://www.zdrav-zivot.com.hr/index.php?cat=probiotici>