

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI 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 Ivančić Bašić
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 domaćina.....	5
4. Utjecaj genotipa domaćina, mikrobnih međudodnosa i okoliša na kompoziciju mikrobnih zajednica.....	6
4.1. Genotip domaćina.....	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 liječenju bolesti na kompoziciju mikrobnih zajednica.....	15
8. Literatura.....	17
9. Sažetak.....	20
10. Summary.....	21

1. Uvod

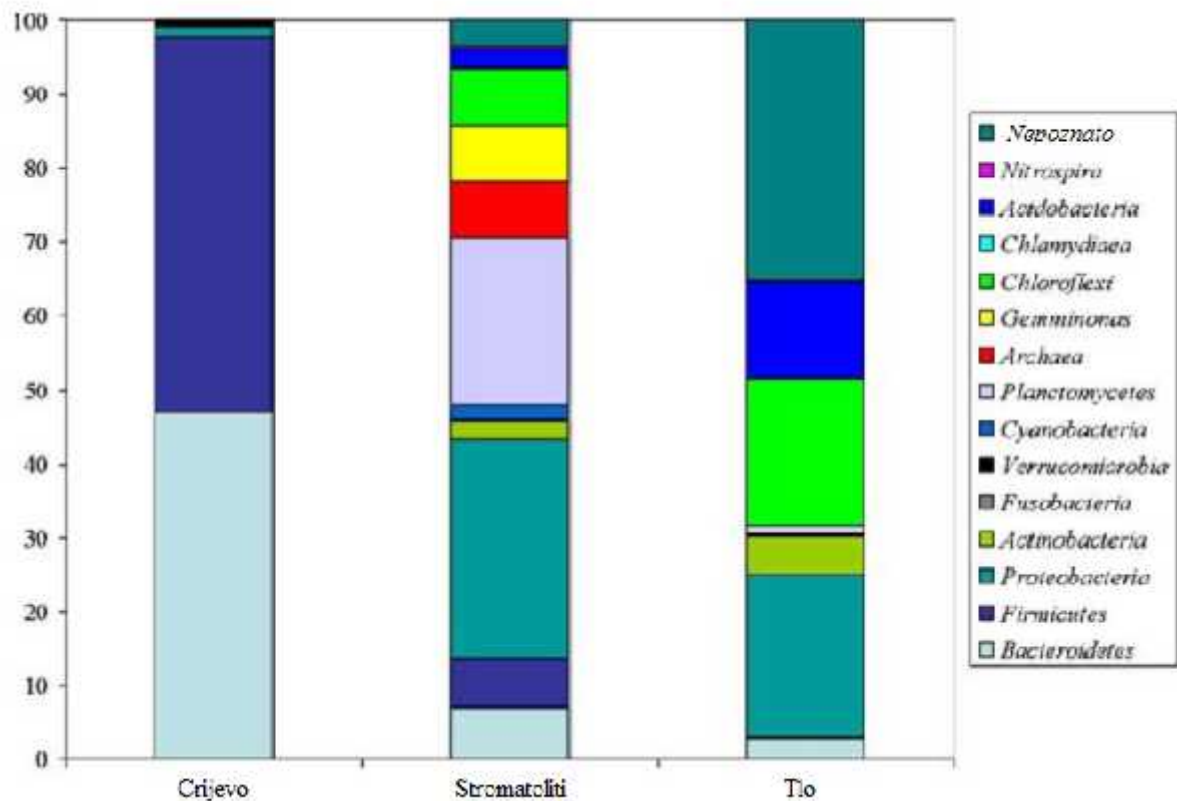
Mikroorganizmi imaju izrazito bitnu ulogu u evoluciji života na Zemlji i povezani su s evolucijom ljudi također (Turroni, 2008). Mikrobni ekosistemi pronađeni su diljem svijeta, a jedan od kompleksnijih nalazi se upravo u nama samima (Zoetendal, 2006). Nastanjuju kožu, mukozne površine i probavne cijevi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

Ljudsko tijelo domaćin 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 domaćinom. Konzumiraju, pohranjuju i raspoređuju energiju te služe kao posrednici u kemijskim transformacijama fiziološki važnima za domaćina. Imaju sposobnost vlastitog samoodržavanja i popravka kroz samoumnjažanje.

Čovjeka su jako bitni jer obavljaju dodatne funkcije koje on sam nije uspio steći i kroz evoluciju. Odnos čovjeka kao domaćina i sastavnica mikrobiota najčešće se opisuje kao komenzalizam, a rjeđe kao mutualizam. Uzrok tome može biti u nedostatku znanja o doprinosu mikrobnih zajednica čovjeku ili zanemarivanju njihove važnosti u životu čovjeka. Osim što štite tijelo od napada različitih patogena, sudjeluju u razgradnji polisaharida i fermentaciji ugljikohidrata te na taj način opskrbljuju domaćina ugljikom i energijom. Zauzvrat dobivaju potrebne glikane i nalaze se u zaštitenom, najčešće anoksičnom, 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. Ljudstvo većinom nastanjuje slične ili iste vrste. Ostatak gena uglavnom pripada arhejama, a samo 0.1% je eukariotskog (kvasci) i viralnog (bakteriofagi) podrijetla (Qin, 2010).

Proučavanjem mikrobne raznolikosti unutar ljudskih crijeva i crijeva drugih sisavaca, primijećeno 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 tako 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 milijuna godina), to je jako malo (Turrioni, 2007).



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

U ovom seminaru najviše će biti riječi o mikrobnjoj zajednici u crijevu ovjeka, a posebice debelom crijevu, zbog toga što je tu najveća i najraznolikija mikrobna 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 izvođena 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 omogućavala je identifikaciju samo onih mikroorganizama koji su bili sposobni rasti na određenom hranjivom mediju. Procijenjeno je da se samo 1%, pa čak i manje, bakterija u većini različitih staništa može uzgojiti standardnim kultivacijskim tehnikama i postalo je očito da je velika većina mikroba ostala neopisana. Upotreba standardnih metoda ipak ima svojih prednosti, kao što je ekonomičnost i mogućnost izvođenja biokemijskih i fizioloških pokusa.

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

Metode neovisne o bakterijskim kulturama koje se temelje na sekvencioniranju 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 svojti 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 metagenomika 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 ina ne posjeduje i zato je bitan za ovjekov život (Turrioni, 2008).

Prisutnost mikrobiota nije nužna za opstanak doma ina. Me utim, 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 ve inu polisaharida. Tu nastupaju mikrobioti sa genima koji kodiraju za enzime koje doma ina nema (Bik, 2009). Posjeduju gene uklju ene u mehanizam ugljikohidrata ali ne posjeduju gene uklju ene u metabolizam masnih kiselina što nam govori da koriste samo polisaharide kao izvor energije (Turrioni, 2008).

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

Primarni fermentatori degradiraju glikane u kratke lance masnih kiselina koje onda koristi doma ina. Bogati su klju nim genima odgovornim za proizvodnju acetata, butirata, laktata i sukcinata (Turrioni, 2008). Uklju eni su u anabolizam aminokiselina i vitamina, uklju uju i vitamine B1, B6 i K, esencijalnim za ljudsko zdravlje (Turrioni, 2008, Bik, 2009).

Utje u na skladištenje masti tako što pove avaju unos glukoze te se time pove ava 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).

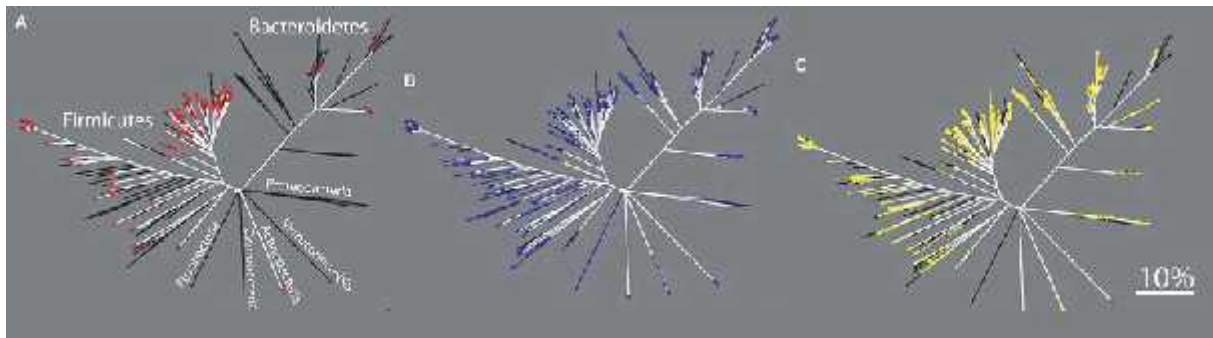
Metanogene arheje *M. smithii* predstavljaju posljednju kariku u metaboli kom lancu obrade polisaharida. Smanjuju parcijalni tlak vodika, tako što ga uklanjaju metanogenezom. Time pove avaju brzinu mikrobne fermentacije ugljikohidrata (Bäckhed, 2005, Turrioni, 2008).

Mikrobioti stvaraju fizi ku 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 (Turrioni, 2008). Utje u na postnatalno sazrijevanje epitela crijeva, pove avaju broj sekretornih žlijezda i endokrinih stanica i op enito ubrzavaju proliferaciju epitelnih stanica (Leser, 2009).

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

4. Utjecaj genotipa domaćina, mikrobnih mehanizama i okoliša na kompoziciju mikrobnih zajednica

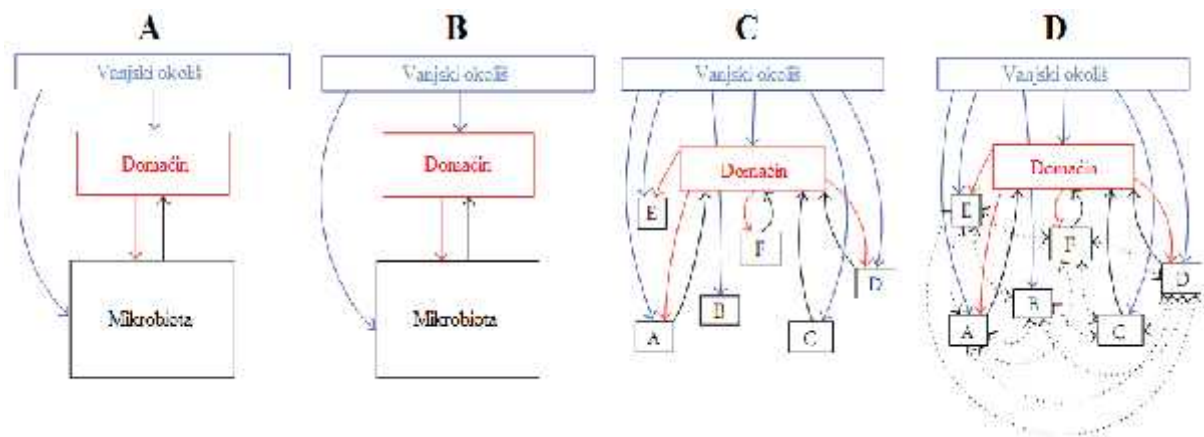
Kompozicija bakterijskih zajednica specifična je za domaćina i stabilna kod zdravih odraslih pojedinaca. Primijetna je i velika varijabilnost između različitih pojedinaca, koja se ne može povezati s geografski podrijetlom, dobi ili spolom (Zoetendal, 2006). Svaki pojedinak ima zajednicu mikrobiota jedinstvenu po svom sastavu, isto kao što ima jedinstveni otisak prsta (Sl. 2.). Između zajednica različitih ljudi postoje sličnosti i istraživanja u prošlosti su se uglavnom bavila tim sličnostima, u potpunosti zanemarujući razlike (Dethlefsen, 2006).



Slika 2. Filogenetska stabla mikrobiota koji nastanjuju tri različite osobe napravljena pomoću 16S rRNA bakterijskih sekvenci. Crvena, plava i žuta boja predstavljaju raznolikost jedinstvenu za pojedinu osobu, bijela boja predstavlja bakterijske vrste zajedničke ovim osobama, a crna boja predstavlja vrste koje nisu pronađene kod pojedine osobe. Osoba B posjeduje najveću raznolikost, a osoba A najmanju (preuzeto iz: Ley, 2006).

Određena struktura mikrobnih zajednica u ljudskim crijevima rezultat je prirodne selekcije koja djeluje na dvije razine. "Top-down" selekcija potječe od domaćina i prednost daje stabilnim zajednicama s mnogo suvišnih funkcija (Ley, 2006). Teži se sprječavanju toga da određena 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 ključnom vrstom u svim mikrobnim zajednicama crijeva (Turrioni, 2008). "Bottom-up" selekcija potječe iz kompeticije među članovima zajednice, prisiljava mikrobiote da postanu funkcionalno specijalizirani. Dolazi do kompeticijskog isključivanja: neke vrste izumiru. Zato je cilj mikrobiota da pronađu slobodnu nišu i specijaliziraju se za resurse koje nitko ne koristi.

Zajednice mikrobiota se mogu promatrati kroz četiri koncepta: zajednica mikrobiota je višestani ni organ koji je u interakciji s domaćinom i okolišem (Sl. 3., pod A); složena od različitih sojeva koji se ponašaju kao jedno u svojim interakcijama s domaćinom i okolinom (Sl. 3., pod B); složena od različitih sojeva koji svaki zasebno stupaju u interakciju s domaćinom i okolinom (Sl. 3., pod C); dinamička ekološka zajednica sastavljena od različitih sojeva koji međusobno mogu stupiti u interakcije, a ne samo s domaćinom i okolinom (Sl. 3., pod D). Svaki od ovih koncepta vodi do različitih pretpostavki i stoga svaki znanstvenik preferira drugačiji koncept (Foxman, 2008).



Slika 3. četiri različita koncepta kroz koja je moguće promatrati zajednice mikrobiota (preuzeto iz: Foxman, 2008).

Kad domaćin nema koristi od zajednice mikrobiota, cijela zajednica može izumrijeti ako domaćin nakon smrti ne ostavi potomke. Ekološke teorije sugeriraju da je za selekciju u zajednici potrebno preseljenje zajednice na novo stanište. To se događa kod kolonizacije tekorojenih domaćina. Tada se eliminiraju oni članovi zajednice koji ne doprinose nekoj od funkcija koje zajednica obavlja. Na taj se način 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 značajan utjecaj na njihovu strukturu u ljudskim crijevima.

Iako mnogo faktora utječe na sastav mikrobnih zajednica crijeva, u daljem tekstu objašnjen je utjecaj genotipa domaćina, 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 određeni genotip doma ina razvijaju se odmah nakon rođenja doma ina. Ova saznanja ukazuju da najvjerojatnije sam genotip doma ina utječe na strukturu zajednica. Usporedivan 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 sličniji nego među srođnicima 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 mikrobiotima 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 pomoću PAMP-a nije bitno samo za prepoznavanje patogenih bakterija, već i za održavanje homeostaze epitela crijeva i za zaštitu od ozljeda (Khachatryan, 2008).

Mukozna barijera ne sprječava imunološki sustav uvijek da dođe u kontakt s mikrobnim organizmima. Ipak, neki smatraju da imunološki sustav ne utječe toliko na sam 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 također utječe i na broj mjesta dostupnih za prihvatanje mikrobiota (Dethlefsen, 2006). Doma ina posjeduje mehanizme pomoću 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 mjesta (Turrone, 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.

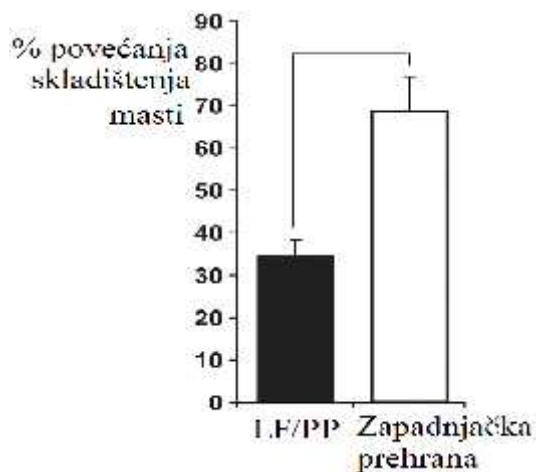
Mikrobioti svojim djelovanjem imaju sposobnost utjecati na uvjete u svom staništu i na taj način formiraju različite niše za sebe, ali i druge mikrobiote. Prisutna je i interspecijska kompeticija koja uključuje natjecanje za resurse i mjesta za prihvaćanje. Različite vrste koriste i interferencijske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

Na sastav zajednica utječu 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 prihvaćanje, sposobnost za brzi rast kako bi izbjegli ispiranje, te otpornost na stresne uvjete vanjskog okoliša koje moraju preživjeti kako bi uspjeli prijeći s jednog domaćina na drugog (Ley, 2006).

Postoji i interspecijska suradnja koja se odvija tijekom hidrolize kompleksnih ugljikohidrata i fermentacije dobivenih šećera, ali i u razmjeni faktora rasta (Dethlefsen, 2006). Mikrobioti stvaraju hranidbene mreže u kojima produkt jedne bakterije postaje supstrat druge (npr. metanogene arheje koje koriste vodik u stvaranju metana). Na taj način se sprječava 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*. Također 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 među najvažnijim imbenicima koji utječu na ljudsko zdravlje. Na hranjivu vrijednost hrane djelomice utječe 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 transplacirana svježa ili zamrznuta fekalna mikrobna zajednica ovojeka. Takvi miševi su stavljeni na prehranu siromašnu mastima i bogatu biljnim polisaharidima (LF/PP, "low fat/plant polysaccharide") kroz određeni period. Zatim je polovica miševa prebačena na "zapadnjačku" prehranu, a ostatak je ostao na LF/PP prehrani. To je dovelo do promjene u strukturi mikrobiota, promjene u metaboličkim putovima i u ekspresiji gena mikrobioma miševa prebačenih na "zapadnjačku" prehranu u samo jednom danu. Sastav mikrobiota miševa na LF/PP prehrani stabilizirao se nakon 28 dana, a sastav mikrobiota miševa na "zapadnjačkoj" prehrani stabilizirao se već nakon 7 dana. U crijevu miševa na "zapadnjačkoj" prehrani povećana je relativna gustoća razreda *Erysipelotrichi* i *Bacilli* iz reda *Firmicutes* te znajno smanjenje gustoće članova reda *Bacteroidetes* u usporedbi s miševima na LF/PP prehrani. Pohrana masti također je povećana kod miševa na "zapadnjačkoj" prehrani nego kod miševa na LF/PP prehrani (Sl. 4.) (Turnbaugh, 2010).



Slika 4. Prikaz povećanog skladištenja masti kod miševa na "zapadnjačkoj" prehrani (preuzeto iz: Turnbaugh, 2010).

Drugo istraživanje bavilo se uspoređivanjem fekalnih mikrobiota djece iz Europe (EU) i djece iz ruralnog afričkog sela Burkina Faso (BF), čija je prehrana bogata vlaknima te je stoga slična prehrani u ranoj ovojekovoj 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 *Xylophaga*. 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 djece. 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 neprobavljivi 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 oligofruktoza. 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 djetinjce uvijek razvija složeni i aktivni crijevni ekosistem u prethodno sterilnom okolišu. U samo nekoliko dana gastrointestinalni trakt novorođene djetinca postaje dom velike zajednice bakterija, čiji broj ubrzo dosegne broj stanica doma i normalna (Turrone, 2009). Formiranje mikrobiota kod novorođene djetinca bitno je zbog razvoja urođene imunološke sustava i razvoja probavne cijevi (Morowitz, 2011).

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

U jednom istraživanju proučavan je utjecaj majčinog mlijeka, umjetne hrane za novorođene djetinjce, umjetne hrane s dodatkom prebiotika i majčinim mlijekom majke koje su se hranile probioticima. Promatran je utjecaj na sastav roda *Bifidobacterium*, koji je jedan od dominantnih rodova u crijevu novorođene djetinca. *B. infantis*, *B. longum* i *B. breve* su uglavnom vrste tog bakterijskog roda koje su pronađene u crijevu novorođene djetinca, a kod odraslog djetinca su pronađene vrste *B. adolescentis* i *B. catenulatum*. Dokazan je pozitivan utjecaj majčinog mlijeka, jer djetinjce hranjena njima kasnije imaju manje problema s alergijama, proljevom, astmom i gastrointestinalnim infekcijama nego ona hranjena umjetnom hranom. Mikrobioti djetinca hranjene majčinim mlijekom posjeduju veći broj vrsta u roda *Bifidobacterium* s navedenim vrstama karakterističnim za novorođene djetinjce, nego djetinjce hranjena umjetnom hranom za novorođene djetinjce. Isto tako, pokazan je i pozitivan utjecaj prebiotika u majčinu prehranu. Ipak, ako se u takvu komercijalnu hranu dodaju prebiotici, npr. neki oligosaharidi, oni stimuliraju rast bifidobakterija. Prebiotici mogu imati i negativni utjecaj 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 mikrobiolozi svoju pažnju pridaju samo stranim patogenima. Svi ostali mikroorganizmi koji nastanjuju ljudsko tijelo bili su zanemarevani (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 poveća 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 reduciranu kompleksnost bakterijskog reda *Firmicutes* i preveliku prisutnost vrsta kao što su one koje spadaju u *Porphyromonadaceae* (Turrone, 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 (Khachatryan, 2008).

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

DIJABETES TIP 2

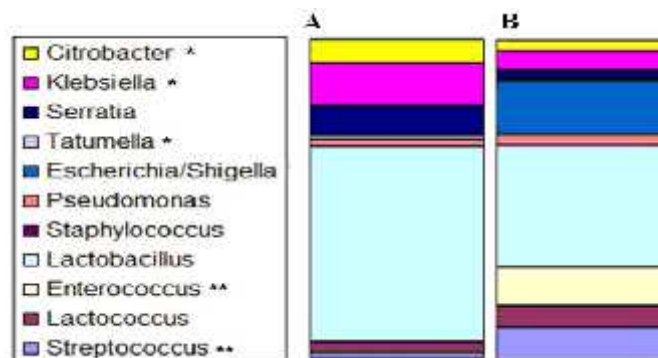
Dijabetes tipa 2 je također povezan s kompozicijskim promjenama mikrobiota. Relativna gustoća reda *Firmicutes* i pripadajućeg razreda *Clostridia* je znatno manja, a redova *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* i pripadajućeg razreda *Betaproteobacteria* veća u usporedbi s kompozicijom mikrobiota zdravih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

AUTIZAM

Djeca s autizmom često 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 često 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).

NEKROTIZIRAJU I ENTEROKOLITIS

Nekrotizirajući enterokolitis (NEC) je upalna nekroza crijeva koja pogađa 5 – 10% novorođenadi s porođajnom težinom manjom od 1500 grama. NEC većinom biva otkriven u podmaklom 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 s NEC (Sl. 5.). Istraživanja su rađena na miševima (Carlisle, 2011).



Slika 5. Usporedba mikrobiota miševa sa NEC-om (A) i zdravih miševa (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 poremećaja nedostatka koncentracije (ADHD, attention-deficity hyperactivity disorder) i Tourette-ovog sindroma (Jia, 2008).

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

Za razliku od ljudskog genoma, s kojim se slabo može manipulirati pomoću xenobiotika, kompozicija mikrobiota se lako može mijenjati. Plastičnost mikrobioma omogućava specifičnu ili sistematičnu manipulaciju. Nova saznanja bi mogla revolucionarizirati strategije za liječenje raznih bolesti.

Zajednica mikrobiota metabolički obrađuje neke lijekove te toksične tvari koje unosimo u organizam. Na primjer, ginsenosid je osnovna bioaktivna komponenta lijeka Radix Ginseng. Ginsenosid Rb1, saponin propopanaxadiola, biva metaboliziran pomoću β -D-glukozidaze mikrobiota u 20-O- β -D-glukopiranozil-20(S)-protopanaxadiol 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 čija povećana koncentracija uzrokuje neke bolesti pomoću antibiotika ili cjepiva koja bi senzibilizirala imunološki sustav domaćina protiv te određene bakterije. Nedostaci su široki spektar djelovanja antibiotika i prilagodba bakterija na antibiotik.

Prema drugoj strategiji, prvo bi bilo potrebno proučiti simptome pojedinih bolesti i otkriti njihove uzroke. Zatim, kombinacijom antibiotika, probiotika, prebiotika i laksativa djelovati na čitavu zajednicu i pokušati povratiti homeostazu.

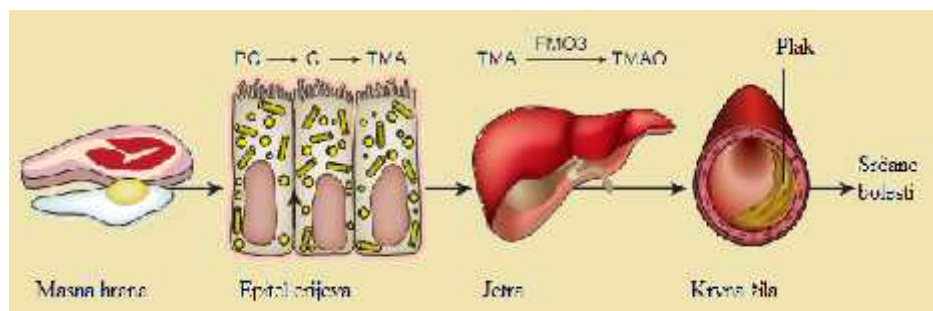
Važna je činjenica da se određeni bioaktivni metaboliti mogu proizvoditi u životinjama i biljkama i služiti kao izvor novih lijekova. Npr., mikrobne zajednice nekih morskih spužvi proizvode metabolite protiv razvitka raka (Jia, 2008).

Antibiotici mogu imati negativan utjecaj na sastav zajednica i njihov odnos prema domaćinu. Posljedice uzimanja antibiotika mogu biti dugotrajne i dovoditi do kroničnih stanja kao što je astma. U većini slučajeva se kompozicija mikrobiota vrati u prvotno stanje unutar

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

Kompozicija mikrobiota tri zdrava ovjeka uspoređivana je prije i nakon uzimanja antibiotika ciprofloksacina. Zaključeno je da ciprofloksacin djeluje na relativnu gustoću i brojne bakterijske svojte mikrobiota te smanjuje bogatstvo zajednica i nekih svojti. Jačina djelovanja antibiotika varirala je kod različitih pojedinaca. Kompozicija mikrobiota se vratila u stanje slično prvotnom većetiri tjedna nakon prestanka uzimanja antibiotika, dok se neke svojte nisu oporavile niti nakon 6 mjeseci.

Možemo zaključiti da promjene u kompoziciji mikrobiota ne moraju utjecati na funkcije crijeva. Na taj je način dokazana hipoteza da su mikrobne zajednice raznolike kako bi imale više vrsta koje obavljaju iste funkcije. Tako se sprječava nastajanje ključnih vrsta, čiji bi gubitak bio fatalan za zajednicu i domaćina. Ipak, prisutnost dominantnih metaboličkih funkcija ne mora značiti prisutnost specijaliziranih aktivnosti kao što je utjecaj na imunološki sustav i slično (Dethlefsen, 2008).



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

Poznato je da hrana bogata zasićenim masnim kiselinama i ugljikohidratima dovodi do pojave srčanih bolesti. Također 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 nutijent i koristi se u liječenju bolesti masne jetre koja nije uzrokovana alkoholom. Međutim, pokazalo se da se kolin otpušta iz fosfatidilkolina enzimom fosfolipazom u crijevu mikrobiotima metabolizira u trimetilamin (TMA). TMA dopireva u jetru i tamo se pomoću flavin monooksigenaze (FMO3) pretvara u TMAO (Sl. 6.). Kolin ima puno u masnoj hrani, pa bi se takva prehrana trebala izbjegavati kako bi se smanjio rizik od srčanih bolesti. Ipak, kolin se ne smije potpuno izbaciti iz prehrane jer je esencijalan u nekim metaboličkim 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., Poullet 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
- Khachatryan 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., Denev 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 functional. *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 genom 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 pronađeni na koži, u ustima, nosu, ušima, rodnici i probavnom traktu. Svaki od njih ima zajednicu mikrobiota jedinstvenu po svom sastavu. Bitni su jer obavljaju funkcije koje drugi organizmi nikada nisu uspjeli i kroz evoluciju.

Istraživanja koja proučavaju složenost ovih ekosistema donedavno su izvođena upotrebom tradicionalnih tehnika koje uključuju 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 domaćina povećavaju i efikasnost dobivanja energije i sintetiziraju i esencijalne vitamine. Utječu na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih stanica, pH i razvoj imunološkog sustava. Stvaraju fizičku barijeru u obrani od patogena i proizvode antibakterijske peptide.

Odmah nakon poroda svaki od njih 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 majčinim mlijekom pred komercijalnom dječjom hranom.

Kada se poremeti sastav mikrobiota, to može dovesti do različitih bolesti: IBD, autizam, alergije, astma, dijabetes tipa 2 i slično. Sastav mikrobiota može se poremetiti nepravilnom prehranom i uzimanjem antibiotika.

Kompozicijom mikrobiota može se manipulirati pomoću probiotika, prebiotika, antibiotika i nekih lijekova. Na taj se način zajednica može vratiti u homeostazu i izliječiti 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 a 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 be bred using 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. They 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, etc. 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.