

Lidský mikrobiom/ Lidská mikrobiota

Martin Krsek

**Ústav ochrany a podpory zdraví
Lékařské fakulta MU Brno**

Jaká je hlavní úloha mikrobů na Zemi?

- degradace

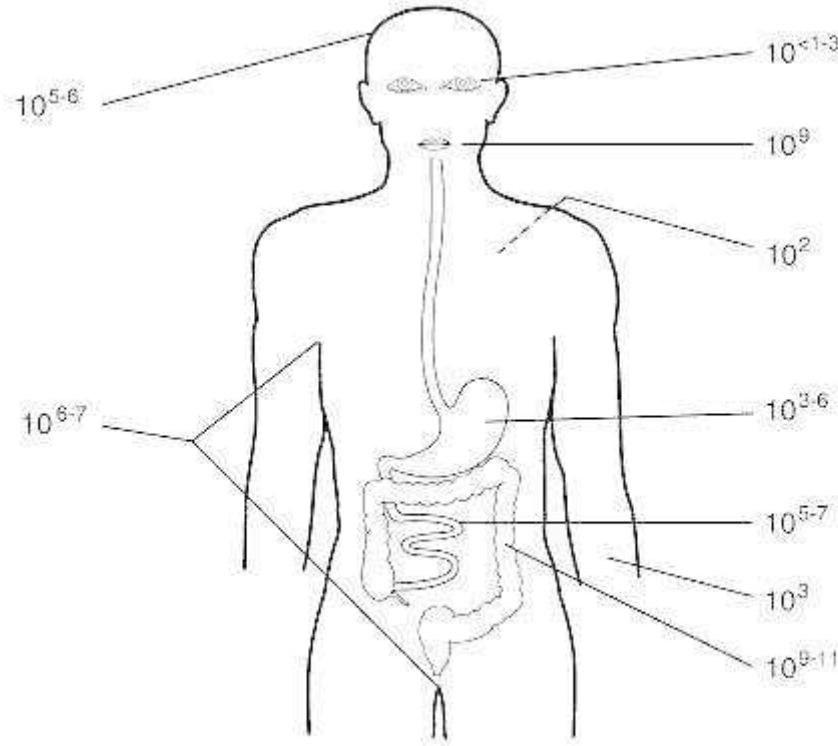
- koloběh živin

- fotosyntéza

- interakce s rostlinami a živočichy

- udržovat život na Zemi

Mikrobi a naše tělo



- počet mikrobů/g homogenizované tkáně
- počet mikrobů/cm² povrchu kůže



Kůže – 10^{12} , ústa – 10^{10} , zažívací trakt - 10^{14}

Kolik buněk má naše tělo?

How big is a human cell?

cell type	average volume (μm^3)	BNID
sperm cell	30	109891, 109892
red blood cell	100	107600
lymphocyte	130	111439
neutrophil	300	108241
beta cell	1,000	109227
enterocyte	1,400	111216
fibroblast	2,000	108244
HeLa, cervix	3,000	103725, 105879
hair cell (ear)	4,000	108242
osteoblast	4,000	108088
alveolar macrophage	5,000	103566
cardiomyocyte	15,000	108243
megakaryocyte	30,000	110129
fat cell	600,000	107668
oocyte	4,000,000	101664

Kolik buněk má naše tělo?

5 miliard (10^9) – 200 miliónů triliónů (10^{18}) ?

Průměrná váha - 70 triliónů buněk (10^{12})

Průměrný objem – 15 triliónů buněk (10^{12})

Snad tedy 37.2 triliónů buněk (10^{12}) ?

Celkový poměr lidských a bakteriálních buněk je

1 : 1-10

Co tedy vlastně jsme?!

Převládající bakteriální druhy na různých částech těla dospělého člověka

Kůže a sliznice každého člověka jsou brzy po narození kolonizovány rozmanitou mikroflórou.

Lidské tělo, které obsahuje kolem 10^{13} buněk, běžně hostí kolem 10^{14} buněk bakterií. Tyto bakterie tvoří **normální mikroflóru** těla.

[Normal Flora - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>

Table 3. Predominant bacteria at various anatomical locations in adults.

Anatomical Location	Predominant bacteria
Skin	staphylococci and corynebacteria
Conjunctiva	sparse, Gram-positive cocci and Gram-negative rods
Oral cavity	
teeth	streptococci, lactobacilli
mucous membranes	streptococci and lactic acid bacteria
Upper respiratory tract	
nares (nasal membranes)	staphylococci and corynebacteria
pharynx (throat)	streptococci, neisseria, Gram-negative rods and cocci
Lower respiratory tract	none
Gastrointestinal tract	
stomach	<i>Helicobacter pylori</i> (up to 50%)
small intestine	lactics, enterics, enterococci, bifidobacteria
colon	bacteroides, lactics, enterics, enterococci, clostridia, methanogens
Urogenital tract	
anterior urethra	sparse, staphylococci, corynebacteria, enterics
vagina	lactic acid bacteria during child-bearing years; otherwise mixed

Význam normální mikrobioty

Normální flóra **ovlivňuje** anatomii, fyziologii, citlivost k patogenům a morbiditu hostitele.

Normální mikrobiota je relativně **stabilní**, určité rody osídlují různé oblasti těla během určitých období života člověka.

Tři vývojové změny u lidí: odstavení, prořezávání zubů, počátek a konec funkce vaječníků

Ačkoliv většina představitelů mikrobioty osidlující kůži, nehty, oči, orofarynx, genitálie a gastrointestinální trakt je u zdravých jedinců **neškodná**, u imunokompromitovaných hostitelů mohou často způsobit **nemoci**.

Význam normální mikrobioty

Germ-free (axenická) zvířata (intestinal atonia)

- alimentární **lamina propria** nevyvinutá, málo nebo žádný **immunoglobulin** v séru nebo sekretech, redukováná **intestinální motilita**, intenzita obnovy **intestinálních epitelových buněk** zhruba poloviční ve srovnání s normálními zvířaty
- žijí déle, ale

Zvířata ošetřená streptomycínem po infekci streptomycin-rezistentní bakterií *Salmonella*:

- 10^6 buněk x méně než 10 k ustanovení gastrointestinální infekce
- fermentační produkty (acetic and butyric acids) produkované normální mikroflorou inhibují růst bakterií *Salmonella*

Mikrobiota kůže

- dospělý člověk – 2 m² kůže - neustálý kontakt s vnějším prostředím
- různé oblasti kůže = geografické oblasti Země
- pouště předloktí, studené lesy vlasů, tropické lesy podpaží
 - mastné, upocené (hlava, krk, trup) – produkce kožního mazu
Propionbacterium
 - vlhké oblasti – *Corynebacterium*
 - suché oblasti (největší diverzita) – *Staphylococcus*
- velké rozdíly v mikroflóře – význam pro obranu
- různé mikrobiální komunity i v různých vrstvách kůže

Mikrobiota kůže

- většina bakterií se soustřeďuje do potních žláz
- G+ koky - *Staphylococcus epidermidis*
sekrece antimikrobiálních látek - obrana
ale i život ohrožující infekce v nemocnicích
 - katetry a chirurgické zákroky
 - *Micrococcus* sp.
- corynebacteria – např. *Propionibacterium acnes* – nepatogenní (?)
z lipidů na kůži dělá SCFA – opět obrana
– ale dostane-li se do vlasového folikulu, pórů nebo kožních žláz, může způsobit zánět nebo akné
- i mikromycety – *Malassezia*
nejvíc hub na nohách

Mikrobiota kůže a imunita

P. acnes – kmeny na zdravé kůži produkují mají geny pro thiopeptidy inhibující G+ druhy (v kultuře inhibují *Staphylococcus epidermis*)

P. acnes způsobující akné je neprodukuje

S. epidermis – sekrece lipoteichoové kyseliny – prevence uvolnění zánětlivých cytokinů z buněk kůže

Přidání *S. epidermis* na kůži sterilních myší podpořilo imunitu (T-buňky)

Různí mikrobi ovlivňují rozdílné části imunitního systému

Někteří mikrobi produkují antimikrobiální látky, jiní naopak indukují uvolňování cytokinů spojených s nemocemi

Kožní probiotika? Návrat k „přirozenému“ stavu?

Normální mikrobiota oka

Historicky:

- malé počty *Staphylococcus epidermidis* a určité koryneformní bakterie (*Propionibacterium acnes*)
- mrkání stírá spojivky
- lakrimální sekrece (slzy) - bactericidní látky včetně lysozymu
- *Neisseria gonorrhoeae* a *Chlamydia trachomatis* zřejmě schopné specifické vazby na epitel spojivek (Ophthalmo-Septonex, AgNO₃)

Dnes: - bohatá mikrobiota včetně virů

Spojivka i rohovka –cca 12 mírně odlišných bakteriálních rodů

Třetinu z nich nelze klasifikovat/přiřadit

Normální mikrobiota respiračního traktu

horní cesty dýchací (nasopharynx), především nares (nosní dírky)
silně kolonizované

- *Staphylococcus epidermidis* a corynebacteria
- 20% populace - *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- zdravé dutiny sterilní
- pharynx - streptococci a různé Gram-negativní cocci;
někdy i patogeni (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*)

dolní cesty dýchací (trachea, bronchi a plicní tkáň) téměř bez mikrobů

- o 3 řády méně než v ústech a 6-9 řádů než v zaživ. traktu (surfaktanty)
- čistící efekt řasinkového epitelu, činnost makrofágů, kašláni, kýchání
- ostrůvky mikrobů – *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*
- poškozený epitel - *H. influenzae* nebo *S. pneumoniae* sestupující z nasopharynxu

Normální mikrobiota urogenitálního traktu

Moč - sterilní, mikroorganismy mají problém se sem dostat a udržet se zde

anterior urethra - *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, alpha-hemolytic streptococci, některé enterické bacteria (e.g. *E. coli*, *Proteus*) a corynebacteria (kontaminanty)

Normální mikrobiota urogenitálního traktu

vagina

- různý mikrobiom v závislosti na rase, věku
- velice individuální
- kolonizována po porodu - corynebacteria, staphylococci, streptococci, *E. coli*, a bakterie mléčného kvašení – „Doderlein's bacillus" (*Lactobacillus acidophilus*).

Během reprodukčního života vaginální epitel obsahuje glycogen. Převládá zde „Doderlein's Bacillus“, který je schopen ho metabolizovat na kyselinu mléčnou – ta spolu s dalšími produkty metabolismu inhibuje kolonizaci jinými bakteriemi a reguluje množství bakterií mléčného kvašení; výsledné nízké pH vaginálního epitelu zabraňuje ustanovení se jiných bakterií stejně jako potenciálně patogenních kvasinek *Candida albicans*.

Normální mikrobiota urogenitálního traktu

vagina

- u většina žen dominuje jeden ze 4 kmenů *Lactobacillus*
- někdy ale dominují jiné anaerobní bakterie – ale i ty produkují kyselinu mléčnou
- dominance *Lactobacillus*
 - 80% asijských žen a 90% bílých (pH 4,4 a 4,2)
 - 60% hispánských a černých (pH 5,0 a 4,7)
 - možné spojení i s předčasným porodem
 - v průměru 10% předčasných porodů
 - v oblasti dominované černým a hispánským obyvatelstvem jde o 20%
- rychlé změny mikrobiomu (i 24 hodin)

Mateřský mikrobiom

- vagina – *Lactobacillus*
- novorozenec – Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroides
- placenta po porodu - *E.coli*, *Bacteroides*, *Prevotella tanneriae*, *Neisseria lactamica*
 - druhové složení nejpodobnější dutině ústní
 - metabolické dráhy – metabolismus kofaktorů a vitamínů
- mateřské mléko – mikrobiální polévka
 - *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Serratia spp.*, *Corynebacterium spp.*
 - ale silně individuální
 - matka předává mikroby z prostředí dítěti – trénink imunitního systému
- během těhotenství a kojení se mění mateřský mikrobiom – význam i pro zdraví matky

Mateřský mikrobiom

Mastitidy – vymizení *Lactobacillus*, dominance jednoho kmene patogenní bakterie

Přidání laktobacilu do potravy – táž bakterie se ukázala v mléku

Po třítýdenní kůře vymizení problémů – lepší než antibiotika?

Prsa i u nekojící ženy mají vlastní mikroflóru – význam pro rakovinu?

Normální mikrobiota ústní dutiny

- 1676 – Antonie van Leeuwenhoek – „animacules“
- 1890 – W.D.Miller – The microorganisms of the Human Mouth
- 2016 – Jakubovics – struktura dentálního plaku

Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD)

- November 22, 2017
- 772 prokaryotic species (70% kultivovatelných)
- 16S rDNA – 6 kmenů: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* a *Spirochaetes*
= 96%

Mikrobiota ústní dutiny

- společný vývoj s námi po milióny let
 - využití ohně, zemědělství, zpracované potraviny (cukr), antimikrobiální terapie
- závislé na věku:
 - po narození - *Streptococcus salivarius* (98%)
 - prořezávání zubů *S. mutans* (lactic acid) a *S. sanguis*
 - Bacteroides a Spirochetes kolem puberty

Normální mikrobiota ústní dutiny

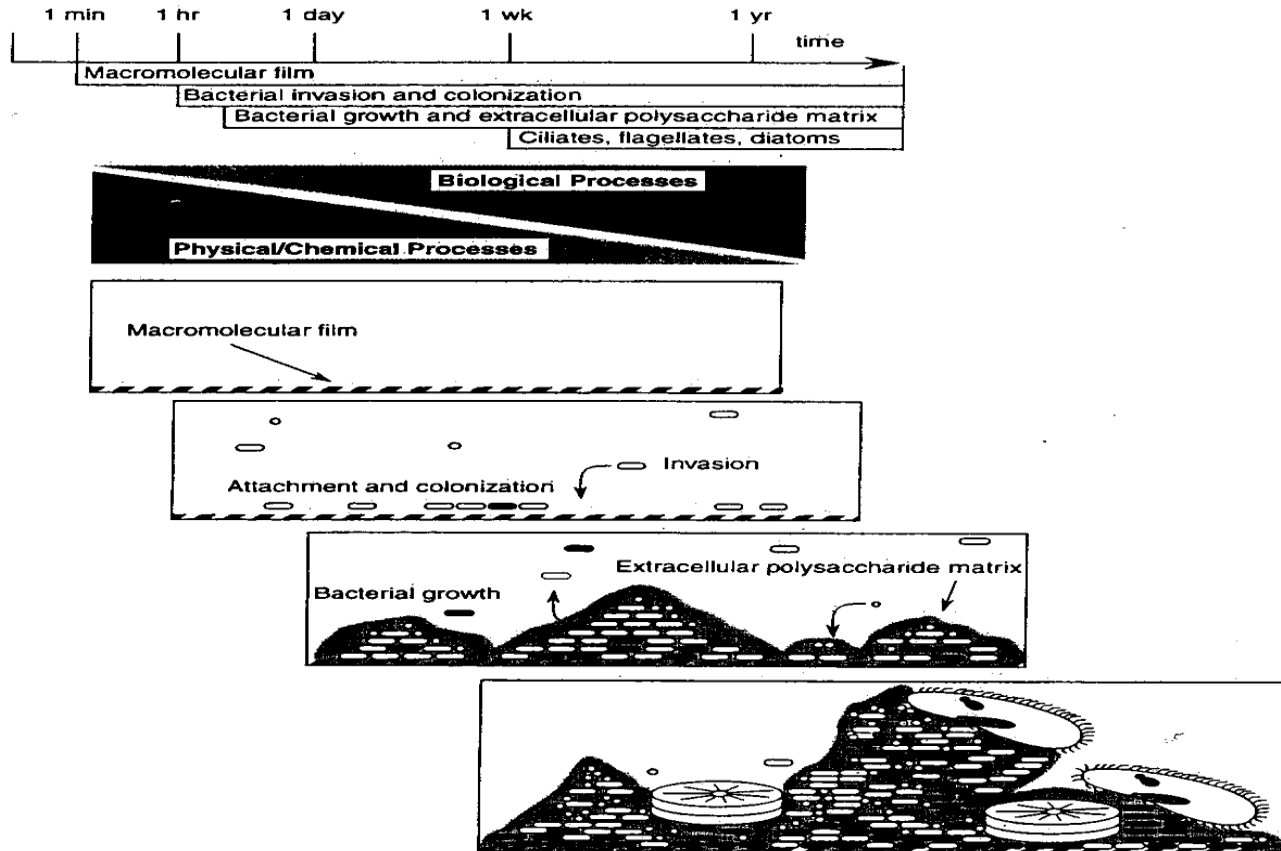
Tři habitaty

- sliznice tváří, dásně, tvrdé patro – Firmicutes, *Streptococcus sp.*
- hrdlo, mandle, hřbet jazyka, sliny – *Veillonella spp.*, *Neisseria spp.*, *Leptotrichia spp.*
- dentální plak – *Capnocytophaga spp.*, *Actinomyces spp.*, *Rothia spp.* a *Corynebacterium spp.*

Ústa – teplo, vlhko, živiny – sliny, crevikulární tekutina dásní

- proteiny, glykoproteiny
- immunoglobulin A, lactoferin, lactoperoxidase, lysozyme, statherin, histatin
- výsledkem je vyvážená mikrobiota
- tyto látky spolu s ostatními (i mikrobiální) vytváří film umožňující mikrobům jejich uchycení a zároveň chrání zuby proti ataku kyselin

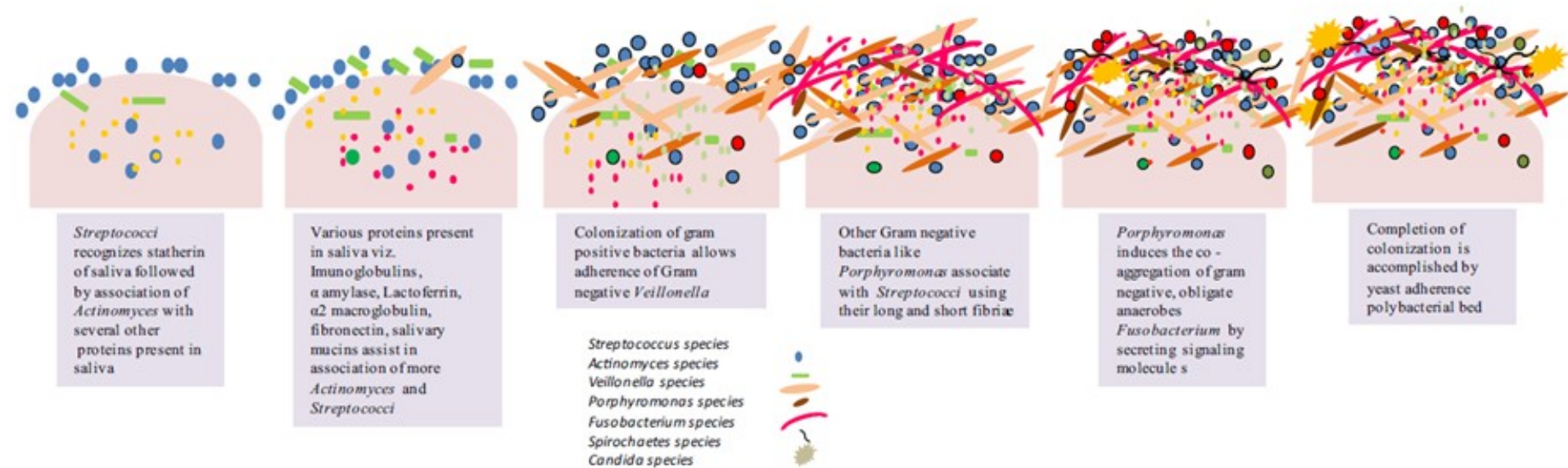
Tvorba biofilmu - obecně



The formation of a biofilm occurs as a successional process. The first step is the physical conditioning of the surface with the deposition of substances that attract bacteria and permit their adherence and growth. Next, populations invade, attaching to the surface and colonizing it. These bacteria initially form a monolayer. As they reproduce to form a thicker layer, new bacteria invade to establish a community with multiple populations. These bacterial populations excrete extracellular polysaccharides that form a matrix within which the biofilm's bacterial populations adhere. Eucaryotic microorganisms, including algae and protozoa, then invade the biofilm, continuing the successional process to form a complex biofilm community that is highly resistant to outside disturbance. (Source: Lawrence et al. 1995)

Normální mikrobiota ústní dutiny

tvorba zubního plaku



- nejprve fyzikální proces – pokrytí povrchů filmem z rozpuštěných látek
- poté (minuty) – reverzibilní přichycení bakterií – ireverzibilní
- orální bakterie – různé adheziny – interakce s molekulami a receptory na ostatních bakteriích
- *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Veillonella* spp.,
Porphyromonas spp., *Fusobacterium* spp., *Spirochetes* spp., *Candida* spp.

Normální mikrobiota ústní dutiny

Biofilm

- **koadheze** pozdějších kolonizátorů na již přichycené předešlé
- zvýšená diverzita a biomasa biofilmu
- význam bakteriálních **polymerů** (glukany, fruktany, heteropolymery)
- **matrix** – živiny, voda, enzymy
 - gradient – pH, O₂, živiny
- regulace exprese genů – odlišná od stejných planktonických mikrobů
- usnadněný horizontální transfer genů
- quorum sensing peptidy zvýšily frekvenci transformace u *S. mutans* 10-600x
- zvýšená rezistence k antimikrobiálním látkám

Normální mikrobiota ústní dutiny

Viry

- patogenní – příušnice, vzteklna, hepatitida, HIV, respirační infekce
- většina ale bakteriofágy – lytické, lyzogenní -

Houby

- detekováno 85 rodů
- *Candida spp.*, *Cladosporium spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Fusarium spp.*, *Saccharomycetales spp.*, *Aspergillus spp.* a *Cryptococcus spp.*
- *C. albicans* – její přítomnost umožní růst anaerobů v aerobních podm.

Archea

- minoritní součást
- metanogeni – zvláště u osob s periodontitídou

Normální mikrobiota ústní dutiny

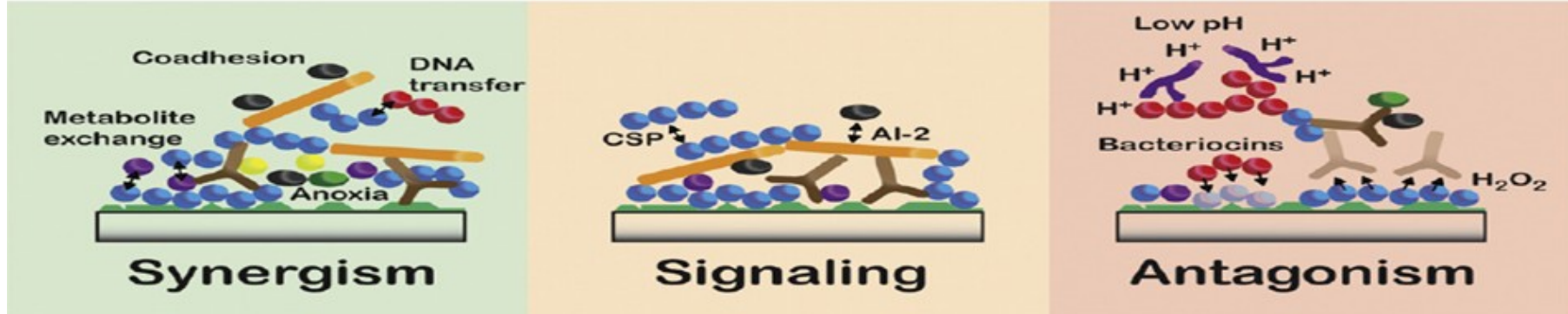
Bakterie

- objev ultramalých bakterií (nejen ústní dutina)
- redukovaný genom, absence mnoha biosyntetických a metabolických drah včetně elektronového transportního řetězce
- obligátní symbionti?

Normální mikrobiota ústní dutiny

Dentální plak

- bakterie žijící vedle sebe využívají různé živiny, produkují různé látky: synergismus, indukce odezvy v cílových buňkách a kompetice



- stejná látka – různá funkce – dle situace, koncentrace
- H₂O₂ – inhibice, ale v subletálních koncentracích signální funkce
- podobně organické kyseliny, bakteriociny – antagonismus, synergismus
- bakteriociny – kompetence buněk, uvolnění DNA

Úloha normální mikrobioty ústní dutiny

- **pouhá přítomnost** inhibuje kolonizaci potenciálními patogeny GIT
- **metabolismus nitrátů** a kardiovaskulární nemoci
- ¼ přijatých nitrátů se vrátí do dutiny ústní (sliny...)
- mikrobiota přemění nitráty na nitrity – ty do krve a přeměna na NO
- NO – zásadní pro zdravé cévy – pružnost, ohebnost – snížení tlaku
- ale i erekce, uvolnění svalstva v trávicí soustavě – posun potravy
- použití antibakteriální ústní vody výrazně snížilo příjem nitritů, zrušilo účinek nitritů na snižování krevního tlaku

- ale i souvislost se systemickými chorobami:
- metastatic infections of heart, brain, spleen, pancreas, liver, and bone, arteriosclerosis, cardiovascular diseases, stroke, respiratory diseases, meningitis, pneumonia, diabetes

Úloha normální mikrobioty ústní dutiny

Negativní účinky mikrobioty v dutině ústní

- zubní kaz, gingivitida, periodontitis
- UK – 46% 15tiletých dětí – kazy v trvalých zubech
 - 45% dospělých - perioditida

Zubní kaz – rozpuštění struktury zubů **kyselinami** z cukrů, snížení pufrovací kapacity slin a tím pH v ústech – změna ústní mikrobioty ve prospěch acidofilních druhů – ***Streptococcus mutans*** a laktobacily – další produkce kyselin – *Bifidobacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Scardovia spp.*

Jiné bakterie naopak zvyšují pH (močovina, arginin – amoniak)

Stejní obligátní anaerobi jsou obohaceni i v zánětlivých a nádorových tkáních

Úloha normální mikrobioty ústní dutiny

Gingivitida

- 90% dospělých
- dentální plak – **primární** kolonizátoři – G+ aerobové a fak. anaerobové (streptokoci a *Actinomyces spp.*)
- **zralý** (mature) plak – G- anaerobové – *Fusobacterium spp.*, *Treponema spp.*, *Synergistetes spp.*
- pravidelné čištění zubů – plak „nedozraje“
- zanedbaná hygiena – endotoxiny a jiné enzymy do dásní – dráždění a záněty – ztráta spojení dásně a zubu – periodontální kapsa – kolonizace anaeroby – reakce hostitele (tvorba proteáz) ještě zhorší situaci – uvolnění zubů
- *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Anaeroglobus geminatus*, *Eubacterium saphenum*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* a další

Úloha normální mikrobioty ústní dutiny

Zdravá ústa – většina bakterií v symbióze s hostitelem

Nemoc – zvýšený výskyt kariogenních a periodontopatických bakterií

- narušení rovnováhy – dysbiotický stav

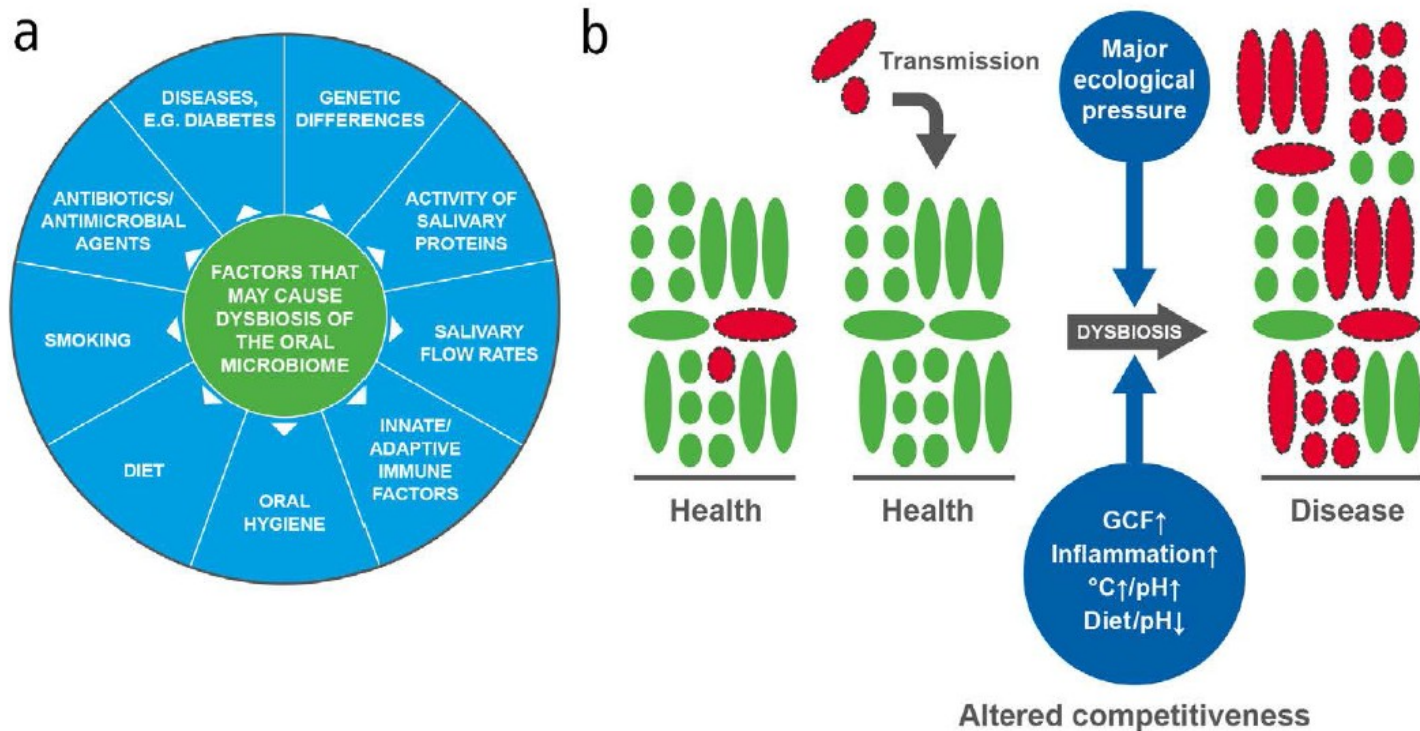


Fig. 5 (a) Causes of dysbiosis; (b) A model of dysbiosis (adapted from Marsh⁸⁰)

Zubní plak a dentální nemoci

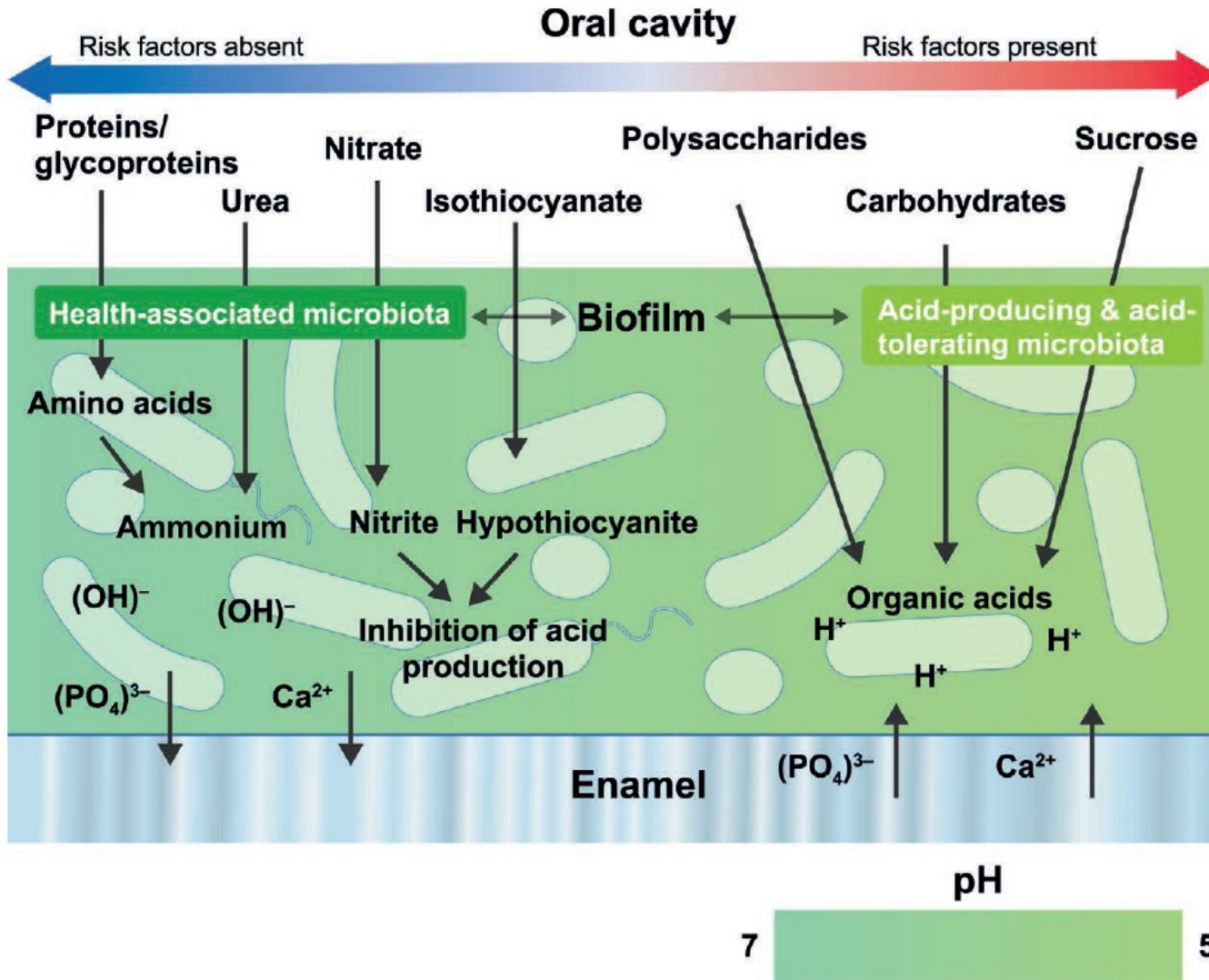


Fig. 6 A contemporary model of host–microbe interactions in the pathogenesis of caries (adapted from de Soet & Zaura and Takahashi)^{97,51}

Zubní plak a dentální nemoci

Nespecifická plaková hypotéza (19. st.) – dentální infekce způsobeny nespecifickým nárůstem všech bakterií – odstranit maximum

Specifická plaková hypotéza – nemoci způsobené pár druhy, jejich odstranění vyřeší problém

Ekologická plaková hypotéza (1980) – výrazné změny v prostředí plaku změní vztahy mezi bakteriemi – obohacení některých druhů.

Prevence nemoci nejen inhibicí patogenů, ale i změnou podmínek prostředí.

Normální mikrobiota ústní dutiny

Zubní náhrady – více aerobů, kvasinek a laktobacilů

Na náhradě – *Candida albicans*

Pod náhradou – kyselejší prostředí, méně slin – opět *C. albicans*

Zubní kazy - vakcinace, geneticky modifikovaný *S. mutans*

- **ALE** – *S. mutants* může být nahrazen jinými bakteriemi- *S. pneumoniae*
- benefity mikrobů - vitamíny, indukce nízké hladiny protilátek, antagonismus proti nepůvodním druhům (mastné kys., peroxidy, bacteriociny)
- zároveň ale i nemoci: abscesy, zubní kazy, gingivitis, periodontální nemoci, ale i abscesy alveolárních kostí, plic, mozku, končetin (*Bacteroides melaninogenicus*)

Mikrobiota ústní dutiny a čištění zubů

- čištění zubů už několik tisíc let před Kristem
 - ale pravidelné používání kartáčku a pasty až po 2. světové válce
 - reklamy – sterilní dutina ústní?!
-
- různé techniky čištění zubů
 - manuální x elektrický kartáček
 - výběr pasty

Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu

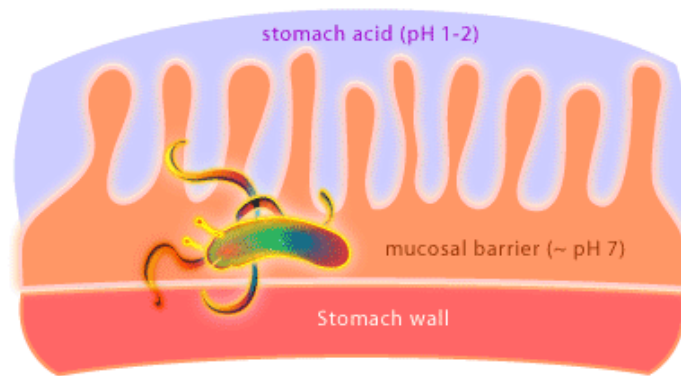
- **porod** - bakterie vstupují s první potravou – záleží tedy na ní:
- **kojené** děti - bifidobacteria (90%), *Enterobacteriaceae* a enterococci
- **umělá výživa** - bifidobacteria nepřevládají
- přechod na **kravské mléko** nebo pevnou stravu - bifidobakterie plus enterické bakterie, bacteroides, enterococci, lactobacilli a clostridia
- **lidské mléko** - růstový faktor podporující růst bifidobakterií
- bifidobakterie brání kolonizaci nepůvodními nebo patogenními druhy
- důkazy „tissue tropism“ a specifické adherence

- **gram-pozitivní bakterie** - polysacharidy kapsulí nebo teichoové kyseliny buněčné stěny se váží na specifické receptory buněk epitelu

- **gram-negativní bakterie** - specifické fimbrie se váží na glycoproteiny povrchu buněk epitelu

Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu

- věk, dieta, kulturní podmínky, užívání antibiotik, ...
- ezofagus – žádné bakterie
- žaludek – pH - acid-tolerantní lactobacilli
 - *Helicobacter pylori* – žaludeční vředy, rakovina žaludku a dvanácterníku
 - urease – urea – ammonium
 - možná i pozitivní funkce
 - ochrana proti dětským průjmům a problémům jícnu (pálení žáhy a vážnější důsledky)



Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu – pokračování

- **tenké střevo** – vysoká průtoková rychlost - lactobacilli a *Enterococcus faecalis* - 10^5 - 10^7
- vzdálenější části (10^8 /ml) – další druhy - *E. coli* a příbuzné bakterie plus *Bacteroides*
- trávení - převážně lidské enzymy, mikrobi – možná kompetice o esenciální živiny

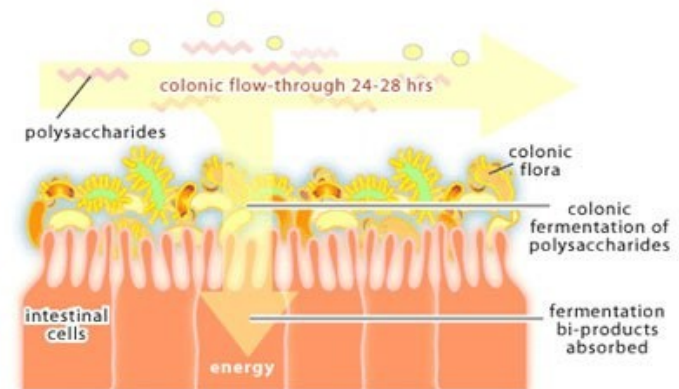
- **tlusté střevo (colon)** – mikrobi jako v exkrementech - 10^{11} /ml – 10^{13}
- bakterie – kolem 35-50% obsahu tlustého střeva – více jak 1 kg
- koliformní, enterokoci, klostridia a laktobacilli
- predominantní anaerobní *Bacteroides* a anaerobní bakterie mléčného kvašení *Bifidobacterium spp.* (*Bifidobacterium bifidum*)
- významné množství anaerobních methanogenů

Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu – pokračování

Úloha bakterií v GI traktu

- produkce vitamínů
- přispívají k výživě a trávení (polysacharidy – acetate, butyrate a propionate – zdroj uhlíku a energie pro buňky sliznice tl. střeva)
- ochrana proti infekci cizorodými mikrobi
- stimulace vývoje a aktivity imunologických tkání

- produkce karcinogenních metabolitů (colon cancer)
- změny ve složení GI flory (špatná výživa, antibiotika)
 - posun populací a kolonizace cizorodými bakteriemi
 - gastrointestinální nemoci



Viry a náš mikrobiom

- většina známých virů jsou patogeni – jen tak jsme se o nich dozvěděli
- ale mnoho virů nás infikuje bez příznaků nemoci
- molekulární metody – mnoho dalších virů objeveno
- původně 2 humánní polyomaviry – dnes 13 – infikují nás během dětství a pak čekají
- Kochovy postuláty – problém u virů
- většina virů není ani zcela patogenní ani neškodná – dle situace

Viry a náš mikrobiom

Benefity virů

- infekce v dětství stimuluje vývoj imunitního systému – ochrana proti pozdější infekci a přehnané reakci – alergie
- komensální vir může poskytnout ochranu proti patogennímu viru
- pegivirus C (příbuzný hepatitídě C, Zika viru, horečka dengue)
zmírňuje důsledky HIV – $\frac{3}{4}$ miliardy lidí je infikováno
- viry preferují rychle se dělící buňky – rakovinné – spontánní regrese

- kolem 8% našeho genomu jsou retrovirální DNA sekvence
- některé jejich funkce jsou esenciální pro přežití hostitele a jeho vývoj

Mykobiom

- 2015 – jen 269 z 6000 výsledků pro mikrobiom zmiňovalo houby
- mykobiom – jen 55 výsledků

- orální mykobiom u HIV pacientů
- výraznější příznaky hepatitidy B korelují s množstvím druhů *Candida spp.* a *Saccharomyces spp.*
- nadměrná přítomnost *Candida tropicalis* zhoršuje příznaky inflammatory bowel disease
- nenarušená mikrobiální komunita – houby neškodné, nebo i prospěšné
- po narušení – možné problémy

Mykobiom

- dutina ústní – nejen *Candida spp.* a *Saccharomyces spp.*
- 20 dobrovolníků – 101 druhů hub, každý měl 9-23 druhů
- *Cladosporium spp.* (astma), *Aureobasidium spp.* (transplantace),
Aspergillus spp. (devastující infekce), *Fusarium spp.* (obtížné infekce),
Cryptococcus spp. (meningitida u HIV)

- jinde na těle *Malassezia spp.* – kožní nemoci
- plíce – *Aspergillus spp.* u zdravých lidí, *Candida spp.* u nemocných
(cystická fibróza, kardiovaskulární nemoci,...)

- inflammatory bowel disease – jiný mykobiom než u zdravých lidí
- obezita – více zástupců Ascomycota, celkově ale snížená diverzita
- *Mucor spp.* – u štíhlých lidí (korelace s obezitou)

Máme všichni stejné mikroby ?

- **rozdíly: zažívací trakt, vagina (druhová i metabolická rozmanitost)**
- **podobnost: mikroflóra úst a kůže – změny v čase, ale méně variabilní u různých jedinců**

Ustanovení lidského mikrobiomu

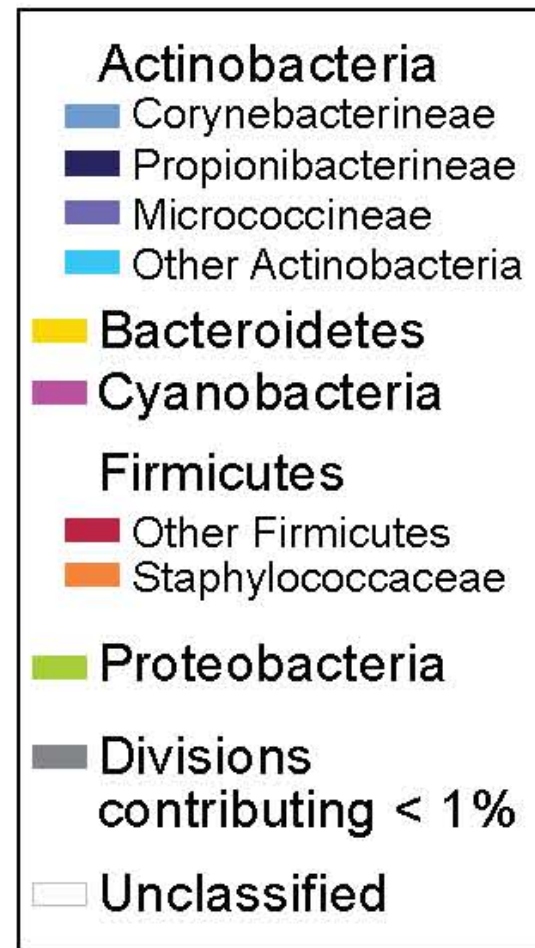
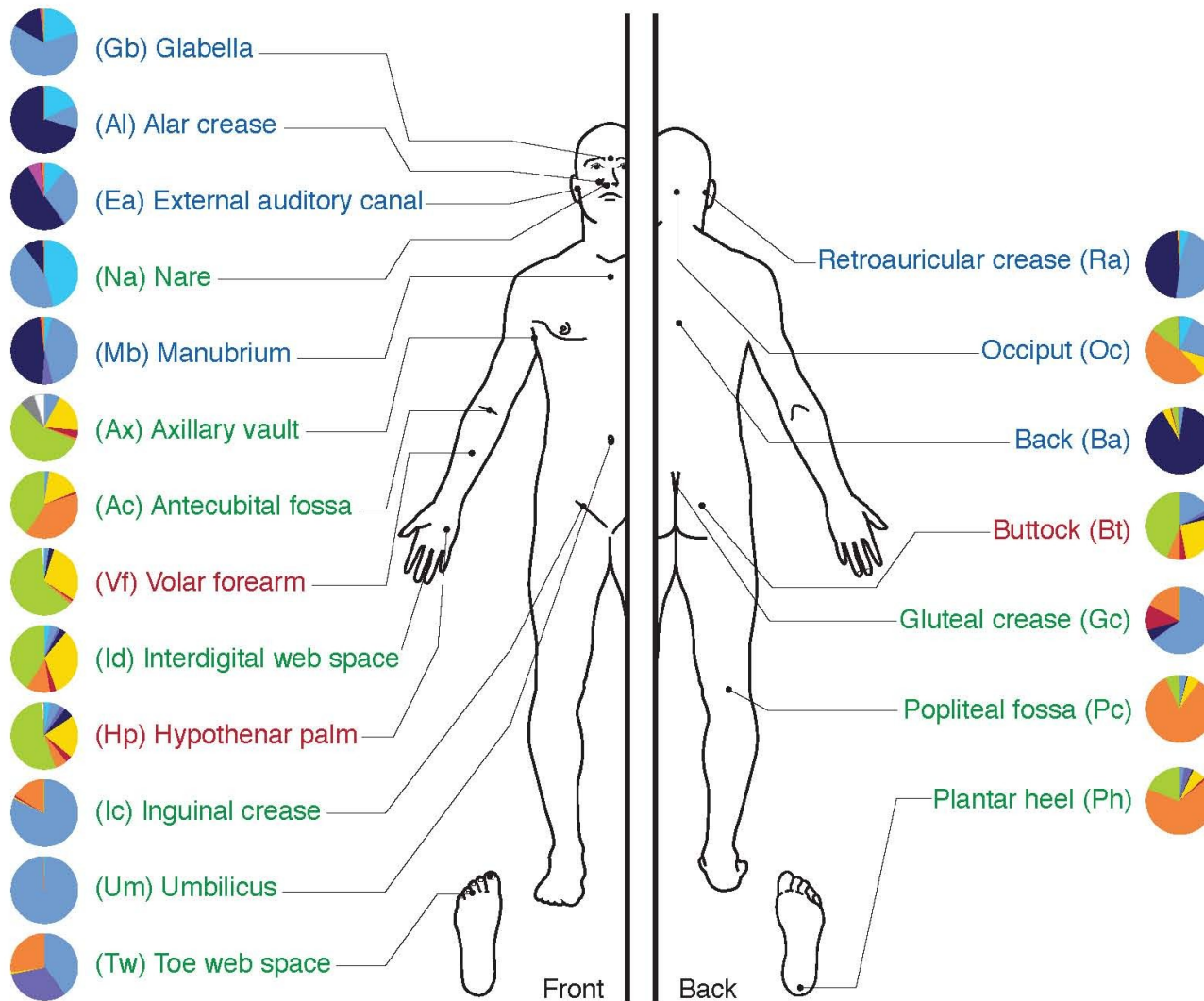
- **plod** v děloze není sterilní
- mikroflóra **vaginy** se mění během těhotenství (80% *Lactobacillus* sp.)
- **novorozenec** – Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroides
- mikrobiom **placenty**- nepatogenní komensální microbiota kmene Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes a Fusobacteria (*E.coli*, *Prevotella tanneriae*, *Neisseria lactamica*) – podobné ústní mikroflóře
- další kolonizace během **porodu**, poté při **kojení** (mléko není sterilní), z kůže matky
- mléko: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Serratia* spp., *Corynebacterium* spp.
- záleží na prostředí matky (příprava...)
- také zkoumání prostředí – vše ústy
- kolem druhého roku života je dosaženo určité rovnováhy

Human Microbiome Project

- zahájen 2008 – pětiletý projekt - rozpočet \$115 million
- **(Human Genome Project – zahájen 1990, dokončen 2003)**
- vzorky flóry ústní dutiny, kůže, vagíny, zažívacího traktu a dýchací soustavy 300 zdravých jedinců

- význam změn lidského mikrobiomu pro zdraví a nemoc
- **ALE** – co bylo první?!?!?!?!?
- zahájeno mnoho dalších (specializovaných) studií mikrobiomu:
 - American Gut Project, MetaHIT, MyMicrobes, Human Longevity, Earth Microbiome project, Human Food Project

- dramatické rozdíly mezi jedinci co se týká druhového složení
- **ALE** posuzováno podle funkce - velmi podobné
- mikrobiom každého jedince je v čase celkem stabilní
- hlavní problém v interpretaci výsledků – veřejné databáze



Význam lidského mikrobiomu

- do r. 2015 – publikováno kolem 19 000 článků (5,000 v r. 2015)
- většina ale popisných – identifikace
- zůstává otázkou jejich role ?
- jak spolupracují mezi sebou a s lidským hostitelem?
- lidský mikrobiom: také viry, archaea, houby, jednobuněčná eukaryota...

- lidský genom -20 000-25 000 protein kódujících genů
- lidský mikrobiogenom - 2-20 miliónů protein kódujících genů
- všichni mikrobi kontinuálně vylučují (excrete/secrete) malé a velké molekuly a částice obsahující RNA, DNA, proteiny - komunikace se sousedy a hostitelem – mnoho z těchto molekul a částic může proniknout stěnou zažívacího traktu do krevního oběhu
- metagenom mikrobiomu – rychlejší změny než lidský genome
 - rychlá odezva
- mikrobiom = sofistikovaný orgán (nebo soubor orgánů)

Význam lidského mikrobiomu

- narušení mikrobiomu spojováno s mnoha nemocemi:
 - inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease), diabetes, obezita
- mikrobi ovlivňují signální cesty které se účastní komunikace mezi zažívacím traktem a mozkiem (nervové, endokrinní a imunitní signály)

Manipulace lidského mikrobiomu

- *Clostridium difficile* - faecal transplant (stool bank - OpenBiome)
- 4. století – čínská lékařská literatura – fekální transplant při otravách z potravy a silných průjmech
- beduíni – velbloudí trus při bakteriální dysentérii

- ale napřed **MUSÍME POZNAT** mikrobiom, teprve pak můžeme pomýšlet na cílenou manipulaci

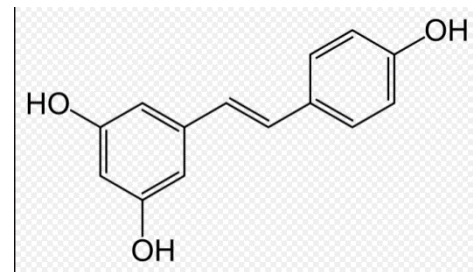
Prebiotika

- komplexní uhlovodíky – zkoumána celulóza, hemicelulóza, lignin, pektin, oligosacharidy – odolávají kyselinám v žaludku, hydrolýze lidskými enzymy – dostanou se až do tlustého střeva – substrát pro fermentaci mikroby
- podobně oligosacharidy z mléka (kojení), proteiny, AK, určité lipidy
- trávení v tlustém střevě komplexní proces nutričních interakcí mezi různými bakteriálními druhy
- např. komplexní polysacharidy fermentovány rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*,...
- glykolytické bakterie (*Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*) rostou na jednodušších cukrech
- jednoduché mastné kyseliny (SCFAs) – hlavní produkt fermentace
 - butyrát – primární zdroj energie pro buňky epitelu střeva
 - propionát – syntéza cholesterolu v játrech
 - acetát – hepatická lipogenese a ATP ve svalech
- SCFAs také snižují pH – antagonismus proti patogenům
antimikrobiální aktivita

Prebiotika – pokr.

- někdy jen inulin, frukto- a galaktooligosacharidy a laktulóza považovány za prebiotika

- na druhé straně někdy i ne-karbohydrátové sloučeniny
 - polyfenoly, minerály, vitamíny – modulují mikrobiota
 - např. resveratrol (červené víno) – více *Bacteroides*, *Bifidobacterium*



- 95% polyfenolů dorazí do tlustého střeva
- Ca doplňky - modulují mikrobiota u obézních myší
- riboflavin, cystein – nové prebiotikum?
 - striktně anaerobní bakterie (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*) může ochránit proti kyslíku – zvl. v mukózní vrstvě sliznice (kyslík z krve)

Prebiotika – pokr.

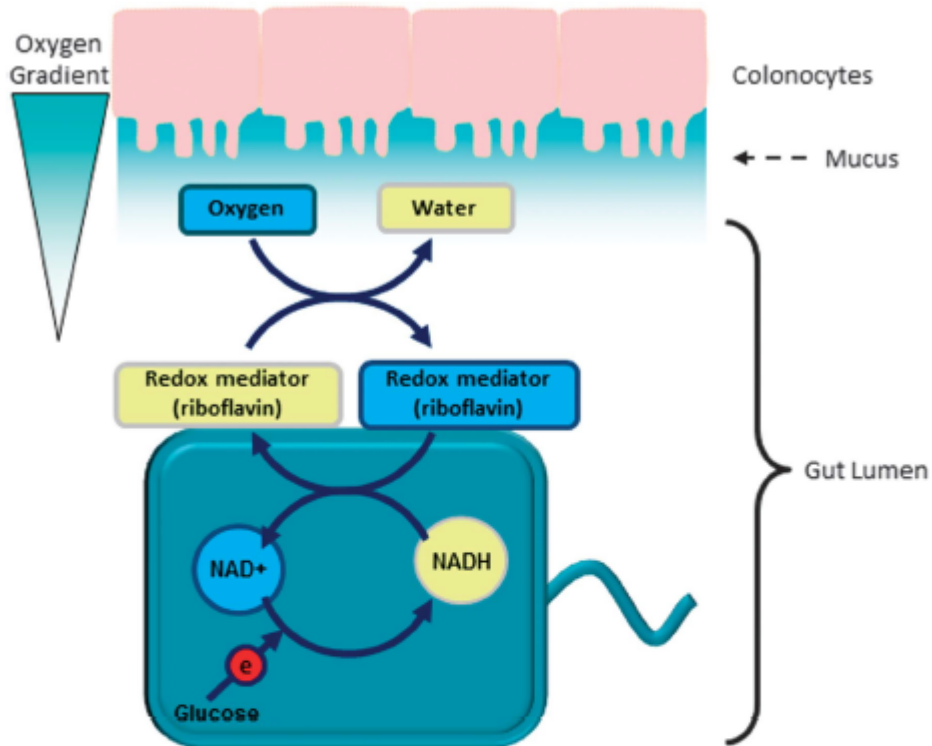


Figure 1. Schematic representation of the function of vitamins as redox mediators carrying reduction equivalents that are liberated during the glycolysis of carbohydrates via NADH to oxygen. Glucose is an example of a carbohydrate electron donor. The electrons reduce the mediators and finally oxidize electron acceptors from the epithelium, such as oxygen or nitrate. The flagellated box represents a bacterium, such as *F. prausnitzii*. In the presence of redox mediators, the anaerobic bacteria can reduce the oxygenated environment using their metabolism and thus reduce oxidative stress.^{69,70}

Pokusy s riboflaminem

- zvýšil výskyt *F. prausnitzii*
- produkce protizánětlivých peptidů
- IBD charakterizovány nízkými počty *F. prausnitzii*

- tlusté střevo tedy nejen absorpce vody, minerálů a zpracování nestrávené potravy
- mikrobiom ovlivňuje fyziologii hostitele, ...

Mikrobiom a obezita

- 2014 – 1,9 mld lidí s nadváhou, z toho 600 mil obézních
- od r. 1980 se počet obézních zdvojnásobil (WHO)
- od počátku tohoto století je mikrobiom zažívacího traktu (gut microbiota – GM) považován za významný faktor patogeneze metabolických nemocí a obezity (metabolické dráhy, jejich vliv na imunitní systém a odezvy na impulzy z prostředí – strava,....)
- GM se významně podílí na trávení a absorpci živin i na celkové energetické bilanci
- složení GM ovlivňováno dietou, životním stylem a prostředím
- 20% nárůst Firmicutes a tomu odpovídající pokles Bacteroides se odrazí ve zvýšeném příjmu energie a indukuje obezitu

Mikrobiom a obezita

- GM obézních jedinců vykazuje zvláštní metabolismus uhlovodíků a tuků
- GM je schopen trávit lidskými enzymy nestravitelné polysacharidy
- výsledkem je energie, SCFAs – ty zase ovlivňují metabolismus glukózy, cholesterolu a tuků v různých tkáních
- západní dieta (moc tuků) redukuje *Bacteroides* a zvyšuje *Firmicutes*
- *Prevotellaceae* (produkce H) a archea hojně u obézních jedinců
 - transfer H mezi bakteriemi a archeemi může zvýšit příjem energie v GIT (*Methanobrevibacter smithii*)
- GM aktivují žlučové kyseliny a zúčastní se jejich regulace a metabol.
- žlučové kyseliny pomáhají absorpci lipidů

Mikrobiom a obezita

- cca 40% genů GM je společných pro všechny jedince
- udržování energetické homeostáze vyžaduje přísnou regulaci množství zkonsumované a přijaté energie
- obezita spojena se změnou stylu života, potravou bohatou na kalorie, ale i změnou GM
- germ-free myši nevykazují obezitu spojenou s dietou bohatou na tuky - intestinální SCFAs redukovány, kalorie ztráceny močí a výkaly
- jde tedy i o účinnost využití energie ze zkonsumované potravy
- konjugovaná linolenová kyselina zrychluje metabolismus myší
- *L. rhamnosus* ji produkuje a pomáhá udržet váhu myší na dietě s vysokým podílem tuků
- podobně působí *E. coli*, naopak (zvýšení váhy) *Lbc. reuteri*

Mikrobiom a obezita

- obezita je spojována i se zvýšeným rizikem rakoviny – děloha, prsu, děložní čípek, vaječníků, tlustého střeva, konečníku, jícen, ledvin, slinivky, prostaty, hematologické problémy
- zvýšená mortalita pacientů trpících rakovinou
- význam prevence obezity/rakoviny
- bakterie u gravidních myší v mezenterické lymfě – do plodu?
- význam způsobu porodu
 - vaginální porod – mikroflóra zažívacího traktu – *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*
 - císařský řez – *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionbacterium* – kožní mikroflóra
- význam výživy
 - kojené děti – dominance *Bacteroidetes*
 - umělá výživa – dominance *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*

Mikrobiom a obezita

- výskyt obezity koresponduje „výskytu“ polotovarů
 - negativní dopad konzervačních prostředků a emulgátorů
- prebiotika - podpora růstu prospěšných bakterií
 - zpomalení ukládání tuků indukcí produkce SCFAs
 - modifikují produkci hormonů ovlivňujících apetit
 - modifikují produkci enzymů ovlivňujících lipogenezi
 - mohou snížit ukládání tuků dekonjugací žlučových kyselin, které jsou méně účinné v absorpci tuků z potravy
- antibiotická eradikace *Helicobacter pylori* – zvýšení obezity

Mikrobiom a obezita

Obezita je pravděpodobně spojena s:

- zvýšeným výskytem bakterií kmene *Firmicutes*, *Actinobacteria*
- sníženou četností kmene *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* a bakterie *Faecalibacterium prausnitzii*
- prokázán přenos obezity fekální transplantací při léčbě *C. difficile*
- obézní jedinci měli bohatou mikroflóru (snížená metabol. aktivita)

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

- mikrobi v potravinách – možnosti:
 - potrava a mikrobi v ní nezpůsobí žádné výrazné změny
 - potrava je probiotická - ...
 - potrava obsahuje patogeny – dysbióza
- vývoj mikrobiomu ovlivněn způsobem porodu, výživou, genetikou
- transfer mikrobů z matky na dítě kojením (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*)
- komenzálové (*Bifidobacterium*) – prevence kolonizace patogeny –
 - *Listeria*, *Campylobacter*,...
- po čase se tento ekologický systém stane sekundárním imunitním systémem
- se snížením diverzity mikrobiální komunita se sníží i stabilita systému – systém je citlivější k invazivním druhům (patogeni)
- snížení diverzity spojeno se „západní dietou“

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

- probiotické organismy stejně četné jako patogenní
- vyvinuly se spolu s člověkem v mnoha potravinách
- jejich pozitivní vliv
 - sekundární metabolity stimulující rozvoj jiných užitečných organismů – kompetice s patogeny

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

Bifidobacterium spp.

- významná komensální LAB
- 3-6% mikroflóry dospělého člověka – později snižování
- přítomnost této bakterie a dalších LAB zabraňuje infekci

Clostridium spp.

- stimuluje imunitní buňky hostitele
- zabraňuje negativním karcinogenním škodám na DNA
- zabraňuje a léčí akutní průjmy u dětí
- léčí intoleranci laktózy

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

Campylobacter spp.

- *C. jejuni* – G- - průjmy, gastroenteritidy
- kontaminant drůbeže a migrujících ptáků
- nepasterizované mléko, hovězí dobytek, vepřové (párky), voda

Clostridium spp.

- G+ sporogenní, toxigenní bakterie
- drůbež, hovězí i vepřové maso, konzervované potraviny
- *C. perfringens* – kontaminuje dobytek i maso
 - ze vzorku 50 zdravých zvířat bylo 76% hovězího dobytka, 44% prasat a 80% kuřat kontaminováno – značná část dokonce enterotoxin produkujícími kmeny
 - vzorky masa dopadly ještě hůř (kolem 90%)
- enterotoxiny jsou vážný problém clostridiové kontaminace

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

Escherichia spp.

- žádoucí mikrob, ale někdy také patogen
- změna z přítele na patogena – horizontální transfer genů
 - **diarrheagenické kmeny** – enteropatogenní, enterotoxigenní, enteroinvazivní, enterohemorhagický, enteroagresivní a difúzně adherentní
 - **extraintestinální kmeny** – uropatogenní kmeny a kmeny způsobující neonatální meningitidu
- v rozvinutých zemích závažné jen enteroinvazivní a enterohemorhagické kmeny
- O157:H7 – přežije v mnoha hostitelích i prostředích – pH2, desikace
- LAB a *Enterococcus faecalis* – snížili cfu ve výkalech zvířat o 2-4 řády

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

Listeria spp.

- *L. monocytogenes* – G+ tyčka fakultativně anaerobní
- gastroenteritidy u zdravých jedinců, meningitidy u imonokompr., potraty
- mortalita – 20-30%
- nachází se a přežívá v mnoha prostředích – rezistentní biofilm
- dá se omezit pomocí LAB, kvasinek a dalších bakterií (změna pH, antimikrobiální enzymy, kompetice, bakteriociny)

Staphylococcus

- G-, f. anaerobní, MRSA – 1961
- enterotoxiny – otravy potravou – nemoc během 2-8 hodin

Mikrobiom a mikrobi v potravinách

LAB – bakterie mléčného kvašení - *Firmicutes*

- ústa, vagina, zažívací trakt, mukózní povrchy
- také běžně v prostředí - rozšíření pomohl i člověk – domestikace zvířat
- kromě kys. mléčné i řada sekundárních (antimikrob.) metabolitů
- bakteriociny, antimikrobiální org. kyseliny
- zabraňují kolonizaci patogeny
- přirozené konzervanty
- inhibice *S. enteritidis* (i kompeticí o laktulózu a Ca) - v mléč. výr.
- přítomné i v mateřském mléce – i imunokompetentní buňky

Mikrobiom a individuální dieta

- s potravou patogeni, toxiny (grilování, rezidua herbicidů,...)
- modifikace mikrobiomem - degradace, nebo také ne...

- potrava s vysokým podílem satureovaných tuků, mléčných produktů
 - mikrobi produkující H_2S – záněty, poškození DNA buněk epitelu
- vegetariánská strava – produkce SCFAs

- maso – esenciální mikroživiny, AK, proteiny
 - ale možná kontaminace nežádoucími mikroby (stažení z prodeje)
 - rychlá kontaminace – *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp.,
E.coli, *Listeria* spp.
 - prevence - LAB

Mikrobiom a individuální dieta

Vegetariáni

- větší zastoupení rodů *Bacteroides*, *Prevotella*
- kromě vlákniny a karbohydrátů i žádoucí fenoly (i v kávě a víně)
- obě látky redukuje invazi mikrobů a projevy zánětů
- někdy ale i opačný trend – méně *Bacteroides* a *Bifidobacterium*
- cereálie mají kladný vliv i v dietě omnivorů – prebiotika

Omnivoři

- dieta složená se zeleniny a masa nejlepší pro lidské zdraví
- ale tzv. západní dieta tento přínos snižuje
- středozevní dieta (méně masa a více ovoce, zeleniny, ryb a mléčných výrobků)

Pár slov závěrem

Mikrobiom a zdraví

- prenatální vývoj
- způsob porodu
- výživa během prvních měsíců (kojení...)
- následná výživa
- šetrné používání antibiotik
- hygiena
- životní styl