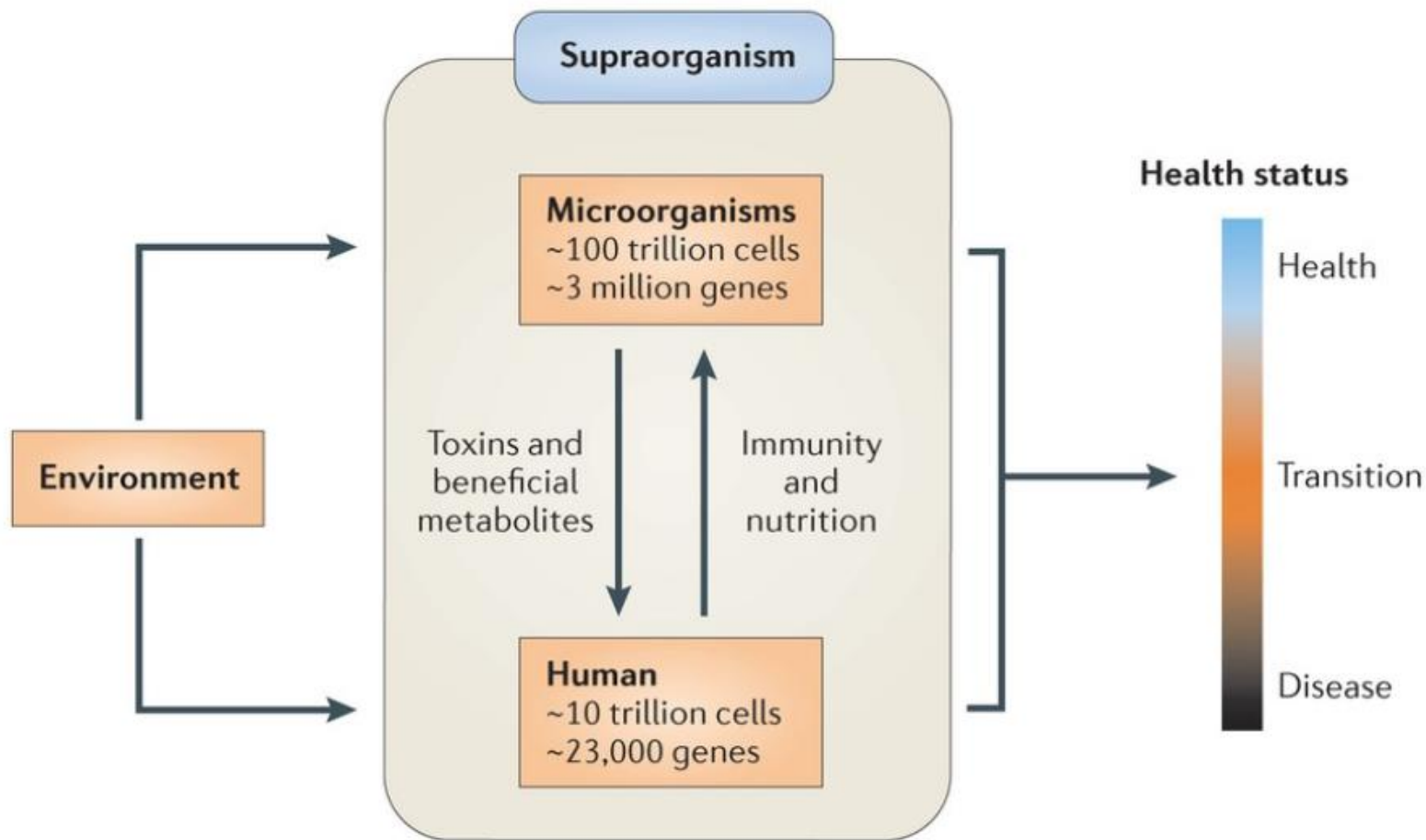


# Mikroflóra a mikrobiom

Filip Růžička

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Přednáška pro TZKM 2020



Nature Reviews | **Microbiology**

!!! v angličtině (krátká soustava = American system) *trillion* =  $10^{12}$  (tj. bilion v ČJ) !!!  
 Trilion v dlouhé soustavě (kontinentální Evropa , vč. ČR) =  $10^{18}$

Bakterií máme v těle více, než vlastních buněk  
Naše těla obsahují cca 10 biliónů buněk ( $10^{12}$ )  
Hostíme cca  $10^{14}$  -  $10^{15}$  mikroorganismů - 1,5 kg

Bakteriální geny převyšují počtem geny lidské 100:1

Ve střevě žije více než 1000 rodů bakterií, 5 rodů *Archaea*,  
66 rodů hub, prvoků a virů (bakteriofágů)

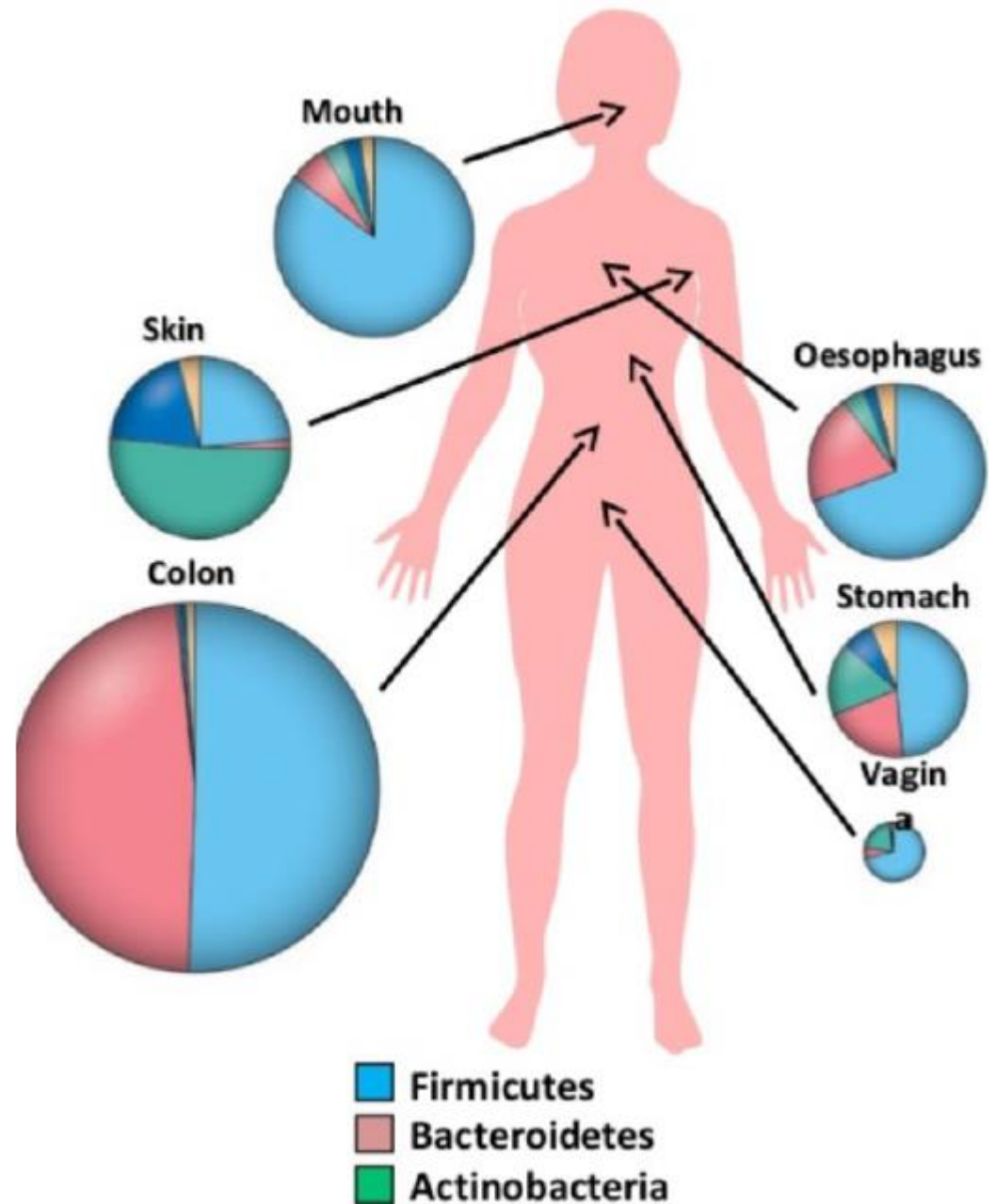
Mikrobiom je individuální („otisk prstu“) - mění se v čase  
složením potravy, xenobiotiky (léky ATB, omeprazol, jedy),  
hormony (endo-, xenogenní), psychickými vlivy aj...

**Firmicutes** - např. laktobacily, bacily, stafylokoky, streptoky, klostridia aj.

**Bacteroidetes** - např. bakteroidy, flavobacteria, sphingobacteria aj.

**Actinobacteria** - např. bifidobakteria, aktinomycety, nokardie, streptomycety, mykobakteria, korynebakteria, mikrokoky, propionibakteria aj.

**Proteobacteria** - např. entrobakterie, vibria, pseudomonády, neisserie aj.



**Mikroflóra = Mikrobiota** - je společenství žijících mikroorganismů sídlících v stanovené ekologické nise

**Komenzální mikrobiota (komezálové)** - mikrobiální společenství kolonizující hostitele bez choroboplodných zárodků. Vztah mezi hostitelem a touto mikrobiotou je oboustranně prospěšný

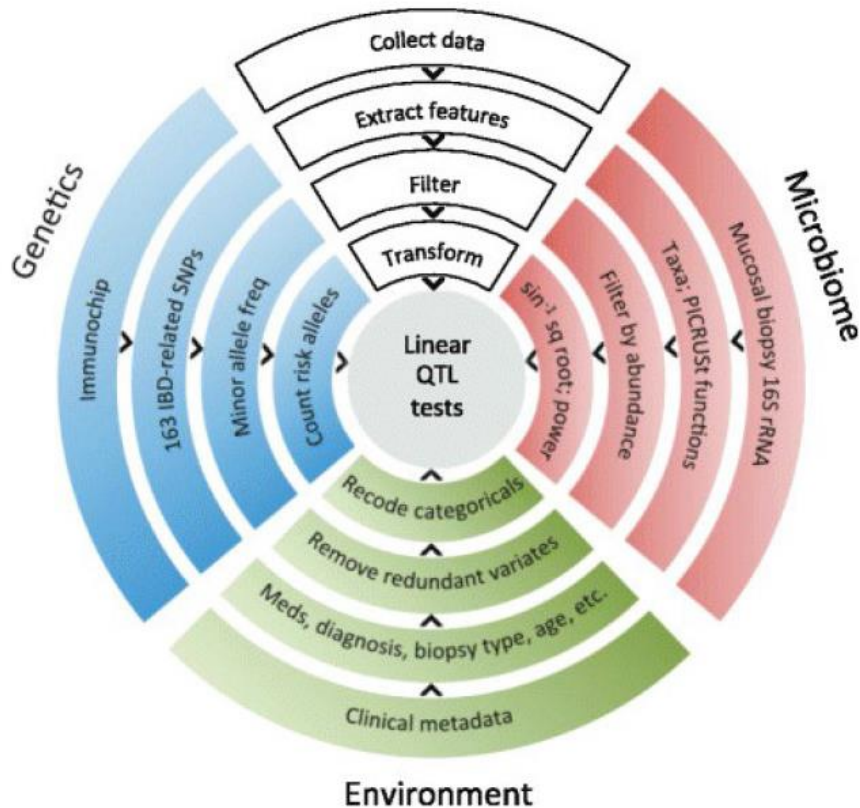
**Mikrobiom** - všechny mikroorganismy, jejich geny a jejich metabolismy

**Quorum sensing** - molekuly umožňující bakteriím koordinovaně regulovat expresi svých genů, tím jsou schopny synchronizovat svoje chování a chovat se v mnoha ohledech jako mnohobuněčný organismus / obecněji značí typ rozhodovacího procesu využívaného decentralizovanými skupinami či společenstvy (např. hmyzu) k jednotné reakci („kolektivnímu“ rozhodnutí).

# Funkce mikrobiomu

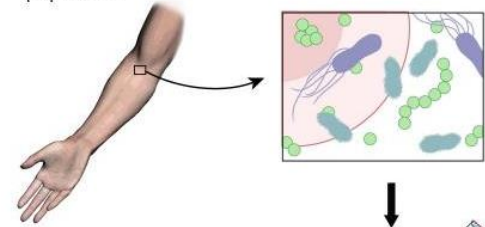
- Stimulace imunitního systému
- Vývoj imunitního systému po narození
- Trávení potravy
- Zdroj vitamínů (B, K)
- Vývoj střevní stěny
- Prevence před pomnožením patogenních bakterií
- Vliv na vývoj mozku a na jeho funkce
- Vliv na metabolismus (ukládání tuku aj.)
- Vliv na vznik řady onemocnění (obezita, DM, Ca, ateroskleróza, chronická zánětlivá onemocnění (střeva), psychická onemocnění, autoimunitní onemocnění aj. ....)
- a další....

# Výzkum mikrobiomu

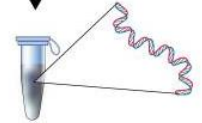


## Bacterial 16S rRNA sequencing workflow example for skin microbiome studies

(1) Obtain superficial skin sample containing mixed bacterial population



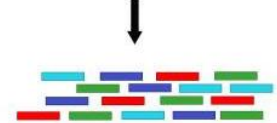
(2) Isolate DNA from skin sample



(3) Amplify bacterial 16S rRNA gene with primers encompassing variable regions of interest

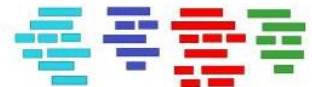


(4) Sequence 16S rRNA genes

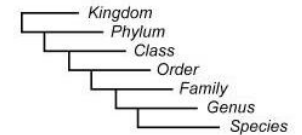


(5) Perform data processing, quality control and analysis of bacterial 16S rRNA sequences:

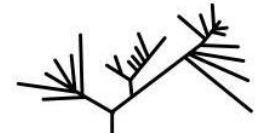
- Alignment of sequences



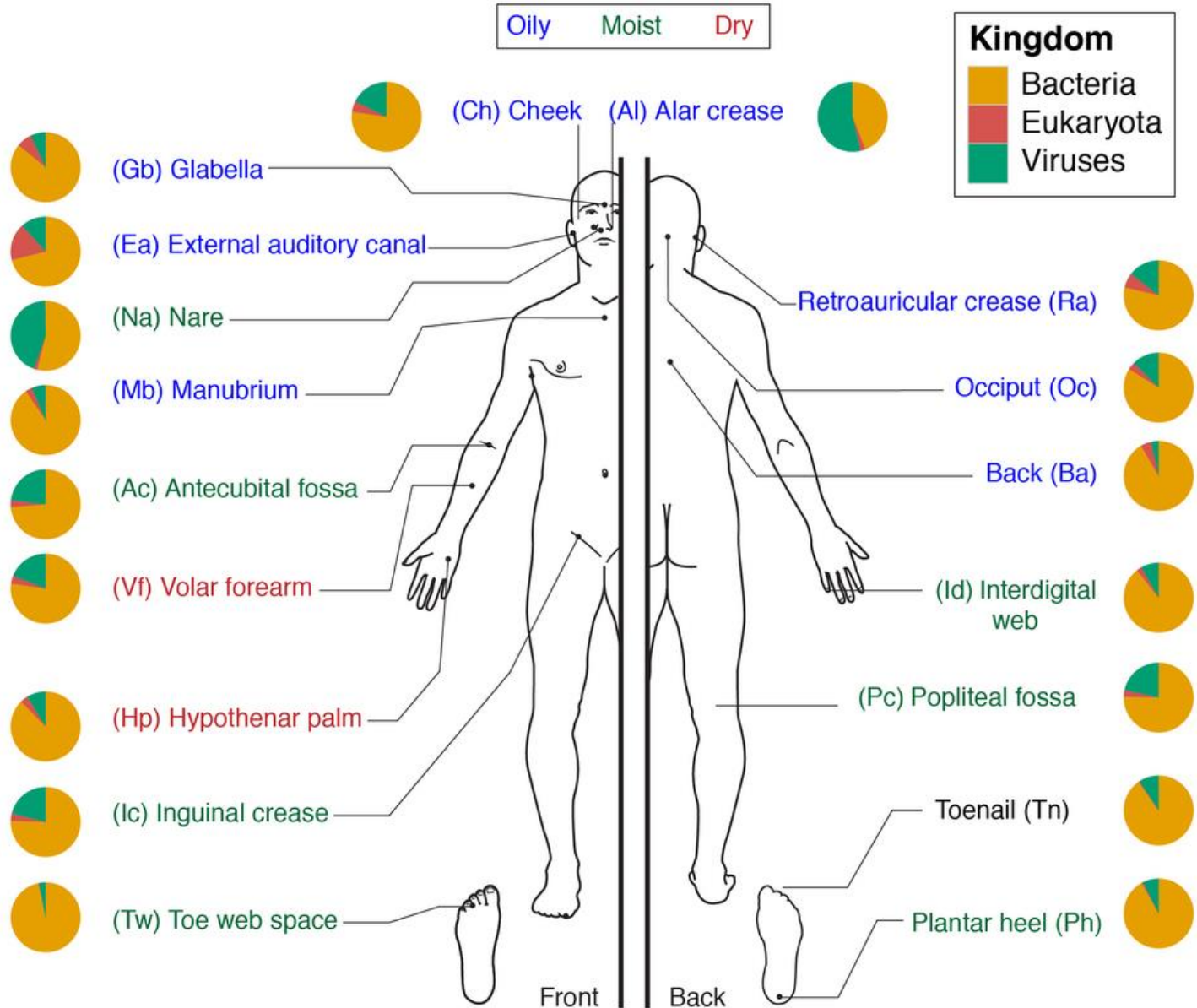
- Taxonomic classification using existing reference databases



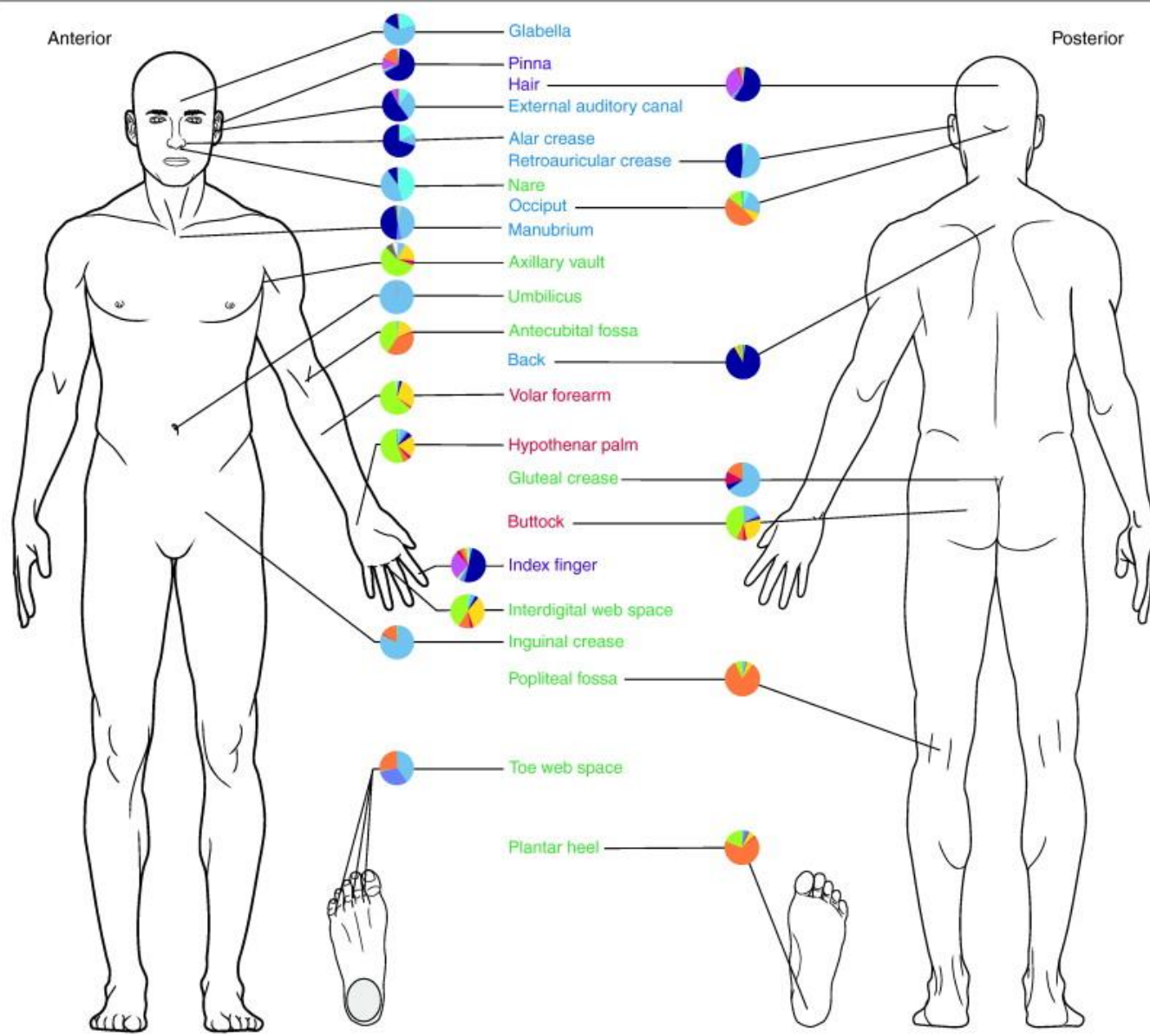
- Community and phylogenetic analysis of sequences



# Kožní mikrobiom







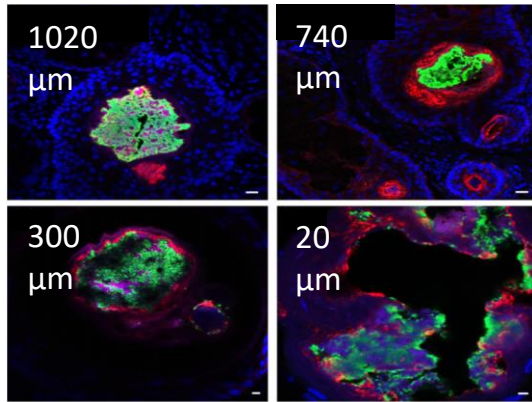
**Pie charts**

<b>Key:</b>	<b>Actinobacteria:</b>	<b>Firmicutes:</b>	<b>Bacteroidetes</b>
	■ Corynebacterineae	■ Other Firmicutes	■ Cyanobacteria
	■ Propionibacterineae	■ Staphylococcaceae	■ Proteobacteria
	■ Micrococcineat	■ Unclassified	■ Divisions contributing <1%
	■ Other Actinobacteria		

**Skin site description**

<b>Key:</b>	■ Oily/Sebaceous**
	■ Moist**
	■ Dry**
	■ Other*

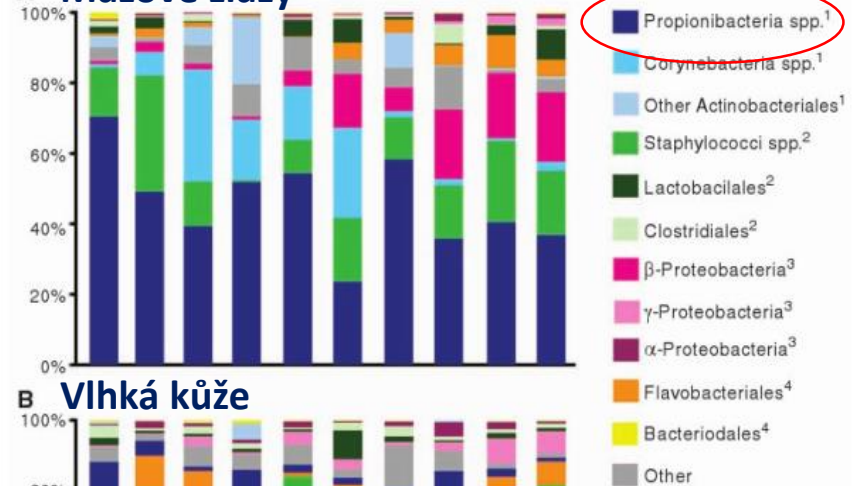
# *P. acnes* je součástí mikrobioty kůže a sliznic (cca $10^6/cm^2$ )



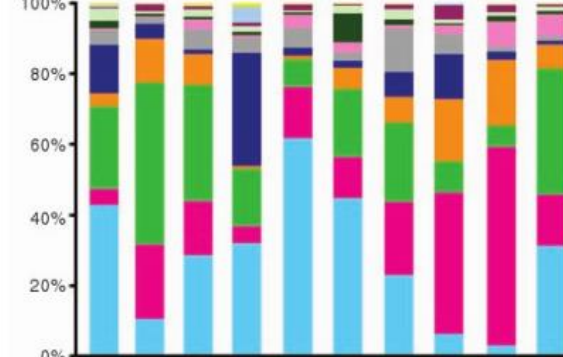
Jahns et al. 2014

# Dominuje v kožním mikrobiomu

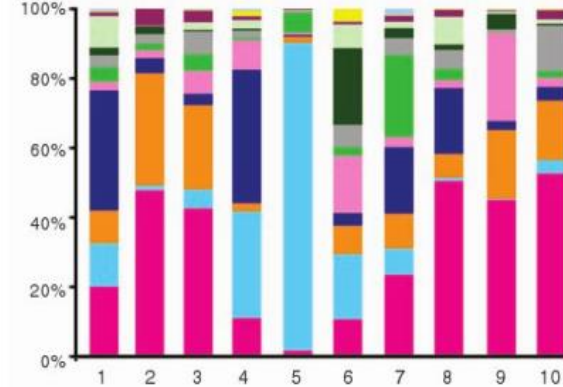
## A Mazové žlázy



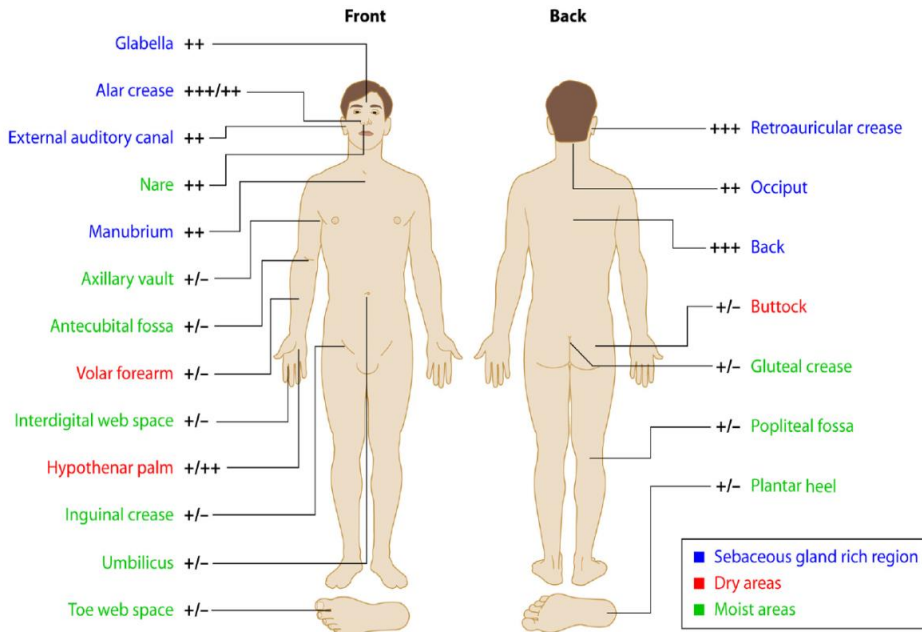
## B Vlhká kůže



## C Suchá kůže



Achermann et al. 2014



Grice et al. 2009

**Folliculitis - acne vulgaris** – podíl *P. acnes* ???

**SAPHO** (Synovitis, Acne, Palmoplantar pustulosis, Hyperostosis, Osteitis)

---

**Umělé klouby** (zejm. rameno - ~ 0,9-1,9 %) - ↓ Klinické příznaky a ↓ zánět (↓ CRP)  
– „aseptické“ uvolnění

Další **ortopedické implantáty**

**Cerebrovaskulární shunty, CVK**

**Prsní implantáty** – fibróza a kapsulární kontraktura

**Kardiovask. implantáty** (kardiostim., umělé chlopně a cévy aj.)

**Implantáty čoček**

aj...

---

**Sepse**

**Abscesy**

**Osteomyelitidy , infekce po kraniotomii**

**Spondylodiscitidy**

**Periodontitidy aj.**

**Prostatitidy,**

**Endophthalmitidy/keratitidy**

**Chronické rhinosinitidy aj**

---

**Ca prostaty ?**

**Degenerace meziobratlových plotének ?** (~ 28 % *P. acnes* +)

**Sarkoidóza ?**

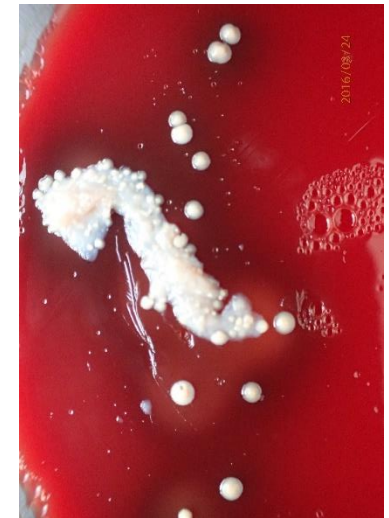
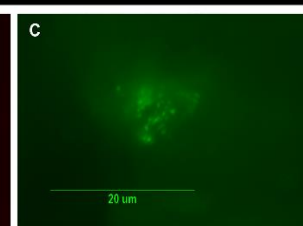
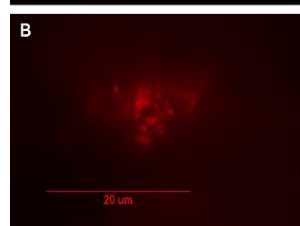
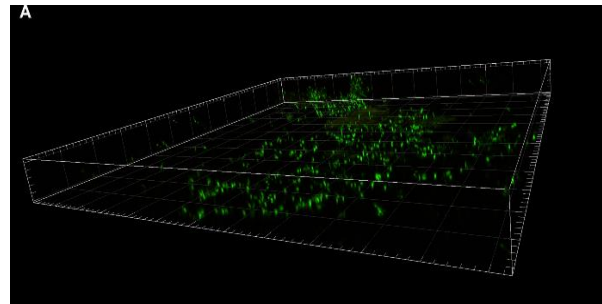
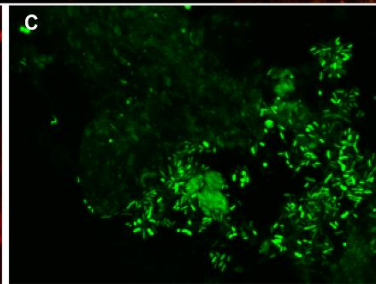
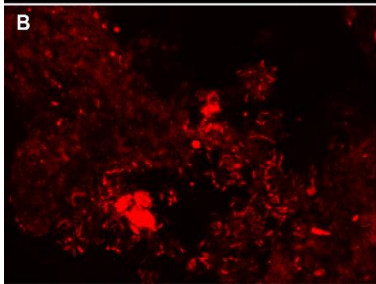
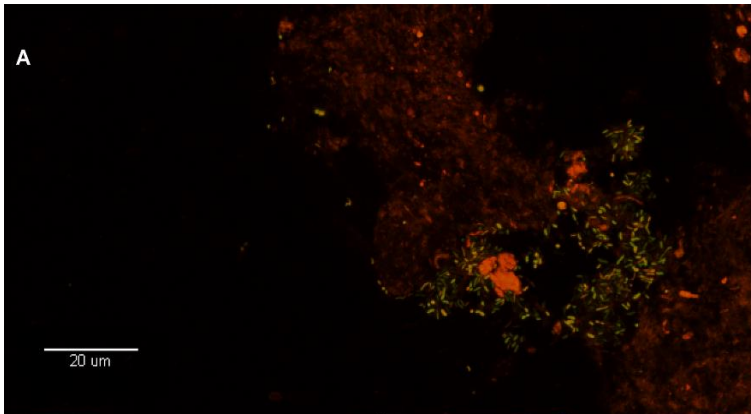
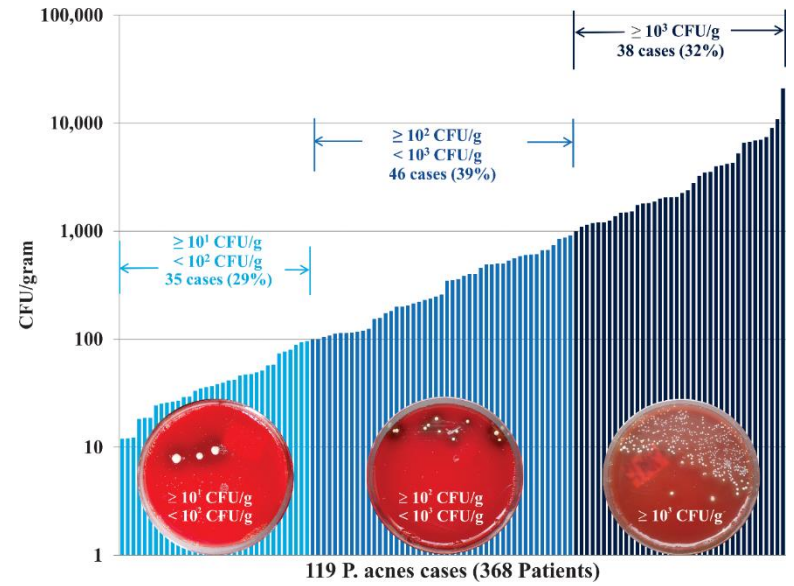
**???**

Lumbální mikrodisektomie n=368,

Vzorky *P. acnes* pozitivní: 119 (32.3 %)

*P. acnes* pozitivní : 39% mužů, 23% žen)

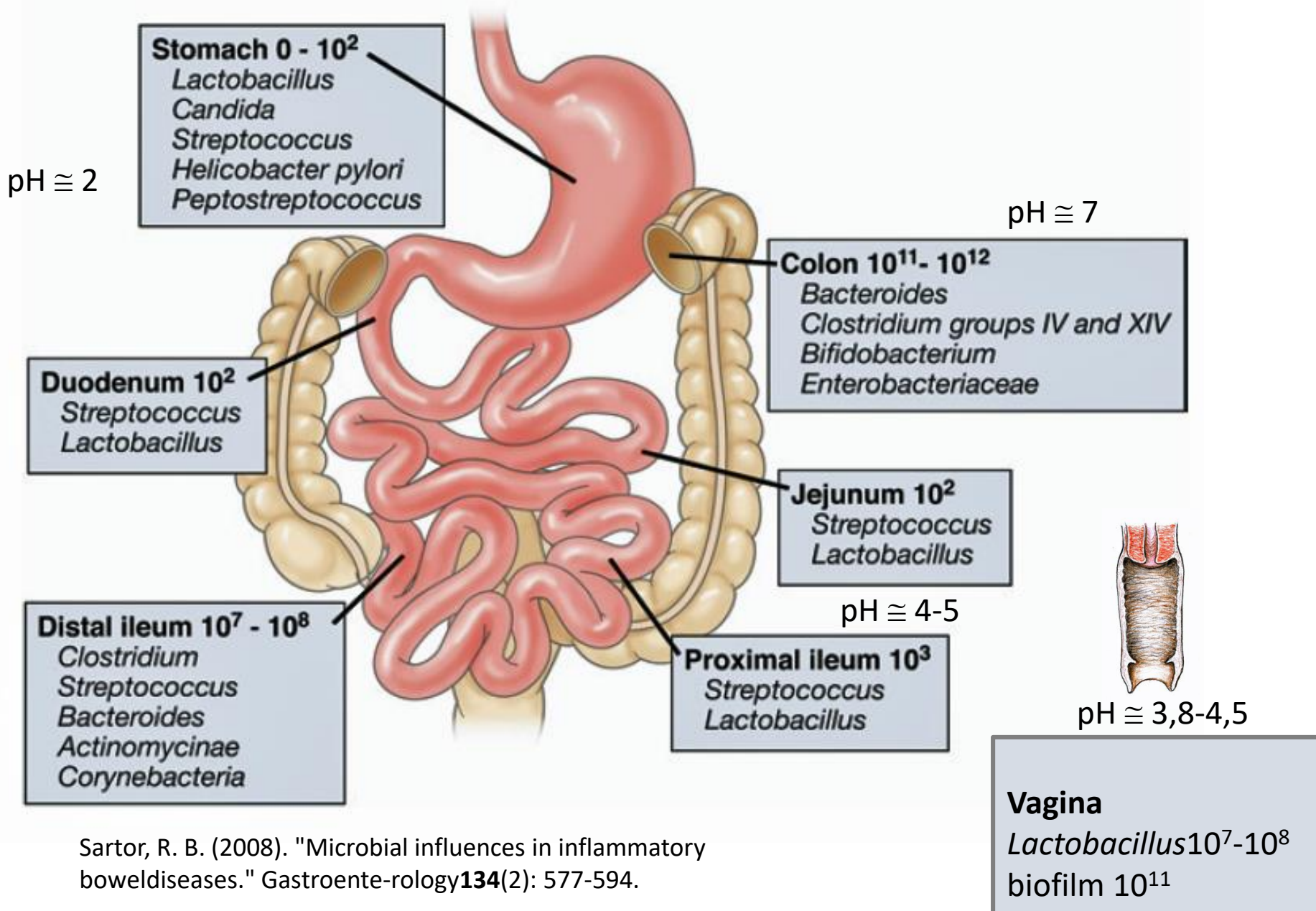
Capoor, 2017, PLOS One



A. 3D CSLM – barvení DNA (SYTO9, green)

B. FISH - EUB338 eubacterial sonda ; FISH - *P. acnes* sonda

# Mikrobiom GIT



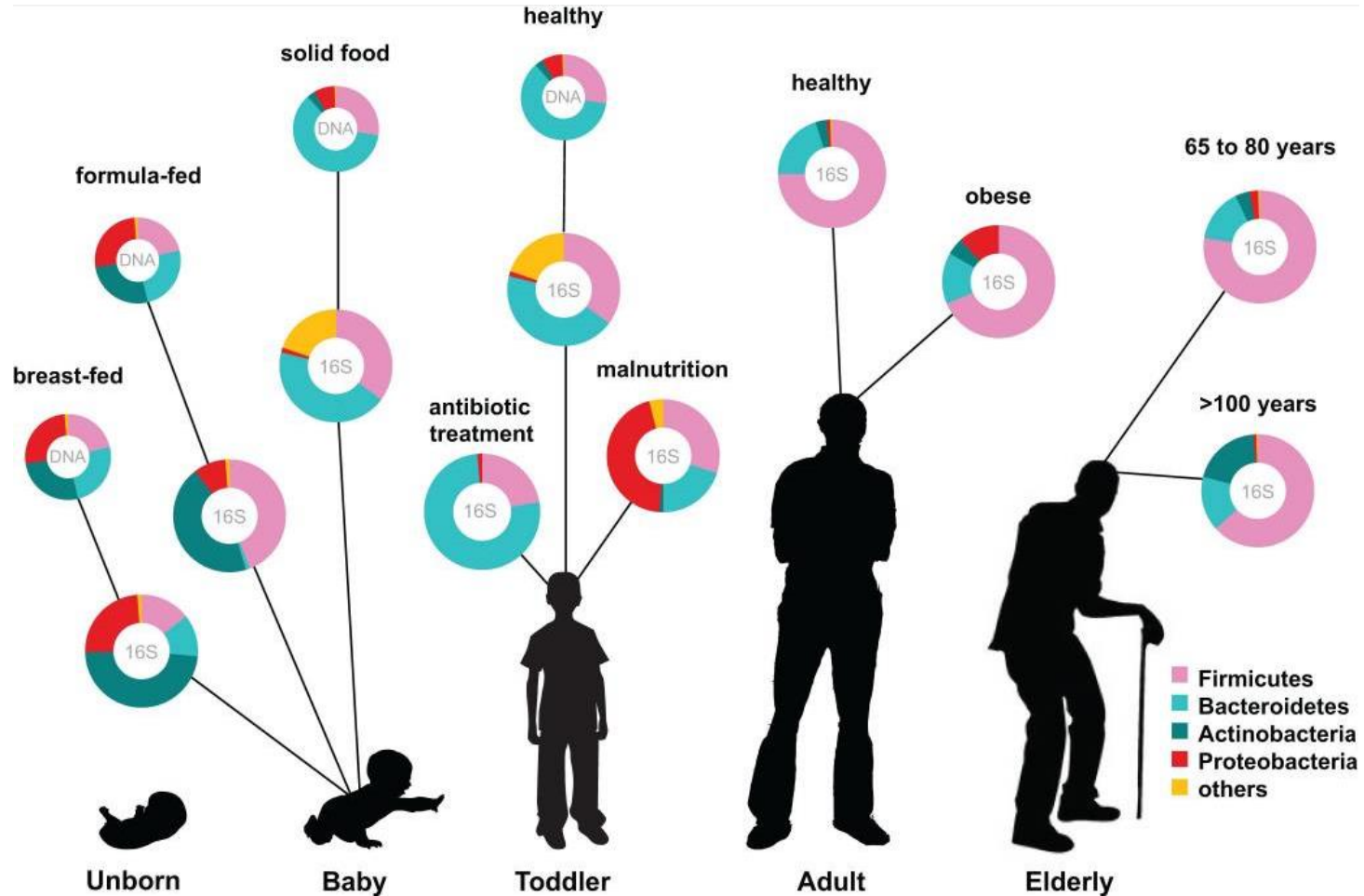
Sartor, R. B. (2008). "Microbial influences in inflammatory boweldiseases." *Gastroente-ology* **134**(2): 577-594.

- Firmicutes (60%)**      např. laktobacily, bacily, stafylokoky, streptoky, klostridia aj.
- Bacteroidetes (20%)**      např. bakteroidy, flavobacteria, sphingobacteria aj.
- Actinobacteria (10%)**      např. bifidobakteria, aktinomycety, nokardie, streptomycety, mykobakteria, korynebakteria, mikrokoky, propionibakteria aj.
- Proteobacteria (1%)**      např. entrobakterie, vibria, pseudomonády, neisserie aj.

# Funkce mikrobiomu GIT

- Imunomodulace: stimulace a vývoj imunitního systému a rozvoj lymfoid. tkání,
- Ochrana proti patogenům (baktericiny, mastné kys, kompetice aj.)
- metabolismus živin: fermentace sacharidů, tvorba KMK – zejm. butyrát, bílkoviny→AK, biogenní aminy
- ovlivnění střevní motility
- tvorba vitamínů a cholinů (vit. H, B, folát)
- enterohepatální oběh žlučových kyselin
- metabolismus cholesterolu
- Vliv na CNS
- aj...

# Vývoj mikrobiomu GIT



Ottman, N., et al. (2012). "The function of our microbiota: who is out there and what do they do?" *Front Cell Infect Microbiol* 2: 104.

Sterilní → kolonizace mateřskou mikrobiotou při porodu → ↓ redox. potenciálu → aneroby (*Bacteroides* a *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* aj)



- střevní mikrobiom se utváří již intrauterinně ? - smolka zdravých novorozenců (*Escherichia*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*)
- typ porodu (vaginální – mateřská mikrobiota / císařský řez)
- Typ výživy mateřské mléko / umělé mléko / příkrmy
- ↓ redox. potenciálu → ↑ aneroby (*Bacteroides* a *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* aj.)
- do 3 let stabilizace a v průběhu života relativně stabilní
- změny kolem 75 - 85 let - vyšší zastoupení kmene Bacteroidetes, klesá druhová rozmanitost

**Laktace:** bakterie mléč. kvašení, bifidobakterie (60-90%)

**Umělá výživa:** podobnost dospělému mikrobiomu

**Ovoce, zelenina, vláknina:** *Firmicutes* (Roseburia)

**Maso, cukry, tuky, málo vlákniny:** *Alistipes*, *Bilophila*, *Bacteroides*

↑ sacharidů - více Bifidobakterií

↑ nasycených tuků - vyšší poměr Firmicutes/Bacteroidetes

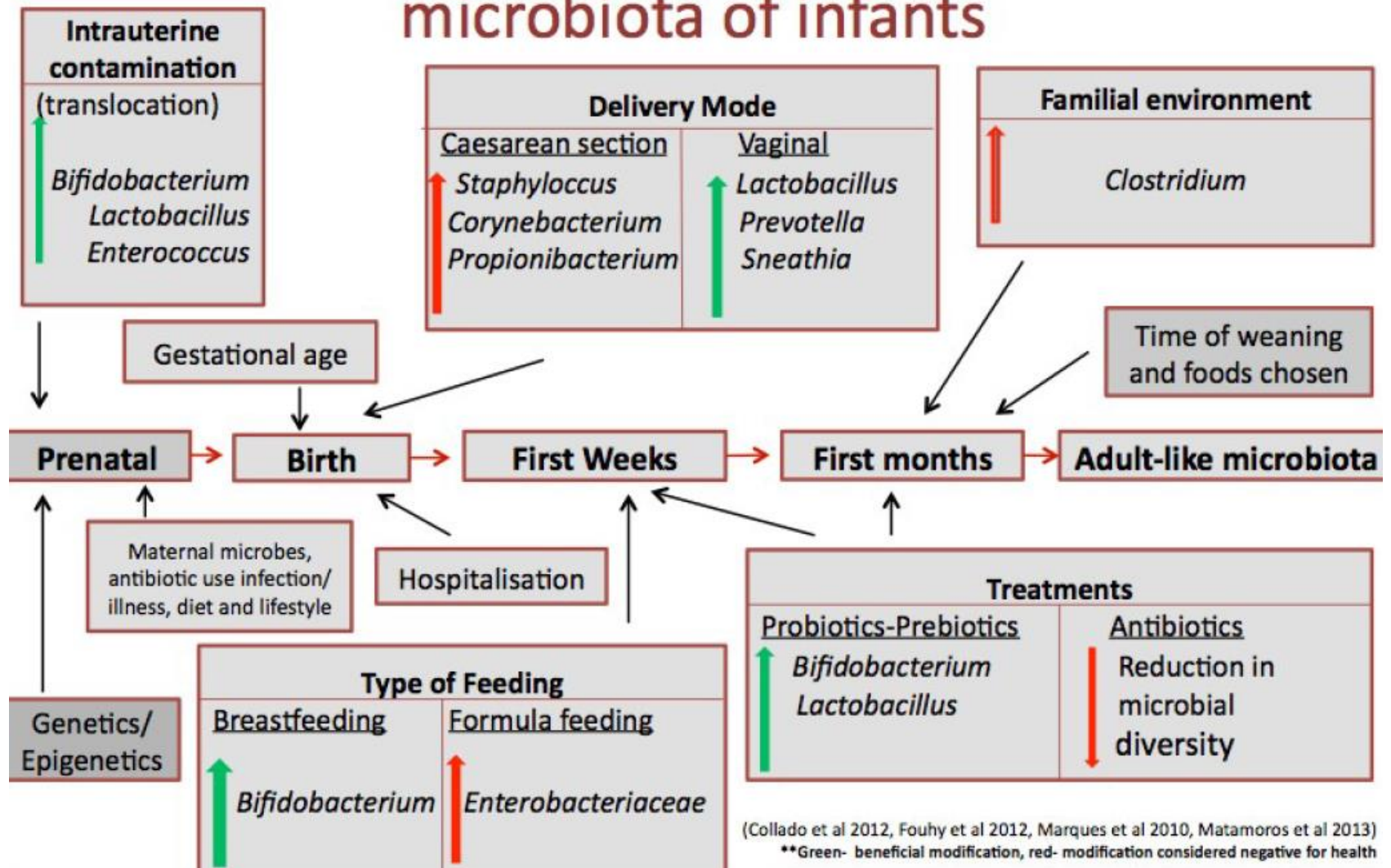
**Antibiotika:** pokles diverzity střevní mikrobioty

**Probiotika:** *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a další

**Prebiotika:** selektivní stimulace růstu/aktivity bakterií střeva

**Pravidelné cvičení** vedlo ke zvýšení různorodosti střevní mikrobioty a Firmicutes

# Influence of external factors on intestinal microbiota of infants



(Collado et al 2012, Fouhy et al 2012, Marques et al 2010, Matamoros et al 2013)  
 \*\*Green- beneficial modification, red- modification considered negative for health

# Hlavní enterotypy

fylogenetické a funkční odlišnosti a různé metabolické cesty

## Enterotyp 1 - *Bacteroides*

Typický pro západní dietu (živočišné bílkoviny a tuky)

Syntéza biotinu, riboflavinu, panthotenátu a askorbátu

## Enterotyp 2 - *Prevotella*

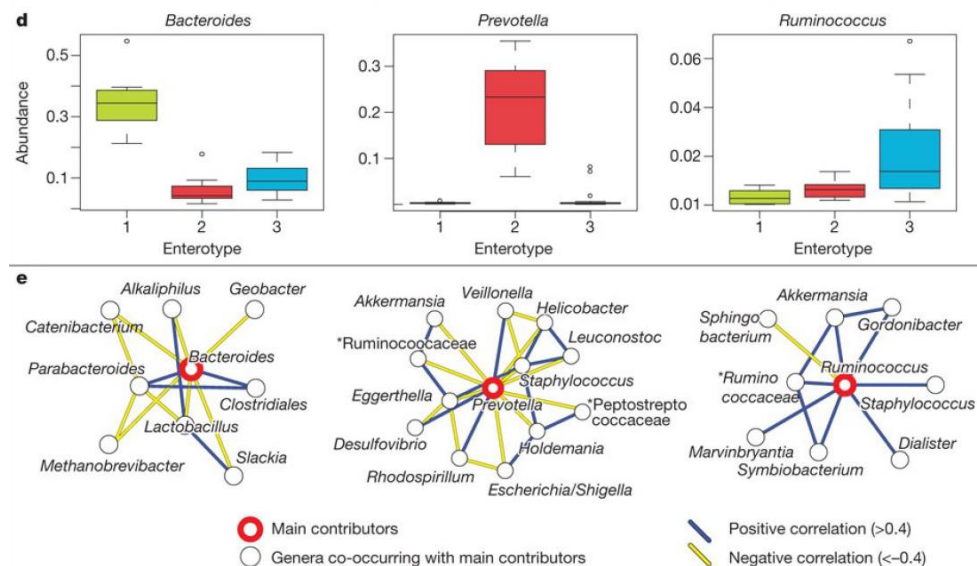
Typický pro vegetariány a vegany (vláknina)

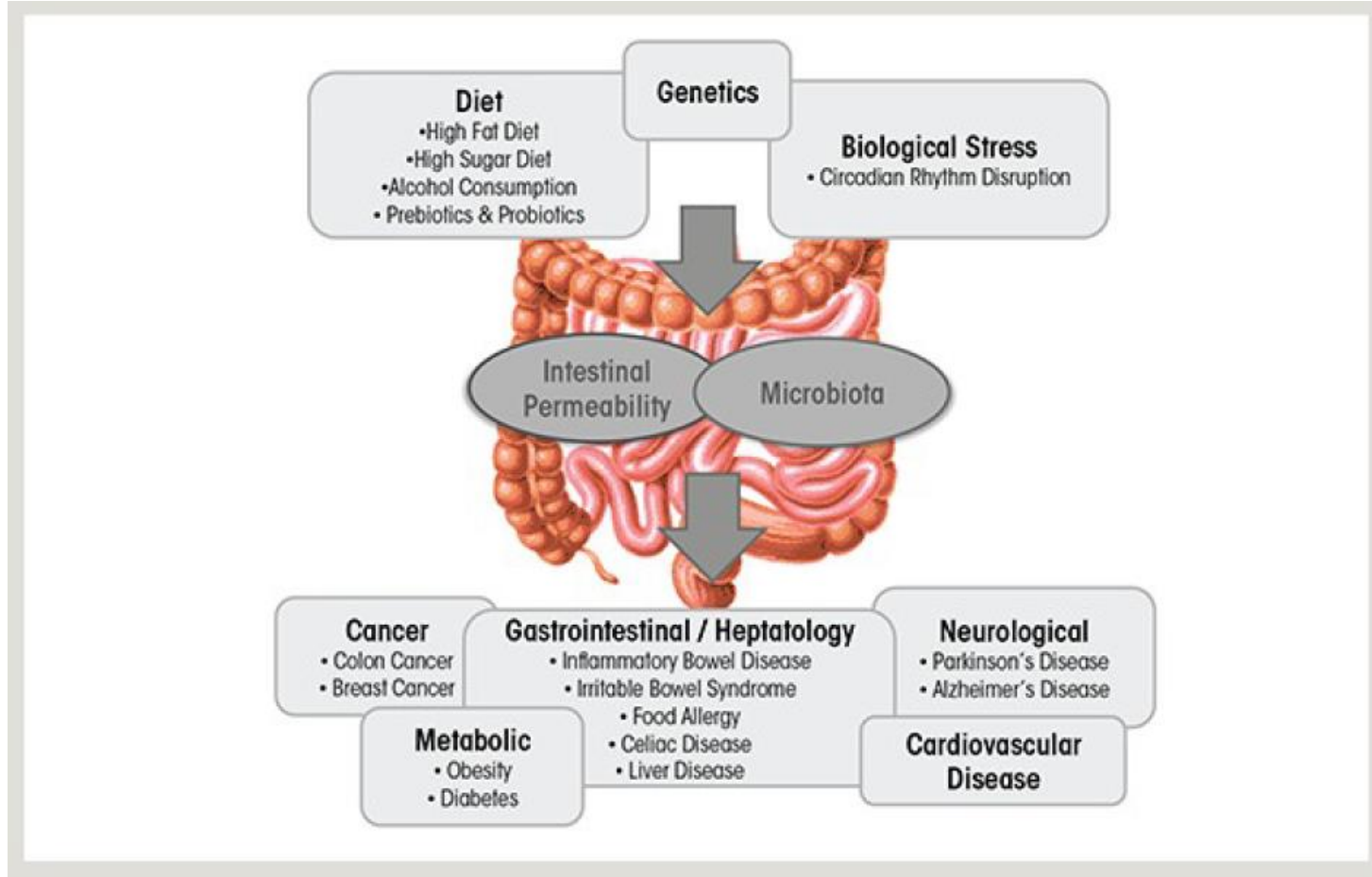
Syntéza thiaminu a kyseliny listové

## Enterotyp 3 - *Ruminococcus* – alkoholy a polynenasycené mastné kyseliny zvířat (přežvýkavci, ovce, kozy) štěpí celulózu

Produkce hemu)

Arumugam, 2011, *Nature*





Potravinové alergie, atopická alergie, astma ...

Idiopatické záněty střev - ulcerózní kolitida, Crohnova choroba

Syndrom dráždivého střeva

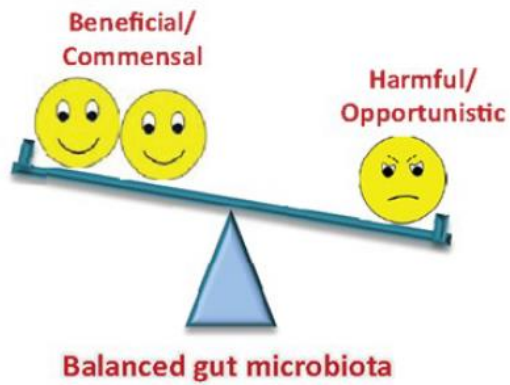
DM, obezita, KV choroby

Ca tlustého střeva, prsu ....

Revmatoidní artritida

Neurologická a psychiatrická onemocnění (autizmus, deprese, schizofrenie aj.)

Chronický únavový syndrom aj.....

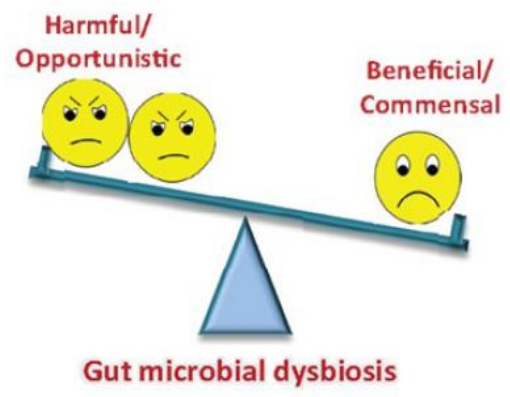


- ↓ Gut permeability;
- ↓ Toxemia/Sepsis;
- ↓ Proinflammation;
- ↑ Insulin sensitivity;
- ↑ gut/metabolic/cardiovascular health

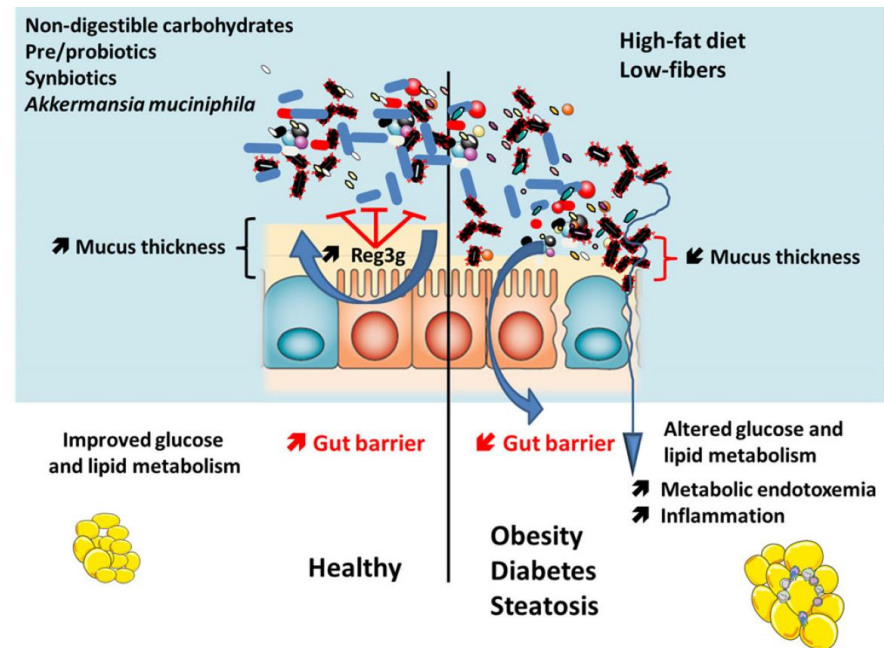
High-fat/ high-sugar diets, over-nutrition, sedentary lifestyle, antibiotic abuse



Prudent diet & lifestyle, probiotics/ prebiotics, Anti-inflammatory/ immune-potentiating therapeutics, nutraceuticals



- ↑ Gut permeability;
- ↑ Endotoxemia; septicemia;
- ↑ Systemic inflammation;
- ↑ Insulin resistance;
- ↑ Adiposity, diabetes, MetS, CVD, NAFLD, NASH, IBD, IBS etc.



**Obezita:** ↓Bacteroidetes a ↑Firmicutes

↑ proteobakterií, ↓ bifidobakteria, ↑ metanogenní archea

↑ příjmu E z potravy, zánět střeva, změny metabolismu

**Kolorektální karcinom:** *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, *B. fragilis*, *E. faecalis*, *C. septicum*, *Fusobacterium* sp.

Genotoxiny (např. cyklomoduliny, colibactin, cytotoxický nekrotizující faktor aj. s vlivem na apoptózu buněk),

Enzymy (glukuronidáza uvolňuje toxiny vázané na GK, azoreduktáza – kancerogenní produkty aj.)

Reaktivní kyslíkové radikály (superoxidy, O, OH radikály aj), *Zánětlivé změny střeva*

**Idiopatické střevní záněty: Morbus Crohn** – souvislost s *M. avium* *susp. paratuberculosis*, a AIEC, *H. pylori*, ↓ klostridií - ↓ butyrátu),

**Ulcerózní kolitida** (↓ klostridií - ↓ butyrátu, *B. vulgatus* a *F. varium* aj.)

**Průjmovitá onemocnění:** *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*

# Alergie

GIT - 200 m<sup>2</sup> + se sliznicemi asociovaný imunitní systém - GALT (Gut-associated lymphoid tissue).

Normální mikroflóra je nezbytná pro fyziologický vývoj. V časném období života reguluje ovlivňováním vývoje střevní lymfatické tkáně systémové a lokální imunitní odpovědi (včetně odpovědí na mikrobiální a potravinové antigeny) k tolerogennímu nezápětlivému stavu, při čemž současně udržuje schopnost přiměřené (fyziologické) zápětlivé odpovědi.

Chronický zápět

Změny mucinu

„Hygienická hypotéza“ a vznik alergií - mikrobiální deprivace může – nevyváženost přirozené antigenní stimulace – dysregulace Th1 a Th2, souhra Th1, Th17, Th2 a Treg buněk

# CENTRÁLNÍ NERVOVÝ SYSTÉM



**OBOUSMĚRNÁ!**  
**!!!!!!!**

**Systémová komunikace**  
Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny  
Neurotransmitery  
Bakteriální metabolity  
Cytokiny

**Nervová komunikace**  
Sympatikus  
Vagus





## **Dysbióza → narušení vývoje i poruchy psychiky**

- riziko rozvoje zánětlivé reakce
- Imunitní aktivace pomocí cytokinů
- Narušení vzájemná komunikace pomocí signálních molekul, např. kyseliny gama – aminomáselné (GABA), dopaminu (DA), norepinefrinu (NE), acetylcholinu (Ach), mastných kyselin s krátkým řetězcem a mnoho dalších.
- Tryptofanový metabolismus (prekurzor serotoninu)

Deprese

Úzkost s stres

Poruchy autistického spektra

Schizofrenie

aj. ....

# Jak mozek ovlivňuje mikrobiom

Dráhy a mediátory systému centrální regulace pocitu hladu a sytosti  
→ změna v dostupnosti živin pro střevní MF

Nervové a endokrinní dráhy - autonomní nervový systém a **osa HPA**  
(hypotalamus – hypofýza – nadledviny) → modulace střevní  
fyziologie (motilita, permeabilita a sekrece)

Uvolňování signálních molekul, cytokinů a antimikrobiálních peptidů  
(AMPs) do střevního lumen prostřednictvím neuronů, imunitních a  
endokrinních buněk přímou nebo nepřímou stimulací z CNS

aj.....

## **Prebiotika**

těžko stravitelné látky, zejména fruktooligosacharidy (např. inulin), různé druhy vlákniny, pektiny, xylany a celulóza.

Mikrobi štěpí tyto substráty na látky významné pro MF i střevní sliznici (krátké mastné kyseliny, aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory a antioxidantia). Tyto substance (zejm. butyrát) kryjí značnou část nutričních potřeb kolonické sliznice, která není schopna vyživit se pouze substráty z krevního oběhu. Prospěšné pro střevní MF, např. oligofruktóza a inulin stimulují růst a aktivitu laktobacilů a bifidobakterií

## **Probiotika**

živé mikroorganismy převážně lidského původu, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus* a *Bifidobacterium*), *Saccharomyces boullardii*, *E. coli*, *Enterococcus*, *Streptococcus thermophilus* aj.

**Symbiotika** - jsou potraviny kombinující probiotika s prebiotiky

## **Psychobiotika**

## **Transplantace střevní, resp. fekální mikroflory**