

# **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

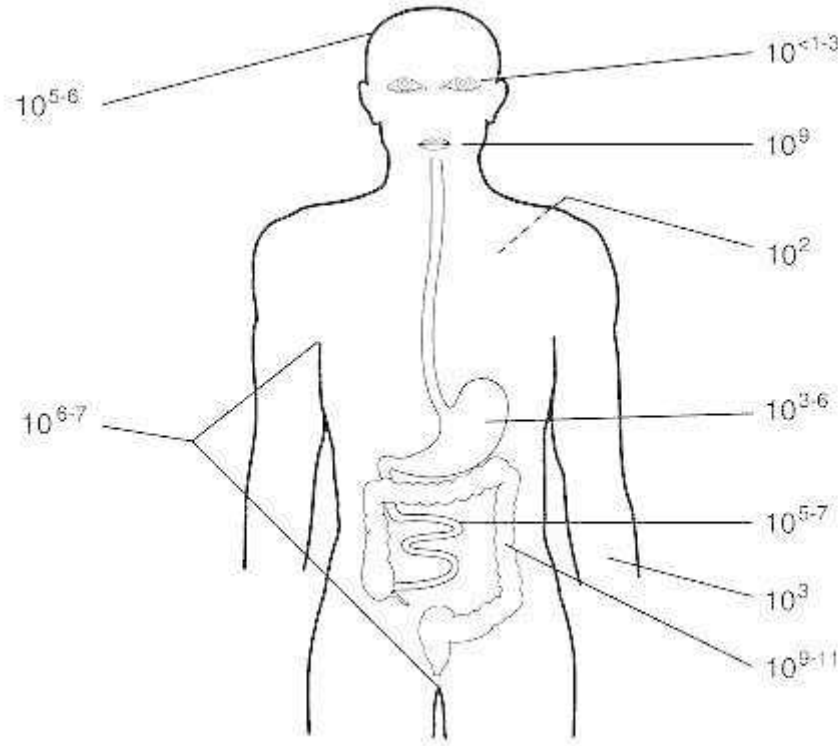
- fotosyntéza

- interakce s rostlinami a živočichy

- udržovat život na Zemi



# Mikrobi a naše tělo



- počet mikrobů/g homogenizované tkáně
- počet mikrobů/cm<sup>2</sup> 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 ( $\mu\text{m}^3$ )	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 streptomycinem 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 m<sup>2</sup> 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 (voda)
- 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, AgNO<sub>3</sub>)

**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 zažív. traktu (surfaktanty)
- čistící efekt řasinkového epitelu, činnost makrofágů, kašláni, kýchání
- ostrůvky mikrobů – *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*
- poškozený epitel - *H. influenzae* nebo *S. pneumoniae* sestupují 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 Leewenhoek – „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

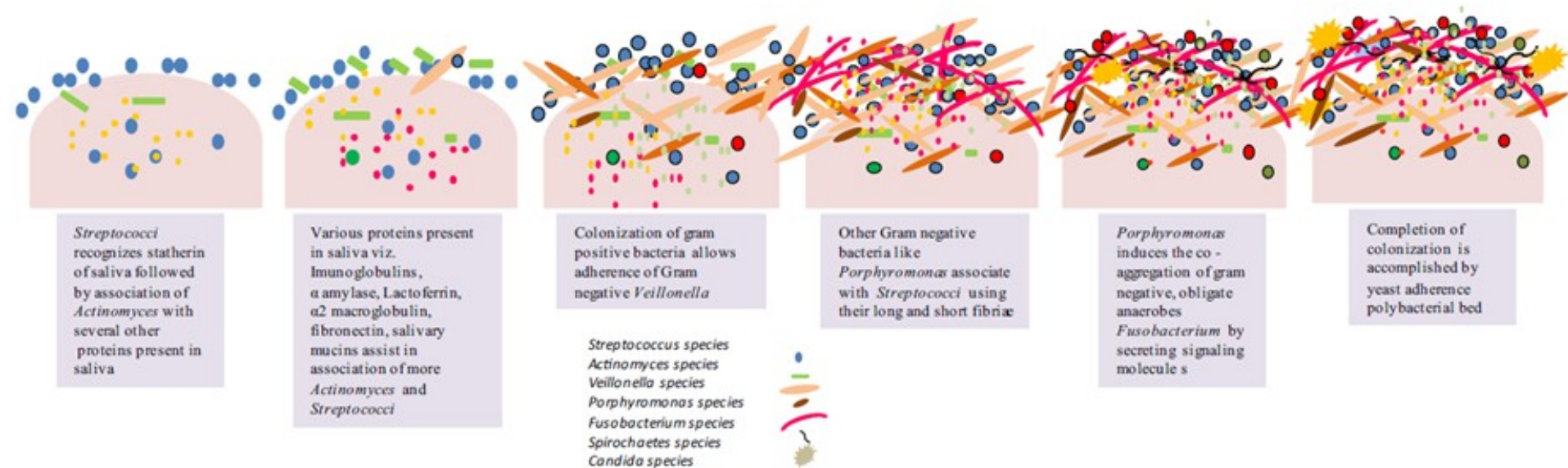
- sliznice tváří, dásně, tvrdé patro – Firmicutes, *Streptococcus sp.*
- hrdlo, mandle, hřbet jazyka, sliny – *Veillonella spp.*, *Neisseria spp.*, *Leptotrichia spp.*
- dentální plak – *Capnocytophaga spp.*, *Actinomyces spp.*, *Rothia spp.* a *Corynebacterium spp.*

## 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



# Normální mikrobiota ústní dutiny



- nejprve fyzikální proces – pokrytí povrchů filmem z rozpuštěných látek
- poté (minuty) – reverzibilní přichycení – 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, O<sub>2</sub>, 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

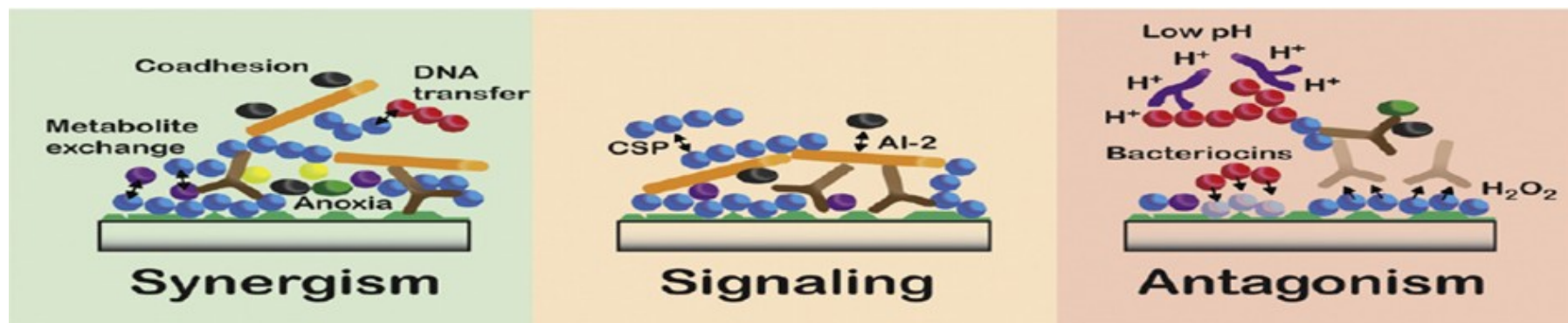
- objev ultramalých bakterií (nejen ústní dutina)
- redukovaný genom, absence mnoha biosyntetických a metabolických drah včetně elektronového transportního řetězce
- obligátní symbionti?



# 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
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 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 nádorov 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

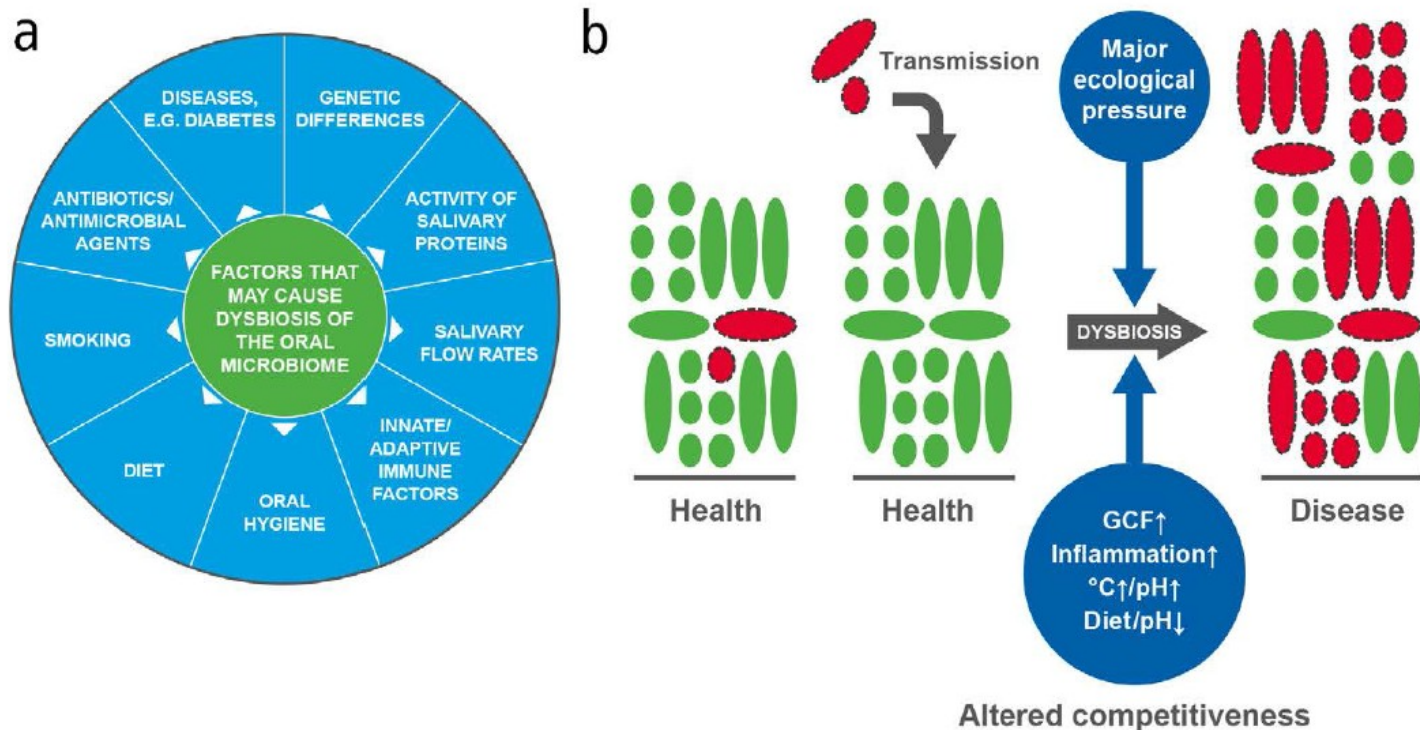


Fig. 5 (a) Causes of dysbiosis; (b) A model of dysbiosis (adapted from Marsh<sup>80</sup>)



# Zubní plak a dentální nemoci

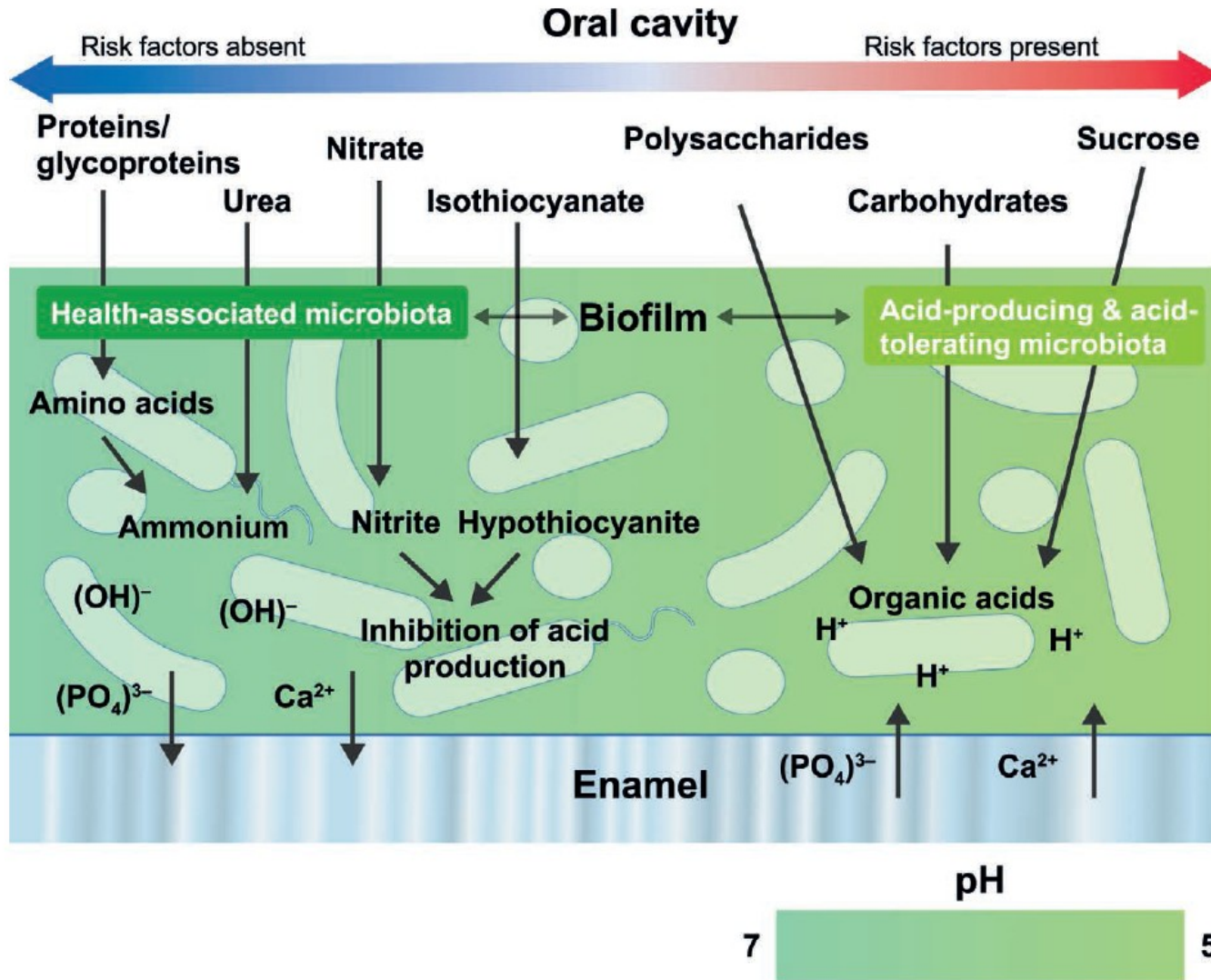


Fig. 6 A contemporary model of host-microbe interactions in the pathogenesis of caries (adapted from de Soet & Zaura and Takahashi)<sup>97,51</sup>





# Zubní plak a dentální nemoci

**Nespecifická plaková hypotéza** (19. st.) – dentální infekce způsobeny nespecifickým nárustem 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



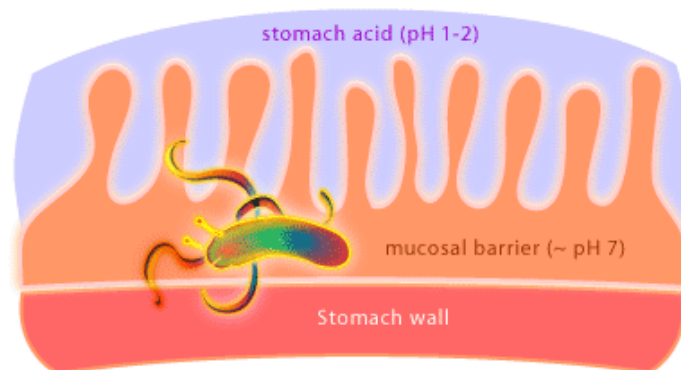
# Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu

- **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

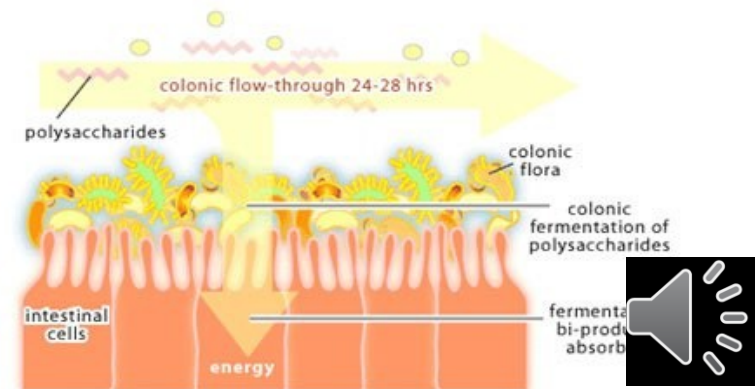
- **tenké střevo** – vysoká průtoková rychlost - lactobacilli a *Enterococcus faecalis* -  $10^5$  -  $10^7$
- vzdálenější části ( $10^8$ /ml) – další druhy - *E. coli* a příbuzné bakterie plus *Bacteroides*
- trávení - převážně lidské enzymy, mikrobi – možná kompetice o esenciální živiny
  
- **tlusté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

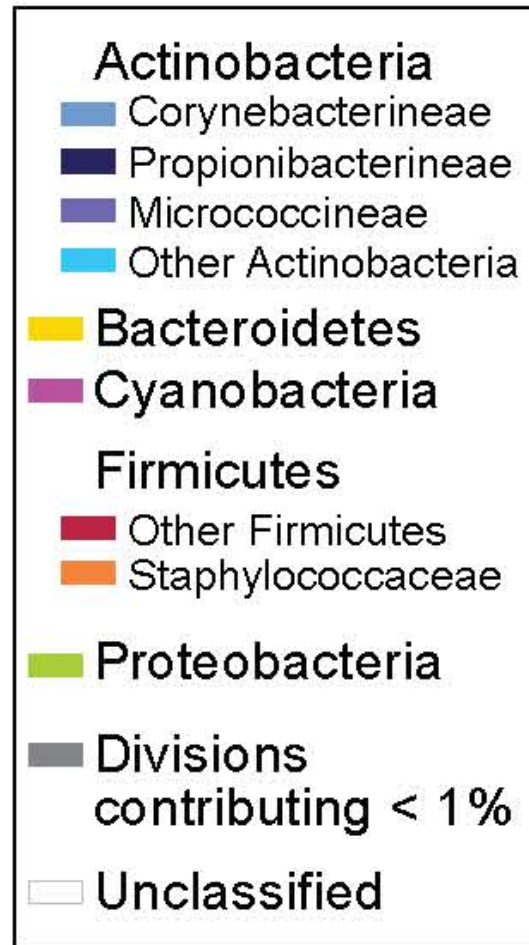
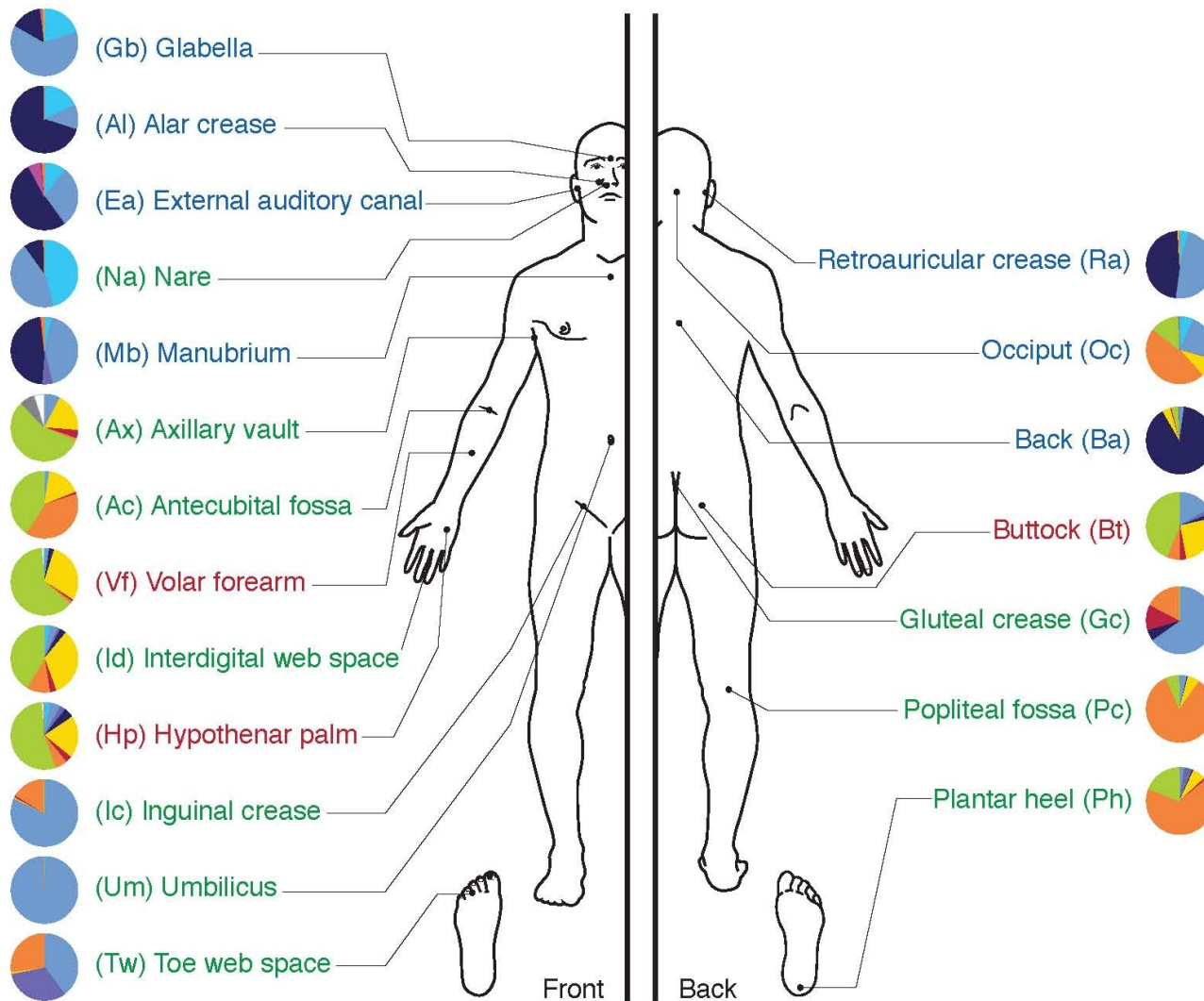
# Ustanovení lidského mikrobiomu

- **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 mikroflóre
- 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 dítěte na život...)
- také zkoumání prostředí – vše dělá dítě 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/crete) 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



# *Clostridium difficile*

## *C.difficile*

- anaerobic gram-positive spore-forming bacteria
- transmitted by fecal-oral route
- colonizes the large intestine
  
- release of exotoxins (TcdA, TcdB) causes colitis
- typically after recent antibiotic exposure (penicillins, cephalosporins, clindamycin, fluoroquinolones)

## **Presentation:**

Abdominal pain

Fevers

Diarrhea, can be bloody

Dehydration



# *Clostridium difficile* – pokr.

## **Diagnosis:**

Stool testing for toxin

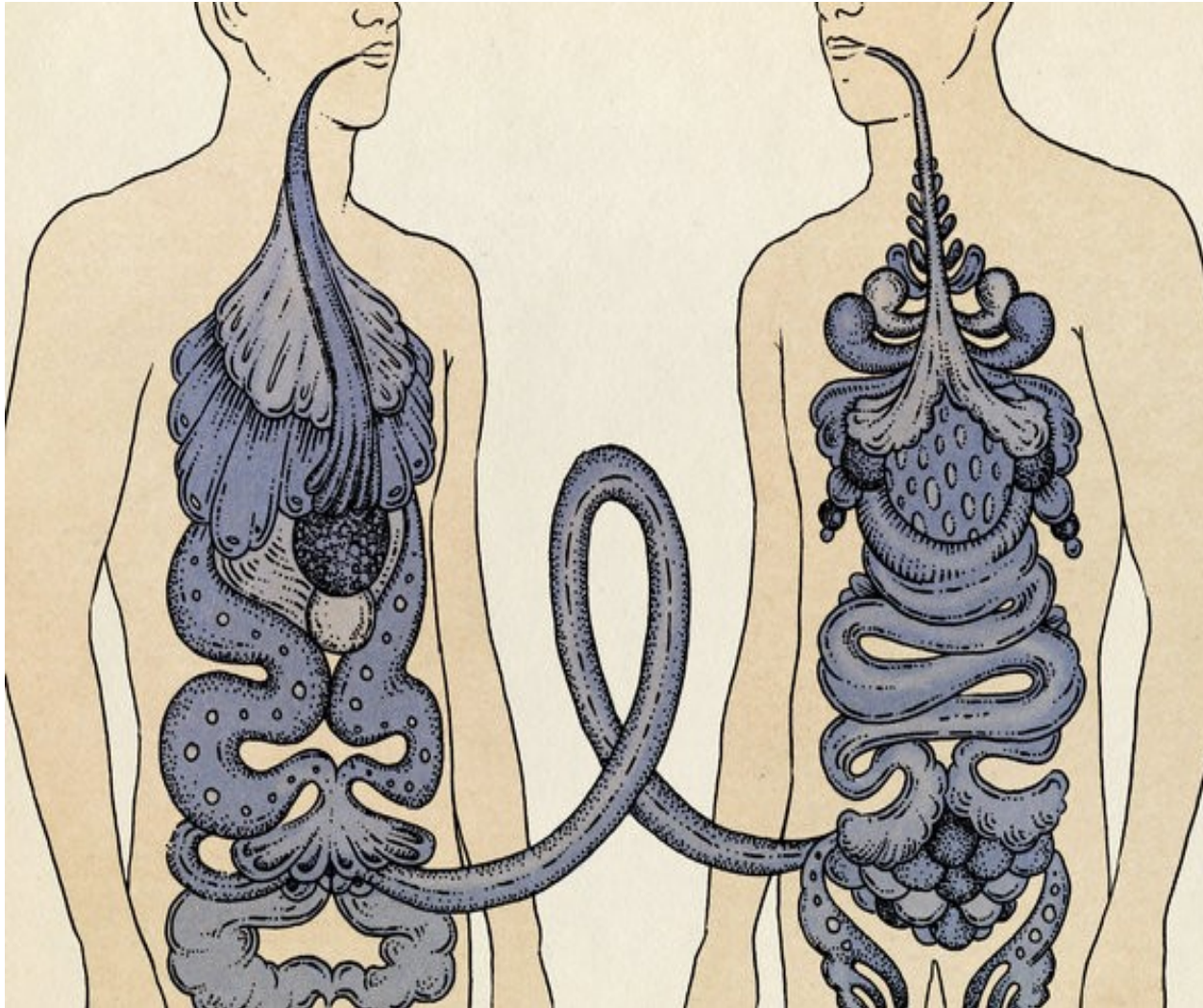
Sigmoidoscopy

## **Oral antibiotics** to treat CDI

Metronidazole, Vancomycin → ~70-75% effective

Fidaxomicin for Vancomycin failure → 90% effective

# *Clostridium difficile* – pokr.



# Fekální transplant

Donor contraindication:

Donors should not:

- Have had any antibiotic exposure in the past six months

- Be immunocompromised

- Have had any tattooing or body piercing in past six months

- Have any history of incarceration

- Have recently traveled to endemic areas

- Have any chronic GI disorders, such as inflammatory bowel disease

# Fekální transplant – pokr.

Donor screened for:

hepatitis A, B, C

HIV

syphilis

*C.difficile*

*Giardia*,

*E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *H.pylori*, Campylobacter infections

# Fekální transplant – pokr.

Recipient

Before procedure:

- stop any antibiotic therapy two days before the procedure
- a liquid diet followed by laxative preparation the night before scheduled procedure

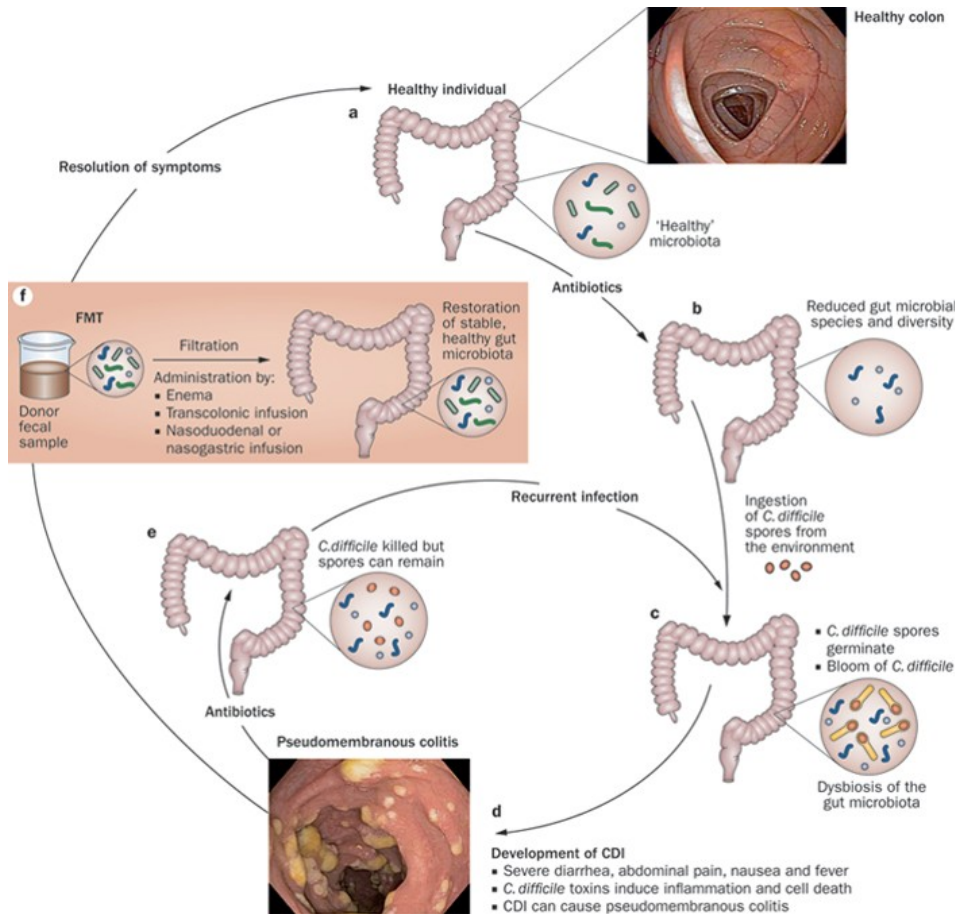


# Fekální transplant – pokr.

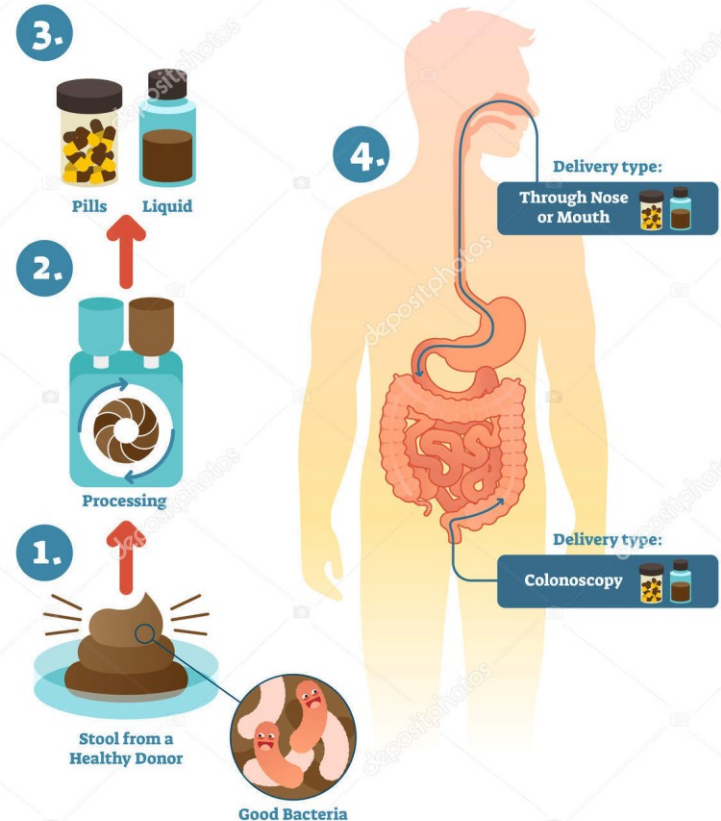
- Fresh stool collection
- less than 6 hours prior to procedure
- volume 20 ml to 30ml mix 250 ml of sterile 0.9% normal saline with stool in a blender



# Fekální transplant - pokr.



## FECAL TRANSPLANT THERAPY



# Fekální transplant – pokr.

Risk of aspiration if not delivered deep into upper small intestine

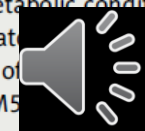
Risk of acquiring infection from donors – rare

Risk of complications from sedation and endoscopy – bleeding, perforation, transmission of other infections: 1/1000-1/10,000

# Společnosti vyvíjející mikrobiomové terapie

Table 2. Companies developing microbiome therapies\*.

Company	Programs and Status
Rebiotix [111]	Developing a new kind of biological drug designed to reverse pathogenic processes responsible for disease through the transplantation of live human-derived microbes into a sick person's intestinal tract. Rebiotix focus is new solutions for challenging gastrointestinal diseases. The company has completed the Phase 2 open-label clinical trial to assess the safety of RBX2660 (microbiota suspension) for the treatment of recurrent <i>Clostridium difficile</i> infection
Enterome [119]	Development of novel drugs and diagnostics to support personalized therapies in microbiome-related diseases such as Inflammatory Bowel Diseases (IBD), metabolic diseases, and related disorders. Three programs at the validation phase: IBD 120 Ulcerative colitis-relapse prediction; MET 220 Bariatric surgery-outcome prediction; MET 230 Stratified nutrition test. One program at discovery phase: IBD 110 Crohn's disease-activity monitoring
Second Genome [120]	Development of microbiome modulators, which are bioactive therapeutics that benefit human health by altering the composition and activities of the microbial communities in the body to regulate host pathways. Second Genome's focus is on microbiome modulators (small molecules, peptides and bacteria) that impact infection, immunity and metabolic disease. The company is currently pursuing three preclinical programs and additional discovery efforts
4D Pharma [121]	Developing biotherapeutics using live bacteria, as opposed to traditional drugs based on chemically synthesized small molecules and antibodies. 4D Pharma has two ongoing programs. Thetanix: for treatment of paediatric Crohn's disease. Blautix: for treatment of Irritable Bowel Syndrome (IBS)
Seres Health [122]	Developing Ecobiotic® therapeutics (combinations of a small number of selected discrete organisms) to treat a range of important medical conditions based on the microbiome biology at their core. SER-109 therapeutic for recurrent <i>C. difficile</i> is in Phase 3 trials. Pre-clinical pipeline includes SER-262 for primary <i>C. difficile</i> and SER-155 for drug-resistant bacteria. Therapeutics for inflammatory and metabolic diseases are in discovery phase
Microbiome therapeutics [123]	Development of microbiome modulators- products designed to alter bacterial populations and their environment in the gastrointestinal tract to prevent and treat serious health conditions. The company initial research and products are focused on metabolic conditions including prediabetes, diabetes and obesity. The lead microbiome modulator is in clinical development to assess its efficacy and safety as a reformation of the most widely prescribed drug for the treatment of type 2 diabetes. NM5 is in clinical development as a prescription for treatment of prediabetes and diabetes



# Probiotika

Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, po aplikaci v přiměřeném množství prospěšně ovlivňují zdraví hostitele.

## Tab. 1 – Nejčastěji používaná probiotika

### Lactobacily

*L. acidophilus*  
*L. rhamnosus* GG  
*L. casei* Shirota  
*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*  
*L. reuteri*  
*L. brevis*  
*L. cellobiosus*  
*L. curvatus*  
*L. fermentum*  
*L. plantarum* 299v

### Grampozitivní koky

*Lactococcus lactis* subsp. *cremonis*  
*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
*Enterococcus faecium*  
*S. diacetylactis*  
*S. intermedius*  
*E. coli* (sérotyp O83:K24:H1)

### Bifidobaktérie

*B. bifidum*  
*B. adolescentis*  
*B. animalis*  
*B. infantis*  
*B. longum*  
*B. thermophilum*

### Kvasinky

*Saccharomyces boulardii*

## Tab. 2 – Nejdůležitější charakteristiky probiotik

### Prospěšnost pro zdraví

- schopnost kolonizace adherence
- antagonistický vliv na patogenní flóru
- schopnost tvorby antimikrobiálních substancí
- schopnost imunomodulace
- měřitelná a klinicky dokumentovatelná užitečnost pro zdraví příjemce

### Mikrobiologické bezpečnostní požadavky

- možnost přesného taxonomického zařazení
- humánní původ
- netoxické a nepatogenní
- geneticky stabilní
- schopnost přežívat a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce
- potencionálně rezistentní proti antimikrobiálním substancím původní mikroflóry příjemce
- rezistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám

### Průmyslové parametry

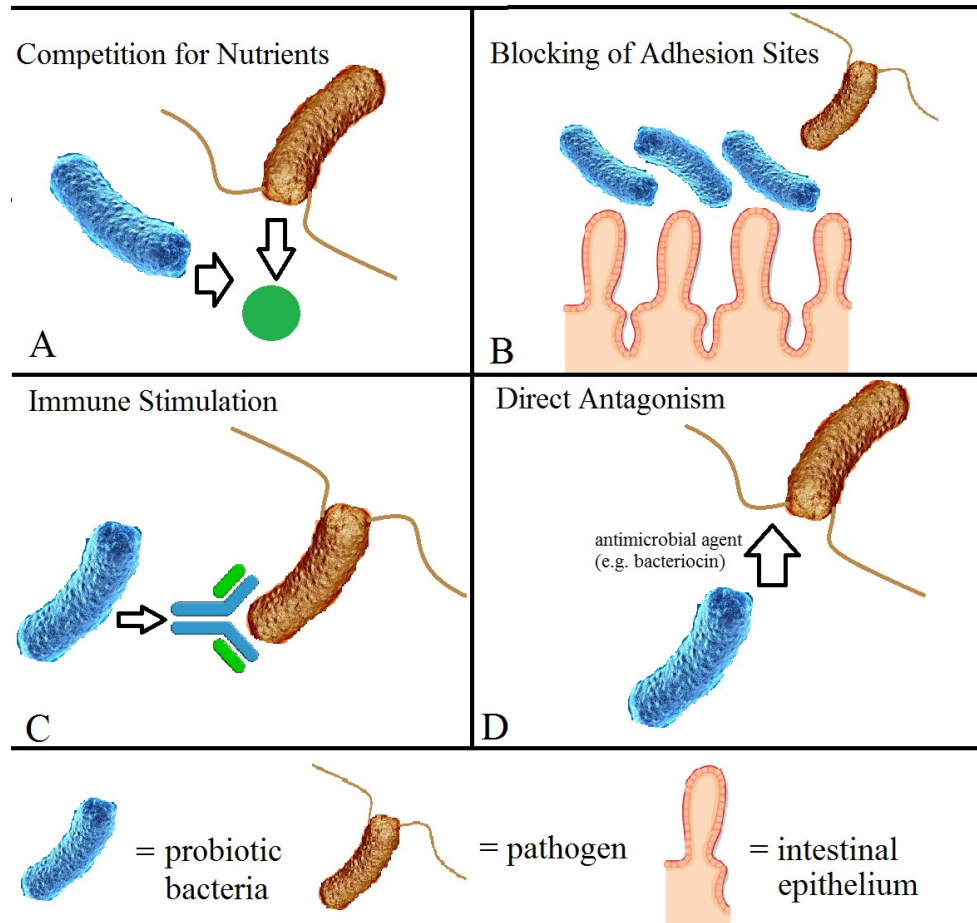
- stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování
- příznivé organoleptické vlastnosti

## Tab. 3 – Mechanismy možného působení probiotik

- stabilizace střevní flóry kompeticí s patogenními mikroorganismy o vazebná místa na receptorech a o živiny
- produkce mastných kyselin s krátkými řetězci (zvláště kyselina máselná)
- pokles pH střevního obsahu
- zvýšení rozpustnosti minerálních látek
- omezení zpětné resorpce žlučových kyselin
- stabilizace střevní slizniční bariéry, úprava střevní permeability
- produkce antimikrobiálních substancí
- modifikace toxinů a toxinových receptorů
- stimulace imunitní odpovědi na patogeny (zvýšená produkce sekrečního IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL-10, TGF- $\beta$ ; snížená produkce prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , interferonu- $\gamma$  stejně jako mediátorů zánětu – např. matrixmetaloproteináz)



# How Probiotics Work



**Probiotika** (resistence původní mikroflóry) – 100 let – **Mutaflor**

# Prebiotika – pokr.

- prebiotika (1995) – nestravitelné složky stravy
- selektivně stimuluje růst a aktivitu určitých bakterií, které mají pozitivní účinek na lidské zdraví (bifidobakterie a další)
- komplexní uhlovodíky – celulóza, hemicelulóza, lignin, pektin
- ale i inulin, oligosacharidy, oligofruktóza, galaktooligosacharidy a laktulóza
- odolávají kyselinám v žaludku, hydrolýze lidskými enzymy
- dostanou se až do tlustého střeva – substrát pro fermentaci mikroby
  
- podobně oligosacharidy z mléka (kojení), glykogen ve vagíně
- proteiny, AK, určité lipidy
- trávení v tlustém střevě komplexní proces nutričních interakcí mezi různými bakteriálními druhy



# Prebiotika – pokr.

- urychlují pasáž tráveniny zažívacím traktem
- snižují pravděpodobnost osídlení parazity
- dočasně váží složky potravy lipidy, cukry, žlučové kyseliny, kationty, toxické látky
- zvyšují pocit plnosti, jsou prevencí zácpy
- snižují **glykemickou křivku** (redukce a prevence *hyperglykémie* a *hyperinzulinémie*, tj. diabetu II. typu)
- podporují růst probiotik a tím pozitivně ovlivňují zdraví hostitele
- je podpořena tvorba střevní ochranné mukózy
- podle některých studií tímto dochází ke **stimulaci imunitního systému proti nádorům**

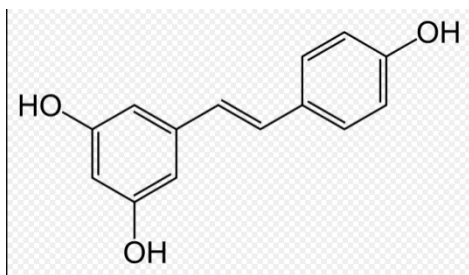


# Prebiotika – pokr.

- např. komplexní polysacharidy fermentovány rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp.,...
- glykolytické bakterie (*Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*) rostou na jednodušších cukrech
- hlavní produkt fermentace - jednoduché mastné kyseliny (SCFAs)
  - butyrát – primární zdroj energie pro buňky epitelu střeva
  - propionát – syntéza cholesterolu v játrech
  - acetát – hepatická lipogenese a ATP ve svalech
- snižují pH – antagonismus proti patogenům (antimikrobiální aktivita)

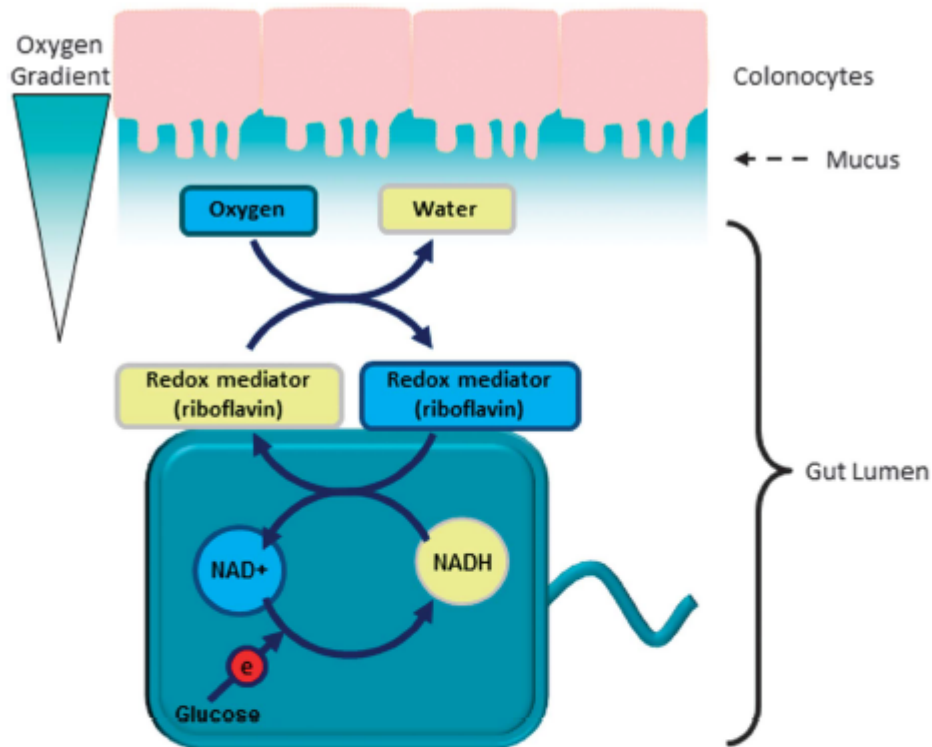
# Prebiotika – pokr.

- i ne-karbohydrátové sloučeniny dnes považovány za prebiotika
  - polyfenoly, minerály, vitamíny – modulují mikrobiotu
  - např. resveratrol (červené víno) – více *Bacteroides*, *Bifidobacterium*



- 95% polyfenolů dorazí do tlustého střeva
- Ca doplňky - modulují mikrobiotu 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.<sup>69,70</sup>

## Pokusy s riboflavinem

- zvýšil výskyt *Faecalibacterium prausnitzii*
- produkce protizánětlivých peptidů
- IBD -Inflammatory bowel disease
- nízké počty *F. prausnitzii*
- tlusté střevo tedy nejen absorpce vody, minerálů a zpracování nestrávené potravy
- mikrobiom ovlivňuje fyziologii hostitele, ...

# Mikrobiota a obezita

- 2014 – 1,9 mld lidí s nadváhou, z toho 600 mil obézních (2016-650)
- od r.1975 se obezita ztrojnásobila
- 2016 -39% - nadváha, 13% obezita
- většina lidí žije v zemích, kde nadváha a obezita zabíjí více lidí než podvýživa
- 2016
  - 41 miliónů dětí do 5 let – nadváha, nebo obezita
  - přes 340 miliónů ve věku 15-19
- obezitě se dá zabránit (prevence)



# Mikrobiota a obezita

- od počátku tohoto století je mikrobiota zažívacího traktu (gut microbiota – GM) považována 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

# Mikrobiota 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 aktivuje žlučové kyseliny a zúčastní se jejich regulace a metabol.
- žlučové kyseliny pomáhají absorpci lipidů

# Mikrobiota 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 - účinnost využití energie ze zkonsumované potravy
- normální myši - konjugovaná linolenová kyselina zrychluje jejich metabolismus (prebiotikum – odbourávání tuků)
- *Lactobacillus rhamnosus* ji produkuje a pomáhá udržet váhu myší i na dietě s vysokým podílem tuků
- podobně působí *E. coli*, naopak (zvýšení váhy) *Lbc. reuteri*

# Mikrobiota a obezita

- obezita je spojována i se zvýšeným rizikem rakoviny – děloha, prsu, děložní čípek, vaječníků, tlustého střeva, konečníku, jícn, 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*



# Mikrobiota a obezita

- výskyt obezity koresponduje s „výskytem“ 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

# Mikrobiota a obezita

Obezita je pravděpodobně spojena s:

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

# Fágová terapie

- testováno na západě ve 20. a 30. letech minulého století
- později především v bývalém Sovětském svazu



# Fágová terapie vs. antibiotika

## Bacteriophages

## Antibiotics

Very specific towards bacterial species

Antibiotics target both pathogenic bacteria and normal human microbiota. This sometimes results in dysbiosis and serious secondary infections (e.g. yeast)

Replicate exactly at the site of infection

Antibiotics do not concentrate at the site of infection and are metabolized and eliminated from the body

No major side effects

Multiple side effects, including intestinal disorders, allergies, and secondary infections

Selecting new phages takes few weeks

Developing a new antibiotic takes several years

Phage-resistant bacteria remain susceptible to other phages

There is a number of bacterial strains resistant to all known antibiotics



# Fágová terapie- pokr.

## Problémy:

- Antibiotika ve většině případů účinná a zároveň levná
  - čili malé uplatnění pro viry
- Úzké spectrum hostitele
- Bylo by potřeba více fágů k pokrytí pravděpodobného zdroje infekce
- Některé studie naznačují, že fágy je třeba užít v ranných stádiích infekce
- Bakteriofágy rychle odstraněny z krve a mohou vyprovokovat imunitní odezvu
- Jejich použití pro systémové infekce je problematické
- Testy z let 1930-1940 ukázaly 40-80% účinnost
- Účinnost je závislá na pH, teplotě, neutralizace fágů, rezistenci k fágům, ...



# Fágová terapie – pokr.

## Problémy

- Obtížnost schválení jako léčiva – riziko použití samo se replikující entity schopné vývoje/změny
- Zatím chybí regulační směrnice/instrukce pro použití fágů pro klinické použití
- Starch z VIRŮ



# Fágová terapie – pokr.

1970s – Pakistán- pokusy sponzorované WHO s bakteriofágy (SSSR) pro boj s cholerou

V porovnání s antibiotiky je účinnost nižší

Ale – fágová terapie může selektivně snížit počty vibrií bez ovlivnění ostatní intestinální mikroflóry a bez toxického vlivu na pacienta

Vhodný nástroj studia

*Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2016). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. Current microbiology, 74(2), 277-283.*



# Fágová terapie – pokr.

In December 2001, three Georgian lumberjacks from the village of Lia were exposed to a strontium-90 source from two Soviet-era radiothermal generators they found near their village. In addition to systemic effects, two of them developed severe local radiation injuries which subsequently became infected with *Staphylococcus aureus*. After hospitalization in Tbilisi, Georgia, the patients were treated with various medications, including antibiotics and topical ointments; however, wound healing was only moderately successful, and their *S. aureus* infection could not be eliminated. Approximately 1 month after hospitalization, treatment with PhagoBioDerm (a wound-healing preparation consisting of a biodegradable polymer impregnated with ciprofloxacin and bacteriophages) was initiated. Purulent drainage stopped within 2–7 days. Clinical improvement was associated with rapid (7 days) elimination of the aetiologic agent, a strain of *S. aureus* resistant to many antibiotics (including ciprofloxacin), but susceptible to the bacteriophages contained in the PhagoBioDerm preparation



**Figure 1** The use of PhagoBioDerm for wound healing in patient 1-DN. The pictures show (from left to right) the purulent lesion on day 23 of hospitalization, application of PhagoBioDerm on day 29 of hospitalization, and wound healing after 23 days.



# Fágová terapie – pokr.

Srpen 2006 the United States Food and Drug Administration povolily LPM-102 (směs 6 fágů) jako potravinářský doplněk k usmrcení *Listeria monocytogenes*

LPM-102 – povoleno k ošetření masných výrobků k přímé konzumaci

Říjen 2006 – LPM-102 povoleno k použití na sýry k eliminaci *Listeria monocytogenes*

# Pár slov závěrem

## Mikrobiom a zdraví

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



Nejsme nic výjimečného

Jsme součástí přírody