

Εντερική μικροχλωρίδα: ένα οικοσύστημα προς εξερεύνηση

Μαντώ Κυριακού
Επίκουρη Καθηγήτρια
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ

- Αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τον ρόλο της
- Εμποδίζει την εισβολή και ανάπτυξη νέων μικροοργανισμών και προφυλάσσει τον οργανισμό από την αύξηση παθογόνων που υπάρχουν σε χαμηλούς πληθυσμούς
- Έντονη μεταβολική δραστηριότητα με αποτέλεσμα την πέψη της τροφής και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών
- Ρυθμίζει την ανάπτυξη και την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος
- Πιθανή κατεύθυνση της ανάπτυξής της με την χρήση προβιοτικών, πρεβιοτικών και συνβιοτικών προϊόντων - Εμπορικό ενδιαφέρον

Human genome/Microbiome

- ❖ Η εκτίμηση του μεγέθους της εντερικής μικροχλωρίδας ανέρχεται σε 10^{12} - 10^{14} μικροβιακά κύτταρα
- ❖ 10 X κύτταρα από τα κύτταρα του ξενιστή
- ❖ 100 X γονίδια από τα γονίδια του ξενιστή
- ❖ *Homo sapiens*: φαινότυπος σύνθετος που προκύπτει από διαφορετικούς οργανισμούς
- ❖ Γενετικό υλικό: σύνολο γενετικών χαρακτηριστικών από πολλούς οργανισμούς
- ❖ Κέρδος για τον ξενιστή: απόκτηση ιδιοτήτων που δεν χρειάστηκε να εξελίξουμε μόνοι μας

Εντερική μικροχλωρίδα: ένα ανεξάρτητο «όργανο»

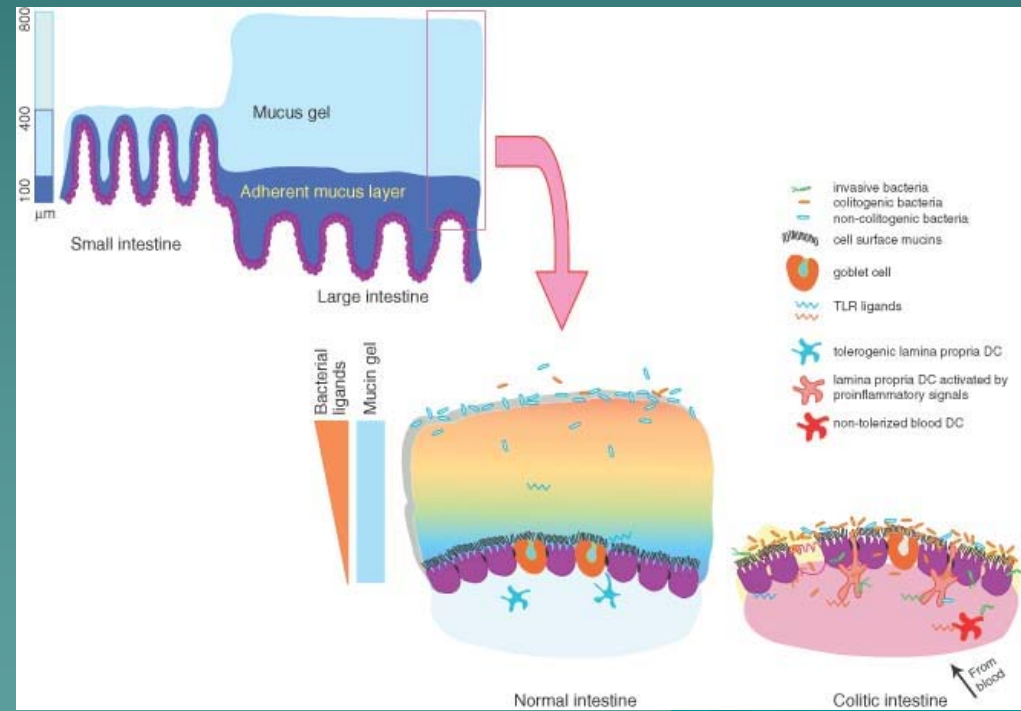
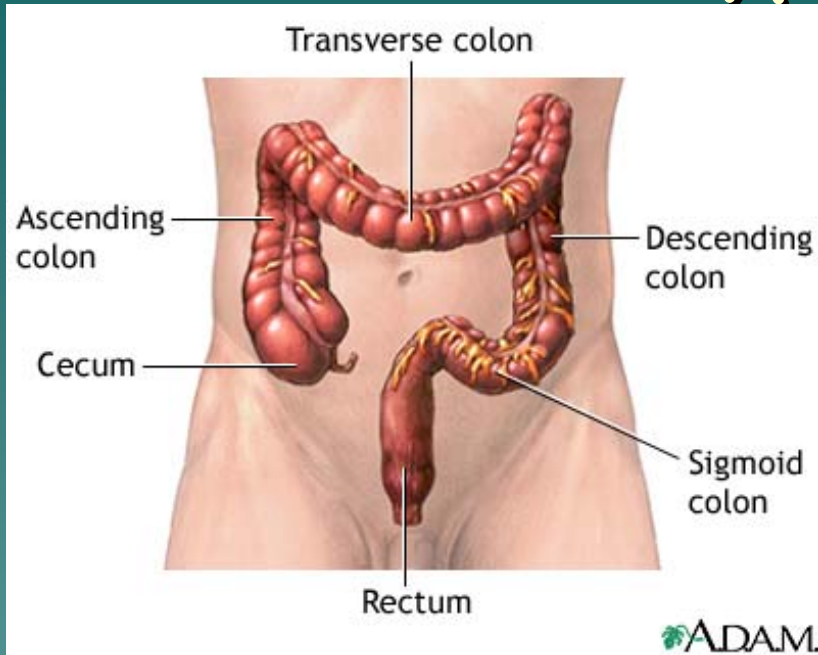
Ανεξάρτητο «όργανο», τοποθετημένο μέσα σε όργανο του ξενιστή:

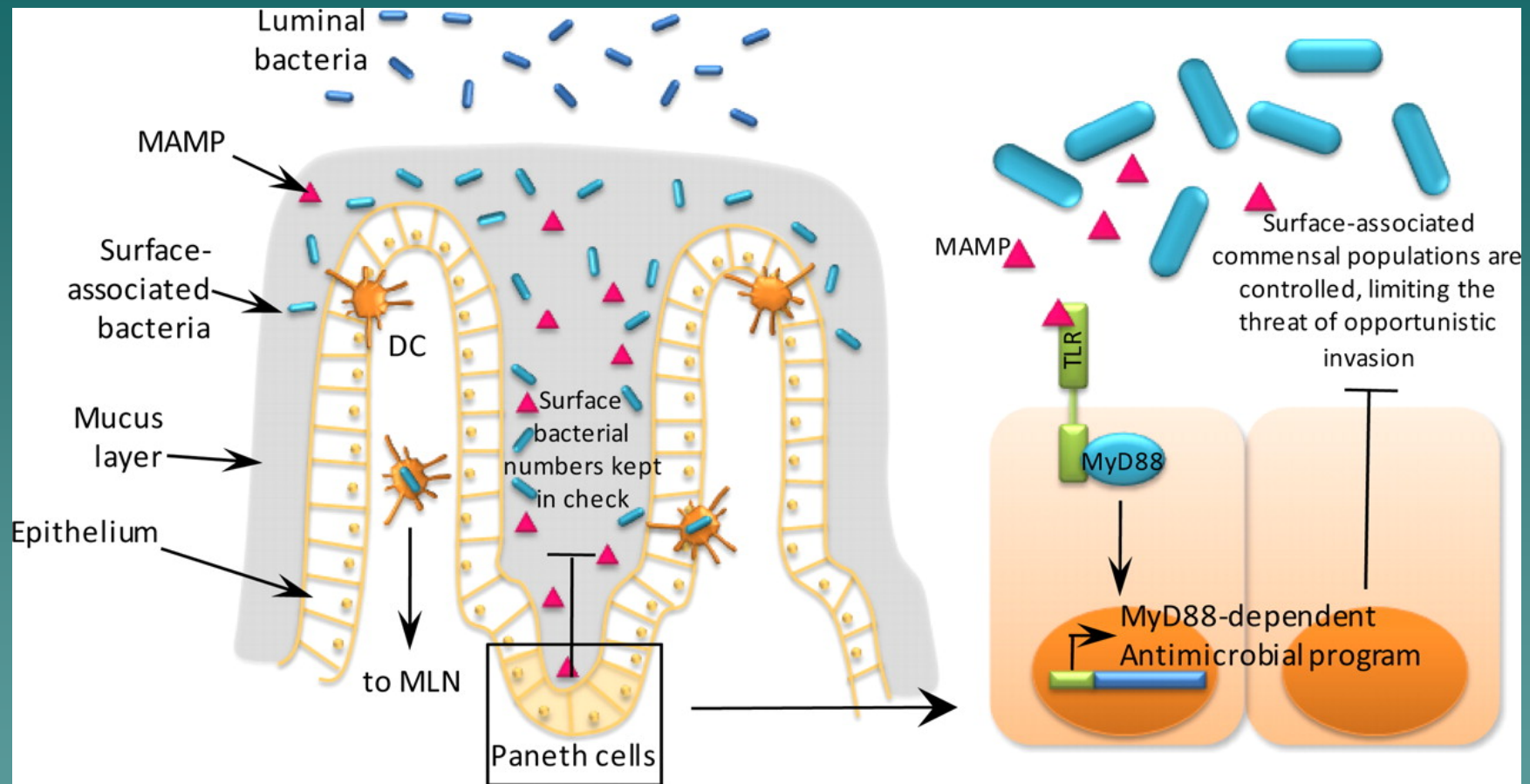
- ❑ Αποτελείται από διαφορετικές κυτταρικές σειρές που επικοινωνούν μεταξύ τους και με τον ξενιστή
- ❑ Καταναλώνει, αποθηκεύει και ξανα-κυκλοφορεί ενέργεια
- ❑ Αναλαμβάνει πολύ σημαντικές για τη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, χημικές μετατροπές
- ❑ Αυτοσυντηρείται μέσω των μηχανισμών της κυτταρικής αναπαραγωγής

Commensalism/Mutualism

- ◆ Σχέσεις που επηρεάζουν όλους τους συνεταιίρους στο οικοσύστημα και κατά συνέπεια την υγεία του ανθρώπου
- ◆ Παχύ έντερο: βιοαντιδραστήρας, όπου η εντερική μικροχλωρίδα διασπά πλήθος από άπεπτα συστατικά που καταλήγουν (φυτικές πηκτίνες, ημικυτταρίνες, ανθεκτικό άμυλο, απόβλητα μικροοργανισμών κ.α.)

Ο χώρος της



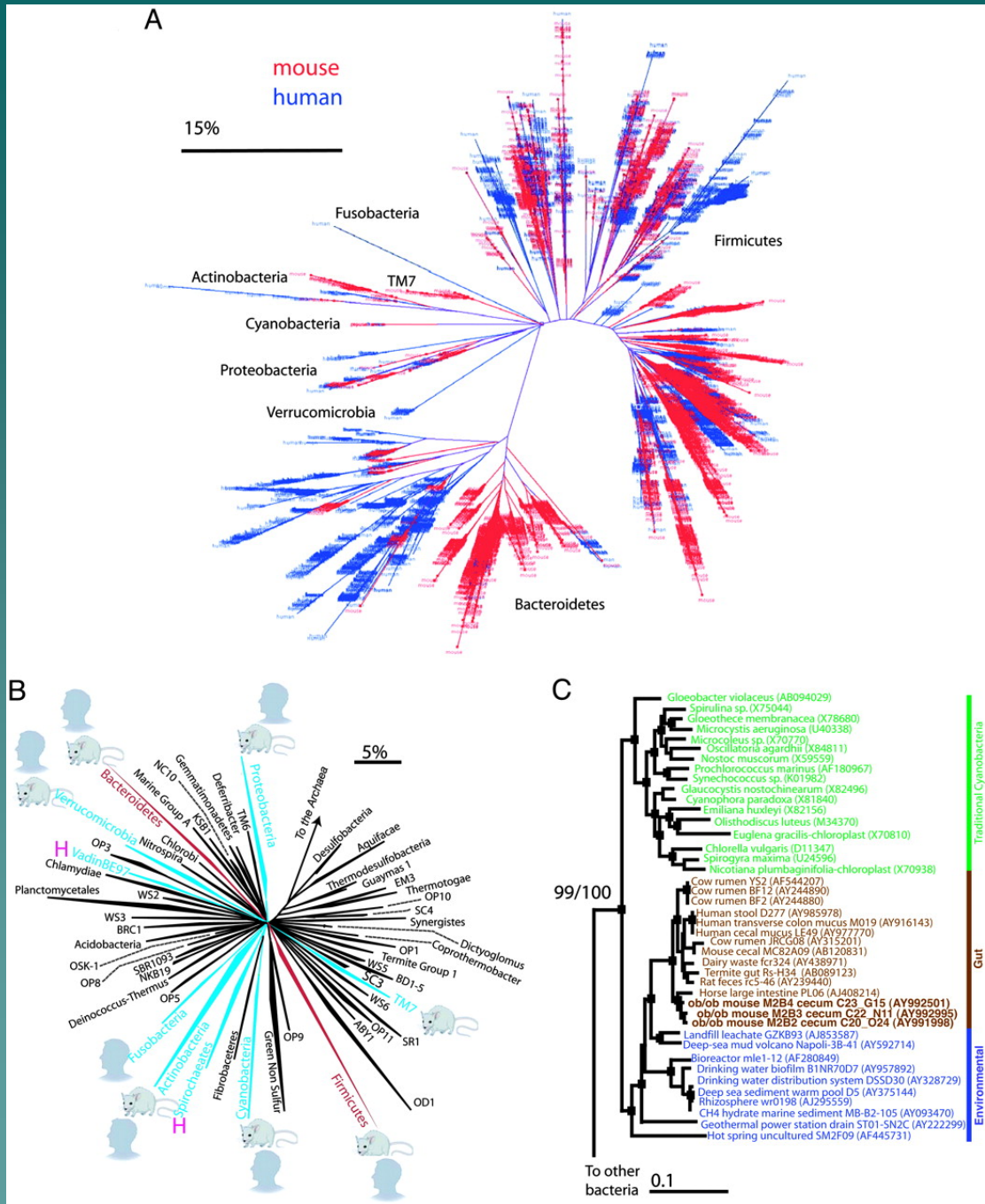


Τα μέλη της

- Στα ενήλικα άτομα ο γαστρεντερικός σωλήνας περιλαμβάνει: αρχαία, βακτήρια και ευκάρυα
- Τα βακτήρια του παχέος εντέρου έχουν κατακτήσει τη μέγιστη πυκνότητα που αναφέρεται σε οικοσύστημα
- Βιοποικιλότητα: αντιπροσωπεύονται μόνο **8 από τις 55** γνωστές υπερ-δαιρέσεις (5 αρκετά σπάνιες)

Αυτοί που επικράτησαν...

- ⇒ **Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides** (γένος *Bacteroides*)
- ⇒ **Firmicutes** (γένη *Clostridium*, *Eubacterium*)
- ⇒ Η κάθε κατηγορία καταλαμβάνει το 30% των απομονώσεων σε δείγματα κοπράνων ή του βλεννογόνου που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο
- ⇒ Proteobacteria: παρόντα αλλά δεν επικρατούν
- ⇒ Εργαλεία: κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές & μη-καλλιεργητικές τεχνικές (metagenomics)



- ❑ ~1822 αλληλουχίες από το παχύ έντερο στη GenBank → 1689 μη-καλλιεργούμενα στελέχη
- ❑ ~ 800 διαφορετικά είδη (500-1000)
- ❑ > 7000 στελέχη
- ❑ Τεράστια βιοποικιλότητα σε επίπεδο στελέχους, υποείδους

Η εξέλιξη στο έντερό μας...

CFB: η παρουσία τους συνδέεται με τα θηλαστικά

⇒ Εξελίχθηκαν σημαντικά από τότε που υιοθέτησαν την συμβίωση

⇒ Υπο-ομάδες τους ανιχνεύονται σε διαφορετικά είδη θηλαστικών. Αρχαία συμβίωση → κοινή εξέλιξη

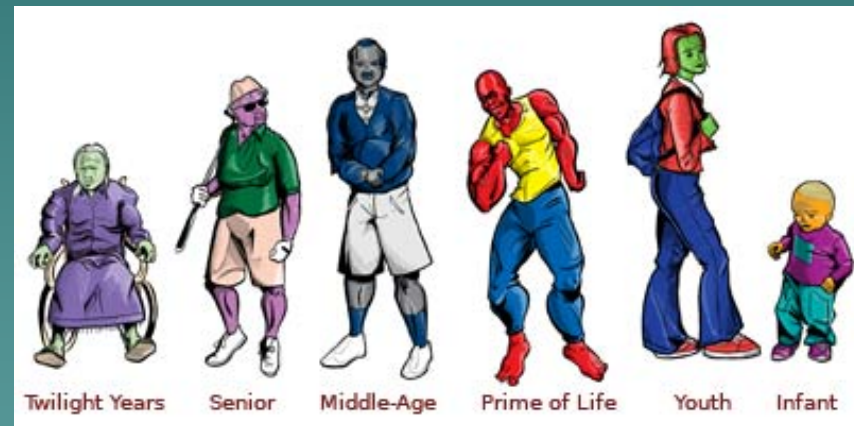
Εξέλιξη σε 2 επίπεδα

- ⌘ **Επίπεδο μικροοργανισμού** ⇒ ο τρόπος ζωής του ξενιστή επηρεάζει ατομικά τα μικροβιακά κύτταρα σε ένα ανταγωνιστικό περιβάλλον (π.χ. τύπος υποστρωμάτων που δημιουργούνται)
- ⌘ **Επίπεδο ξενιστή** ⇒ η μη άριστη λειτουργική απόδοση του μικροβιακού συνόλου, οδηγεί σε προβλήματα στην υγεία του ξενιστή ➔ μειωμένος αριθμός ξενιστών με τη συγκεκριμένη μικροχλωρίδα ➔ οι μο χάνουν το ενδιαίτημά τους

Υπόθεση: Φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή επιλογή από τον ξενιστή για μία μικροχλωρίδα που η συλλογική της δράση θα είναι ωφέλιμη για τον ίδιο

Το δένδρο της ζωής

- ❁ 0-2 ετών: Το νεογνό αποκτά τους πρώτους μο κατά τη γέννησή του. Από τη στιγμή αυτή ξεκινά μία πορεία εγκατάστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και διαδοχής μικροβιακών πληθυσμών, μέχρι περίπου 2 ετών
- ❁ > 2ετών-ενήλικη ζωή: Η μικροχλωρίδα διατηρείται σταθερή και χαρακτηριστική για κάθε ξενιστή
- ❁ >60-65 ετών: μεταβολές στην εντερική μικροχλωρίδα



Εντερική μικροχλωρίδα νεογνών

Πολύπλοκη διαδικασία που φαίνεται ότι χωρίζεται σε 4 φάσεις.

1^η φάση: Τα πρώτα μας μικρόβια: τα μικρόβια της μητέρας μας. Εντεροβακτήρια και εντερόκοκκοι κυρίως αλλά και σταφυλόκοκκοι (αερόβια). *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. αυξάνονται με τον χρόνο, ενώ οι λακτοβάκιλλοι σπάνια απομονώνονται στην αρχή. Τα κλωστρίδια ανιχνεύονται από νωρίς και απομονώνονται από το 1/3 των νεογνών μέχρι την 4η ημέρα

2^η φάση: Περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα όπου το βρέφος τρέφεται αποκλειστικά με γάλα: Εντεροβακτήρια και εντερόκοκκοι σε υψηλούς αριθμούς, ενώ οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν πτωτική τάση. Αυξάνονται τα αναερόβια

3^η φάση: Είναι το διάστημα όπου ξεκινά το νεογνό να προσλαμβάνει εκτός από το γάλα και κάποια πρόσθετα (στερεά τροφή).

Οι εντερόκοκκοι και τα βακτήρια του γένους *Bacteroides* αυξάνονται ενώ τα εντεροβακτήρια και τα μπιφιδοβακτήρια δεν μεταβάλλονται. Οι λακτοβάκιλλοι αυξάνονται αν και απομονώνονται δύσκολα.

4^η φάση: Η περίοδος αυτή ξεκινά με τον απογαλακτισμό του νεογνού και την εισαγωγή του στη δίαιτα του ενήλικα.

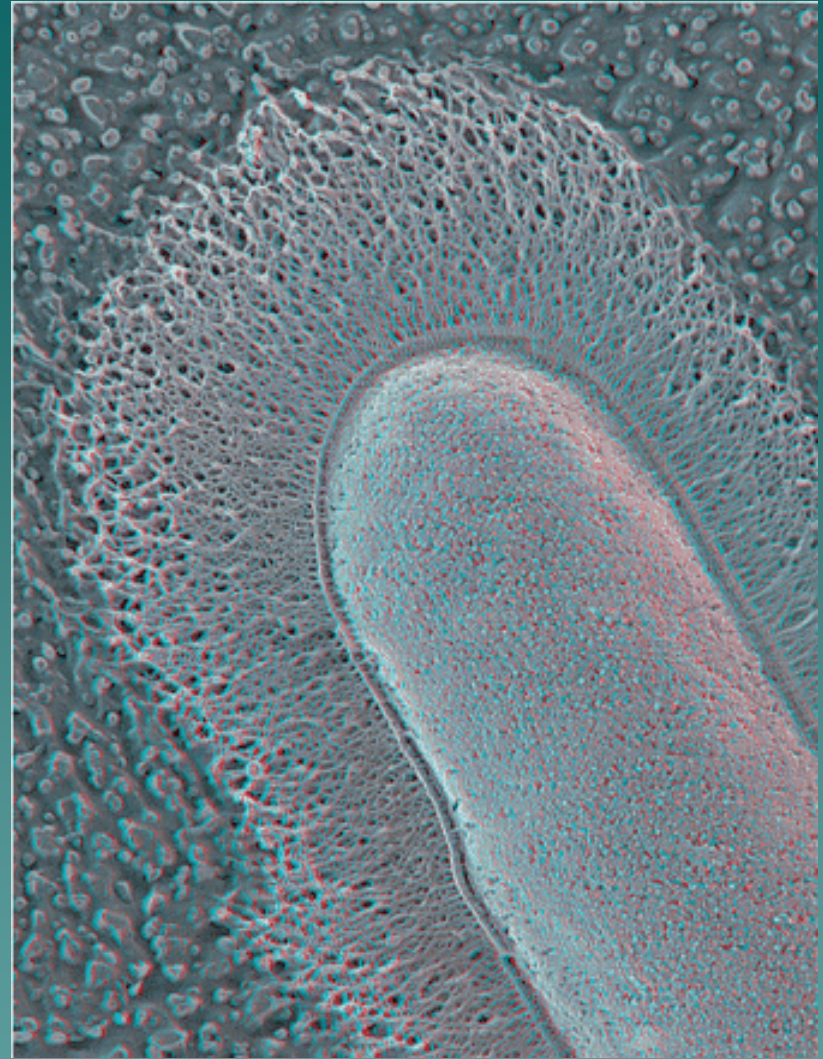
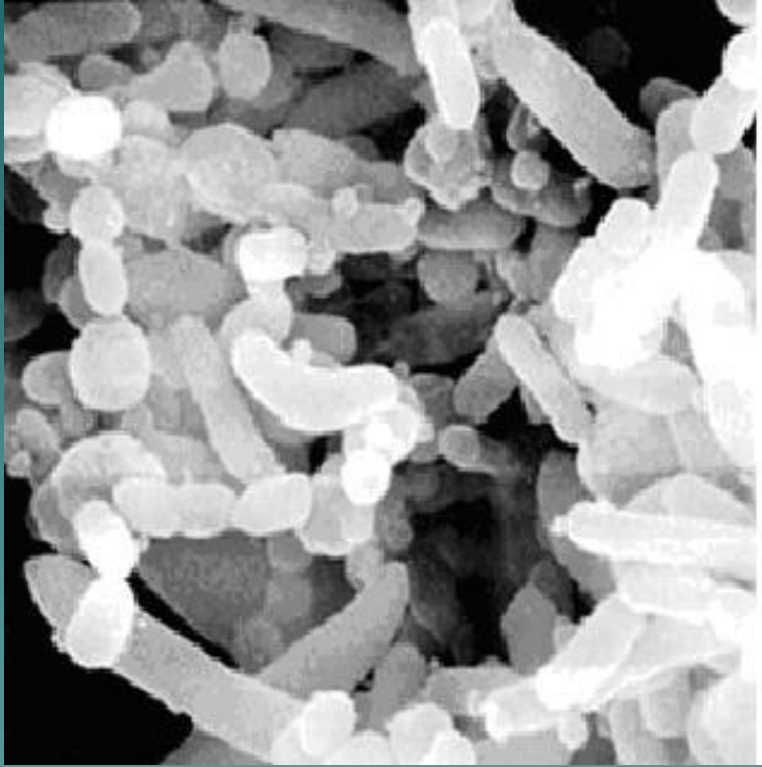
Η εντερική μικροχλωρίδα γίνεται όλο και πιο πολύπλοκη και τείνει να πάρει την μορφή του ενήλικα.

Εντερική μικροχλωρίδα ενηλίκων

- Το 35-50% του όγκου του παχέος εντέρου του ανθρώπου αποτελείται από βακτήρια και αρχαία. Τα αναερόβια βακτήρια είναι κατά 100 έως 1000 φορές περισσότερα από τα προαιρετικά αερόβια
- Τα κυριότερα αναερόβια γένη είναι τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*
- Τα προαιρετικά αερόβια ανήκουν κυρίως στα Εντεροβακτήρια μεταξύ των οποίων και το *Escherichia coli*. Επίσης σημαντική παρουσία είναι και οι εντερόκοκκοι

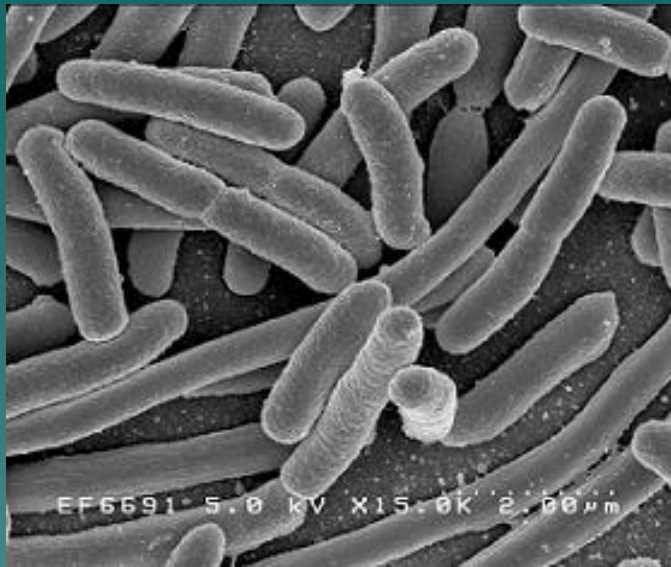
Bacteroides thetaiotaomicron

- Από τα πιο σημαντικά μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας
- Είναι άριστα προσαρμοσμένο στη διάσπαση πολυσακχαριτών που καταλήγουν άπεπτοι στο παχύ έντερο: περιέχει το μεγαλύτερο σύνολο γονιδίων σε βακτήριο που έχει αλληλουχηθεί, που σχετίζονται με τον μεταβολισμό υδατανθράκων
- Διαθέτει 226 γλυκοσιδικές υδρολάσες και 15 πολυσακχαριδικές λυάσες
- Ο άνθρωπος διαθέτει 98 γλυκοσιδικές υδρολάσες και κανένα ένζυμο που να σχετίζεται με τη διάσπαση πολυσακχαριτών που περιέχουν ξυλάνες, πηκτίνες, αραβινόζη, σάκχαρα πολύ κοινά στις διαιτητικές ίνες



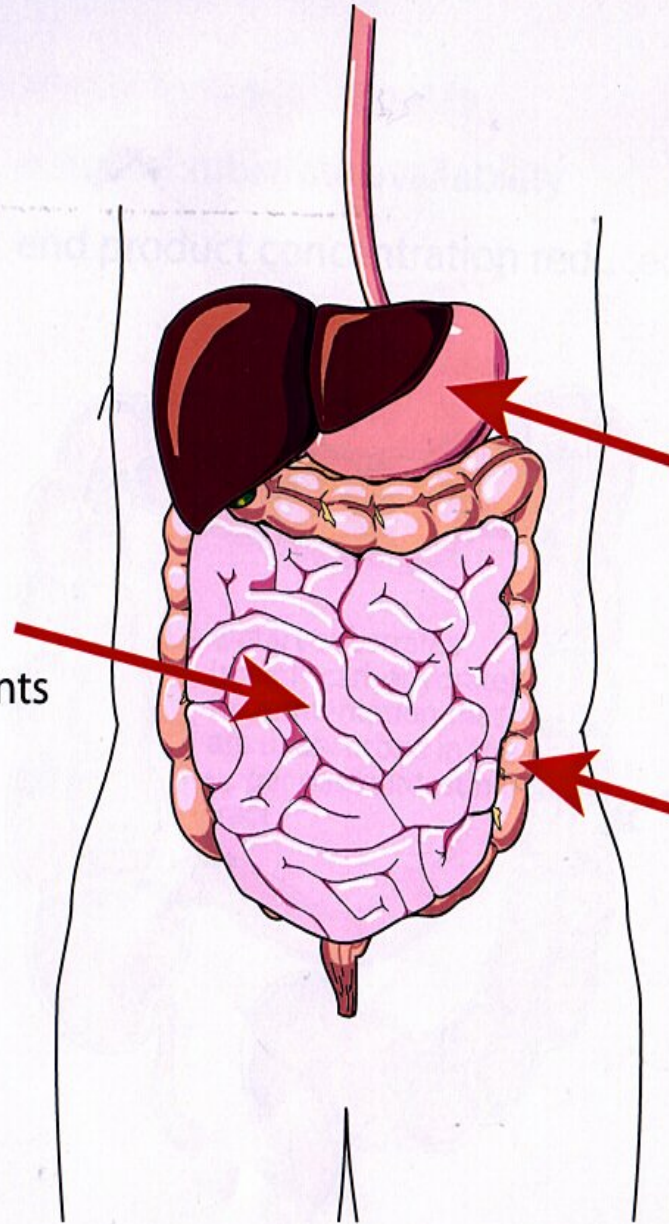
Τα αρχαία μας

- ◎ Υπάρχουν στο παχύ έντερο στο 50-85% των ενηλίκων ατόμων
- ◎ *Methanobrevibacter smithii*
- ◎ Παράγουν μεθάνιο, ενώ καταναλώνουν H_2
- ◎ Η ζύμωση των πολυσακχαριτών στο βιοαντιδραστήρα του παχέος εντέρου από τα βακτήρια, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οργανικών οξέων μικρής αλυσίδας, αλλά και H_2 και CO_2 . Η συσσώρευση του H_2 αναστέλλει τη δράση των NADH αφυδρογονασών με αποτέλεσμα τη μικρότερη παραγωγή ATP
- ◎ Αναπτύσσοντας συνεργιστικές σχέσεις με τα βακτήρια, απομακρύνουν το H_2 και βελτιώνεται η απόδοση του συστήματος



small intestine

bacterial numbers:
c.a. 10^4 - 10^6 /ml contents
e.g. lactobacilli,
Gram positive cocci

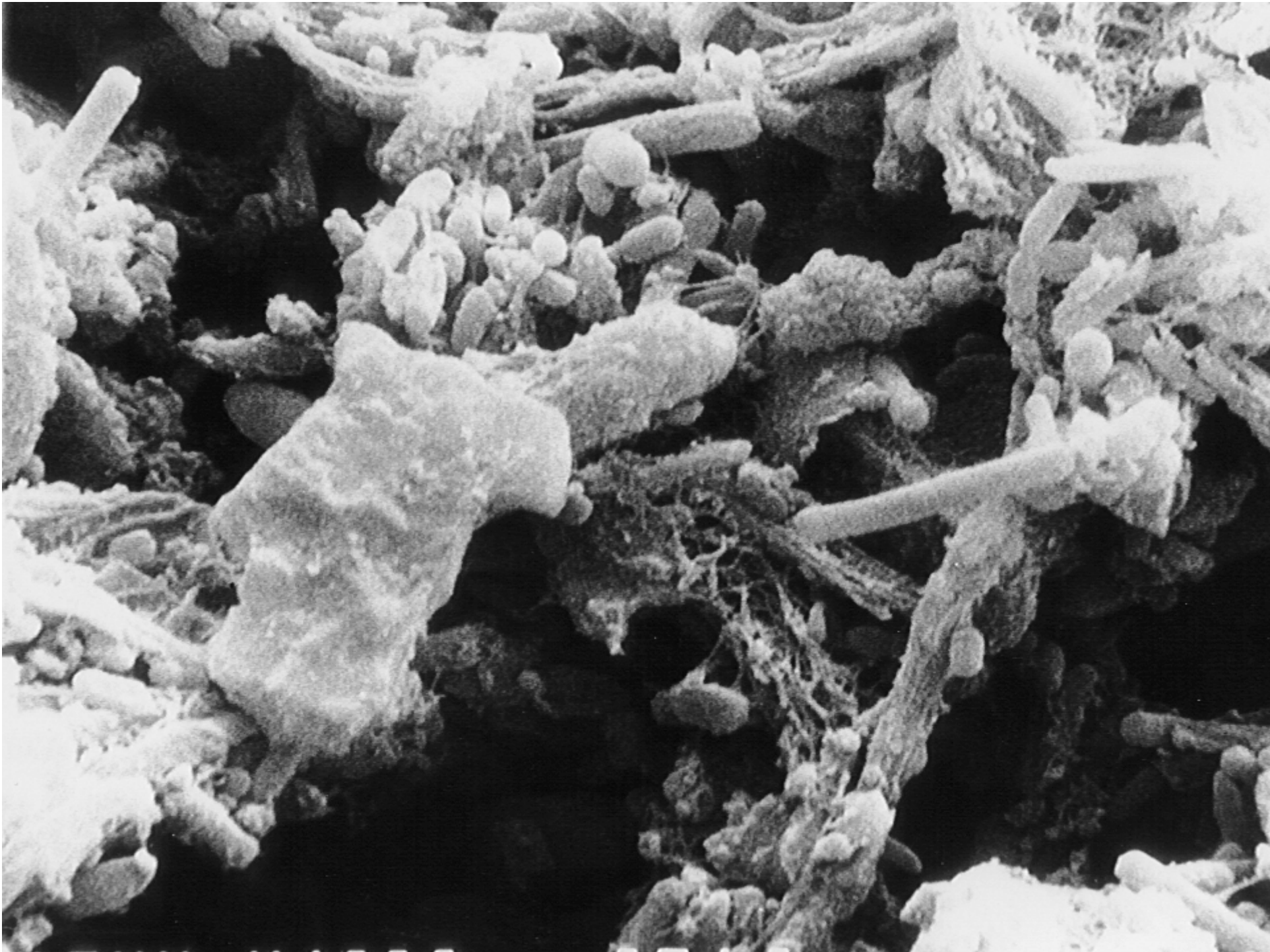


stomach

bacterial numbers:
c.a. 10^3 /ml contents
e.g. *Helicobacter pylori*

colon

bacterial numbers:
c.a. 10^{12} /g contents
bacteroides, bifidobacteria,
clostridia, peptostreptococci,
fusobacteria, lactobacilli,
enterobacteria, enterococci,
eubacteria, methanogens,
sulphate reducers etc



Εντερική μικροχλωρίδα υπερηλίκων

- Αντικρουόμενα αποτελέσματα. Το σύνολο της αναερόβιας μικροχλωρίδας φαίνεται ότι διατηρείται σταθερό
- Σημαντικές αλλαγές σε επιμέρους πληθυσμούς, αλλά και σε επίπεδο ειδών
- ↓ *Bacteroides* και *Bifidobacterium* spp.
Επιπλέον μείωση της ποικιλίας των ειδών
- ↑ *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp.,
Fusobacterium spp., προαιρετικά αναερόβια
- ↓ SCFA, αμυλολυτική δραστηριότητα
- ↑ πρωτεολυτική δραστηριότητα

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Καταβολισμός άπεπτων υποστρωμάτων (φυτικές ίνες, σάκχαρα, κάποια λιπίδια και πρωτεΐνες, αλλά και ενδογενής βλέννα, απόβλητα βακτηρίων, χολικά οξέα και χοληστερόλη)

Η ζύμωση των υδατανθράκων που διαφεύγουν της πέψης από το άνω τμήμα του πεπτικού είναι από τις πιο σημαντικές λειτουργίες της μικροχλωρίδας (7-10% ημερήσιων ενεργειακών αναγκών του ξενιστή).

Προμηθεύει τα βακτήρια με ενέργεια, αλλά παράγονται και λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFA) τα οποία αποτελούν εναλλακτική πηγή ενέργειας για τον ξενιστή. Τα λιπαρά αυτά οξέα διαφέρουν στα νεογνά από τους ενήλικες.

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Σύνθεση βιταμινών, όπως το παντοθενικό οξύ, η βιοτίνη, η πυριδοξίνη και η μενακινόνη (βιταμίνη Κ). Η εντερική μικροχλωρίδα είτε παράγει, είτε μεταβολίζει προς απορροφήσιμες μορφές τις βιταμίνες αυτές, ενώ βιοσυνθέτει πλήθος άλλων βιταμινών (βιταμίνη Β12, θειαμίνη κα) αν και δεν απορροφώνται από το παχύ έντερο

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Αντίσταση στον αποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς

- ❖ Δυναμικό φαινόμενο το οποίο διαφοροποιείται ανάλογα με τα μικροβιακά είδη, τον ξενιστή (δίαιτα, συνθήκες στρες, ηλικία κτ).
- ❖ Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (βακτηριοσίνες και H_2O_2 από τους λακτοβακίλλους και τα μπιφιδοβακτήρια, οργανικά οξέα).
- ❖ Ανταγωνισμός βακτηρίων για τις διαθέσιμες πηγές ενέργειας και άνθρακα.
- ❖ Παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων που παρεμποδίζουν την προσκόλληση στους ειδικούς υποδοχείς
- ❖ Αναερόβια βακτήρια θεωρούνται κυρίως τα υπεύθυνα για το φαινόμενο. Δράση συνδυασμού βακτηρίων και όχι μεμονωμένων στελεχών.
- ❖ Παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή (επίπεδα IgA , περισταλτική κίνηση, παραγωγή βλέννας κλπ)

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Ανάπτυξη θέσεων προσκόλλησης

- Η παρουσία της εντερικής μικροχλωρίδας επάγει τη παραγωγή επιθηλιακών πρωτεϊνών (βλέννα), που συμβάλλουν στην πρόσδεση των βακτηρίων στον βλεννογόνο.
- Οι θέσεις προσκόλλησης καθορίζονται από το γονιδίωμα του ξενιστή, γεγονός σημαντικό για τα πρώτα στάδια αποικισμού των βρεφών. Αν τα βακτήρια παρουσιάσουν γλυκολυτική δράση, τότε τροποποιούν τις θέσεις πρόσδεσης και μπορούν να δημιουργήσουν θέσεις πρόσδεσης για διαφορετικά στελέχη ευεργετικά ή και εντεροπαθγόνα

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Ανάπτυξη ανοσοποιητικού συστήματος

- ✓ Εντερικός βλεννογόνος: μηχανικός φραγμός ανάμεσα στο περιβάλλον και στον ξενιστή. Ύπαρξη στον βλεννογόνο ανοσολογικού συστήματος (Gut-associated lymphoid tissue, GALT).
- ✓ Εντερική μικροχλωρίδα επάγει την ωρίμανση του GALT, ασκώντας αντιγονικά ερεθίσματα και επηρεάζοντας την χυμική και κυτταρική ανοσία. Η εμφάνιση της μικροχλωρίδας του εντέρου μετά από την γέννηση, φαίνεται ότι συσχετίζεται άμεσα με την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού.

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

- ✓ Στον εντερικό αυλό ανιχνεύονται περίπου το 80% των Β-κυττάρων και πάνω από το 60% των Τ-κυττάρων
- ✓ Πειράματα σε αξενικά ζώα αποδεικνύουν ότι μόνο όταν εποίκιστούν με κανονική μικροχλωρίδα εμφανίζουν ανοσοποιητικό σύστημα αντίστοιχο με εκείνο των κανονικών ζώων. Τα αξενικά ζώα δεν διαθέτουν κύτταρα που εκκρίνουν IgA
- ✓ Έρευνες δείχνουν ότι παιδιά με αλλεργίες έχουν μικρότερα επίπεδα μπιφιδοβακτηρίων και λακτοβακίλλων, ή παρουσιάζουν μικρότερη αναλογία μπιφιδοβακτηρίων ως προς τα κλοστρίδια. Επίσης διαφέρουν και ως προς τα είδη των μπιφιδοβακτηρίων που περιέχουν.

Εντερική μικροχλωρίδα - ξενιστής: άρρηκτοι δεσμοί → συνομιλία

- ✓ Η IgA είναι γνωστό ότι βοηθά στη δημιουργία βιοφίλμ από τη φυσική μικροχλωρίδα, αλλά συγχρόνως περιορίζει την εξάπλωση των παθογόνων που εισέρχονται
- ✓ Σε συνεργασία με την IgA δρουν διάφορα πεπτιδία με αντιμικροβιακή δράση που εκκρίνονται π.χ. από τα κύτταρα Paneth. Μία καινούργια μορφή αντιμικροβιακών πεπτιδίων με εξειδικευμένη δράση στα παθογόνα είναι οι angiogenins
- ✓ Παρατηρήθηκε ότι ένα από τα σημαντικά βακτήρια της μικροχλωρίδας, το *Bacteroides thetaiotaomicron* αλληλεπιδρά με τα κύτταρα αυτά έτσι ώστε να επάγεται η έκκριση των ουσιών αυτών (μηχανισμός άγνωστος)

Αναγνώριση των βακτηρίων της μικροχλωρίδας από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου

- Τα βακτήρια που διαπερνούν το βλεννογόνο, ξεπερνώντας την αντιμικροβιακή δράση του, αναγνωρίζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, μέσω ειδικών υποδοχέων (Toll like receptors) και πρωτεϊνών NOD (nucleotide-binding oligomerisation domain isoforms)
- Και οι δύο αυτές ενδιάμεσες μορφές αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς και προκαλούν την αντίδραση της μη-ειδικής άμυνας, αλλά και της ειδικής προκαλώντας τη σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, προφλεγμονοδών κυτοκινών και χημειοκινών, όπως επίσης και δευτερογενείς αντιφλεγμονώδεις αποκκρίσεις απαραίτητες για την λήξη της φλεγμονής

- Είναι άγνωστο π.χ. πως δεν προκαλείται γενικευμένη φλεγμονή από την παρουσία τεράστιων αριθμών βακτηρίων με μαστίγιο στην εντερική μικροχλωρίδα, ενώ η είσοδος κάποιου παθογόνου με μαστίγιο (*Salmonella spp*) ενεργοποιεί τον μηχανισμό μέσω του υποδοχέα TLR5
- Φαίνεται ότι υπάρχουν μηχανισμοί τόσο στον ξενιστή όσο και στην ίδια τη μικροχλωρίδα, που μειώνουν τις προφλεγμονώδεις αντιδράσεις που προκαλούνται από τη φυσική μικροχλωρίδα.

Δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας

Διέγερση της εντερικής διέλευσης - Ωρίμανση βλεννογόνου

- Η παρουσία της εντερικής μικροχλωρίδας διεγείρει την περισταλτικότητα και επηρεάζει το νευρικό σύστημα του εντέρου. Μελέτες σε αξενικά ζώα.
- Η παρουσία της εντερικής μικροχλωρίδας διεγείρει την ωρίμανση και τον ρυθμό ανακύκλωσης των επιθηλιακών κυττάρων στο παχύ έντερο. Πειράματα σε αξενικά ζώα

Αρνητικές δράσεις της εντερικής μικροχλωρίδας για τον ξενιστή

- ☠ Σχηματισμός καρκινογόνων ενώσεων. Μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας μπορούν να μετασχηματίσουν με ενζυμικές διεργασίες διατροφικά συστατικά σε καρκινογόνες ενώσεις. Στελέχη κλωστριδίων και του γένους *Bacteroides*, έχουν κυρίως συσχετιστεί με την καρκινογένεση ενώ αντίθετα λακτοβάκιλλοι και μπιφιδοβακτήρια προστατεύουν μετατρέποντας καρκινογόνες ενώσεις σε αδρανείς μορφές.
- ☠ Επαγωγή ευκαιριακών λοιμώξεων. Φαινόμενο της μετάθεσης ιδιαίτερα επικίνδυνο για ασθενείς σε ανοσοκαταστολή

Αρνητικές δράσεις της εντερικής μικροχλωρίδας για τον ξενιστή

- Αντιδράσεις υπερευαισθησίας που σχετίζονται με τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Κυρίως είδη του γένους *Bacteroides* προκαλούν ενδοαυλιακές φλεγμονές, αλλά και αερόβια στελέχη, μέσω άγνωστων μηχανισμών. Χορήγηση αντιβιοτικών προκαλεί ύφεση των φαινομένων. Σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση με προβιοτικά

Intestinal putrefaction

- Ps. aeruginosa*
- Proteus sp.*
- Staphylococci
- Clostridia
- Veillonellae

2

Inhibition of growth of exogenous and harmful bacteria

Digestion/ absorption of food ingredients & minerals

Production of carcinogens

- Enterococci
- E. coli*
- Sulphate Reducers
- Lactobacilli
- Streptococci
- Bifidobacteria
- Bacteroides

Stimulate immune function

Vitamin synthesis

Diarrhoea, infections, toxin production, cancer, toxigenesis, genotoxicity.

11

No./g faeces (log scale)

Βιβλιογραφία

- ✓ B.Samuel & J. Gordon (2006). A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism, *PNAS*, 103: 1011-1016
- ✓ F. Backhed et al., (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine, *Science*, 307: 1915-1020
- ✓ F. Guamer & J. R. Malagelada (2003). Gut flora in health and disease, *Lancet*, 361: 512-519
- ✓ E. J. Woodmansey (2007). Intestinal bacteria and ageing, *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1178-1186
- ✓ F.M. Ruemmele et al. (2009). Clinical evidense for immunomodulatory effects of probiotic bacteria, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48(2): 126-141

Ευχαριστώ!!