

PREBAVNA MIKROBIOTA KOT DEJAVNIK PRI RAZVOJU DEBELOSTI

Vesna JERMAN ¹, Gorazd AVGUŠTIN ²

Delo je prispelo 12. aprila 2010, sprejeto 20. maja 2010
Received April 12, 2010; accepted May 20, 2009

Prebavna mikrobiota kot dejavnik pri razvoju debelosti

Porast debelosti v moderni družbi je povezan z večjo pojavnostjo z debelostjo povezanih bolezni in predstavlja veliko finančno breme za javno zdravstvo. Pomembno odkritje na področju mikrobiologije prebavnega trakta sesalcev je povezano z vlogo prebavne mikrobiote pri razvoju debelosti. Z novimi molekularnimi metodami in poskusi z gnotobiotskimi živalmi so do neke mere pojasnili udeležbo prebavne mikrobiote pri uravnavanju telesne mase in energijskega ravnovesja gostitelja. Prebavna mikrobiota vpliva na vnos hranil in porabo energije iz hrane in pospešuje shranjevanje le-te v maščobna tkiva s procesi fermentacije, olajšane absorpcije in tudi z vplivom na izražanje gostiteljevih genov (protein Fiaf) ter na aktivnost gostiteljevih encimov (proteinska kinaza AMPK). Pri debelih miših in ljudeh je prebavna mikrobiota dokazano bolj učinkovita pri izkoriščanju energije iz hrane kot pri suhih. osebkih. Obstajajo značilne razlike v sestavi mikrobnih združbe glede na debelost oz. suh fenotip. V prebavilih debelih živali in ljudi se dosledno kaže povišan delež predstavnikov bakterij iz debla *Firmicutes* na račun zmanjšanja predstavnikov debla *Bacteroidetes*, obe prevladujoči debla pa v prebavilih sesalcev skupaj predstavljata do 90 % vseh bakterij. Izkazalo se je, da je prebavna mikrobiota udeležena tudi pri patofiziologiji debelosti preko dejavnikov, kot je mikrobnih LPS. Rezultati raziskav kažejo, da lahko spremembe deleža maščob v hrani vplivajo na sestavo mikrobnih združbe ter da te spremembe vplivajo na pojavnost metabolnih bolezni. Odpira se novo področje manipulacije prebavne mikrobiote za zdravljenje debelosti in z njo povezanih bolezni.

Ključne besede: mikrobiologija / prebavni trakt / debelo črevo / mikrobiota / *Bacteroidetes* / *Firmicutes* / debelost / ITM / genomika / metagenomika

Gut microbiota as a factor in obesity development

The increased prevalence of obesity in modern society is associated with incidence of obesity related diseases and represents a financial burden on public health. Important discovery in the field of microbial ecology of the gut was the possible involvement of the gut microbiota in obesity development. Using new molecular techniques and gnotobiotic animal models has revealed the relation between the regulation of body mass and energy balance of the host with the microbial community of the gut. Gut microbiota affects nutrient intake, facilitate the extraction of energy from food and promote storage of the calories in host adipose tissue through processes of fermentation, absorption and through the effect on the expression of host genes (e.g. Fiaf) and the activity of host enzymes (e.g. AMPK). In obese mice and humans the gut microbiota is clearly able to obtain energy from food more effectively as in the lean subjects. There are significant differences in the composition of microbial communities in relation to fat vs. lean phenotype. In the gut of obese animals and humans the increased proportion of the *Firmicutes* at the expense on *Bacteroidetes* was consistently detected. Both are the dominant bacterial groups in mammalian gastrointestinal tract, accounting together for 90% of all bacteria. It has been shown that gut microbiota is involved also in pathophysiology of obesity through factors such as microbial LPS. Existing results show that high fat diet can affect the composition of microbial community in the gut and that these changes can further affect the incidence of metabolic disease. This evidence potentially opens a new field of manipulation of the gut microbiota as a new strategy to treat obesity and related diseases.

Key words: microbiology / alimentary tract / hindgut / microbiota / *Bacteroidetes* / *Firmicutes* / obesity / BMI / genomics / metagenomics

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., e-mail: vesna.jerman@bf.uni-lj.si
² Isti naslov, prof. dr., e-mail: gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si

1 EPIDEMIJA PREKOMERNE DEBELOSTI

Debelost je stanje telesa, pri katerem je delež maščob prekomerno povečan in zato predstavlja breme za telo. Povečevanje števila debelih ljudi je značilen pojav v družbah razvitega dela sveta, kjer je hrane v obilju in hkrati prevladuje življenjski slog z nezadostno telesno aktivnostjo. Prekomerno kopičenje maščobnih tkiv ima vpliv na izgled in zdravje telesa ter lahko vodi v razvoj bolezni, zato je prekomerna debelost opredeljena kot bolezensko stanje. Debelost je ključna pri nastanku in napredovanju nekaterih kroničnih nenalezljivih bolezni, kot so bolezni srca in ožilja, sladkorna bolezen in nastanek malignih novotvorb (Calle in Thun, 2004). Dokazana je bila jasna povezava med prekomerno telesno maso in povišanimi vrednostmi holesterola in sladkorjev v krvi, kar posledično povečuje pojavnost srčno-žilnih bolezni. Od sedmih pomembnih dejavnikov tveganja za nastanek kroničnih nenalezljivih bolezni jih je vsaj pet tesno povezanih s telesno nedejavnostjo in nezdravo prehrano. V gospodarsko razvitih državah zahodnega sveta, predvsem v ZDA, kjer je opravljenih tudi največ študij, povezanih z debelostjo, je pretirana debelost na sedmem mestu najpogostejših dejavnikov tveganja za razvoj bolezni, v razvitih državah pa je med vzroki za smrt debelost, ki je posledica pretiranega hranjenja na drugem mestu, takoj za zlorabo tobaka. V sistemu zdravstvenega zavarovanja ZDA spremljajo in vrednotijo strošek, ki ga predstavljajo posamezne bolezni, in v letu 2008 naj bi ZDA za bolezni, ki so posledica debelosti, porabile kar 45 milijard dolarjev.

Telesno maso ocenjujemo z indeksom telesne mase (ITM). Mejne vrednosti ITM za prekomerno debelost so v različnih državah med 25 in 30 kg/m². Vloga maščobnih tkiv v zdravem telesu je shranjevanje energije, del teh tkiv pa sodi med endokrine žleze, ki uravnavajo imunski sistem in sodelujejo pri sami regulaciji shranjevanja energije. Telo sesalcev je evolucijsko bolj zaščiteno pred stradanjem kot pred pretiranim obiljem, saj je izguba telesne mase za organizem nevarnejša od pretirane debelosti. Povečanje telesne mase je rezultat interakcij med gensko zasnovno ter socialnimi, kulturnimi in okoljskimi dejavniki in je večinoma posledica obilja.

Ocene vpliva genotipa na debelost so med 6 in 85 % (Yang in sod., 2007), s samimi genetskimi razlikami med ljudmi pa ne moremo pojasniti porasta števila pretirano debelih ljudi v tako kratkem obdobju, kot smo temu priča v zadnjih desetletjih. Genetsko pogojena debelost je večinoma poligenske oblike, pri kateri je udeleženo večje število genov (Rankinen in sod., 2002), katerih učinki so manjši. Debelost, ki je posledica mutacije enega gena, je v populaciji redka, so pa posledice te mutacije večje (O'Rahilly, 2002). Najbolj raziskana je mutacija v genu za peptidni hormon leptin. Leptin večinoma nastaja v

maščobnih celicah, adipocitah, in igra pomembno vlogo v metabolizmu glukoze in maščobnih kislin. Količine leptina so proporcionalne količini telesnih maščob in do povečanega izražanja leptina pride ob povečanem številu adipocit (Couturier in sod., 2007). Mutacije v genu za leptin (*ob*) ali v genu za leptinski receptor (*lepr*) v populaciji so redke, zanje so uveljavljena in uspešna zdravljenja z rekombinantnim leptinom, hkrati pa so tudi osnova mišjega modela, na katerem potekajo raziskave tako debelosti kot z njo povezanih bolezni. Zaradi majhne pojavnosti te mutacije v populaciji pa so pomembne študije na drugih modelih, ki ne izhajajo iz monogeno pogojene genetske okvare.

Kot smo že omenili, z genetiko ne moremo pojasniti hitrega povečevanja števila prekomerno debelih ljudi po celem svetu. Svetovna zdravstvena organizacija je prepoznala prekomerno debelost kot epidemijo leta 1997 in osem let kasneje so podatki kazali, da je najmanj 400 milijonov ljudi po vsem svetu predebelih.

1.1 STANJE DEBELOSTI V SLOVENIJI

Tudi v Sloveniji se delež čezmerno debelih oseb povečuje in s tem zdravstveni problemi, povezani s preobilno prehrano in nezadostno telesno dejavnostjo. V letu 2002 je bilo do 40 % vseh smrti v Sloveniji posledica bolezni srca in ožilja. Po ocenah pristojnih inštitucij ekonomsko breme bolezni, ki so povezane s prekomernim hranjenjem, že presega zmogljivosti zdravstvenih zavarovanj. Raziskave odrasle populacije so sicer redke, kažejo pa na naraščanje deleža čezmerno hranjenih (ITM med 25 in 30) ter deleža prekomerno debelih (ITM nad 30) ljudi. Glede na izsledke raziskav iz let 1996/97, 2001 ter 2002/2003 so bili deleži čezmerno prehranjenih Slovencev med 55 in 62 %, deleži prekomerno debelih pa med 15 in 20 % (Ministrstvo za zdravje RS, 2007). Razširjenost debelosti v Sloveniji je primerljiva z drugimi evropskimi državami, porast debelosti pa se kaže tudi pri otrocih in pubertetnikih (Avbelj in sod., 2005). V okviru Mednarodne zdravstvene organizacije je Evropska unija v letu 2006 podpisala deklaracijo za preprečevanje naraščanja debelosti s ciljem zaustaviti epidemijo debelosti do leta 2015. Ministrstvo za zdravje RS je dokument podprlo in se s tem zavezalo k reševanju te problematike.

Pri pridobivanju energije iz hrane imajo bolj ali manj pomembno vlogo tudi mikroorganizmi, ki nase-ljujejo prebavni trakt, t.i. prebavna mikrobiota. Rezultati novejših študij vpliva mikrobne združbe v prebavilih so dali slutiti, da ima prebavna mikrobiota pomembno vlogo tudi pri nastanku debelosti. S tem namenom se je pomemben del raziskav, ki so osredotočene v debelost, usmeril v preučevanje vloge mikrobne združbe v preba-

vilih. V pričujočem prispevku se bomo omejili na vlogo prebavne mikrobiote pri razvoju debelosti v primeru monogastričnih sesalcev, med katere spada tudi človek.

2 MIKROBNA ZDRUŽBA V PREBAVNEM TRAKTU SESALCEV

Mikrobiologija prebavnega trakta je področje, ki se je v zadnjem desetletju zaradi uveljavitve ter znižanja stroškov molekularnih metod izjemno razmahnilo. Pred prihodom t.i. druge generacije molekularnih tehnik je bilo proučevanje mikrobov v prebavilih sprva omejeno na tiste, ki jih je bilo mogoče gojiti, kasneje pa na omejeno število tistih, ki jih je bilo mogoče zaznati z molekularnimi tehnikami prve generacije. Večina molekularnih študij temelji na obsežnem odkrivanju in/ali nabiranju nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA, za katere velja, da so primerni molekularni označevalci (ang. *marker*), ker so prisotni v vseh organizmih in so zadostno ohranjeni za poravnave ter dovolj različni za filogenetske analize. Po letu 2003 se je z razvojem metod hitrega in masovnega sekvenciranja (Leamon in sod. 2003; Margules in sod., 2005) nabiranje novih sekvenc iz prebavne mikrobiote še pospešilo ter omogočilo razmah študij primerjalne genomike.

V prebavnem traktu sesalcev je ocenjeno število mikrobnih celic med 10^{13} in 10^{14} ($\sim 10^{11-12}$ celic/ml prebavne vsebine). Večina prebavnih mikroorganizmov pri monogastričnih živalih, kamor sodi tudi človek, naseljuje zadnji del prebavnega trakta, to je debelo črevo ali kolon, ki ga uvrščamo med ekosisteme z največjim številom mikrobnih celic na prostorninsko enoto (Bäckhed in sod., 2005). Med prisotnimi mikroorganizmi prevladujejo predvsem po Gramu pozitivne bakterije, arheje in evkarionti pa so v manjšini: v prebavilih miši so tako deleži bakterij med 90–96 %, do 2 % mikrobne združbe zastopajo arheje, evkarionti predstavljajo od 1–7 % ter virusi 1 % mikrobne združbe (Turnbaugh in sod., 2006). V prebavnem traktu je pestrost mikrobne združbe relativno majhna v primerjavi z ekosistemi, kjer prav tako prihaja do razgradnje organske snovi, kot so na primer tla (Ley in sod., 2006b). V prebavilih ljudi in miši kar 90 % vseh bakterijskih filotipov prebavne mikrobiote pripada debloma *Firmicutes* in *Bacteroidetes*, to je le dvema od sedemdesetih bakterijskih debel, in sicer v razmerju 60–80 %: 20–40 % (Ley in sod., 2005, 2006a; Eckburg in sod., 2005). Pestrost mikrobne združbe se kaže predvsem na nižjih taksonomskih nivojih, to je vrstah in podvrstah, kar naj bi bila posledica gostiteljske selekcije in koevolucije v relativno stabilni ekološki niši (Dethlefsen in sod., 2007). Ocenjeno število bakterijskih »molekularnih« vrst

v debelem črevesu odraslega človeka je okrog 1000, od teh naj bi jih bilo manj kot 70 ubikvitarnih (Dore, 2009).

Do začetne okužbe sesalskega prebavila pride ob porodu, na sestavo prebavne mikrobiote, ki se bo v prebavilu nato vzpostavila, pa imajo vpliv tako genotip gostitelja kot okoljski dejavniki (Camp in sod., 2009), vključno s fiziološko anatomskimi spremembami prebavnega trakta, do katerih pride med razvojem (Berg 1996; Palmer in sod., 2007). Raziskave vpliva različnih dejavnikov na sestavo prebavne mikrobiote, ki so bile opravljene v preteklosti, temeljijo na različnih metodah in rezultati teh študij so si zato pogosto nasprotujoči. Zaradi načina okužbe predvidevamo, da si bosta združbi prebavne mikrobiote matere in njenih otrok precej podobni. To so zaznali Turnbaugh in sod. (2009) pri pregledu prebavne mikrobiote enojajčnih in dvojajčnih dvojčkov ter njihovih mater. Palmer in sod. (2007) v nasprotju s tem pri pregledu prebavne mikrobiote v fecesu otrok in njihovih mater niso zaznali večjih razlik od prebavne mikrobiote drugih odraslih ljudi. Ley in sod. (2005) so na modelu suhih in debelih linijah miši ugotovili, da je sestava prebavne mikrobiote med materami in mladiči enaka, razlikuje pa se zastopanost posameznih skupin in le-ta je bila odvisna od genotipa (debel-suh). Vpliv gostitelja na sestavo prebavne mikrobiote so zaznali tudi pri prenosu prebavne mikrobiote iz prebavil rib cebric (*Danio rerio*) v prebavila gnotobiotskih sterilnih miši. Po prenosu se je sestava mikrobne združbe v prebavilu okuženih miši v času spremenila in postala bolj podobna prebavni mikrobioti običajnih miši (Rawls in sod., 2006). Sicer naj bi sestava prebavne mikrobiote pri istih osebkih v času ostajala enaka (Zoetendal in sod., 2001) in naj bi glede na okoljske dejavnike prihajalo do sprememb predvsem v deležu prisotnih skupin (Ley in sod., 2005). O prožnosti ali stabilnosti prebavne mikrobiote govori študija Dethlefsena in sod. (2008), v kateri so ugotovili, da se je po štirih tednih po prenehanju jemanja antibiotika v prebavilih ljudi vzpostavila enaka združba prebavne mikrobiote kot pred jemanjem, ne glede na to, da so antibiotiki sprva znižali mikrobno pestrost.

Kljub temu nekatere opravljene študije kažejo, da se sestava prebavne mikrobiote spreminja v odvisnosti od tipa hrane (Ley in sod., 2006a; Nadal in sod., 2009) in se do neke mere spreminja tudi s starostjo (Mueller in sod., 2006; Mariat in sod., 2009).

3 RAZLIKE V SESTAVI PREBAVNE MIKROBIOTE DEBELIH IN SUHIH OSEBKOV

Novejše študije so jasno pokazale, da obstaja korelacija med povišanim deležem telesnih maščob in strukturo mikrobne združbe v prebavilih miši (Ley in sod.,

2005), podgan (Mozes in sod., 2008), prašičev (Guo in sod., 2009) in ljudi (Ley in sod., 2006a; Collado in sod., 2008; Nadal in sod., 2009). Pri vseh so zaznali statistično značilno spremembo v relativni zastopanosti predstavnikov bakterijskih debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes* kot povišanje deleža firmikutov pri debelih osebkih.

Spremembe v razmerju predstavnikov firmikutov in bakteroidet so prvič zaznali v prebavnem traktu debelih (linija *ob/ob* z okvaro v genu za leptin) in suhih (linija *+/+*) miši (Ley in sod., 2005), in sicer je bilo pri debelih miših do 50 % več firmikutov. V nadaljevanju so sledili spremembi deleža firmikutov in bakteroidet v fecesu prekomerno debelih ljudi med enoletnim programom hujšanja ob spremembi iz visoko kalorične v nizko kalorično dieto (Ley in sod., 2006a). Prebavna mikrobiota se je spreminjala skupaj z zmanjšanjem telesne mase. Skupni delež obeh bakterijskih skupin je ostal enak, spremenilo pa se je razmerje med prevladujočima skupinama v prid bakteroidet, in sicer iz 3 % na začetku na 15 % celotne bakterijske združbe ob koncu poskusa. Podobno se je med hujšanjem devetintridesetih prekomerno debelih pubertetnikov spremenila zastopanost izbranih bakterijskih skupin (Nadal in sod., 2009). Ob znižanju ITM so v fecesu zaznali zmanjšanje števila nekaterih skupin iz debla *Firmicutes* ter zvišanje deleža bakterij iz debla *Bacteroidetes*.

Krmljenje z visoko kalorično dieto je tudi pri podganah spremljala sprememba v bakterijski združbi prebavne mikrobiote, kjer so opazili značilno zmanjšanje števila predstavnikov iz debla *Bacteroidetes* in povečanje števila rodov enterokokov in laktobacilov iz debla *Firmicutes* pri debelih podganah v primerjavi s suhimi (Mozes in sod., 2008).

Nedavno so Turnbaugh in sod. (2009) v metagenomski študiji pregledali ogromno število celotnih in delnih sekvenc bakterijskih genov za 16S rRNA v fecesu debelih in suhih ljudi (n=154). Ugotovili so, da je prebavni mikrobiom družinskih članov podoben in da je proučevanim osebkom bolj kot nabor bakterijskih vrst skupen nabor genov. Zaznali so tudi značilno manjšo pestrost na ravni bakterijskih rodov v fecesu debelih ljudi v primerjavi s suhimi in zato predpostavili, da pretirana debelost bakterijsko raznolikost zmanjšuje.

Razlike v razmerju predstavnikov debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes* so odkrili tudi pri različnih starostnih skupinah ljudi. Mariat in sod. (2009) so pregledali zastopanost bakterijskih skupin *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Escherichia coli* v fecesu otrok (3–10 mesecev), odraslih (25–45 let) ter starejših ljudi (70–90 let) z metodo kvantitativnega PCR (qPCR). Za prebavno mikrobioto majhnih otrok je bilo značilno prevladovanje bifidobakterij in tudi bakterije iz vrste *E. coli* so bile pri majhnih

otročih na nivoju dominantne skupine. Pri odraslih so prevladovali firmikuti in bakteroidete, pri starejših ljudeh pa se je ponovno statistično značilno povečal delež *E. coli*. Razmerje med številom celic firmikutov in bakteroidet se je med starostnimi skupinami razlikovalo in je bilo pri otrocih 0,4, pri odraslih 10,9 ter 0,6 v skupini starejših ljudi. Kalliomaki in sod. (2008) so spremljali število glavnih bakterijskih skupin prebavne mikrobiote pri odraščajočih otrocih (od rojstva do 7. leta starosti) in primerjali otroke, ki so kasneje postali prekomerno debeli in otroke z normalno telesno maso. Predlagali so, da je mogoče po zastopanosti bakterijskih skupin v prebavni mikrobioti sklepati na kasnejšo nagnjenost k debelosti. Glavne razlike so odkrili v številu bifidobakterij in streptokokov, prvih je bilo pri otrocih, ki so kasneje postali debeli, manj, streptokokov pa več.

4 VLOGA PREBAVNE MIKROBIOTE PRI PRIDOBIVANJU ENERGIJE IZ HRANE

Kakšno vlogo ima povišanje relativnega deleža predstavnikov debla *Firmicutes* v prebavilu debelih ljudi in živali, kakšno vlogo številčnejši predstavniki debla *Bacteroidetes* pri suhih, ter na kakšen način poteka selekcija, še ni jasno. Predstavniki debla *Bacteroidetes* v prebavilih fermentirajo ogljikove hidrate, porabljajo dušikove spojine ter so udeleženi v biotransformaciji žolčnih kislin. S pomočjo bakteroidet in njihovih encimov se v prebavilih ponovno dekonjugira tudi do 95 % konjugiranih žolčnih kislin, ki se lahko nato kot take vrnejo v telo. Večina bakteroidet je »zmerno« saharolitičnih, hidrolizirajo tudi kompleksne rastlinske polisaharide, kot so ksilan, pektin in celuloza, in imajo za to veliko število genov za različne glikozilaze. Pri nekaterih vrstah iz rodu *Bacteroides* so ugotovili, da so hidrolazni encimi nameščeni na notranji membrani, njihovo izražanje pa je regulirano glede na prisotne polisaharide, zaradi česar naj bi se bakteroidete lažje prilagajale prisotnim virom substrata. V deblo *Firmicutes* spadajo klostridiji, bacili, laktobacili in molikuti. V zadnjem delu prebavnega trakta človeka in živali so prisotni predvsem firmikuti iz razreda klostridijev in laktobacilov, prvih pa je bistveno več in jim pripisujemo pomembnejšo vlogo. Pri fermentaciji polisaharidov uporabljajo podoben sistem membranskih proteinov kot bakteroidete, le da jim substrata ni potrebno prenesti v periplazmo.

Da bi lahko razumeli funkcijo tako ene kot druge skupine v prebavnem traktu ter kakšen vpliv bi predstavniki bakteroidet in firmikutov lahko imeli pri razvoju debelosti, so opravili študije okužbe sterilnih gnotobiotičnih miši z izbranimi sevi. Mahowald in sod. (2009) so gnotobiotične sterilne miši kolonizirali z dvema sevoma,

s predstavnikom firmikutov iz vrste *Eubacterium rectale* in s predstavnikom bakteroidet iz vrste *Bacteroides thetaiotaomicron*. Slednji sodi med dobro proučevane bakteroidete (Bäckhed in sod., 2004, 2005). Zanj je značilno ogromno število zapisov za različne glikozidne hidrolaze (226) in polisaharidne liaze (15) (Bjursel in sod., 2006). Vsi ti proteini tvorijo t.i. glikobiom, celoten set genov oz. njihovih encimov, ki so udeleženi pri izkoriščanju ogljikovih hidratov. S transmembranskimi proteini zaznavajo različne polisaharide in jih prenašajo v periplazmo, različne hidrolaze pa omogočajo njihovo razgradnjo do monosaharidov. Za *E. rectale* je značilno manjše število encimov, ki razgrajujejo polisaharide v primerjavi z obsežnim glikobiomom *B. thetaiotaomicron*. *E. rectale* je poznan tudi kot producent maslene kisline iz očetne kisline in njegova prisotnost povečuje ekspresijo transporterjev maslene kisline pri miših. Pokazali so, da se predstavniki *B. thetaiotaomicron* hranijo na stenah prebavnega trakta in imajo zvišano raven izražanja predvsem za encime, ki cepijo mukozne snovi in ki so nedostopne *E. rectale*, do očetne kisline. Prisotnost predstavnikov obeh združb omogoča boljši izplen prisotnih substratov.

Čeprav v prebavnem traktu dominirajo predstavniki bakterij, imajo tudi arheje pomembno vlogo pri povečanju izplena energije iz fermentacije hrane. Večinoma so v prebavilih vsejedi sesalcev prisotne hidrogenotrofne metanogene arheje, ki z odstranjevanjem vodika omogočajo ostalim mikroorganizmom proizvajati več očetne in maslene kisline, ki se nato absorbirata skozi epitelne celice črevesa. Metanogene arheje z odstranjevanjem vodika preprečujejo njegovo kopičenje kot tudi kopičenje končnih produktov fermentacije, kot je mravljična kislina. Šele nastali metan predstavlja končni odliv tako energije kot elektronov. Najpogosteje zastopana arheja pri človeku je vrsta *Methanobrevibacter smithii*, ki lahko predstavlja po nekaterih študijah celo več kot 10 % celotne mikrobne populacije v prebavilu (Samuel in sod., 2007).

Za boljše razumevanje doprinosa arhej k celokupnemu izplenu iz fermentacije v prebavnem traktu sta Samuel in Gordon (2006) sterilne gnotobiotske miši okužila s sevoma iz vrst *Methanobrevibacter smithii*, *Bacteroides thetaiotaomicron* ter mešanico obeh. Največji izkoristek iz hrane ter povišano lipogenezo sta odkrila ob prisotnosti obeh in zaznala do 1000-kratno povečanje števila predstavnikov obeh vrst, če sta rasli skupaj. Ugotovila sta, da *Methanobrevibacter smithii* vpliva na ekspresijo genov v *B. thetaiotaomicron*, in sicer tako, da ta svoj metabolizem preusmeri v razgradnjo fruktoznih polisaharidov, ki jih cepijo do mravljične kisline, vira energije za metanogenega partnerja. Mikrobi v prebavnem traktu torej ne vplivajo le na gostitelja, temveč tudi eden na drugega, v kolikor so med njimi skupni intermediati. Pri koloniza-

ciji prebavnega trakta miši s sevoma iz vrst *Desulfovibrio piger* in *B. thetaiotaomicron* do povečanja lipogeneze v miši ali do povečanja števila obeh skupin mikroorganizmov ni prišlo (Samuel in Gordon, 2006).

5 PREBAVNA MIKROBIOTA KOT METABOLNI ORGAN GOSTITELJA

Prebavna mikrobiota je torej prepoznana kot pomemben dejavnik pri razgradnji hrane, povečevanju dostopnosti hranil, vira energije ter pri sintezi vitaminov. Funkcije prebavne mikrobiote so bile razjasnjene s poskusi na gnotobiotskih laboratorijskih živalih, predvsem miših (Berg, 1996). Prebavna mikrobiota se je izkazala za nujno potrebno pri vzdrževanju normalne funkcije črevesa, kot je razgradnja in sprejem hranil, ter pri razvoju imunosti. Med njene dodatne funkcije danes štejemo še regulacijo metabolizma in biološke dostopnosti zdravil, kot so ksenobiotiki, razgradnjo dietetičnih toksinov, obnovo epitelnih celic, postavitev in aktivacijo imunskega sistema, vpliv na velikost srca ter celo na gibalne spretnosti (Turnbaugh in sod., 2007).

Zaradi naštetih vplivov prebavne mikrobiote na samega gostitelja prebavno mikrobioto pogosto omenjamo kot metabolni organ, ki opravlja funkcije, ki jih sesalci med evolucijo nismo razvili, celotni set mikrobnih genov v prebavilu pa kot prebavni mikrobiom. V sklopu celotnega prebavnega mikrobioma naj bi obstajal, kot že omenjeno, poseben nabor genov, tako imenovano jedro mikrobioma, ki so nujno potrebni za zdravje gostitelja (Turnbaugh in sod., 2009). Rezultate za potrditev te hipoteze so raziskovalci pridobili predvsem z metodami masovnega sekvenciranja, s pomočjo katerih je mogoče zbrati veliko število sekvenc, jih nato obdelati z orodji primerjalne metagenomike ter na podlagi rezultatov primerjav sklepati, katere metabolne poti so v določenem primeru bolj izražene (Tringe in sod., 2005). Gill in sod. (2006) so pregledali veliko število mikrobnih genov v fecesu dveh osebkov in primerjali zapise bakterijskih genov za encime z geni gostitelja. Na podlagi rezultatov primerjav so nato sklepali, katere metabolne funkcije mikroorganizmi opravljajo v prid gostitelju. Zasedili so predvsem povišano število genov za metabolizem glikanov, aminokislin in ksenobiotikov.

6 VLOGA PREBAVNE MIKROBIOTE PRI RAZVOJU DEBELOSTI

6.1 VLOGA PREBAVNE MIKROBIOTE PRI URAVNAVANJU SKLADIŠČENJA MAŠČOB

Da imajo mikroorganizmi pomembno vlogo pri razvoju debelosti, so med prvimi pokazali Bäckhed in sod. (2004, 2005). V nizu poskusov so ugotovili, da prebavni mikrobi na več načinov povečujejo energetske izkoristek iz hrane. V začetnih poskusih so primerjali telesno maso in delež maščob v telesu običajnih in sterilnih gnotobiotičkih miši, ki so zaužile enako količino hrane. Pri običajnih miših so izmerili do 40 % več maščob v telesu kot pri njihovih vrstnicah, ki so rasle brez mikrobov v prebavnem traktu. V naslednjem koraku so v sterilne gnotobiotičke miši prenesli prebavno mikrobioto običajnih miši. Po okužbi so gnotobiotičke miši pridobile do 60 % več telesne maščobe brez povečanja vnosa hrane ali zmanjšanja telesne aktivnosti. Poskus so nato ponovili z gensko spremenjenimi mišmi z okvaro v genu za leptin (linija *ob/ob*). S prebavno mikrobioto debelih *ob/ob* miši so okužili običajne sterilne miši ter ponovno zaznali značilno večje povečanje telesne mase v primerjavi z mišmi, ki so bile okužene s prebavno mikrobioto običajnih mišk. Postavili so hipotezo, da mikrobiota debelih mišim omogoča večji izkoristek energije iz sicer slabo razgradljivih polisaharidov (Bäckhed in sod., 2005).

Mehanizem v ozadju je kasneje osvetlila ista skupina raziskovalcev. Ugotovili so, da so sterilne miši zaščitene pred razvojem debelosti, do katere pride zaradi načina prehranjevanja, vsaj z dvema med sabo ločenima mehanizmoma.

- Prebavna mikrobiota lajša absorpcijo monosaharidov, glukoze in maščobnih kislin, in povečuje lipogenezo v jetrih preko odziva dveh signalnih proteinov, ChREBP in SREBP-1c. Povišane ravni inzulina zaradi aktivacije transkripcijskih faktorjev, kot sta ChREBP in SREBP-1c, zvišujejo nastanek 3-gliceridov v jetrih, le-ti se sproščajo v krvni obtok in se nato kopičijo v adipocitnih celicah maščobnih tkiv v procesu lipogeneze.
- Prebavna mikrobiota inhibira sintezo proteina Fiaf (fasting-induced adipocyte factor), ki je značilen za prebavila in v nizu reakcij povečuje oksidacijo shranjenih maščob.

Zadnje so sledili na gensko spremenjenih miškah z mutacijo v genu za Fiaf. Sam Fiaf deluje tako, da zavira aktivnost lipoproteinskih lipaz (LPL) in s tem povečuje sproščanje maščobnih kislin iz adipocit. Zaviranje izražanja faktorja Fiaf vodi v povišanje aktivnosti LPL ter posledično v shranjevanje maščobnih kislin v maščobna tkiva. Pokazali so tudi, da Fiaf poveča oksidacijo maščob-

nih kislin v mitohondriju s povečevanjem izražanje genov, ki kodirajo regulatorje oksidacije maščobnih kislin (PGC-1 α).

Na vpliv prebavne mikrobiote pri skladiščenju energije dodatno kažejo izmerjene aktivnosti encima AMPK, proteinske kinaze, ki sodeluje v uravnavanju energetske homeostaze v celicah. Do aktivacije AMPK pride ob celicnem stresu. V kaskadi reakcij se AMPK fosforilira in kot taka deluje na encime in na izražanje genov, ki so udeleženi v procesih, v katerih nastaja ATP, kot so glikoliza, oksidacija maščobnih kislin, vnos glukoze itd. Povišane koncentracije fosforiliranega encima so bile značilne za sterilne gnotobiotičke miši, medtem ko je prisotnost prebavne mikrobiote količino fosforilirane AMPK zmanjšala (Bäckhed in sod., 2007). Razlogi za povišane koncentracije fosforilirane kinaze v običajnih miškah niso jasni, rezultati omenjene študije pa so pokazali, da prebavna mikrobiota vpliva na porabo energije preko fermentacije in absorpcije, kot tudi preko vpliva na ekspresijo gostiteljevih genov in aktivnost gostiteljevih encimov.

Turnbaugh in sod. (2006) so predlagano hipotezo Bäckheda in sod. (2004, 2005) preverili s primerjalno metagenomiko. Pregledali so prisotnost genov v mikrobiomu debelih (*ob/ob*) in suhih (+/+) miši in iskali povezavo med gostiteljevim fenotipom (debelostjo/suhostjo) in izraženimi metabolnimi potmi prebavne mikrobiote. V fecesu debelih miši so odkrili povišane deleže genov bakterij iz debla *Firmicutes*, kar se sklada z rezultati raziskav strukture združbe prebavne mikrobiote v miših (Ley in sod., 2005) in drugih živalih. V prebavilih debelih miši so izmerili večje koncentracije končnih produktov fermentacije, kot sta maslena in očetna kislina, in manj kalorij v izločenem fecesu, primerjalna metagenomska analiza pa je dodatno pokazala povišane deleže genov, ki kodirajo encime za razgradnjo kompleksnih polisaharidov. Glede na delež genov so sklepali, da je mikrobiom debelih mišk bolj sposoben razgraditi kompleksnejše polisaharide do kratkoveržnih maščobnih kislin in tako pridobiti več energije.

Vsi ti rezultati kažejo, da prebavni mikrobiom s svojim setom genov predstavlja dejavnik, ki skupaj z genotipom ter načinom življenja gostitelja igra vlogo pri razvoju debelosti. Odprla so se nova vprašanja, na katera stroka vztrajno išče odgovor:-

6.2 VLOGA PREBAVNE MIKROBIOTE PRI RAZVOJU Z DEBELOSTJO POVEZANIH BOLEZNI

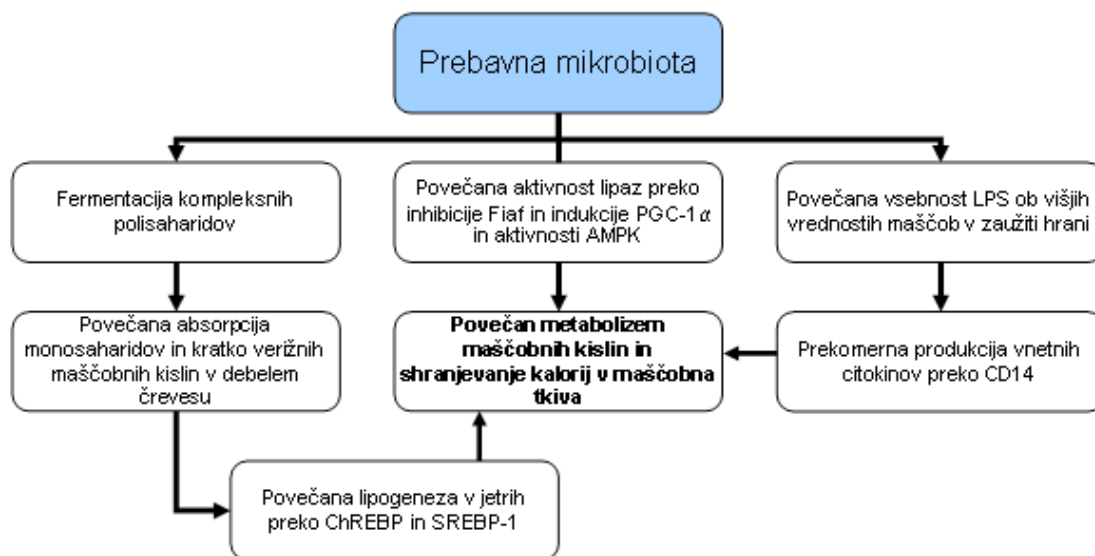
Za debelost so med drugim značilne povišane vrednosti vnetnih faktorjev v krvi, kar so pokazali na podganah, miših in tudi pri ljudeh (Cani in sod., 2009). Do

prekomerne produkcije vnetnih citokinov prihaja predvsem v adipocitah in to vodi v kronično sistemsko vnetje. Hkrati je pri debelih osebkih prisotna večja vsebnost lipidov v krvi, kar skupaj z vnetjem dodatno zmanjšuje imunost, iz česar se razvije inzulinska rezistenca (Wellen in sod., 2005).

Cani in sod. (2007a, 2008) je zanimal vpliv prebavne mikrobiote na debelost in razvoj inzulinske rezistence. V poskusih z mišmi, ki so jih hranili s krmo z visokim deležem maščob, so pokazali, da takšna krma povečuje t.i. endotoksimijo (količino LPS v krvi) in vpliva na sestavo mikrobne združbe. Odkrili so zmanjšanje števila celic iz nekaterih po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterijskih skupin, v celoti pa se je razmerje med po Gramu negativnimi in pozitivnimi povečalo v korist slednjih. Odgovor na povišane količine plazemskega endotoksina so bile povišane koncentracije glukoze, nato inzulina, kar je na koncu imelo za posledico kopičenje maščob in razvoj metabolnih bolezni. V nadaljevanju so pokazali, da krma z visokim deležem maščob zmanjša število predstavnikov iz rodu *Bifidobacterium*, ter iz skupin *Eubacterium rectale* – *Clostridium coccoides*, kar naj bi povzročilo tudi večjo prepustnost prebavnega epitela, posledica česar je več LPS v krvi. Ugotovili so tudi, da kronična endotoksimija povečuje pojavnost debelosti

(Slika 1), inzulinske rezistence in diabetesa. V mehanizmu v ozadju naj bi bili vpleteni vnetni citokini, saj povišane vrednosti LPS v krvi povečujejo njihovo ekspresijo preko receptorja za LPS CD14. Povišane ravni vnetnih faktorjev fosforilirajo inzulinske receptorje, jih s tem inaktivirajo, posledica pa je razvoj inzulinske rezistence. Ti rezultati kažejo, da lahko do sprememb v sestavi mikrobne združbe pride ob spremembi deleža maščob v krmi ter da te spremembe vplivajo na pojavnost metabolnih bolezni (Cani in sod., 2008).

Opisane raziskave strukture in funkcije prebavne mikrobiote podpirajo idejo, da bi lahko s spremembo mikrobne združbe v prebavilih vplivali na shranjevanje maščob v telesu in posledično na izboljšanje ITM in zdravljenja. Uspešno zdravljenje prekomerne debelosti ne more potekati brez sprememb v načinu prehranjevanja ter zadostne telesne aktivnosti, kljub temu pa bi lahko modifikacije prebavne mikrobiote proces zdravljenja lajšale. Kažejo se možnosti uporabe antibiotikov, prebiotikov in probiotikov pri ciljanem spreminjanju sestave prebavne mikrobiote. Uspešnost takšnih zdravljenj je bila zaenkrat pokazana pri podganah (Brugman in sod., 2006), miših (Cani in sod., 2007b) in tudi ljudeh. Pri podganah je uporaba antibiotikov zmanjšala pojavnost diabetesa, z antibiotični zdravljenji ljudi pa so z zmanjšanjem po Gramu



Slika 1: Shematski prikaz doslej odkritih mehanizmov, preko katerih prebavna mikrobiota vpliva na razvoj debelosti. AMPK, adenosin-monofosfat proteinska kinaza; ChREBP, transkripcijski regulator glukoznega in lipidnega metabolizma; Fiaf, adipocitni hormon; LPS, lipopolisaharid; PGC-1 α , transkripcijski kofaktor; SREBP-1, transkripcijski faktor.

Figure 1: Schematic view of so far identified mechanisms through which digestive microbiota affects the development of obesity. AMPK, adenosin-monophosphate protein kinase; ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding protein; Fiaf, fasting-induced adipocyte factor; LPS, lipopolisaccharide; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; SREBP-1, sterol response element-binding protein type 1.

negativnih bakterij v prebavilu uspeli znižati ravni LPS in nenormalnega zadrževanja lipidov v jetrnih celicah (Di-Baise, 2008).

Razumevanje interakcij prebavne mikrobiote in gostitelja pri razvoju debelosti se je šele začelo. Odnosa med prebavno mikrobioto in spremembo v telesni masi gostitelja še ne razumemo, saj še ni pojasnjena vloga različnih deležev firmikutov in bakteroidet pri debelih oziroma suhih živalih in ljudeh. Predvsem se kaže potreba po nedvoumni dokazih, da so spremembe prebavne mikrobiote pri debelih/suhih osebkih posledica oziroma vzrok za debelost/suhost. Nejasni so tudi mehanizmi, po katerih pride do sprememb v prebavni mikrobioti in celoten nabor dejavnikov, ki na to vplivajo. Prebavno mikrobioto ljudi je trenutno mogoče slediti v fecesu, pregled mikrobne združbe iz različnih delov prebavil poskusnih živali pa kaže, da se njena sestava razlikuje glede na lokacijo v črevesu (Camp in sod., 2009). Potrebne bodo dodatne študije strukture mikrobne združbe v celotnem prebavilu ljudi, preden bomo lahko z večjo zanesljivostjo povezali strukturo prebavne mikrobiote z debelostjo. Prav tako bo potrebno ovrednotiti dejanski vpliv prebavne mikrobiote pri pridobivanju energije iz hrane in se prepričati, da te spremembe občutno vplivajo na telesno maso in razvoj metabolnih bolezni.

7 POVZETEK

Prekomerno povečanje telesne mase in kopičenje maščobnih tkiv večinoma dojemamo kot posledico preobilnega hranjenja in nezadostne telesne aktivnosti, kar vodi v razvoj debelosti ter z njo povezanih bolezni, kot so bolezni srca in ožilja, diabetes in rakava obolenja. Zaradi povečane incidence debelosti, ki jo je svetovna znanstvena organizacija prepoznala kot epidemijo, v zadnjem desetletju intenzivneje preučujejo genetske in okoljske dejavnike, ki vplivajo na regulacijo energije. Med dejavnike, ki so vpleteni v razvoj debelosti, se je uvrstila tudi prebavna mikrobiota. Prebavni mikroorganizmi so udeleženi tako pri vnosu, kot tudi porabi in shranjevanju energije, kaže pa se tudi povezava med strukturo mikrobne združbe in gostiteljevim fenotipom. V prebavnem traktu sesalcev večina bakterij pripada debloma *Firmicutes* in *Bacteroidetes*. Pri debelih osebkih se kaže značilno povečano število firmikutov v primerjavi s suhimi, povečanje njihovega relativnega števila pa je značilno tudi ob uživanju visoko kalorične hrane. Vloga različnih deležev firmikutov in bakteroidet pri debelih oziroma suhih živalih in ljudeh še ni pojasnjena, kaže pa se, da ima prebavna mikrobiota vlogo pri pridobivanju energije iz hrane. Primerjave gnobiotskih sterilnih in običajnih miši so pokazale, da prebavna mikrobiota povečuje izplen energije iz

hrane, prebavna mikrobiota debelih živali pa je pri tem še uspešnejša. Študije primerjalne metagenomike so v nadaljevanju pri debelih osebkih odkrile povišane deleže genov, ki kodirajo encime za razgradnjo kompleksnih polisaharidov, in predlagale, da je mikrobiom debelih gostiteljev sposoben pridobiti več energije iz enake količine hrane. Sprememba v združbi prebavne mikrobiote, do katere pride ob spremembi deleža maščob v hrani, naj bi vplivala tudi na pojavnost metabolnih bolezni, in sicer preko vnetnega odziva na povečan vnos bakterijskega LPS. Dosedanje ugotovitve obetajo povsem nov pogled na funkcijo prebavil in razširitev definicije zdravja na interakcije med gostiteljem in njegovo prebavno mikrobioto. Kljub temu pa so potrebne dodatne študije, ki bodo dokončno pojasnile mehanizme teh interakcij, vzroke, zaradi katerih pride do sprememb v prebavni mikrobioti, ter povezave teh sprememb z debelostjo.

8 CONCLUSION

Excessive weight gain and accumulation of body fat is largely perceived as a result of excessive consumption and insufficient physical activity, leading to the development of obesity and with obesity related disorders such as cardiovascular disease, diabetes and cancer. Increasing incidence of obesity was recognized as an obesity epidemic. Therefore, over the last decade environmental and genetic factors that affect energy regulation have been intensively studied. Among factors involved in the development of obesity, the gut microbiota has been also recognized as important. Gastrointestinal microorganisms are involved both in harvest as well as consumption of energy, and a link between microbial community structure and host genotype has also been shown. Most of the bacteria in the gut of mammals belong to two phyla, the *Bacteroidetes* and the *Firmicutes*. In obese animals and humans, a significant increase in the number of the *Firmicutes* was discovered and their relative increase was also characteristic for caloric food intake. The mechanism responsible for changes in numbers of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* has not yet been elucidated, but it has been suggested that gut microbiota plays a role in obtaining energy from food. Studies on germ-free animal models have shown that the gut microbiota increases recovery of energy from food and that the gut microbiota from obese animals can harvest energy even more efficient. Comparative metagenomic studies revealed an increased proportion of genes coding for enzymes that are involved in degradation of complex polysaccharides and it has been suggested that obese microbiome is able to obtain more energy from the same amount of food. Changes in the gut microbial community that occur with

the change of the proportion of fats in the diet are supposed to also affect the incidence of metabolic disorders via an increased inflammatory response to bacterial LPS. Up to date, these findings promise a completely new perspective on the function of the gastrointestinal tract and expand our definition of health on interactions between the host and the gut microbial symbionts. However, further studies are needed to unequivocally clarify the mechanisms of these interactions, to identify reasons for changes in the structure of gut microbiota and to link these changes to obesity.

9 VIRI

- Avbelj M., Saje-Hribar N., Seher-Zupančič M., Brcar P., Kotnik P., Iršič A., Bratanič N., Kržišnik C., Battelino T. 2005. Prevalenca čezmerne prehranjenosti in debelosti med pet let starimi otroki in 15 oziroma 16 let starimi mladostnicami in mladostniki v Sloveniji. *Zdravniški Vestnik*, 74: 753–9
- Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 15718–15723
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307: 1915–1920
- Bäckhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 979–984
- Bates S.H., Myers M.G. 2003. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14: 447–452
- Berg R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4: 430–435
- Bjursell M.K., Martens E.C., Gordon J.I. 2006. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 36269–36279
- Brugman S., Klatter F.A., Visser J.T., Wildeboer-Veloo A.C., Harmsen H.J., Rozing J., Bos N.A. 2006. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*, 49: 2105–2108
- Calle E.E., Thun M.J. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene*, 23: 6365–6378
- Camp J.G., Kanther M., Semova I., Rawls J.F. 2009. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology*, 136: 1989–2002
- Cani P.D., Neyrinck A.M., Maton N., Delzenne N.M. 2005. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1. *Obesity Research*, 13: 1000–1007
- Cani P.D., Delzenne N.M. 2007a. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10: 729–734
- Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F. 2007b. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50: 2374–2383
- Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Neyrinck A.M., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57: 1470–1481
- Cani P.D., Delzenne N.M. 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Design*, 15: 1546–1558
- Collado M.C., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S. 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88: 894–899
- Couturier C., Sarkis C., Seron K., Belouzard S., Chen P., Lennain A., Corset L., Dam J., Vauthier V., Dubartt A., Mallet J., Froguel P., Rouille Y., Jockers R. 2007. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 19476–19481
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6: 2383–2400
- Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, 449: 811–818
- DiBaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik-Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E. 2008. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings*, 83: 460–469
- Dore J. 2009. A microbiomics view of the human intestinal microbiota. V: FEMS 3rd Congress of European Microbiologists. Danone Satellite Symposium: Microbes for Health.
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635–1638
- Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312: 1355–1359
- Guo X., Xia X., Tang R., Zhou J., Zhao H., Wang K. 2008. Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 367–373
- Kalliomaki M., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 534–538
- Leamon J.H., Lee W.L., Tartaro K.R., Lanza J.R., Sarkis G.J., deWinter A.D., Berka J., Lohman K.L. 2003. A massively parallel PicoTiterPlate (TM) based platform for discrete

- picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis*, 24: 3769–3777
- Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 11070–11075
- Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. 2006a. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444: 1022–1023
- Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. 2006b. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124: 837–848
- Mahowald M.A., Rey F.E., Seedorf H., Turnbaugh P.J., Fulton R.S., Wollam A., Shah N., Wang C., Magrini V., Wilson R.K., Cantarel B.L., Coutinho P.M., Henrissat B., Crock L.W., Russell A., Verberkmoes N.C., Hettich R.L., Gordon J.I. 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 5859–5864
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z.T., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.L., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P.G., Begley R.F., Rothberg J.M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437: 376–380
- Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V.D., Sokol H., Dore J., Corthier G., Furet J.P. 2009. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9: 123–128
- Ministrstvo za zdravje RS. 2007. Strategija Vlade Republike Slovenije na področju telesne (gibalne) dejavnosti za krepitev zdravja od 2007 do 2012. Ljubljana: 56 str.
- Mozes S., Bujnakova D., Sefcikova Z., Kmet V. 2008. Intestinal microflora and obesity in rats. *Folia Microbiologica*, 53: 225–228
- Mueller S., Saunier K., Hanisch C., Norin E., Alm L., Midtvedt T., Cresci A., Silvi S., Orpianesi C., Verdenelli M.C., Clavel T., Koebnick C., Zunft H.J., Dore J., Blaut M. 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1027–1033
- Nadal I., Santacruz A., Marcos A., Warnberg J., Garagorri M., Moreno L.A., Martin-Matillas M., Campoy C., Marti A., Molerés A., Delgado M., Veiga O.L., Garcia-Fuentes M., Redondo C.G., Sanz Y. 2009. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *International Journal of Obesity*, 33: 758–767
- O'Rahilly S. 2002. Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes. *European Journal of Endocrinology*, 147: 435–441
- Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5: 1556–1573
- Rankinen T., Perusse L., Weisnagel S.J., Snyder E.E., Chagnon Y.C., Bouchard C. 2001. The human obesity gene map: the 2001 update. *Obesity Research*, 10: 196–243
- Rawls J.F., Mahowald M.A., Ley R.E., Gordon J.I. 2006. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 127: 423–433
- Samuel B.S., Gordon J.I. 2006. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 10011–10016
- Samuel B.S., Hansen E.E., Manchester J.K., Coutinho P.M., Henrissat B., Fulton R., Latreille P., Kim K., Wilson R.K., Gordon J.I. 2007. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104: 10643–10648
- Tringe S.G., von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E.M. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308: 554–557
- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444: 1027–1031
- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature*, 449: 804–810
- Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenkov T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457: 480–484
- Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., Akkermans-van Vliet W.M., de Visser J.A.G.M., de Vos W.M. 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13: 129–134
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115: 1111–1119
- Yang W.J., Kelly T., He J. 2007. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiologic Reviews*, 29: 49–61