

Lidský mikrobiom

Bc. Romana Hájková

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Romana HÁJKOVÁ**
Osobní číslo: **T090079**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**

Téma práce: **Lidský mikrobiom**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizace Projektu lidského mikrobiomu.
2. Popis metod využívaných při studiu mikrobiálních společenstev.
3. Vyhledání dosud dosažených výsledků se zaměřením na střevní a kožní mikrobiom.
4. Shrnutí celkového významu Projektu lidského mikrobiomu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. ČEJKOVÁ, D. a ŠMAJS, D. Projekt lidského mikrobiomu. *Universitas – revue Masarykovy univerzity, Brno, Masarykova univerzita. ISSN 1211-3387, 2010, vol. 43, no. 2, s. 23-28.*
2. PETERSON, J. et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research (online), 19(12), 2317-2323 [cit. 2012-01-31]. DOI: 10.1101/gr.096651.109. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.096651.109>*
3. FIERER, N. et al. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences (online), 105(46), 17994-17999 [cit. 2012-01-31]. DOI: 10.1073/pnas.0807920105. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807920105>*
4. GILL, S. R. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science (online), 312(5778), 1355-1359 [cit. 2012-01-31]. DOI: 10.1126/science.1124234. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1124234>*

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

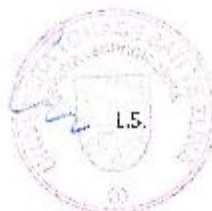
6. ledna 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fšera, CSc.
pedagogický zástupce

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 21.5.2012

.....


¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem Projektu lidského mikrobiomu je určit, zda má změna ve složení mikrobiomu souvislost se zdravotním stavem lidí. Pro dosažení tohoto cíle je nutné využít nejmodernější technologie, výpočetní techniku a zejména metody sekvenace DNA. Tato práce se zabývá celkovou charakteristikou HMP, jeho hlavními prioritami a sekvenačními metodami. Metagenomické přístupy jsou využívány k identifikaci funkčních vlastností mikrobiomu. Díky těmto metodám a přístupům se objevují stále nové geny a proteiny pro jednotlivé mikrobiální kmeny. Již jsou publikovány souvislosti mezi změnami střevního a kožního mikrobiomu v rámci prostorového a časového měřítka. Budoucí kroky projektu by mohly směřovat k lepšímu porozumění otázek týkajících se vztahu mezi mikrobiálním společenstvím a jeho hostitelem.

Klíčová slova

16S rDNA, mikrobiom, HMP, metagenomika, sekvenování

ABSTRACT

Goal of the Human Microbiome Project is to determine, whether the change of microbiome structure is related to human health state. To achieve this goal it is necessary to use the latest technologies, computing techniques and especially the latest DNA sequence methods. This thesis deals with overall HMP characteristic, its main priorities and sequence methods. Metagenomic approaches are used for the identification of microbiome functional attributes. Thanks to these methods and approaches new genes and proteins of particular microbial strains are revealing. The relations between changes of gut and skin microbiome within space and time measures are already published. Future project's steps might lead to the better understanding of issues regarding the relationship between microbial community and its host.

Keywords

16S rDNA, microbiome, HMP, metagenomics, sequencing

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a ochotu při vedení mé práce, díky kterým jsem mohla přivést tuto práci do zdárného konce.

Souhlasím, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronicky nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERIZACE PROJEKTU LIDSKÉHO MIKROBIOMU	12
1.1 VÝZNAM HMP.....	12
1.2 CÍLE HMP.....	13
1.2.1 Etické, právní a sociální důsledky	14
1.3 FÁZE PROJEKTU	14
1.4 REALIZACE HMP	15
1.5 DEMONSTRAČNÍ PROJEKTY	16
1.5.1 Příklady demonstračních projektů.....	17
1.5.2 Mezinárodní konsorcium.....	18
2 METODY STUDIA MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV	20
2.1 METAGENOMICKÉ PŘÍSTUPY	20
2.1.1 Metagenomické analýzy	21
2.1.2 Metagenomické knihovny.....	22
2.1.3 Sekvenační technologie	23
2.1.4 DNA čip	24
2.2 SEKVENAČNÍ METODY	24
2.2.1 Next generation a 454 sekvencování.....	25
2.2.2 WGW – Whole Genome Shotgun sekvenační metoda.....	25
3 AKTUÁLNÍ DOSAŽENÉ VÝSLEDKY	27
3.1 PŘIROZENÁ STŘEVNÍ MIKROFLÓRA	27
3.2 DĚTSKÁ STŘEVNÍ MIKROFLÓRA.....	28
3.2.1 Faktory dětské střevní mikroflóry.....	29
3.3 STŘEVNÍ MIKROBIOM VE VZTAHU K RAKOVINĚ.....	29
3.4 IMUNITA STŘEV	30
3.5 STŘEVNÍ MIKROBIOM VE VZTAHU K LIDSKÉ OBEZITĚ	31
3.5.1 Stravovací návyky.....	32
3.6 PŘIROZENÁ MIKROFLÓRA KŮŽE	33
3.7 FAKTORY MIKROBIÁLNÍ ROZMANITOSTI RUKOU	33
3.7.1 Plísňová společenstva.....	35
3.8 TOPOGRAFICKÁ A ČASOVÁ ROZDÍLNOST KOŽNÍHO MIKROBIOMU	35
4 BUDOUCÍ SMĚRY HMP	37
4.1 DALŠÍ CÍLE HMP.....	37
4.2 SHRnutí PŘÍNOSŮ HMP	38
4.2.1 Rozvíjení referenční sady.....	39

4.2.2 Databáze integrovaných mikrobiálních genomů a společný fond programů	40
ZÁVĚR	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	47
SEZNAM OBRÁZKŮ	48
SEZNAM TABULEK	49

ÚVOD

Projekt lidského mikrobiomu (HMP) se zabývá neprobádanými souvislostmi mezi nespočteným množstvím druhů mikroorganismů a člověkem. Již nějakou dobu je známo, že lidské tělo je obýváno nejméně desetkrát větším počtem bakterií, než je celkový počet lidských buněk, a že většina těchto bakterií se nachází v lidském střevním traktu. Zatímco lze očekávat, že mikroorganismy mají hlavní význam v udržení zdraví nebo příčinách nemoci, nejsou zcela pochopeny konkrétní role, které zde hrají, jak ovlivňují vývoj, fyziologii, imunitu a výživu člověka. Po uveřejnění Projektu lidského genomu v roce 2004 byla započata práce na dalším projektu, který by znamenal celkový přehled všech mikrobiálních druhů osidlujících lidské tělo. Tento soubor je označován jako lidský mikrobiom. Kromě bakteriálních buněk se také do něj řadí viry a jiné eukaryotické buňky (červy, plísňe apod.).

První část práce se zaměří na charakteristiku projektu; jeho předmět zkoumání; cíle, o které usiluje; hlavní iniciátory projektu a průběžnou realizaci. Představa HMP je taková, že charakteristika mikrobiomu je nejlépe provedena analýzou konzervativních genů 16S rDNA různých organismů. Druhá kapitola se zabývá významem nových technologických nástrojů, metagenomických přístupů a jiných sekvenčních metod, které jsou označovány jako sekvenční metody nové generace tzv. next generation methods. V další části se práce soustředí na vztah střevního a kožního mikrobiomu k nejrůznějším nemocem, např. obesitě, nádorovým a kožním onemocněním aj. Dále se hledá časová a prostorová spojitost v zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů v mikrobiomu. Pozornost je věnována také konkrétním lidským faktorům, které by mohly být příčinou změn jeho složení. V závěrečné části této práce jsou shrnuty dosavadní zjištěné výsledky a přínosy projektu. Nastíněny jsou také další směry, ke kterým se chtějí další studie ubírat.

V celé historii mikrobiologie se většina studií člověka zaměřuje na mikroorganismy, které jsou příčinami různých nemocí. Ačkoliv je projekt teprve na samém začátku, lze předpokládat, že má možnost zbořit nepodložené bariéry mezi lékařskou mikrobiologií a mikrobiologií vztahující se k vnějšímu prostředí. V současné době se předpokládá, že se Projekt lidského mikrobiomu stane prioritou určitého "seznamu" lidských nemocí ve více zdravotnických centrech a mnoha jiných sponzorujících agenturách.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERIZACE PROJEKTU LIDSKÉHO MIKROBIOMU

1.1 Význam HMP

Dokončení sekvenace lidského genomu v rámci Projektu lidského genomu (Human Genome Project, HGP) v roce 2004 vyvolalo mnoho sekvenačních projektů, které se zabývají zkoumáním konkrétních funkcí částí lidského genomu, příbuzenskými vztahy člověka k jeho nejbližším rodinným příslušníkům, podstatou genetiky nádorových onemocnění (tzn. individuální vnímavost a individuální průběh lidských chorob) a genetickou proměnlivostí současného lidstva. Projekt lidského mikrobiomu (Human Microbiome Project, HMP) je logickým navázáním na HGP, jehož snahou je celkové shrnutí mikrobiálních genů a genomů, a to v nejdůležitějších místech mikrobiálního osídlení člověka. Projekt je chápán jako společné úsilí klinických oborů, které se skládá z několika projektů po celém světě, včetně USA, Evropy a Asie [1].

V minulosti se mikrobiologové přednostně zaměřili na zkoumání jednotlivých mikroorganismů, které bylo možné snadno kultivovat za laboratorních podmínek nebo těch, které způsobovaly infekční onemocnění. S příchodem nových molekulárně-biologických technologií (zejména nových sekvenačních metod) bylo možné obrátit pozornost ke studiu veškeré genetické informace mikrobiomu, tzv. metagenomu. Odhaduje se, že až 60 % všech mikroorganismů z lidského mikrobiomu nelze kultivovat v současných laboratorních podmínkách, a proto je vyšetření jejich genetické informace zatím jediným dostupným a efektivním přístupem k jejich studiu [1,2].

Projekt byl zahájen v roce 2007 a je bohatě sponzorován americkým Národním institutem zdraví (National Institute of Health, NIH) ve čtyřech amerických sekvenačních centrech: Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX; The Genome Center at Washington University, Saint Louise, MO; The J. Craig Venter Institute, Rockville, MD; Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, MA. Koncept projektu poprvé navrhl v roce 2001 Joshua Lederberg, americký molekulární biolog, který poprvé použil pojem "lidský mikrobiom", aby pojmenoval ekologickou společnost komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů. Návrh k zahájení HMP je obsažen v konceptu, který je vyobrazen jako třístupňové úsilí. HMP je pětiletý projekt, který je financován 150 miliony dolary pro toto období. Podmínkou pro uskutečnění projektu je studium

mikrobiomu nejméně u čtyř částí lidského těla (trávicí trakt, dutina ústní, urogenitální trakt a kůže). Předpoklad tohoto projektu je takový, že závěrem budou vytvořené nejen potřebné zdroje (data, technologie, výpočetní nástroje, předběžná analýza etických, právních a sociálních důsledků výzkumu aj.), ale i zdokumentováno dost příkladů různých mikrobiomů důležitých pro lidské zdraví [1,2].

1.2 Cíle HMP

Hlavní prioritou projektu je stanovit, které mikroorganismy žijí v různých částech lidského těla (nebo na jeho povrchu) a prozkoumat, jak se odlišuje jejich zastoupení u zdravých a nemocných jedinců. Předpokládá se, že HMP bude hledat nejen nové způsoby k určení zdraví a náchylnosti k nemocem, ale také navrhopvat, zavádět a sledovat kroky pro zacházení s lidskou mikroflórou v rámci fyziologie jednotlivců. Pro pochopení, jaký je rozsah genetické a fyziologické rozmanitosti člověka, musí být charakterizován lidský mikrobiom a jeho faktory, které ovlivňují rozložení základních mikroorganismů. Výsledek může dále poskytnout pohled na současný lidský vývoj. Takový vývoj představuje rychle se rozvíjející nové technologie a výsledné přeměny životního stylu lidí a biosféry, které mohou mít vliv na zdraví a náchylnosti k nemocem. Důležitým východiskem tohoto biologického úsilí je pochopit zdravotní stav lidského organismu. K zodpovězení všech těchto otázek je žádoucí definovat, co lze považovat za normální stav (zdraví), a co už za stav abnormální (nemoc). Konečným cílem HMP je prokázat, zda existují možnosti, jak sledováním lidského mikrobiomu a jeho zacházením zlepšit lidský zdravotní stav [1,2].

Souhrnně lze říci, že cílem projektu je:

- zjistit, do jaké míry je lidská mikroflóra stálá nebo proměnlivá v průběhu času (např. za den/rok/celý život jednotlivce),
- zjistit, jak velká podobnost je u mikrobiomů mezi jednotlivými členy rodiny, popř. určitého lidského společenstva, a nakolik jsou tyto mikrobiomy odlišné od nepřibuzných mikrobiomů,
- určit, zda existuje základní mikrobiom, tzn. faktory ovlivňující mikrobiom u všech lidí nebo jen většiny,
- určit, co ovlivňuje genetickou rozdílnost mikrobiomu a jeho proměnlivost v různých fyziologických a patologických podmínkách,

- využít nové, vysoce výkonné technologie pro souhrnné určení lidského mikrobiomu z různých částí těla alespoň od 250 zdravých dobrovolníků,
- poskytnout standardní datové zdroje a provádět studie pouze ve vědecké komunitě [1,2].

1.2.1 Etické, právní a sociální důsledky

Pro hledání sekvenačních dat v globálním měřítku je nutná spolupráce odborníků z klinických, biologických, biochemických, etických, právních a mnoha dalších oborů. Zvláštní pozornost je věnována ochraně soukromí dárců. Ti jsou informováni o tom, že mikrobiomická data z jejich odebraných vzorků budou uložena ve volně přístupné databázi na internetu, zatímco veškerá data o jejich DNA budou uložena v přístupové databázi (dbGaP), která bude k dispozici pouze pro výzkumníky lidského mikrobiomu, a která bude schválena řídicím výborem NIH [2,3].

Jako příklad právních, sociálních a etických důsledků lze uvést:

- problémy při náboru účastníků a získávání informovaného souhlasu, tj. vrácení výsledků instituci, která se zabývá infekčními nemocemi,
- problémy týkající se ochrany soukromí, pokud mají lidé specifické mikrobiální "podpisy", které by je mohly individuálně od sebe odlišovat,,
- etické a právní podmínky marketingu v rámci produktů určených pro mikrobiální výzkum (např. probiotika) [2].

1.3 Fáze projektu

Uskutečnění projektu probíhá ve dvou fázích. První fáze projektu tzv. skoková fáze byla zahájena v roce 2007. V této rané fázi bylo velkým úsilím zaměřit se na zdravotní stavy lidí, které musely být nejdříve definovány. Účastníky skokové fáze byla čtyři sekvenační centra pod dohledem NIH. Financování skokové etapy podpořilo mnoho vědeckých činností např. sekvencování 500 nových referenčních bakteriálních genomů, rozvíjení protokolu o přijímání a odběru vzorků z pěti (u mužů čtyř) částí těla od 250 normálních dobrovolníků aj. Protokol nutný pro nábor normálních dárců byl odsouhlasen pro pět částí těla (u kterých byly následně

odebrány vzorky). Nesnadnou otázkou zůstalo, které vzorky zařadit do referenčních zdrojů [2,3].

Další fáze projektu naváže na výzkum ve skokové fázi. V této etapě bude hlavní prioritou vytvořit referenční databáze pro vývoj nových technologií a rozšířit vědecké úsilí pomocí souboru demonstračních projektů. Pomocí těchto souborů se vědci pokusí zjistit změny mikrobiomu ke konkrétnímu onemocnění. Čtyři centra, která se zúčastnila skokové fáze, budou nadále pokračovat v rozvíjení nových sekvenačních metod, jejichž výhodou je rychlost sekvenování oproti klasickým technologiím. Cílem sekvenování je přidat 900 nových referenčních bakteriálních genomů do sekvenačních databází (100 dodatečných nových bakteriálních genomů bude sekvenováno evropským MetaHit projektem, tudíž konečným cílem bude nejméně 1000 genomických sekvenací) [2,3].

1.4 Realizace HMP

Zpočátku projektu byla používána metoda sekvenace krátkých úseků 16S rDNA pro určení složení společenstev mikrobiomu. Tato DNA je natolik stabilní, aby se mohl uplatnit přístup amplifikace i sekvenace, a natolik proměnná, aby bylo možné rozlišit jednotlivé druhy nebo rody bakterií. Pro zařazení mikroorganismů ke známým druhům se porovnávala data 16S rDNA s daty, která byla již dostupná v databázích. Sekvenační metoda „shotgun“ (metoda náhodného sekvenování) byla pak použita u stejných vzorků pro hlubší analýzu. Pro výzkum nejruznějších onemocnění bylo vybráno a podpořeno 15 pilotních metagenomických projektů. Seznam chorob a příznaků, u kterých se uvažuje, že mají vztah k lidskému mikrobiomu, je uveden v Tab. 1. Navržený koncept projektu je vyobrazen ve třech úrovních [1,3]:

1. stupeň: počáteční sběr a analýza dat, sestavení rozsáhlých seznamů referenčních genomů; získání datových souborů referenčních mikrobiomů z přiměřeného množství vzorků; vytvořit globální síť sbírky vzorků, včetně zemí, jejichž sociální struktury, technologie a životní styl podstupují rychlým změnám

2. stupeň: výběr různých jednotlivců pro dodatečné hloubkové sekvenování; rozsah hloubky vzorkování a počet jednotlivců potřebných k charakterizaci celkového lidského mikrobiomu,

3. stupeň: rozmanitost projektu celosvětového lidského mikrobiomu, sekvenace mikrobiomu z rozsáhlých geografických, demografických a kulturně rozmanitých vzorků jednotlivců [3].

Tab. 1. Seznam chorob a příznaků ve spojitosti s lidským mikrobiomem [1].

orgánová soustava	choroba/příznak
kůže	lupénka
	akné
	atopická dermatitida
trávicí trakt	obezita
	Crohnova choroba
	jícnový adenokarcinom
	nekrotizující enterokolitida
	ulcerózní kolitida
	syndrom dráždivého tračníku
urogenitální trakt	bakteriální vaginóza
	sexuálně přenosné choroby
kombinace orgánových systémů	imunodeficiencie
	horečnaté stavy

1.5 Demonstrační projekty

Hlavní snahou demonstračních projektů je prokázat souvislost mezi změnami mikrobiomu a zdravím/nemocí člověka, nikoliv prokázat jejich vlastní příčinu. Pokud projekt úspěšně splní tento úkol v raném termínu, může se realizovat výzkum. HMP však uznává, že taková studia mohou trvat několik let práce, a mohou zajít až za primární cíle projektu. Patnáct zahájených výzkumných projektů bylo financováno v úvodní jednoleté fázi, během které měl každý výzkumný pracovník možnost prokázat proveditelnost svého projektu. Na konci úvodní fáze budou nejslibnějším projektům navýšeny finance a práce na těchto projektech bude pokračovat další tři roky. Tyto projekty budou studovat bakteriální, plísňové a virové změny a jejich dopad na lidské zdraví. Jednotlivci, kteří poskytli vzorky ke studiu v rámci demonstračních projektů, byli obdobně informováni o ochraně svého soukromí podobně jako ve skokové fázi projektu. Následně je uvedeno jen několik příkladů projektů [2].

1.5.1 Příklady demonstračních projektů

Kůže: Martin Blaser, PI. *"Hodnocení kožního mikrobiomu s lupénkou"*.

Lupénka (psoriasis) je chronické onemocnění imunitního systému, které postihuje více než 7,5 miliónů obyvatel USA ročně. Toto onemocnění se objevuje na kůži obvykle ve formě hustých, červených, šupinatých skvrn. Příčina nemoci je neznámá. Cílem studie je zjistit, jak mohou změny kožního mikrobiomu přispět k tomuto onemocnění [2].

Virom: Gregory Storch, PI. *"Lidský virom u dětí a jeho vztah k horečnatému onemocnění"*.

Odhadovaných 20 miliónů návštěv ročně v USA na oddělení lékařské pohotovosti způsobí horečky u dětí. Příčiny těchto horeček zůstávají u většiny pacientů nediodagnostikovány. Tento projekt popisuje lidský virom u dětí a zkoumá jeho význam v průběhu onemocnění. Projekt dále sleduje vztah mezi imunitním stavem pacientů a složením jejich viromů [2].

Trávicí trakt: Claire Fraser-Liggett, Alan Shuldiner, PI. *"Úloha střevního mikrobiomu u obezity u Amišů (angl. Amish, křesťanská náboženská organizace v Severní Americe)"*.

V konzervativních rodinách, zvláště u Amišů, plní děti mnoho důležitých rolí, a to včetně účasti na každodenních domácích pracích, stejně jako dalších pracovně souvisejících úkolů. Ve Spojených státech přispívá nutriční příjem k rozvoji cukrovky, hypertenze a tím k související obezitě. Některé studie ukázaly, že preference jídel (včetně nápojů) jsou částečně geneticky podmíněny. Amišové jsou většinou zemědělci nebo řemeslníci žijící na venkově, kteří vedou odlišný kulturní životní styl, a nepoužívají ani žádné novodobé technologie. Jsou snadno geneticky definovatelnou skupinou populace s dobře vedenými rodokmeny. Záznamy v rodinné anamnéze některých Amišů sahají až do roku 1727 a jsou velmi zachovalé. Další znaky této populace zahrnují relativně vysokou životní úroveň, nízké tendence k migraci a odmítání antikoncepce, která vede ke stále se zvyšující početnosti rodin. Tyto znaky přispívají ke studiím genetických nemocí. Tento projekt se přímo zaměřuje přímo na příčiny obezity na základě předpokladu, že střevní mikrobiom hraje klíčovou roli u lidské energetické homeostázy [2,4].

Vagina: Jacques Ravela a Larry Forney, PI. „*Mikrobiální ekologie bakteriální vaginózy: Vysoké rozlišení podélné metagenomické analýzy.*“

Bakteriální vaginóza je běžná vaginální infekce v případě mnoha žen. Ačkoliv zásadní příčiny této nemoci nejsou známy, je bakteriální vaginóza spojena s poklesem laktobacilů, které převládají po celý život v poševní sliznici žen s následným přemnožením anaerobních mikroorganismů (*Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* aj.) ve vaginální sliznici. Tento fakt má za následek zvýšení pH ve vaginální sliznici v důsledku snížení produkce kyseliny mléčné. Studie se zabývá každodenními změnami vaginálního mikrobiomu u více než 200 žen během dvou menstruačních cyklů [2,5].

Rakovina trávicího traktu: Zhiheng Pei, PI. „*Mikrobiom předního střeva v rozvoji jícnového adenokarcinomu.*“

Adenokarcinom jícnu (Esophageal adenocarcinoma, EA) je jednou z rakovin o vysoké úmrtnosti v USA a míra přežití po pěti letech s touto nemocí je u méně než 10 % populace. Výskyt EA se za posledních 20 let značně navýšil. Důvod nárůstu není zatím známý. Několik studií ukázalo, že nejméně 95 % případů EA vznikají z onemocnění známého jako Barrettův jícen, který je způsoben gastroezofageálním refluxem (zpětného toku žaludečních šťáv ze žaludku do jícnu). Počáteční výzkum ukázal, že pacienti nesoucí jednotlivé druhy mikrobiomu mají větší pravděpodobnost onemocnět v rané fázi EA [2,6].

1.5.2 Mezinárodní konsorcium

Hlavní zastupitelé NIH sloučili veškerá data mikrobiálních genomů pro Mezinárodní konsorcium lidského mikrobiomu (International Human Microbiome Consortium, IHMC). IHMC je vedena řídicím výborem sestaveným jedním zástupcem z každé země, která financuje výzkum, stejně jako jedním zástupcem z každého vědeckého projektu. Řídicí výbor má za úkol udržet normy týkající se kvalitního získávání dat ke kompletnímu sekvencování genomu. IHMC nabízí členství všem vědcům, kteří souhlasí s podmínky konsorcia, která především zahrnují:

- otevřené, volné a rychlé uvolňování dat v souladu s formou souhlasu dárce,
- společné normy pro kvalitu dat,

- sdílení protokolů a dokumentů informovaného souhlasu aj. [2,7].

2 METODY STUDIA MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV

2.1 Metagenomické přístupy

Metagenomikou se rozumí studium biologické rozmanitosti a genetického materiálu celých společenstev mikroorganismů přímo v jejich přirozeném prostředí bez potřeby kultivace v laboratoři (např. z půdy, střevní mikroflóry apod.). Srovnávací metagenomika odhalila funkční vlastnosti mikrobiomu. Užitečnost srovnávací metagenomiky je zdůrazněna nedávnou studií, která ukázala, že hostitelův fenotyp může být v souladu s mírou zastoupení mikrobiálních genů zapojených do několika metabolických drah. Metagenomické soubory dat z různých mikrobiálních ekosystémů mohou být také srovnávány. Sekvenační čtení DNA jsou porovnána u každého datového souboru s geny uložených v databázi s názvem "Kyoto encyklopedie genů a genomů" (KEGG). Stejně jako u půdy nebo oceánů nabízí metagenomické analýzy možnost prozkoumat, jak ekosystémy reagují na přírodní odchylky, v případě lidí, jak mikrobiální ekosystémy přispívají ke zdraví nebo nemoci. V poslední době byly používány metagenomické přístupy k odhalení mikrobiální genomické a genetické odlišnosti a k identifikaci některých výrazných funkčních vlastností střevního mikrobiomu člověka. Ačkoliv je HMP zaměřeno na člověka, modelové organismy a další experimentální metody jsou potřebné pro aspekty projektu, které nemohou být testovány na lidech. Hlubší sekvencování lidského střevního mikrobiomu bude potřeba k určení, zda tyto vlastnosti mají společné rysy mikrobiomu [3,8].

Určení mikrobiomu je prováděno náhodným a cíleným sekvencováním a vyhodnocováním intra-/interindividuálních rozdílů pomocí DNA čipů (DNA microarrays). Počáteční snahy o stanovení počtu mikrobiálních společenstev a jejich fylogenetických vztahů jsou podtrženy analýzou 16S rDNA různých organismů. Pokrok dosažený pomocí 16S rDNA odhalil významné rozdíly v mikrobiálních společenstvech mezi zdravými jedinci. Protože tento přístup nepopisuje celý soubor mikrobiálních genomů, využívá se také princip náhodného sekvencování veškerého genetického materiálu (Whole Genome Shotgun sequencing, WGS). Při náhodném sekvencování genomu jsou nejprve připraveny genomové fragmenty DNA s optimální velikostí a poté jsou náhodně klonovány za vzniku velkého počtu klonů. Pomocí univerzálních sekvenačních primerů jsou stanoveny sekvenace krátkých úseků na koncích klonovaných fragmentů [8,34].

2.1.1 Metagenomické analýzy

První ohlášené výsledky metagenomických studií pro lidský mikrobiom se týkaly dvou zdravých dospělých osob, které nebyly v příbuzenském vztahu. Celkem 65 059 a 74 462 vysoce kvalitních sekvenačních čtení bylo vygenerováno z náhodných DNA knihoven vytvořených pomocí fekálních vzorků od těchto osob. Tyto dva subjekty ve věku 28 a 37 let (označených jako subjekt 7 a 8), ženského a mužského pohlaví, nepožívaly žádná antibiotika, ani jiné léky, v průběhu jednoho roku před odběrem vzorků. Čtyřicet procent čtení nemohlo být sestaveno do uspořádaných DNA fragmentů (tzv. kontigů) v důsledku malé početnosti některých mikroorganismů ve vzorku. Pomocí uspořádání otevřených čtecích rámců (ORFs, open reading frames) bylo identifikováno oproti veřejným databázím 259 kontigů u subjektu 7 a 330 kontigů u subjektu 8, které s největší pravděpodobností odpovídaly zástupcům domény *Archaea* [8].

Dále bylo objeveno 5 992 kontigů u subjektu 7 a 7 138 kontigů u subjektu 8 přiřazených ke členům domény *Bacteria*. Zbývající kontigy buď netvořily pár s žádným známým ORF, anebo nebyly přiřazeny zcela jednoznačně. Pohled do rozmanitosti obou vzorků umožnilo srovnání pomocí náhodných shotgun sekvenačních čtení. Celkem 1965 čtení z obou datových souborů subjektů odpovídalo sekvenaci genomu *Bifidobacterium longum*, členu bakterií mléčného kvašení, přítomného v distálním střevním traktu u zdravých lidí. Předchozí práce ukázaly, že druhy domény *Archaea*, zejména *Methanobrevibacter smithii*, jsou hlavními mikroorganismy ve střevním distálním ekosystému. *M. smithii* byl představen v datovém souboru ve 3,5 násobném rozsahu, jak uvedlo 7 955 shotgun sekvenačních čtení. Na rozdíl od *B. longum* měla většina srovnání s *M. smithii* větší shodu sekvenací pro párování, což naznačuje menší rozdíl mezi kmeny rodu *Methanobrevibacter* přítomných ve vzorcích [8].

U obou vzorků stolice byla prozkoumána bakteriální odlišnost pomocí sekvenace 16S rDNA z náhodných shotgun sekvenačních soustav a klonovaných knihoven 16S rDNA amplifikovaných PCR. Z 237 sekvenací 16S rDNA bylo vybráno 132 bakteriálních sekvenací pro další analýzy. Pomocí přibližně 97% párové podobnosti bylo identifikováno 72 bakteriálních fylotypů. Určen byl pouze jediný fylotyp z domény *Archaea* (tj. *M. smithii*). Bakteriální fylotypy byly přiřazeny pouze ke dvěma kmenům, *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Analýza 2 062 sekvenací 16S rDNA odhalila podobné fylogenetické rozložení mezi taxony vyššího řádu, ale mnohem rozmanitější populace na úrovni druhů. Ačkoliv nebyly identifikovány žádné sekvenace

16S rDNA kmene *Bacteroidetes* v náhodné komplementaci nebo klonovaných řadách, amplifikace druhově-specifických 16S rDNA primerů získala sekvenace od *Bacteroides fragilis* a *Bacteroides uniformis*. Těžkým úkolem je spojovat geny organismů v širší taxonomické klasifikaci, jelikož se metagenomické soubory dat skládají převážně z neshromážděných dat. Existuje několik přístupů, ale nebyly zatím vyvinuty nástroje pro automatickou analýzu velkých datových souborů z převážně z krátkých sekvenačních čtení [3,8].

2.1.2 Metagenomické knihovny

Všechny genomové a metagenomové sekvenace (zahrnující sekvenaci 16S rDNA) a data získaná ze sekvenačních metod nové generace (next generation methods) se generují na základě dodržení podmínek o datech HMP s následným uložením (např. každý týden) do příslušných knihoven NIH. Všechna sekvenační data a metagenomická data, která byla u dárců potenciálně určená, jsou následně ukládána do kontrolované databáze dbGaP [8].

Metagenomické knihovny poskytují pohled do tohoto rozsáhlého rezervoáru rozmanitosti nukleových kyselin. Jednotlivé metagenomické knihovny jsou generovány z různých půdních a vodních prostředí a jsou připraveny buď jako knihovny založené na sekvenaci pro analýzu s následným uložením do veřejných databází, anebo jako knihovny DNA zachycené v hostitelském organismu (*E. coli*) a uloženy jako sbírky klonů. Sekvenační technologie pokročila v posledních deseti letech do takové míry, kdy velikost nových metagenomických a metatranskripčních datových souborů často zastiňují součet všech předchozích sbírek databází. Ačkoliv je kompletní sbírka genomů ze sekvenačních dat DNA od většiny vzorků životního prostředí často nedostatečná z důvodu obrovského množství genetické rozmanitosti mikrobiálních společenstev, srovnání metagenomických dat může odhalit funkční trendy, které pomáhají vysvětlit adaptaci mikrobů k jejich prostředí. S příchodem Sangerových sekvenačních programů bylo možné vzorkování a utváření sekvenačních sbírek ve skromně zařízených laboratořích [9].

Přířem současné stukturální genomiky je existence systémů umožňujících klonování dlouhých fragmentů DNA. Od zveřejnění prvních metagenomických knihoven vzorků z mořského prostředí byly nukleové kyseliny z různých půdních, vodních a hostitelských prostředí zachyceny knihovnách BAC (bacterial artificial chromosome). Použitím BAC klonů lze studovat sekvenace DNA v širším obsahu. Vytváření knihoven vyžaduje značné úsilí od vysoce kvalifikovaných vědců. Konce těchto klonovaných fragmentů jsou často sekvencovány. Důležitější je, že

knihovny jsou vystaveny funkčnímu šetření nebo výběru pro konkrétní geny a funkce. Téměř každá funkční metagenomická studie navazuje na podobný přístup: výzkumník sbírá vzorky, vytváří metagenomickou knihovnu, opravuje klony neodkladného významu pro další analýzu a uloží je do knihovny po jejich uveřejnění nebo v pozdějším období [9].

2.1.3 Sekvenační technologie

Ke studiu mikroorganismů v přirozeném prostředí vědci aplikují často metodu WGS pro nekultivované vzorky, aby byla vytvořena genomová sekvenační čtení, která odráží strukturu mikrobiálních společenstev. Studie ukázaly užitečnost těchto přístupů také pro výzkum smíšených mikrobiálních společenstev. Několik početních metod bylo vyvinuto k získání taxonomických informací z metagenomických sekvenačních dat. Tyto metody lze rozdělit do dvou tříd: na základě složení nebo řazení. V přístupech založených na složení se využívá metagenomických přístupů (např. klasifikátory založené na Markovových modelech). Žádný z těchto přístupů však není určený pro odhad relativní početnosti genomů mikrobiálních společenstev. Přístupy založené na řazení se běžně používají k nalezení čtecích podobností. Příkladem programu pro rychlé vyhledávání dlouhých sekvenací je metoda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [10].

MEGAN software analyzuje výsledky BLAST a zpětně hledá nejnižšího společného předka v chybných řazených čteních, aby vytvořil fylogenetické rozdělení čtení. Nicméně tento intuitivní způsob odhadu používá čtení rozložená podél listů fylogenetického stromu. Fylogenetický strom je grafické vyobrazení příbuzenských vztahů mezi různými taxonomickými jednotkami, o nichž se předpokládá, že mají společného předka. Odhad počtu taxonomických úrovní dle této metody může být ovlivněn několika faktory např. změnou velikosti genomu [10].

Technologie GAAS (Genome Abundance and Average Size) je nejnovější nástroj, který poskytuje přímý odhad genomové relativní početnosti. Jeho přesnosti a spolehlivosti stále brání převažující nejasnosti ohledně řazených čtení a příliš zjednodušené schéma odhadu. Změny v relativní početnosti každého zástupce mikrobiálního společenstva a jejich příslušné genomové velikosti určují konečnou hloubku sekvencování pro každý organismus v určité sekvenační úrovni. To znamená, že sekvenace genomů početných druhů jsou dobře zastoupeny v náhodných čteních, zatímco méně početné druhy mohou být reprezentovány omezeným počtem sekvenací. Technologie GAAS je užitečná i v situacích, kdy jsou početně zastoupeny

mikroorganismy s malými genomy, např. při propuknutí nemoci způsobené malými RNA viry. Mikrobiální průměrná délka genomu se týká složitosti životního prostředí a rozdělení genomové délky, která popisuje mikrobiální rozmanitost. Studie týkající se genomů virů a mikroorganismů ukázala, že jsou jejich průměrné velikosti ve stejném prostředí na sobě nezávislé, což vysvětluje různé způsoby, jakými viry a mikroorganismy reagují na stres a jiné podmínky [10,33].

2.1.4 DNA čip

Při sekvencování pomocí hybridizace se využívá nové technologie DNA – čipů (DNA microarrays), která umožňuje molekulárně-biologické analýzy výrazně paralelní povahy, především týkající se analýzy genové exprese. Jde o malou skleněnou destičku (popř. silikonovou) s mnoha vzorky (běžně desetitisíce, až miliony) jednovláken oligonukleotidů DNA. Základním principem čipu je párování bází a hybridizace s možností vizuální detekce. Čipové programy DNA byly vynalezeny poměrně nedávno. DNA čipy mají možnost zhodnotit expresi tisíců genů současně. Nedávné studie ukazují, že profilování genové exprese založené na DNA čipech mohou nabídnout potenciální a nezávislé získání prognostických informací u pacientek s nově diagnostikovanou rakovinou prsu. Rakovina prsu byla mezi prvními nemocemi používající ke studiu právě tyto technologie [11,34].

2.2 Sekvenační metody

Na rozdíl od lidského genomu se může lidský metagenom lišit v závislosti na umístění, věku a stravování. Metagenomika a související přístupy se dostaly do čela biologie hlavně díky dvěma hlavním vývojem. Rozvoj DNA sekvenačních technologií nové generace poskytl v mnoha centrech výrazně lepší možnosti pro sekvencování rozsáhlých souborů metagenomických dat. Technologie vytvořila nové příležitosti pro uskutečnění velkých sekvenačních projektů v širokém měřítku, což bylo ještě před několika lety těžko představitelné. Druhým klíčovým faktorem je rozvoj porozumění důležitosti celého mikrobiálního společenstva v biologii savců, lidském zdraví a nemoci [12].

Počáteční studie, založené na Sangerových sekvenačních programech, zahrnovaly cílené sekvencování 16S rDNA. Tato metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA a je označována jako enzymová metoda nebo dle autora Sangerovo sekvencování. Zavedení rychlejší metody pyrosequencování umožnilo uživatelský přístup pro klinické laborato-

ře pro rozsáhlejší odebírání vzorků mikrobiální rozmanitosti. Pyrosequencování poskytuje vysoce přesné sekvencování se syntézou DNA v reálném čase a nevyžaduje rozdělení produktů elektroforézou. Proměnlivé oblasti v rámci bakteriálních úseků 16S rDNA lze rozšířit pomocí PCR a následně podrobit pyrosequencování. Pyrosequencování DNA bylo vyvinuto v polovině roku 1990 jako zásadně odlišný přístup sekvencování DNA. Jedním z důležitých omezení pyrosequencování je neschopnost k sekvenačnímu natahování DNA, jen zřídka vyššího než 100-200 bází. Navzdory tomu, že pyrosequencování DNA poskytuje krátká čtení, což limituje množství sekvenačních dat, využívá se např. pro identifikaci patogenů v nemocnicích [12,34].

2.2.1 Next generation a 454 sekvencování

Tři komerční přístroje nové generace s vysokou propustností sekvencování zahrnují Roche/454 Life Sciences (GS20, FLX, LXR); Illumina/Solexa (Illumina G2) a Applied Biosystems (SOLiD). Společnost 454 Life Science vyvinula komerčně pyrosequencování pro metagenomiku, a proto je termín 454 používán pro pyrosequencování s vysokou propustností. Touto novou metodou sekvencování se označuje řada enzymatických reakcí, během kterých se zaznamenává začleňování DNA bází do syntetizovaného řetězce díky uvolněnému viditelnému záření. Míra emise světla je přímo úměrná množství zabudovaných nukleotidů. Současně probíhá obrovské množství sekvenačních procesů a výsledek je načítán počítačem. Tato metoda byla v HMP použita např. při studiu obezity nebo studiu bakteriální rozmanitosti rukou. Jednotlivé kroky pyrosequencování zahrnují:

1. přípravu knihovny jednořetězcové DNA
2. PCR amplifikaci v emulzi
3. pyrosequencování [12,13].

2.2.2 WGW – Whole Genome Shotgun sekvenační metoda

Shotgun sekvencování je metoda sekvencování náhodně fragmentovaných úseků DNA. Metoda se ukázala jako výborná strategie při posuzování celkové mikrobiální rozmanitosti ve smíšených populacích. Tyto genomové přístupy umožňují vědcům identifikovat a popsat různé mikrobiální geny, které kódují řadu biochemických a metabolických funkcí. Genom se rozštípe na krátké fragmenty, každý z nich se náhodně osequencuje (velké množství fragmen-

tů) a následně se fragmenty seřadí a zrekonstruuje se DNA pomocí počítačového softwaru. Toto seřazení však komplikují různé repetitivní úseky. Navíc je nutné celý genom v podstatě sekvencovat několikrát, aby jednotlivé sekvenace dostatečně přesahovaly a bylo možné z těchto přesahů sestavit genom [12,13].

3 AKTUÁLNÍ DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

3.1 Přírozená střevní mikroflóra

Množství bakterií je ovlivněno kyselostí žaludku, pohyblivostí střev (jeho snížení je spojeno s navýšením počtu bakterií). Největší a zároveň nejsložitější mikroflóra, tvořená střevními bakteriemi, obsahuje v průměru až 10^{12} buněk na 1g výkalu člověka. Střevní a jiné mikroflóry spolu s hostitelskými buňkami každého člověka tvoří složitý ekosystém, který jako celek uskutečňuje různé vzájemně se ovlivňující biologické procesy. Lidé spolu s jejich mikroorganismy se proto považují za tzv. "superorganismy" a komplexní genom za tzv. lidský "metagenom". Střevní mikroorganismy jsou taxonomicky složité jednotky a představují dynamická společenstva mikroflóry, u které se již dlouho dobu věří, že má významný dopad na fyziologii člověka. Mikroorganismy jsou pevně zapojeny do zrání a bujení lidských střevních buněk, pomáhají udržovat jejich stálé prostředí, ale také mohou být naopak příčinou různých onemocnění, např. zánětlivých střevních onemocnění střev nebo obezity. Dopad střevní mikroflóry na fyziologii hostitele závisí také do značné míry na jeho imunitním stavu [14,15].

V tenkém střevě se nachází velmi nízká koncentrace bakterií a jedná se často pouze o přechodnou flóru. V obsahu tenkého střeva byly objeveny ústní streptokoky, enterokoky, enterobakterie a laktobacily. Zvýšená koncentrace bakteriálního osídlení nad $10^5 - 10^7$ v 1 ml již obvykle signalizuje abnormální stav zažívacího systému. Naopak nižší obsah bakterií může být způsoben rychlou peristaltikou nebo produkcí žlučových kyselin. V tlustém střevě a ve stolici se počet bakterií pohybuje mezi $10^{10} - 10^{12}$ v 1 g obsahu stolice. V rámci výzkumu bylo odkryto více než 400 druhů bakterií, které je možno považovat za přírozenou flóru tlustého střeva. Z tohoto množství tvoří více než 95 % striktně anaerobní druhy *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* a *Clostridium*. Z ostatních druhů jsou při aerobní kultivaci pravidelně prokazovány enterobakterie, především *Escherichia coli*. Ostatní druhy gramnegativních tyčinek jsou početně málo zastoupeny a zejména se prokazují při léčbě antibiotiky, kdy je rovnováha porušena a dochází k tzv. dysmikrobii (abnormální rozložení bakteriální flóry ve střevech způsobené průjmy nebo léčbou antibiotiky; př. *Morganella*, *Providentia*, *Proteus*, *Pseudomonas*) [15].

3.2 Dětská střevní mikroflóra

Složení dětské mikroflóry bylo intenzivně studováno jak pomocí kultivovaných mikroorganismů, tak pomocí metody na kultivaci nezávislé (na základě 16S rDNA). U kojenců v dobrých hygienických podmínkách je střevní sliznice kolonizována převážně laktobacily. V rámci výzkumu HMP byla provedena analýza střevní mikroflóry novorozenců. Studované subjekty zahrnovaly 14 zdravých donošených dětí narozených 13 zdravým matkám (včetně jednoho páru dvojvaječných dvojčat). Vzorky stolice byly odebírány podle předepsaného plánu, a to počínaje první stolicí ihned po porodu, poté denně, později s klesající frekvencí. V případě důležitých událostí (např. zavedení pevné stravy, podání antibiotik aj.) byly odebrány dodatečné vzorky. Postupem času se shromáždily vzorky také od rodičů a sourozenců dětí, v případě matek se provedly vaginální stěry a odebrala se část mateřského mléka pro laboratorní šetření. U každého z těchto vzorků byla analyzována mikroflóra pomocí nově vyvinutého genového čipu DNA, který byl navržen, aby poskytl téměř komplexní rozsah známých druhů DNA [15,16].

Celkem bylo podrobena analýze 430 vzorků – 363 ze stolice kojenců, 43 ze stolice dospělých, 12 z mateřského mléka a 10 z poševních stěrů matek. Rozmanitost kmenové úrovně byla u vzorků stolice velmi omezená. Převážnou část vzorků tvořily tři bakteriální skupiny určené pomocí mikročipu: *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*; *Proteobacteria* a grampozitivní *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Druhým zjištěním byl pozoruhodný stupeň interindividuálních rozdílů v procesu kolonizace. Každé dítě se lišilo kombinací mikroorganismů i v načasování, kdy se tyto mikroorganismy objevovaly. Například, rod *Bacteroides* byl dominantní u některých dětí v prvních měsících života, zatímco u jiných zcela tento rod chyběl. Třetím zajímavým výsledkem byla relativní stabilita některých mikrobiálních populací v průběhu času, dokonce v brzkém průběhu kolonizace GI traktu dětí přetrvávala většina taxonomických skupin po dobu až několika měsíců. Nejčasnějšími mikroorganismy GI traktu byly aerobní bakterie (*Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterobacteria*) a pozdějšími anaerobní (*Eubacteria* a *Clostridia*). Několik jiných taxonů mělo tendenci se objevovat přechodně a pak zase mizet v průběhu prvního roku života (*Prevotella*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio*, *Veillonella* a *Clostridium perfringens*) [16].

3.2.1 Faktory dětské střevní mikroflóry

Způsob krmení novorozenců byl v řadě studií sporný. Zatímco některé studie uvedly, že rod *Bifidobacteria* téměř vždy dominoval v GI mikroflóře kojených dětí po několik prvních týdnů po narození, jiné studie zjistily, že se tento rod vyskytuje jen u malého zlomku dětí, nebo že není početně významný. U uměle živených rychle nastupuje flóra podobná flóře dospělých. Vliv porodu je často považován za klíčový faktor ve složení dětské mikroflóry. U GI mikroflóry dětí narozených císařským řezem bylo zaznamenáno, že se liší od dětí narozených přirozenou cestou, a to jak v načasování kolonizace, tak i v jejím složení. V některých případech byly spatřeny jasné stopy mateřské vaginální mikroflóry u GI mikroflóry novorozenců, přesto kvůli řada studií uvádí rozporné výsledky ohledně způsobu porodu. Kvůli zvýšenému počtu GI zdravotních problémů u předčasně narozených dětí byl důsledně studován význam těhotenství. Tyto studie opakovaně ukázaly, že mikroflóra předčasně narozených dětí se liší od těch donošených [16].

Čas pravděpodobně nejvíce záleží v nejranější fázi na utváření mikrobiomu u dětí. Jedna z publikovaných prací uvedla, že mikrobiální složení střevního traktu novorozenců se objevuje zcela náhodně prvních 12 až 18 měsíců života. V určitém bodě se utváření mikrobiomu ustálí a podobá se dospělému mikrobiomu. Hned po porodu mají mikrobiální společenstva tendenci zrát a ustálit se, ale do jaké míry tyto časné události ovlivňují zdraví člověka, není zcela pochopeno. Struktura střevní dětské mikroflóry je proměnlivější a méně stabilní s vlivem času. Toto složení značilo větší interindividuální rozdíly (ale méně složitější než u dospělých osob), které se blížily k dospělému profilu ke konci prvního roku života. Dvojčata prokázala značně vysokou podobnost v mikrobiálním složení svých profilů v průběhu času [16,17].

3.3 Střevní mikrobiom ve vztahu k rakovině

Obecná lékařská mikrobiologie se zaměřuje především na studium jednotlivých druhů jako na izolované, kultivované jednotky. Zvláštní pozornost byla věnována patogenním druhům. V rámci studia nádorové epidemiologie struktura mikrobiálního společenstva ukázala, že je stabilní po dobu nejméně jednoho roku. Rostoucí množství důkazů o lidském těle svědčí o důležité roli střevní mikroflóry související se vznikem rakoviny. Chronický zánět žaludku (způsobený nákazou *Helicobacter pylori*) a chronický střevní zánět (spojený s poškozením

imunitní odpovědi na komenzální bakterie v zánětlivém střevním onemocnění) jsou platnými rizikovými faktory pro vznik rakovin žaludku a tlustého střeva [18].

U některých infekčních onemocnění bylo potvrzeno, že patogenním prostředníkem může být spíše narušená mikroflóra než jediný organismus, což má za následek snížení bakteriální rozmanitosti nebo přemnožení agresivnějších bakterií sídlících v GI traktu (tj. vyvolání zánětlivých reakcí imunitním systémem). Druhy, které jsou známé jako patogenní nebo příležitostně patogenní, a které byly objeveny jako podstatná součást střevní mikroflóry zdravých jedinců, jsou *E. coli* a *B. fragilis*. Ve zvýšené míře jsou tyto druhy spojovány se zánětlivým onemocněním střev (inflammatory bowel diseases, IBD) [19].

V molekulárních epidemiologických studiích nádorových rizik bylo možné důkladně zkoumat lidský genom pomocí studií případů a kontrol (case-control study). Tato studie patří mezi pozorovací analytické studie, kdy je porovnávána skupina případů (tj. skupina osob se sledovaným onemocněním) se skupinou jedinců, která nevykazuje dané onemocnění tzv. kontroly. Bohužel tyto studie nelze použít pro určení vztahu mezi střevním bakteriálním genomem a rizikem vzniku rakoviny. Interindividuální rozdílnost střevního mikrobiomu je ovlivněna fyziologií, životním prostředím a životním stylem hostitele. V důsledku toho nejsou studie případů a kontrol vhodné, protože nemoc sama o sobě, příznaky nemoci a jejich léčba mají potenciál měnit střevní mikrobiální složení. K charakterizování vlivu střevního společenstva na riziko vzniku nádorů je nutné využít přístupů kohortní studie. V této studii jsou přesně vymezeny skupiny osob (tzv. kohorty) na základě faktoru, o kterém se předpokládá, že by mohl souviset se sledovaným onemocněním. Tyto subjekty studie jsou pak určitý čas sledovány s cílem zjistit, zda má pozdější vývoj onemocnění vztah k faktorům, které byly pozorovány [18,20].

3.4 Imunita střev

Primární úlohou zažívacího traktu je trávit a vstřebávat živiny pro splnění metabolických požadavků a požadavků pro normální lidský růst a vývoj. Kromě toho poskytuje střevní sliznice obranyschopnost proti stálé přítomnosti potravinových antigenů a mikroorganismů ve střevech. Role střevních mikrobiálních společenstev byla zkoumána u orální indukce tolerance na reakci imunoglobulinů E (IgE) u bezmikrobních myší. Bezmikrobní zvířata udržovala Th2 typ imunitní odpovědi (např. produkci IgE protilátek) na ústně podávaný ovoalbumin. K přerušení orální tolerance došlo z důsledku nedostatku střevní mikroflóry. Výsledky dále

ukázaly, že v novorozenecké fázi hraje střevní bakteriální flóra klíčovou roli v produkování Th2 populace [21].

Ochrana proti potenciálně škodlivým látkám je zajištěna i mnoha dalšími faktory, jako jsou žaludeční kyseliny, sliny, hleny střevní mikroflóry, peristaltika střev apod. Střevní mikrobiální společenstva jsou důležitou součástí obranné střevní bariéry, jak vyplývá ze zvýšeného průchodů antigenů skrz střevní sliznici v nepřítomnosti střevních mikrobů. Léčba antibiotiky mění složení mikrobiálních společenstev trávicího traktu a nepochybně i u mikroflóry nacházející se v jiné části těla. Tyto změny mohou ovlivnit expresi cytokinů, antimikrobiálních peptidů nebo jiných hostitelských obranných mechanismů, což může vést ke zvýšenému riziku infekcí a rozvoji chronických zánětů. Zatím nejsou vědci ve fázi určit, za jakých konkrétní okolností může používání antibiotik vyvolat onemocnění, a za jakých k němu nedojde. Podobně nepředvídatelné jsou snahy o obnovení zdravé mikroflóry [21,35].

3.5 Střevní mikrobiom ve vztahu k lidské obezitě

Během výzkumu obezity byla DNA mikrobiálního společenstva izolována z obsahu distálního střeva geneticky obézních zvířat a transplantována do jejich štíhlých sourozenců. Kolonizace střevního mikrobiálního společenstva u dospělých bezmikrobních myší, která byla shromážděná z běžně chovaných myší, vytvořila dramatický nárůst tělesného tuku do 14 dnů nehledě na množství přijaté potravy. Tato zjištění vedla k úvaze, že by mohla být mikroflóra obézních jednotlivců účinnější při získávání energie ze stravy než mikroflóra štíhlých jedinců. Změny v ukládání energie z přijaté stravy, které jsou zapříčiněné změnami ve střevním mikrobiomu, nemusí být velké, aby přispěly k obezitě [22].

Z výsledků studia obezity vyplynulo, že relativní početnost členů *Bacteroidetes* u obézních myší byla o 50 % nižší, zatímco *Firmicutes* byla vyšší o příslušný stupeň. Tyto rozdíly nebyly jednotné a nedaly se přisoudit k rozdílům vzhledem ke spotřebě potravy. Naopak u střevní mikroflóry obézních lidí se zjistilo, že se relativní početnost *Bacteroidetes* zvyšuje, jak obézní jednotlivci hubnou, buď při dietě založené na omezení tuků, nebo sacharidů. Navýšený počet *Bacteroidetes* významně souvisel s úbytkem váhy, ale nebyl ve vztahu k celkovému příjmu kalorií [22].

Pro mutaci genového leptinu se u střevní mikroflóry dospělých myší použila genová sekvenace 16S rDNA. Leptin je hormon tukové tkáně, který se podílí na udržování energetické ho-

meostázy, omezuje příjem potravy, zvyšuje energetický výdej, signalizuje množství tuku, nutričních zásob apod. Všeobecně vysoké koncentrace lze proto najít u pacientů s obezitou, naopak nízké koncentrace u pacientů trpících poruchou příjmu potravy (anorexie, bulimie). Leptin a jeho účinky byly objeveny díky studiím na tzv. „ob/ob“ myších (velice žravých a tlustých), kdy primární příčinou obezity byla zvýšená spotřeba potravy během nedostatku leptinu. Tento myší model byl použit k poskytnutí důkazu, že alespoň jeden typ obezity ve spojitosti se střevním mikrobiomem má zvýšenou kapacitu pro ukládání energie ze stravy. K určení, zda je mikrobiální společenstvo potenciálním faktorem přispívajícím k obezitě, byla použita metoda shotgun sekvencování slepého střeva. Slepé střevo bylo vybráno jako střevní lokalita pro odběr vzorků, protože je anatomicky odlišné struktury, nacházející se mezi distálním tenkým a tlustým střevem, které je kolonizováno dostatečným množstvím snadno odebrané mikroflóry pro metagenomickou analýzu [22,23].

3.5.1 Stravovací návyky

Obezita je hlavním problémem veřejného zdraví, která postihuje více než 400 miliónů lidí ročně a je spojena se závažnými poruchami včetně cukrovky a rakoviny. Epidemiologové vyvíjí úsilí o nalezení hostitelských a přírodních faktorů, které ovlivňují energetickou bilanci. Stravovací návyky jsou považovány za jedny z hlavních faktorů, které se podílejí na rozmanitosti střevní mikroflóry. Rody *Prevotella*, *Xylanibacter* a *Treponema* byly přítomné ve střevní mikroflóře dětí pocházejících z africké vesnice, ale ne z Evropy. Studie ukázala, že tyto tři rody mohou být důsledkem vysokého příjmu vlákniny z rostlinných polysacharidů. Vegetariánství ovlivňuje střevní mikroflóru, zvlášť důsledkem sníženého množství a mění se rozmanitostí druhů *Clostridium cluster IV*. Nedávná studie se zaměřila na muže trpící nadváhou, kteří dodržovali redukční dietu, dietu bohatou na rezistentní škrob nebo neškrobové polysacharidy po dobu 10 týdnů. Výsledky nezaznamenaly žádný významný vliv stravy na podílu kmenů *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* nebo *Proteobacteria* vefekálních vzorcích. Pouze dva fylotypy, *Eubacterium rectale* a *Ruminococcus bromii*, se ukázaly ve větší míře při dietě založené na rezistentních škrobech [22,36].

3.6 Přirozená mikroflóra kůže

Kůže je část těla se složitými změnami a projevy týkajícími se okolního prostředí, kde hustota bakterií může být až 10^7 buněk na 1 cm^2 plochy kůže. Mnohé z těchto bakterií nejsou jen pasivními nebo přechodnými kolonizátory povrchu kůže, ale jsou spíše přizpůsobeny nástrahám při obývání nejrůznější kožní oblasti. Těmito nástrahami může být časté odlupování kůže, antimikrobiální obrana hostitele, vystavení se mýdlům a saponátům během mytí (praní), vystavení se UV záření a dehydratace. Přirozené mikrobiální osídlení kůže je ovlivněno jejími vlastnostmi (vlhkostí, umístěním mazových a potních žláz) a kontaminací ze sousedních sliznic (nos, konečník apod.). Hlavním bakteriálním druhem je *Staphylococcus epidermidis* a *S. hominis* a některé další koaguláza negativní stafylokoky (netvoří enzym měnící fibrinogen na fibrin). *Staphylococcus aureus* se vyskytuje častěji na perineu (tkáňový předěl mezi vchodem do pochvy a řitním otvorem), kdy je současně i na sliznici nosní. Z perinea se mohou bakterie přemístit do vaginy, jak bylo prokázáno pro *S. aureus* u syndromu toxického šoku. Na rozdíl od dospělých bylo zjištěno, že u dětské kůže dominuje kmen *Firmicutes*. Včasné a správné stanovení zdravého kožního mikrobiomu během této první periody může mít klíčovou roli v zabránění příchodu potenciálních infekčních mikrobů a může ovlivnit složení mikrobiomu až do dospělosti [15,27].

3.7 Faktory mikrobiální rozmanitosti rukou

Jedna ze studií HMP se zaměřila na bakterie lidských dlaních jako na jedno z dynamičtějších kožních mikrobiálních prostředí, které je vystaveno projevům vnějšího prostředí a různým změnám. Výzkumu se podrobilo 51 mladých vysokoškolských studentů, od nichž byly odebrány vzorky ihned po vykonané zkoušce. Cílem bylo určit intra- a interindividuální rozdíly bakteriálních společenstev a popsat, jaké konkrétní faktory mohou mít vliv na jejich rozdílnost a složení. Použila se metoda pyrosekvencování, která umožnila prozkoumat povrch lidských dlaní s bakteriálními společenstvy s vysokým stupněm detailu. Povrch dlaně odkryl až 150 jedinečných bakteriálních fylogentypů v úrovni druhu, přičemž bylo identifikováno celkem 4 742 fylogentypů u všech zkoumaných lidských dlaní. Tento soubor dat poskytl zatím nejkompaktnější přehled bakteriální rozmanitosti v souvislosti s člověkem. Ačkoliv byl na dlaních běžně objeven soubor základních taxonů, vědci upozorovali významné inter- a intraindividuální změny ve složení bakteriálních společenstev. Ruce jednoho člověka sdílely 17 % vlastních

fylotypů, kdežto s ostatními lidmi jen 13 %. Podobně jako bylo dokázáno u dospělé mikroflóry, složení dětské kožní mikroflóry se zdá být i místně specifické [24].

Muži a ženy ukrývali výrazně odlišné bakteriální komunity na svých plochách rukou. Taxony, které byly sdíleny muži i ženami současně, zahrnovaly členy rodů: *Propionibacterium* a *Corynebacterium* (početnější u mužů); *Enterobacteriales*, *Moraxellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonadaceae* (početnější u žen). Ženské dlaně ukrývaly podstatně větší bakteriální rozmanitost než mužské dlaně, ať už byla rozmanitost hodnocena zkoumáním celkové fylogenetické struktury každé ruky nebo průměrným počtem fylotypů. Nebylo přesně určeno, co řídí tyto rozdíly v celkové rozmanitosti, ale je možné, že rozdíly mohly mít také vliv v pH kůže. Muži mají obecně kyselější kůži než ženy a výzkum jiných mikrobiálních lokalit ukázal, že je mikrobiální rozmanitost často nižší ve více kyselějších prostředích [24].

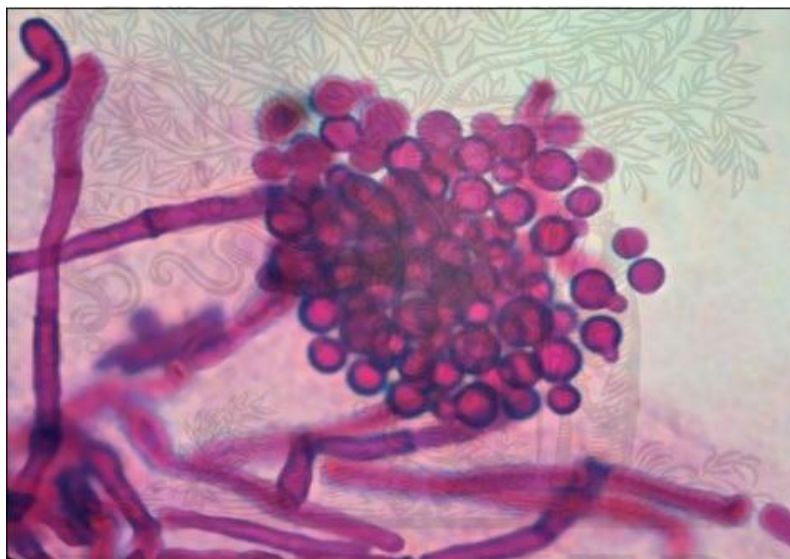
Doba mytí rukou měla také významný vliv na složení bakteriálního společenstva kůže a tento vliv byl o něco výraznější než u rozdílů pohlaví. Bakterie taxonů *Propionibacteria*, *Neisseriales*, *Burkholderiales* a *Pasteurellaceae* byly relativně početnější s průběhem doby uplynulé od posledního mytí rukou, zatímco jiné bakterie skupin *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* a *Lactobacillaceae* vykazovaly opačné znaky a byly relativně početnější na rukou, které nebyly předtím myté. I když doba související s hygienou rukou změnila bakteriální složení, celkové úrovně bakteriální rozmanitosti se k této souvislosti nevztahovaly. Buď se bakteriální společenstva po umytí znovu rychle objevila, nebo umytí (jak bylo zkoušeno u studentů v této studii) neodstranilo většinu bakteriálních taxonů nalezených na povrchu kůže [24].

Dominantní ruce (tzn. pravá ruka u praváků/levá ruka u leváků) měly podobné rozdíly jako ruce nedominantní, ale složení bakteriálních společenstev se výrazně lišilo u rukou téhož jedince. Taxony u dominantní ruky zahrnovaly členy skupin *Enterobacteriales*, *Lactobacillaceae*, *Peptostreptococcaceae* a *Xanthomonadales*. Vliv používání dominantní ruky na bakteriální společenstva byla pravděpodobně způsobena buď rozdíly v podmínkách týkajících se kožního prostředí, nebo kontaktu dominantní ruky s různými typy okolních ploch. Ačkoliv dominantní i nedominantní ruce ukrývají odlišná bakteriální společenstva, společenstva na levých a pravých rukou od stejného jedince si byla podobnější, než by se dalo očekávat. Nicméně tato společenstva sdílela v průměru jen 17 % vlastních fylotypů [24].

3.7.1 Plísňová společenstva

V samostatné studii zkoumající plísňová společenstva kůže byl objeven dominantní rod *Malassezia*, ve kterém bylo identifikováno pět známých druhů a další čtyři nové. Při pozorování stejných jednotlivců o osm až deset měsíců později byly odhaleny odlišné druhy, které naznačovaly obrovskou dynamiku v průběhu času. Přítomnost lipofilních druhů kvasinek rodu *Malassezia* jsou známé jako příčiny různých dermatitid. Tento rod byl zaznamenán ve studiu při léčbě lupů na pokožce hlavy. U zdravých jedinců převažoval tento rod s frekvencí 0,07 %, zatímco u osob trpících odlupováním kůže až 2 %. Rod *Malassezia* se skládá nejméně ze sedmi druhů, z nichž každý má specifické vlastnosti. Některé druhy, jak zobrazuje Obr. 1. (*M. furfur*, *M. gobosa*, *M. restricta*) mají souvislost s různými infekčními nemocí, ale patologické role jednotlivých druhů nejsou zcela objasněna [25,37].

Obr. 1. *Malassezia furfur* v pokožce hlavy [37].



3.8 Topografická a časová rozdílnost kožního mikrobiomu

Kůže je ekosystém s mikrobiálními společenstvy, která žijí ve fyziologicky a topograficky odlišných prostředích (př. vlhké podpaží vs. suché předloktí). Z celkových vzorků odebraných z 20 různých kožních míst u 10 zdravých lidí bylo odhaleno 19 bakteriálních kmenů, ale většina sekvenací byla přiřazena ke čtyřem kmenům: *Actinobacteria* (51,8 %), *Firmicutes* (24,4 %), *Proteobacteria* (16,5 %), a *Bacteroidetes* (6,3 %). V rámci výzkumu byla porovnána relativní početnost hlavních bakteriálních skupin, které se vztahovaly na tři odlišné typy mikrobiálního prostředí: mazové (např. zevní zvukovod), vlhké (např. podpaží) a suché

(např. předloktí). Druhy *Propionibacteria* a stafylokoky převládaly v mazových místech. Druhy *Corynebacteria* se převážně nacházely na vlhkých místech kůže, ačkoliv stafylokoky byly také přítomny. Smíšená populace bakterií obývala suchá místa kůže, a to s větším zastoupením druhů *b-Proteobacteria* a *Flavobacteriales* [26].

V rámci jedné studie se porovnávala celková bakteriální bohatost a rozmanitost dětské kůže. Když byla shromážděna data ze vzorků odebraných ze tří míst (paže, hýždě a čelo). Přestože se počet rodů v daných místech výrazně neměnil, relativní počet komunity výrazně vzrostl s věkem [27].

4 BUDOUCÍ SMĚRY HMP

4.1 Další cíle HMP

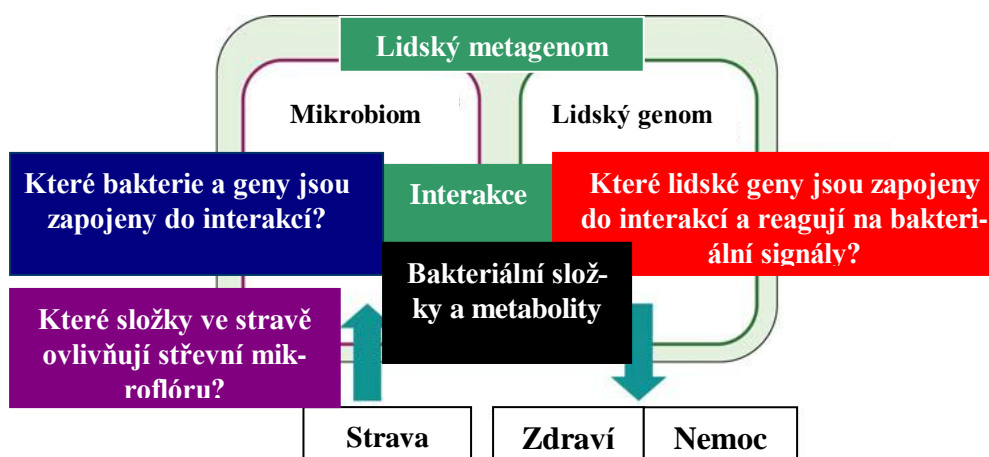
Velké množství dat bude generováno HMP pomocí sekvenačních technologií nové generace a jiných metod s vysokou výkonností. Výpočetní techniky ke zpracování a analyzování těchto údajů jsou teprve na začátku. Zejména objektivní míry pro určitá kritéria mají nedostatky. Úsilím HMP bude zaměřit se na stanovení norem pro použití nových sekvenačních metod v metagenomických studiích. HMP se v budoucnu zaměří na lepší porozumění rolí lidských mikroorganismů v biologii člověka, včetně jejich vztahu k lidskému zdraví či nemoci. HMP bude řešit některé z nejvíce podnětných, obtížných a základních otázek. Pro řešení všech otázek týkajících se lidského mikrobiomu je potřeba odebrat vzorky z mikroflóry a vzít v úvahu časové a prostorové měřítko před provedením tohoto procesu. Očekává se, že HMP odhalí, zda principy ekologie zachytí ze studií makroskopického světa, vztahující se na mikroskopické svět, kterým lidé poskytují přístřeší [2,3].

V současné době nejsou žádné metody k získání dostatečného množství mikroorganismů z různých tělních povrchů jako je kůže nebo sliznice vaginy v reprodukovatelném a reprezentativním množství a dostatečně zbaveného lidských buněk, tak aby mohl být mikrobiom sekvencován. Rovněž není jasné, v jakých časových a prostorových měřítkách tohoto odběru vzorku by mělo dojít. Stejně jako v mnoha případech ekologických studií se musí volit mezi hlubokým odběrem malého počtu míst (jednotliví lidé a tělní lokality) a obsáhlým odběrem. Hluboké vzorkování části těla několika jednotlivců bude potřebné k určení rozložení všech mikrobiálních druhů a genů [3].

Pro lepší porozumění všech otázek týkajících se zdravotního stavu lidí bude potřebné získávat metagenomická data vztahující se k hostiteli, včetně ke změnám v hostitelských genotypch a metabolických fenotypch. Budoucí studie budou zahrnovat mechanismy určené ke zkoumání a identifikaci střevních bakterií a jejich genových produktů (včetně metabolitů), které jsou rozhodující pro fyziologii člověka a utváření struktury střevní mikroflóry. Těchto vědeckých úkolů bude dosaženo pomocí pokročilých OMICs technologií (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika aj.) spojených s obrovským množstvím genomických dat, která jsou již shromažďována [14].

Budoucí studie jsou potřebné k poskytnutí znalostí v širším rozsahu a posouzení vlivu souvisejících faktorů např. věku, stravy a patologických stavů (např. zánětlivých střevních onemocnění, obezity, rakoviny atd.) u střevního mikrobiomu lidí, kteří žijí v odlišných prostředích. Periodické odebírání vzorků ze střevního mikrobiomu může poskytnout pohled na dopad změn ve vývoji mikrobiálního prostředí. Tyto výsledky by mohly poskytnout širší pohled na biologii člověka, včetně nových biologických znaků k definování lidského zdraví, nových možností k optimalizaci výživy jednotlivců, prognóze biologicky dostupných orálně podávaných léků, prognóze individuálních a sociálních predispozicí k onemocněním. Objasnění složitých vztahů střevního mikrobiomu, genetiky hostitele a projevů životního prostředí mohou pomoci v budoucnosti usměrnit strategie k prevenci rakoviny. Na Obr. 2. jsou popsány budoucí směry výzkumu střevní mikroflóry [14].

Obr. 2. Budoucí směry výzkumu zaměřené na lidskou střevní mikroflóru [14].



Lidská střevní mikroflóra spolu se svou a lidskou genetickou rozmanitostí je odpovědná za lidské zdraví a nemoci. Mnoho otázek o hostitelsko-mikrobiálních interakcích zůstává stále nezodpovězených [14].

4.2 Shrnutí přínosů HMP

Hlavní přínosy HMP uvedla tisková zpráva z roku 2010, která zveřejnila výsledky analýzy 178 genomů mikroorganismů obývajících povrch nebo vnitřní prostory těla. Přestože je HMP stále na samém začátku, vědci už rozpoznali několik důležitých skutečností o různorodosti a složitosti mikroorganismů. Byly objeveny neznámé proteiny produkované bakteriemi obývající sliznici žaludku, které jsou příčinou žaludečních vředů. Kromě toho byl zaznamenán malý počet nově identifikovaných bílkovin zapojených do metabolismů sacharidů a aminokyselin.

Vědci vyhodnotili mikrobiální rozmanitost přítomnou v referenční sbírce HMP a zahájili řadu sérií studií specifických onemocnění: obezity, Crohnovy choroby, zánětů, akné a nediodagnostikovaných horeček apod. [28].

Vědci dále osekvenovali vzorky mikrobiomu, stanovili jeho interakce s nemocemi a vyvinuli technologie pro izolaci a identifikaci neznámých mikrobů. Dále byly porovnány výsledky se stejným počtem dříve sekvencovaných mikrobiálních genomů, které byly náhodně vybrány z veřejných databází. Budoucí sekvenace genomů a studie lidského mikrobiomu budou shromažďovat informace o složitějších mikrobech a virech. Další úsilí také umožní vědcům, aby vytvořili seznam datových zdrojů a standardů. Kromě toho bude HMP i nadále podporovat vývoj nových technologií a výpočetních nástrojů, koordinaci datové analýzy a vyšetření etických, právních a sociálních důsledků. HMP v současné době financuje pilotní demonstrační projekty výzkumných pracovníků, kteří odebírali po dobu jednoho roku vzorky mikrobiomů od zdravých a nemocných dobrovolníků se specifickým onemocněním [28,29].

Nyní je HMP v klíčovém bodě v oblasti výzkumu lidského mikrobiomu. HMP poskytl rozsáhlý zdroj souborů dat, výpočetních nástrojů, klinických metod a vědeckých přístupů pro studie lidského mikrobiomu. Studia navrhla několik zásadních výzkumných oblastí, aby se tento výzkum posunul dále. Stále ještě chybí technické chápání základních faktorů, které regulují mikrobiální vývoj během základních událostí v brzkém životě člověka. Je známo, že mikrobiom je možno získat z prostředí ihned po narození, a že během prvních let dospívající imunitní systém, potrava a utváření mikrobiálního společenstva vzájemně působí při budování mikrobiomu. Nicméně tyto společné role v dospívajícím mikrobiomu ještě nejsou zcela pochopeny, stejně jako role imunitního systému hostitele při regulování kolonizace specifickými členy mikroflóry, význam mikrobiomu při regulaci vývoje tkáně hostitele, význam mikrobiomu při obraně kolonizace novými mikroorganismy nebo význam mateřského mléka a dětské stravy na prvotní mikrobiální kolonizování [30].

4.2.1 Rozvíjení referenční sady

V současné době jsou metagenomické analýzy komplexních mikrobiálních komunit omezeny dostupností vhodných referenčních genomů, které jsou potřebné pro důvěrné určení krátkých sekvencí vyráběných současnou generací vysoce paralelních DNA sekvencí. Tyto analýzy jsou omezeny také nedostatkem znalostí o prostředí kmenů organismů, které tvoří tyto community. Sekvencování více referenčních genomů by mohlo pomoci odpovědět na otázky

ohledně genetických změn uvnitř nebo mezi hlavními fylogenetickými rody v dané lokalitě, jako jsou střeva. Porovnání členů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* by mohlo poskytnout pohled, do jaké míry je genetická redundance a specializace mezi těmito dvěma divizemi. Srovnání metagenomických sekvenačních dat s genomy v referenční sbírce může v dalších letech pomoci vědcům určit, zda se jedná o nové nebo již existující sekvenace [3,28].

Prvotní impulz HMP započal sekvenací více než 600 genomů z kultivovaných i nekultivovaných bakterií, včetně několika nebakteriálních mikroorganismů. V kombinaci se stávajícími a jinými v současné době plánovanými studiiemi by měla celková referenční sbírka dosáhnout 1000 genomů. Tato iniciativa bude pokračovat metagenomickou analýzou, aby byla charakterizována mikrobiální společenstva jednotlivých částí těla a určena, zda existuje základní mikrobiom v každé této části. HMP plánuje pomocí různých projektů shromáždit celkem 3000 genomů ze všech částí těla. Většina z těchto genomů bude sekvencována jen na vysoce kvalitní úrovni. Metagenomická data získaná z dokončených projektů referenčních genomů lze nalézt v Projektovém katalogu HMP [29].

4.2.2 Databáze integrovaných mikrobiálních genomů a společný fond programů

Systém integrovaných mikrobiálních genomů (IMG) slouží jako zdroj společenstev pro srovnávací analýzu veřejně dostupných genomů v souhrnném integrovaném obsahu. Pro každý gen poskytuje IMG seznamy souvisejících genů, které jsou založeny na sekvenační podobnosti. Obsah dat z IMG jsou průběžně rozšiřovány prostřednictvím pravidelných aktualizací od první zveřejněné verze IMG a seznam těchto dat stále narůstá. Genomy vytvořené v rámci HMP jsou zvláště zajímavé. Více než 550 referenčních genomů sekvenovaných v rámci HMP jsou přezkoumány a analyzovány pomocí IMG/HMP. V brzké budoucnosti se očekává uveřejnění pangenomických dat [31].

Společný fond programů HMP byl zahájen ve fiskálním roce 2008, aby byly využity pokroky nových genomických technologií k vytvoření mezinárodního zdroje mikrobiálních sekvenačních dat, analytických nástrojů a metod pro identifikaci nových lidských mikrobů. Ve fiskálním roce 2013 bude program naposled poskytovat finanční podporu demonstračním projektům, které zkoumají vztahy mezi lidským mikrobiomem a kožními nemocemi. Financování každého programu je limitováno na období 5-10 let, takže cíle každého programu musí být dosažitelné v této lhůtě [32].

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo určit, zda změny v mikrobiomu souvisí se zdravotním stavem lidí. K tomuto určení byly popsány nové sekvenační metody, technologie a metagenomické přístupy. Pomocí 16S rDNA byly odhaleny významné rozdíly v mikrobiálních společenstvech. První ohlášené výsledky metagenomických studií se týkaly fekálních vzorků dvou dospělých osob. V tlustém střevě byly identifikovány různé mikroorganismy z prokaryotických domén *Bacteria* a *Archea*.

V rámci výzkumu HMP byla provedena analýza střevní mikroflóry novorozenců, přičemž byly posuzovány různé faktory mající vliv na bakteriální rozmanitost. Vliv času se ukázal jako jeden z klíčových faktorů kolonizace tlustého střeva. Potvrdilo se, že utváření mikrobiálního osídlování tlustého střeva je nejdůležitější v prvních měsících života a postupem času se dětská střevní mikroflóra podobá dospělé mikroflóře. Výsledky dále ukázaly, že v novorozenecké fázi hraje střevní bakteriální flóra klíčovou roli pro vyvíjení imunity v dospělém věku. Další studie byla prováděna na myších modelech s nedostatečnou funkcí hormonu leptinu, který má vliv na energetickou bilanci. Při studiu střevního mikrobiomu, jako možné příčiny obezity, byla DNA mikrobiálního společenstva izolována z obsahu distálního střeva geneticky obézních zvířat a transplantována do jejich štíhlých sourozenců. Kolonizace střevního mikrobiálního společenstva vytvořila v nepřítomnosti leptinu dramatický nárůst tělesného tuku během několika dnů.

Při studiu kožních bakteriálních společenstev u dlaní studentů bylo pomocí pyrosekvencování objeveno několik nových fylogrup v úrovni druhu. Ženské dlaně ukrývaly podstatně větší bakteriální rozmanitost než mužské dlaně. Doba mytí rukou měla také významný vliv na složení bakteriálního společenstva a tento vliv byl o něco výraznější než u rozdílů pohlaví. Dominantní ruce měly podobné rozdíly jako ruce nedominantní, ale složení bakteriálních společenstev se výrazně lišilo u rukou téhož jedince. Zastoupení jednotlivých druhů mikrobiálních společenstev souviselo také s místem. Z celkových vzorků odebraných z různých kožních míst patřila většina sekvenací jen ke čtyřem známým kmenům.

I když je HMP stále na začátku svého výzkumu, už nyní lze potvrdit, že může poskytnout studiem mikrobiomu přínos při léčbě různých onemocnění. HMP tak může posunout hranici lidské mikrobiologie poskytováním nástrojů a datových zdrojů, aby informoval lékařské vědy ve větší míře o roli změn mikrobiomu za různých zdravotních podmínek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČEJKOVÁ, Darina a David ŠMAJS. Projekt lidského mikrobiomu. *Universitas - revue Masarykovy univerzity*, Brno, Masarykova univerzita. ISSN 1211-3387, 2010, vol. 43, no. 2, s. 23-28.
- [2] PETERSON, J. et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* [online]. 2009, roč. 19, č. 12 [cit. 2012-01-31]. ISSN 1088-9051.
Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.096651.109>
- [3] TURNBAUGH, Peter J. et al. The Human Microbiome Project. *Nature* [online]. 2007, roč. 449, č. 7164 [cit. 2012-03-07]. ISSN 0028-0836.
Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06244>
- [4] STEINLE, N. et al. Eating Behavior in the Old Order Amish: Heritability Analysis and a Genome-Wide Linkage Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. c 2002, roč. 75, č. 6 [cit. 2012-05-05]. ISSN: 1938-3207
Dostupné z: <http://www.ajcn.org/content/75/6/1098.long>
- [5] PAL, K. et al. Bacterial Vaginosis: Etiology and Modalities of Treatment. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*[online]. 2011, roč. 3, č. 4 [cit. 2012-05-05]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: <http://www.ajcn.org/content/75/6/1098.long>
- [6] KIM, S. et al. Prognostic Biomarkers for Esophageal Adenocarcinoma: Identified by Analysis of Tumor Transcriptome. *Plos One* [online]. 2010, roč. 5, č. 11 [cit. 2012-05-05]. ISSN 1932-6203.
Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015074>
- [7] SPENCER G. Researchers Establish International Human Microbiome Consortium: Coordinated Global Effort To Investigate. *Evropská komise: Výzkum a inováce* [online]. 2008 [cit. 2012-05-05]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/research/index.cfm?lg=cs&pg=newsalert&year=2008&na=na-161008>
- [8] GILL, S. R. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* [online]. 2006, roč. 312, č. 5778 [cit. 2012-04-08]. ISSN 0036-8075.

- Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1124234>
- [9] NEUFELD, J. D. et al. Open Resource Metagenomics: a Model for Sharing Metagenomic Libraries. *Standards in Genomic Sciences* [online]. 2011, roč. 5, č. 2 [cit. 2012-05-06]. ISSN 1944-3277. Dostupné z: <http://www.standardsingenomics.org/index.php/sigen/article/view/sigs.1974654>
- [10] XIA, Li C. et al. Accurate Genome Relative Abundance Estimation Based on Shotgun Metagenomic Reads. *Plos One* [online]. 2011, roč. 6, č. 12 [cit. 2012-05-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0027992>
- [11] KUMAR, R. et al. Application of Microarray in Breast Cancer: An Overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2012, roč. 4, č. 1 [cit. 2012-05-06]. ISSN 0975-7406.
- Dostupné z: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2012/4/1/21/92726>
- [12] PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, roč. 55, č. 5 [cit. 2012-05-06]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.107565>
- [13] Sekvenování DNA. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2012-04-09].
- Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD_DNA
- [14] HATTORI, M. a T. D. TAYLOR. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Research* [online]. 2009, roč. 16, č. 1 [cit. 2012-04-10]. ISSN 1340-2838.
- Dostupné z: <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/dnares/dsn033>
- [15] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1995, 93 s. ISBN 80-238-0297-6
- [16] PALMER, Ch. et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *Plos Biology* [online]. 2007, roč. 5, č. 7 [cit. 2012-04-10]. ISSN 1544-9173.
- Dostupné z: <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document>

- [17] FRIEDRICH, M. J. Microbiome Project Seeks to Understand Human Body's Microscopic Residents. *The Journal of the American Medical Association* [online]. 2008, roč. 300, č. 7 [cit. 2012-05-07]. ISSN 0098-7484.
Dostupné z: <http://jama.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/jama.300.7.777>
- [18] LAMPE, J. W. The Human Microbiome Project: Getting to the Guts of the Matter in Cancer Epidemiology. *Cancer Epidemiology Biomarkers* [online]. 2008, roč. 17, č. 10 [cit. 2012-03-07]. ISSN 1055-9965.
Dostupné z: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-08-0792>
- [19] HAKANSSON, Asa a Goran MOLIN. Gut Microbiota and Inflammation. *Nutrients* [online]. 2011, roč. 3, č. 6 [cit. 2012-05-07]. ISSN 2072-6643.
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/3/6/637/>
- [20] REISSIGOVÁ, Jindra. *Základy epidemiologických studií* [online prezentace]. Praha: Ústav informatiky AV ČR v.v.i., oddělení medicínské informatiky, EuroMISE centrum [cit. 2012-05-17]. Dostupný z:
http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDgQFjAA&url=https%3A%2F%2Fmefanet.upol.cz%2Fres%2Ffile%2FKurzy-multizdrojoveho-vyhledavani-informaci%2FEpidemiologickeStudie.ppt&ei=mhG1T7qTCs7A8QPph9jsDw&usg=AFQjCNHWe8hp8FpT1XqN_VBttCuXyLdZVQ&sig2=T0Xx043IFbIY2klUd7D4JQ
- [21] SINGH, V. et al. Innate and Specific Gut-associated Immunity and Microbial Interference. *FEMS Immunology* [online]. 2009, roč. 55, č. 1 [cit. 2012-04-08]. ISSN 09288244. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-695X.2008.00497.x>
- [22] TURNBAUGH, P. et al. An Obesity-associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* [online]. 2006, roč. 444, č. 7122 [cit. 2012-04-10]. ISSN 0028-0836.
Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05414>
- [23] Leptin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2012 [cit. 2012-05-17].

Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Leptin>

- [24] FIERER, N. et al. The Influence of Sex, Handedness and Washing on the Diversity of Hand Surface Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, roč. 105, č. 46 [cit. 2012-04-10]. ISSN 0027-8424.

Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807920105>

- [25] PARK, H. K. et al. Characterization of the Fungal Microbiota (Mycobiome) in Healthy and Dandruff-Afflicted Human Scalps. *Plos One* [online]. 2012-2-29, roč. 7, č. 2 [cit. 2012-05-08]. ISSN 1932-6203.

Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032847>

- [26] GRICE, E. A. et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* [online]. 2009, roč. 324, č. 5931 [cit. 2012-04-10]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171700>

- [27] CAPONE, K. A. et al. Diversity of the Human Skin Microbiome Early in Life. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2011, roč. 131, č. 10 [cit. 2012-05-08]. ISSN 0022-202x.

Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/jid.2011.168>

- [28] NIH News: NIH Human Microbiome Project Researchers Publish First Genomic Collection of Human Microbes. *National Institutes of Health* [online]. 2010 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: <http://www.nih.gov/news/health/may2010/nhgri-20.htm>

- [29] Program Initiatives. *National Institutes of Health: The NIH Common Fund* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12].

Dostupné z: <http://commonfund.nih.gov/hmp/initiatives.aspx#reference>

- [30] PROCTOR, Lita M. The Human Microbiome Project in 2011 and Beyond. *Cell Host* [online]. 2011, roč. 10, č. 4, s. 287-291 [cit. 2012-05-17]. ISSN 19313128. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.001.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312811002940>

- [31] MARKOWITZ, V. M. et al. IMG: The Integrated Microbial Genomes Database and Comparative Analysis System. *Nucleic Acids Research* [online]. 2011, roč. 40 [cit. 2012-05-09]. ISSN 0305-1048.
Dostupné z: <http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkr1044>
- [32] Common Fund Fiscal Year 2013 Congressional Justification. *National Institutes of Health: The NIH Common Fund*. [online]. 2012 [cit. 2012-04-12].
Dostupné z: http://commonfund.nih.gov/pdf/Vol_1_tab4_Common%20Fund.pdf
- [33] ANGLY, F. et al. The GAAS Metagenomic Tool and Its Estimations of Viral and Microbial Average Genome Size in Four Major Biomes. *Plos Computational Biology* [online]. 2009, roč. 5, č. 12 [cit. 2012-05-18]. ISSN 1553-7358. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1000593>
- [34] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [35] FOXMAN, Betsy a Deborah GOLDBERG. Why the Human Microbiome Project Should Motivate Epidemiologists to Learn Ecology. *Epidemiology* [online]. 2010, roč. 21, č. 6 [cit. 2012-05-17]. ISSN 1044-3983. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- [36] ANGELAKIS, E. et al. The Relationship between Gut Microbiota and Weight Gain in Humans. *Future Microbiology* [online]. 2012, roč. 7, č. 1 [cit. 2012-05-08]. ISSN 1746-0913.
Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.11.142>
- [37] Malassezia Furfur In Stratum Corneum, Periodic Acid-Schiff Stain: Image ID: 37090. *Elsevierimages: The Premier Source for Medical images* [online]. 2005-2010 [cit. 2012-05-10]. Dostupné z: <http://www.elsevierimages.com/image/37090.htm>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BAC	uměle vytvořené bakteriální chromozomy
BLAST	metoda pro vyhledávání dlouhých sekvenací
dbGaP	databáze pro genotypy a fenotypy.
EA	jícnový karcinom
GAAS	nástroj pro výpočet přesného mikrobiálního složení a velikosti genomů
HGP	Projekt lidského genomu
HMP	Projekt lidského mikrobiomu
IBD	zánětlivé střevní onemocnění
IgE	imunoglobulin A
IgA	imunoglobulin E
IHMC	Mezinárodní konsorcium lidského mikrobiomu
IMG	Integrovaný systém mikrobiálních genomů
KEGG	Kyoto encyklopedie genů a genomů
NIH	Národní institut zdraví
OMICs	komplexní přístupy studia buňky (metabolomika, transkriptomika...)
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězcová reakce
WGS	náhodné sekvencování celého genomu

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Malassezia furfur v pokožce hlavy [37].</i>	35
<i>Obr. 2. Budoucí směry výzkumu zaměřené na lidskou střevní mikroflóru [14].</i>	38

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Seznam chorob a příznaků ve spojitosti s lidským mikrobiomem [1].</i>	16
--	----

