



MIKROBIOM KUTATÁSOK A SERTÉS MINT MODELLÁLLAT SEGÍTSÉGÉVEL

HERCEG EMIL BALÁZS - LENCSÉS-VARGA ERIKA - SZALAI KLAUDIA -
TEMPFLI KÁROLY - BALI PAPP ÁGNES

Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
Mosonmagyaróvár

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők irodalmi adatok alapján összefoglalják az emberi és a sertés mikrobiom kutatások fontosabb eredményeit. A bél mikroflórája és annak metabolitjai fontos tényezők az emlős emésztőrendszer működésében és az egészség megőrzésében.

Az endogén humán mikrobiomra vonatkozó ismeretek korlátozottak, mivel a korai mikrobiom kutatások elsősorban a kórokozó mikrobákra összpontosultak. Azonban a humán bélbaktériumok populációinak közelmúltban történő szekvenálása jelentős különbségeket mutatott a bél mikrobiom összetételével kapcsolatban, amelyek összefüggésbe hozhatók például az egészségi állapottal, a testzsír százalékkal vagy az életkorral. Figyelembe véve, hogy a baktériumok sejtszáma az emberi szervezetben található sejtek számával közel azonos, az emberi bél mikrobiomát gyakran második genomnak nevezik. Ezen a gyorsan fejlődő kutatási területen szükség van modell állatok használatára, amelyben a sertés potenciális jelölt az ember és a sertések közötti jelentős anatómiai, emésztésélettani hasonlóságok miatt.

Vizsgálatok igazolják, hogy az étrend módosítása során bekövetkező változások hatnak a sertés bél mikrobiom összetételére, akár csak az embernél, ami jelzi a sertés mint modell állat alkalmazhatóságát és relevanciáját. A sertésmodell kísérleti eredmények felhasználhatók az embernél a tudatos táplálkozás és a bél mikrobiom közötti kölcsönhatások értékelésére.

Kulcsszavak: elhízás, mikrobiom, sertés,

BEVEZETÉS

Bár már az idősámításunk előtti 3. században a görög *Hippokratész* azt állította, hogy „minden betegség a bélből ered”, majd a 19. században a Nobel-díjas *Mecsnikov*, aki a hosszú élettartam és a testben lévő baktériumok egészséges egyensúlya között közvetlen kapcsolatot állapított meg kinyilatkoztatta, hogy „a halál a vastagbélben kezdődik”, mégis sokáig feledésbe merültek elképzeléseik. A szakirodalmi eredmények alátámasztják, hogy a velünk együtt élő mikrobák szerepet játszanak a szervezetünkben lezajló élettani folyamatokban. Napjainkra megerősítést nyert, hogy a gyulladós folyamatokban, az immunrendszer hatékony működésében, az ingerületátvivő anyagok megfelelő képződésében, a tápanyagok különböző makromolekuláinak biokémiai reakcióiban a mikrobiom rendkívül fontos szerepet játszik, ezért különálló szervnek tekinthetjük. Mikrobiomunk állandóan változik. Helyes táplálkozás esetén a mikrobiom megfelelő állapotban van, és nem szaporodnak el a káros mikroorganizmusok. Ha ez utóbbi állandósul krónikus gyulladások, ennek következtében onkológiai folyamatok előfordulásának kockázata növekszik. Fontos tehát minél szélesebb körű ismereteket szereznünk mikrobiomunk működésével kapcsolatban. A sertés mint modellállat alkalmazása sok emberi mikrobiommal kapcsolatos kérdésre adhat választ, így a napjainkban óriási problémát jelentő, már népbetegségnek számító elhízás és a mikrobiom kapcsolata is vizsgálható sertés modell-kísérletek alapján.

A MIKROBIOM FOGALMÁNAK KIALAKULÁSA

A mikrobiom fogalmat *Hans Winkler* (1920) használta először, *Lederberg és McCray* (2001) ezt fejlesztette tovább. Meghatározásuk szerint a mikrobiom az emberi testben élő kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok alkotta ökológiai rendszer (*Lederberg és McCray*, 2001). Az első kutatásokat a hetvenes években többek között *Savage* (1977) kezdte el, és megállapította, hogy a mikrobiomhoz tartozó baktériumoknak a többsége az emésztőrendszerben található (*Ren et al.*, 2011). *Savage* (1977) a béltraktusban található mikroba-számot 10^{14} nagyságrendűre becsülte. Korábban az emberi szervezettel kapcsolatos mikrobiológiai kutatások a betegséget okozó mikrobákra fókuszáltak, így az emberi szervezet endogén flórájáról az ismeretek még kevésbé voltak tisztázottak (*Quilordan et al.*, 2016; *Relman és Falkow*, 2001).

A legelfogadottabb tudományos becslések szerint egészen 2015-ig úgy gondolták az emberi testben és testen 10^{15} - 10^{16} baktérium található, míg az emberi testet felépítő sejtek száma 10^{14} . Az izraeli Weizmann Intézet kutatói szerint ez a szám 4×10^{14} az emberi 3×10^{14} sejt számhoz képest, tehát közel 1:1 arányt mutat. Számos szakember második genomként említi a mikrobiomot. A mikrobiom "személyre szabott", az egészségmegőrzés szempontjából növekvő fontosságára hívják fel a figyelmet a kutatók (Schmidt et al., 1991).

Közvetlenül a kevert mintából izolált DNS felhasználásával megalkotott genomikai könyvtár szekvenálása révén a környezeti minták komplexen vizsgálhatók (Handelsman et al., 1998). Ezt a metagenomikai megközelítést számos vizsgálatban alkalmazták a környezeti mikrobaközösség meghatározására (Handelsman, 2004; Moreira et al., 2012; Stahl et al., 1984; Tringe és Rubin, 2005; Neelson és Venter, 2007). A szekvenálási technológia fejlődésével új lehetőségek nyíltak a mikrobiális közösség jellemzésére. **A szekvenálás alapú metagenomika alkalmas komplex mikrobiális közösségek pontos összetételének** meghatározására anélkül, hogy a közösség egyes tagjait izolálni, tenyészteni kellene; továbbá információt nyújt a mikrobák együttműködéséről, a közösségi szintű anyagcsere-folyamatokról is. A vizsgálatok alapja a közösségekből kivont DNS gyors és nagy áteresztőképességű meghatározása ún. új generációs szekvenálással (next generation sequencing, NGS), amellyel a teljes közösség – beleértve a nem tenyészthető mikrobákat is – genomját vizsgálni lehet.

Az emberi mikrobiom 20-60%-a (testrésztől függően) nem tenyészthető laboratóriumi körülmények között (Aasj et al., 2005; Bik et al., 2006; Palmer et al., 2007; Pei et al., 2004; Tyson et al., 2004; Zhou et al., 2004). A mikrobiom kutatások a mikrobaközösséget alkotó mikrobák meghatározását tűzték ki célul a mikrobák között fennálló filogenetikai kapcsolatok feltárása mellett 16S rRNS technika felhasználásával, amely segítségével a mikrobiomot alkotó baktériumok elkülöníthetők egymástól (Dymock et al., 1996; Giovannoni et al., 1990; Savage, 1977, Shi et al., 2010; Winkler, 1920; Woese és Olsen, 1986).

A baktériumok 16S rRNS génszekvenciáinak azonosítása révén vált világossá, hogy a bél mikrobiomja egyénenként jelentősen különbözik (Eckburg et al., 2005), eltérések figyelhetők meg az elhízott (*Firmicutes* törzsbe tartozó baktériumok aránya magasabb) és sovány emberek (*Bacteroidetes* arány magasabb) között (Ley et al., 2006). Palmer et al. (2007) kutatták a csecsemők mikrobiomjának változását az életkorral. A 16S rRNS

technikát alkalmazták a szájüreg (*Faveri et al. 2008*), a vagina (*Hyman et al. 2005*) és a bőr (*Gao et al. 2007*) mikrobiom vizsgálata során is.

A HUMÁN MIKROBIOM KUTATÁSOK

Az emberi mikrobiom kutatása 2005 novemberében kezdődött el igazán intenzíven és szervezeten. A nemzetközi kutatási együttműködéseket megalapozó találkozó házigazdája a Francia Nemzeti Mezőgazdasági Kutatóintézet (Institut national de la recherche agronomique, INRA) volt elnöke Dusko Ehrlich terjesztette elő azt a javaslatot, hogy első lépésben a humán bélrendszer teljes átfogó metagenomikai vizsgálatát (Human Intestinal Metagenome Initiative, HIMI) végezzék el, határozzák meg az emberi bél mikrobiom összetételét, mind az egészséges, mind a betegségben szenvedő egyéneknél. A találkozó résztvevőinek javaslatára létrehozták a Nemzetközi Metagenom Konzorciumot, hogy a világ minden tájáról bekapcsolódhassanak a kutatásba, és elérjék a HIMI céljait

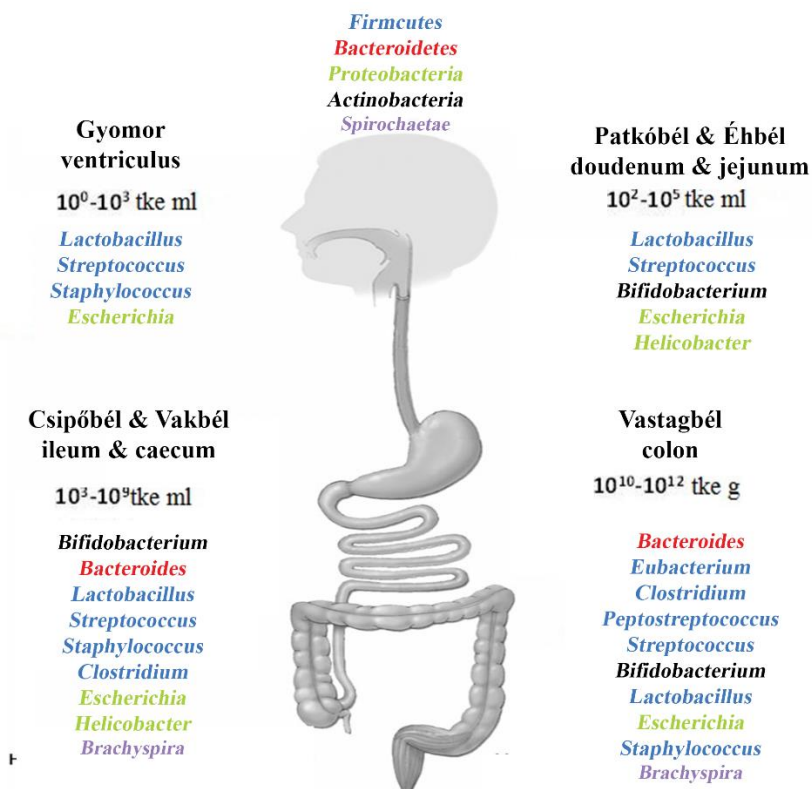
A párizsi találkozót követően az Amerikai Egészségügyi Minisztériumban (National Institutes of Health, NIH) tartottak megbeszélést a NIH által szponzorált Emberi Mikrobiom Projekt (HMP) elindításáról, amely az emberi mikrobiom kutatásokat négy testtájon való vizsgálatokra bővítette (a gyomor-bélrendszer mellett a szájüreg, a hüvely és a bőr vizsgálatára). A projektet kiemelt prioritással építették be az orvosbiológiai kutatások ütemtervébe.

A HMP kezdeti célja a humán mikrobiom összetételének megállapítása volt, ami alapja lehet a későbbi vizsgálatoknak, amelyek kiterjednek különböző populációkra, genotípusokra, betegségekre, életkorra, táplálkozásra, gyógyszeres kezelések és a környezet hatásaira.

A végső cél tehát megteremteni azon széleskörű lehetőségeket, amelyek segítségével javíthatjuk, kontrollálhatjuk az emberi mikrobiomot, és esetlegesen manipulálhatjuk azt betegség esetén (*Peterson et al., 2009*)

A NIH HMP ún. „Jumpstart” fázisa 2007-ben vette kezdetét négy szekvenálási központtal: Baylor College of Medicine, Broad Institute, J. Craig Venter Institute és a Washington University School of Medicine. Ebben a szakaszban több mint 500 újonnan megismert bakteriális genomot szekvenáltak. A legtöbb mikrobát a humán emésztőrendszerben találták.

A projekt 2012-ig tartó első részében a kutatások középpontjában a metagenomikai adatállományok és a számítástechnikai eszközök fejlesztése állt. Az adatállományt egészséges (pl. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* probiotikus baktériumok nagy aránya jellemzi, vagy a közelmúltban azonosított *Akkermansia muciniphila*, amely a vékonybél belső felszínét védő mucinréteggel vonja be) és beteg (a soksejtes szerveget támogató baktériumok arányának drasztikus csökkenése és gyulladáskeltő vegyületeket termelő baktériumok számának növekedése jellemzi, pl. *Clostridium difficile*) mikrobiomra osztották korcsoportok szerint. A felmerülő etikai, jogi és társadalmi kérdéseket tisztázva folytatta a program az emberi mikrobiom kutatást (1. ábra).



1. ábra: A bélmikrobiom eloszlása az emésztőszervrendszerben (Linden 2014). Az azonos törzsbe tartozó baktériumok azonos színnel jelölve

Figure 1: Distribution of microbiota in digestive tract (Linden 2014). The bacteria belonging to the same strain are labeled with the same color

A HMP által gyűjtött adatok elemzése és koordinálása a DACC (Data Analysis and Coordination Center) segítségével folyik, amely egy olyan informatikai rendszert működtet, melyet a tudományos közösség is használhatnak. A HMP DACC koordinálja is a fejlesztési adatokat és szabványokat, valamint honlapjukon elérhető a HMP katalógus a referencia törzsekkel (*URL*). Ez a kereshető és rendezhető projekt katalógus információkat tartalmaz az egyes referencia törzsekről, pl. a testen való izolálás helyéről, a szekvenálás állapotáról, továbbá arról, hogy melyik központ vesz részt a törzs szekvenálásában, meghatározásában. A projekt második fázisában (2012-2015) a HMP résztvevői a kezdeti fázisban megismert információkat referencia adatbázisként és új technológiák kifejlesztéséhez használták, meghatározták a mikrobiom változását a specifikus betegségek esetén.

A humán elhízás és a bélflóra összetétele közötti kapcsolatot több évtizedes kutatómunka során igazolták, ezen belül azt is, hogy a bélflóra szabályozza a zsír tárolását. A bélflóra szerepe az elhízás patogenezisében meghatározó kutatási területté vált. A vizsgálatok eredményei szerint az elhízás kialakulása kapcsolatban van a *Bacteroidetes* és *Firmicutes* törzsek egymáshoz viszonyított arányával, illetve az arányuk változásaival. A *Firmicutes* törzs tagjai nagy határfokkal képesek lebontani a táplálékot, nagyobb súlygyarapodás érhető el. A *Bacteroidetes* törzsbe tartozó baktériumok hatására a tartalék szénhidrátokat és a növényi rostokat rövid láncú zsírsavak előállításán keresztül a szervezet nem raktározza, hanem energiaforrásként hasznosítja. Az elhízás tehát a *Firmicutes:Bacteroidetes* aránnyal is jellemezhető. A nyugati emberek emésztőrendszerében a *Firmicutes* törzs dominál, míg az afrikaiakéban a *Bacteroidetes* (Geritsen et al., 2011; Mariat et al., 2009).

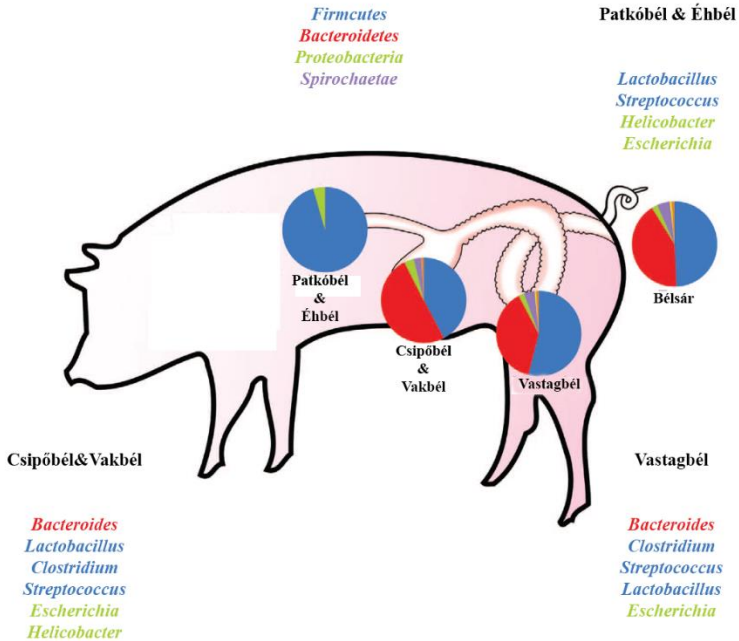
A SERTÉS, MINT MODELLÁLLAT

Fenotípus és mikrobiom

A táplálkozás folyamatai, a jó mikrobiom és az egészségmegőrzés kapcsolata modellállat segítségével bemutatható, pontosabban nyomon követhető a bél mikrobiális összetétele és aktivitásának hatása különböző betegségek kialakulására. Az ember és a sertés szervei nagymértékben hasonlítanak felépítésüket, méretüket vagy funkciójukat tekintve, így a mikrobiom összetétele is a bélrendszerben (1. és 2. ábra), ezért a sertés a mikrobiom vizsgálatok potenciális modellállata lehet. Számos vizsgálat eredménye

szerint az étrend módosítása során bekövetkező változások hasonló módon hatnak a sertés bél mikrobiom összetételére, mint az ember esetében.

Heinritz et al. (2016) sertéseken tanulmányozták az alacsony és magas rostbevitel következményeit. Vizsgálták, hogy azonos energiatartalmú étrendek esetében a magas rost/alacsony zsírtartalom (High Fiber, Low Fat, LF), valamint az alacsony rost/magas zsírtartalom (Low Fiber, High Fat, HF) hogyan befolyásolja a vakbél és a vastagbél mikrobiális összetételét és metabolikus aktivitását, valamint a vérszérum biokémiai paramétereinek változását. HF étrend esetén a *Bacteroides* és az *Enterobacteriaceae* nemzetségek magasabb kópiaszámban voltak a bélrendszerben az LF-hez képest. A *Bifidobaktériumok* nagyobb számban voltak jelen a LF étrend esetén. Az acetát és butirát mennyisége szintén az LF esetén volt magasabb. A glükóz magasabb volt a HF csoportban, míg a glutaminsav-piruvát transzamináz (GPT) nagyobb koncentrációban volt jelen az LF csoportban, azonban ebben az esetben a C-reaktív protein (CRP) mennyisége bizonyos idő elteltével csökkent. Ezek a megállapítások érvényesek a hasonló összetételű étrendet fogyasztó emberekre is, ami igazolja a sertésmodell alkalmazhatóságát.



2. ábra: A bélmikrobiom eloszlása a sertés emésztőszervrendszerben (Looft et al. 2014). Az azonos törzshe tartozó baktériumok azonos színnel jelölve

Figure 2: Distribution of microbiota in digestive tract (Looft et al. 2014). The bacteria belonging to the same strain are labeled with the same color)

Feng et al. (2015) megállapították, hogy a kínaiak táplálkozásuk során már elérik az egészségmegőrzés szempontjából elegendő rostmennyiséget (szemben a nyugati típusú étkezéssel, amely magas zsírtartalmú étrendet takar), ugyanakkor a monosodium L-glutamátot (MSG, azaz nátrium-glutamát) széles körben használják, mint napi élelmiszer-adalékanyag (ún. kínai étterem szindróma; Cui és Dibley, 2012). Több kutató számolt már be humán vizsgálatok mellett laborállat (egér, patkány) kísérleti eredményekre támaszkodva arról, hogy a MSG megváltoztatja a bél mikrobióta összetételét (Boutry et al., 2011a; Boutry et al., 2011b; Sender et al., 2015; Relman, 2002). Ugyanakkor kevés információ áll rendelkezésre arról a pontos mechanizmusról, amely révén az orális MSG befolyásolja a bél mikroorganizmusainak működését és összetételét. Feng et al. (2015) zsír és MSG különböző mennyiségének lehetséges kölcsönhatását vizsgálták. Négy

csoportot hoztak létre a következő étrendek szerint: normál zsírbevitel (kontroll), magas zsírbevitel, normál zsírbevitel + 3% MSG, és magas zsírbevitel + 3% MSG. Minden csoportban 8-8 növendék sertés volt. A bélflóra változását elemezték az éhbél (jejunum), a csípőbél (ileum), a vakbél (coecum) és a remesebél (colon) területén. Eredményeik azt mutatták, hogy mind a MSG, mind a magas zsírbevitel egyértelműen növelte a bél mikroorganizmusok sokféleségét. A MSG és a zsír módosította a bél mikrobiom-összetételét, különösen a vastagbélben. A MSG és a zsír együttes adagolása elősegítette azoknak a mikrobáknak a kolonizációját, amelyeknek köszönhetően az emésztőrendszerben az energia felszabadulása különböző anyagcsere utakon végbemegy. A MSG elősegítette a *Faecalibacterium prausnitzii* és *Roseburia* kolonizációt, míg a magas zsírbevitel a *Prevotella* mennyiségét fokozta a vastagbélben és egyéb bélszakaszokon. Az eredmények segíthetnek abban, hogy jobban megismerjük a bélrendszer kóros elhízást gátló bakteriális összetételét.

A bakteriális sokszínűség csökkenését és megváltozott anyagcsere-útvonalakat mutatnak a bélflóra összetételére irányuló vizsgálatok elhízás esetén. A sertés esetében is igazolt, hogy a bélflóra részt vesz a zsírtárolás folyamatában és a sertés elhízásának kialakulásában (Guo *et al.*, 2008a; Guo *et al.*, 2008b; Verhelst *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2012). Ezen túlmenően olyan *Escherichia spp.*-t is azonosítottak, amely szignifikánsan nagyobb gyakorisággal van jelen a zsírosodásra hajlamosabb sertésekben. Összességében, az endotoxin-indukált gyulladás, a dysbiosis a bélflóra összetételében, és *Firmicutes: Bacteroidetes* arány növekedése befolyásolja az elhízás kialakulását.

Az elhízás megelőzésével kapcsolatban vizsgálták a *Lachnospiraceae*, a *Ruminococcaceae*, a *Prevotella*, a *Treponema* és a *Bacteroides* törzseket. Leírták, hogy ezek a mikrobák étrendi poliszacharid és pektin fermentálásával rövid szénláncú zsírsavakat termelnek. A rövid láncú zsírsavak képesek szabályozni a szervezet energia homeosztázisát, védik a gazdaszervezetet a gyulladásos folyamatoktól és gátolják a zsírtömeg fejlődését. A bélben a mikrobiom összetétele fontos tényező lehet a zsírdepók kialakulásában (He *et al.*, 2016).

Mikrobiom változása a korrallal

A sertés bélflórája az állat növekedése és takarmányozása során állandóan változik. Pajarillo *et al.* (2014) közvetlenül választás előtti (4 hetes) és 2 héttel választás utáni (6 hetes) malacokat vizsgáltak. Az elválasztás előtti időszakban elsősorban *Firmicutes*

(54%), *Bacteroidetes* (38,7%), *Proteobacteria* (4,2%), *Spirochaetes* (0,7%) és *Tenericutes* (0,2%) törzsek találhatóak a bélrendszerben, és a *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *Escherichia* és *Fusobacterium* populációk az uralkodók. Az elválasztás után változik az arány: *Bacteroidetes* (59,6%), *Firmicutes* (35,8%), *Spirochaetes* (2,0%), *Proteobacteria* (1%) és *Tenericutes* (1%). A fekély baktériumok több mint 90%-át *Firmicutes* és *Bacteroidetes* törzsek alkotják. Az elválasztás után a *Prevotella* és a *Clostridium* válik uralkodóvá a *Bacteroides* (hemicellulóz bontás) kárára (Kim és Isaacson, 2015). Kim et al. (2011) egy korábbi vizsgálatában megállapította, hogy a *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, és *Spirochaetes* törzsek jellemzőek a malacok fekély flórájára 10 és 22 hetes koruk között. Növekedésük során a *Firmicutes* mennyisége növekszik (*Anaerobacter*), és ezzel arányosan a *Bacteroidetes* pedig csökken (pl. a *Prevotella* a 10. héten 30%, a 22. hétre 3,5-4%-ra csökken). Ilyen arányban a hetek múlásával a 22. hétre a *Firmicutes* törzsön belül az *Anaerobacter*, *Sporacetigenium*, *Oscillibacter* és *Sarcina* mennyisége növekszik, míg a *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Faecalibacterium* és *Dialister* csökken (Kim et al., 2011). A 2. ábra mutatja a sertés emésztőszervrendszerében a bélflóra eloszlását.

Mikrobiom összetételének módosítási lehetőségei

Quilodrán-Vega et al. (2016) a világon elsőként értékelték sertéstejből izolált tejsavbaktériumok lehetséges probiotikus hatását. Az izolált törzsek között van a *Lactobacillus curvatus* Tuco-5E, amelynek a gyomor-bél kórokozók elleni antagonisták hatását mutatták ki sertésben. A Tuco-5E képes volt csökkenteni az enterotoxikus és enterohemorragiás *Escherichia coli* törzsek, valamint a patogén *Salmonella* szaporodását a bélben. *In vitro* vizsgálatokban a *L. curvatus* Tuco-5E hatására a bélhámsejtek jelentős antagonisták hatást mutattak a *Salmonella* sp. törzs Tuco-17 és *Salmonella enterica* ATCC 13096 ellen. Egér modellen bizonyították, hogy a *L. curvatus* Tuco-5E adagolása 5 egymást követő napon keresztül a *Salmonella* fertőzés előtt a *Salmonella enterica* serovar typhimurium számának csökkenését idézi elő a kezelt egerek májában és lépében, valamint képes megakadályozni a kórokozó véráramon keresztül történő terjedését. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a kocatej probiotikus baktériumok forrása lehet.

Prebiotikus oligoszacharidokat, köztük galakto-oligoszacharidokat (GOS) használtak malac tápszerben, így modellezve az emberi tej oligoszacharid összetételét, amelyekről

ismert, hogy az újszülötteknél fontos szerepe van a bél mikrobiom és az immunrendszer fejlesztésében. A bélrendszer maturációja a szopós malacok és a humán újszülöttek, csecsemők esetében nagyon hasonló. *Alizadeh et al.* (2016) újszülött malac modellt alkalmaztak, így tanulmányozva a GOS sokoldalú hatását csecsemőtápszerben az élet korai szakaszában. A fiatal malacokat elválasztották az anyakocától a fialás után 24-48 órával, és GOS-tartalmú tejpótlóval vagy kontrollként GOS nélküli tejpótlóval táplálták őket 3-tól 26 napos korig, mialatt az intestinalis kolonizáció alakulását figyelték. A tápszerben található GOS könnyen megerjedt a vastagbélben, ami a pH-t csökkentve a vajsav mennyiségének emelkedését eredményezte a caecumban. Emellett a 26. napig a *Laktobacillusok* és a *Bifidobaktériumok* számának növekedését tapasztalták. Hisztomorfológiai változásokat (a mikrovillusok szélessége és bazális membránja fejlődött) észleltek a malacok bélrendszerében a kontrollhoz képest. Különbséget figyeltek meg a bél diszacharidáz aktivitásában a kontroll és a GOS-kiegészítéssel táplált malacok között. GOS-etetés hatására emelkedett a β -defenzin-2 mennyisége a vastagbélben, és a szekretoros IgA szint a nyálban. Összefoglalva úgy tűnik, hogy a GOS adagolás az újszülötteknél ösztönözi a bél megfelelő összetételű mikrobiomjának, a bél morfológiai szerkezetének és védelmi rendszerének fejlődését. *Hoeflinger et al.* (2014) sertéseken vizsgálták meg a *Candida albicans* oro-gastro-intesztinális (oro-GIT) kolonizációját. A született malacokat 4 napig természetes módon az anyakoca tejével táplálták a normális bélflóra kialakulása érdekében. Ezt követően a malacokat mesterséges tenyésztési környezetben helyezték el és tejpótlóval táplálták. A sertéseket orálisan oltották be a három különböző *C. albicans* törzs valamelyikével. A malacokat naponta lemérték, majd a *Candida* kimutatására szájból vagy végbélből és az állatok környezetéből gyűjtöttek mintát. A tanulmány szerint a stabil *C. albicans* kolonizáció kialakulása nem befolyásolja a testtömeg-gyarapodást. A boncolás során kiderült, hogy a nyálkahártyán megtapadó *C. albicans* legnagyobb számban a nyelőcsőben található. A beoltatlan kontroll malacok *C. albicans*-negatívak maradtak. Ebben a vizsgálatban is igazolódott, hogy a sertés jól használható modellállat a *C. albicans* kolonizáció vizsgálatára a humán oro-GIT esetében. A sertésmodell segítségével könnyebben megérthető a *C. albicans* és a gazdaszervezet közötti kommenzalista kölcsönhatások.

Zhou et al. (2016) a sertés utóbelében történő mikrobiális összetétel-változást vizsgálták hosszú ideig tartó (170 nap) alacsony fehérjetartalmú takarmányok etetésekor. Az alacsony fehérjetartalmú étrend hatására csökkent a butirát, az izovalerát, az elágazó

láncú zsírsavak (BCFAs), és a rövid szénláncú zsírsavak koncentrációja (SCFAs) a vakbélben. A diétától jelentősen csökkent a *Lactobacillusok* száma a vakbélben, és a *Streptococcusok* mennyisége a vastagbélben; ugyanakkor a *Prevotella* és *Coprococcus* száma emelkedett a vakbélben, és a *Sarcina*, *Mogibacterium*, *Subdoligranulum* és *Coprococcus* száma magasabb volt a vastagbélben a normál fehérjetartalmú takarmányozással tartottakkal szemben.

Egan et al. (2015) arra kerestek bizonyítékot, hogy a kitozának (biopolimer, képes megkötni a zsírt a gyomorban, így azt nem engedi felszívódni, ezért nagyon népszerű a fogyókúra készítményekben) valóban van-e elhízás elleni hatása. A kísérletben garnéla héjból származó kitozán-adagolás hatását vizsgálták sertés modellben. A két kezelési csoportot (kontroll étrend és 1000 ppm kitozán/emse kiegészítés) 63 napon át vizsgálták. A következő paraméterek változását vizsgálták: testösszetétel, tápanyag emészthetőség, szérum leptin-koncentráció, emésztőenzim génexpresszió és a bél mikrobiom összetétele. A kitozán csökkentette a takarmányfelvételt és a végső testtömeget ($P < 0,001$). Az ileumban csökkent a szárazanyag emészthetősége, a bruttó energia és a nitrogén teljes traktus emészthetősége a kontroll csoporthoz képest ($P < 0,05$). A zsírsav-kötő fehérje 2 (*FABP2*) gén expressziója szintén csökkent ($P = 0,05$) a sertésekben a kitozán hatására a kontrollhoz viszonyítva. A szérum leptin koncentráció növekedett ($P < 0,05$) azokban az állatokban, amelyek a kitozánnal kiegészített takarmányt kapták. Elhízásra utaló jelek, a hátszalonna vastagság (mm), a testzsír-tartalom (kg) jelentősen csökkentek, miközben a sovány hús aránya (%) növekedett ($P < 0,05$) a kitozánnal kiegészített takarmányt fogyasztó sertések esetén. A kitozán-tartalmú takarmányozás hatására csökkent a *Firmicutes* száma a vastagbélben ($P < 0,05$), a *Lactobacillusok* mennyisége a vakbélben ($P < 0,05$) és a vastagbélben ($P < 0,001$), míg a *Bifidobacteriumok* száma növekedett a vakbélben ($P < 0,05$). Összefoglalva, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a garnélahéjból származó kitozán hatásos az elhízás ellen, valamint testsúlycsökkentő/szabályzó hatása is van.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az emlősök gyomor-bél traktusa egy komplex, sokszínű és dinamikus közössége a szimbiotikus baktériumoknak, ami folyamatos kapcsolatban van a gazdaszervezettel. A bélflóra bizonyítottan nagy jelentőségű az emlősöknél, sok funkcióval, mint például a

fermentálható emésztetlen energia szubsztrátok átalakításával, részt vesz az anyagcsere-folyamatokban, segíti a gazdaszervezet immunrendszerének működését a káros és patogén baktériumok szaporodásának akadályozásával.

Az endogén humán mikrobiomra vonatkozó ismeretek korlátozottak, mivel a korai mikrobiom kutatások elsősorban a kórokozó mikrobákra összpontosultak. Azonban a humán bélbaktériumok populációinak közelmúltban történő szekvenálása jelentős különbségeket mutatott a bél mikrobiom összetételével kapcsolatban, amelyek összefüggésbe hozhatók például az egészségi állapottal, a testzsír százalékkal vagy az életkorral. Figyelembe véve, hogy a baktériumok sejtszáma az emberi szervezetben található sejtek számával közel azonos, az emberi bél mikrobiomát gyakran második genomnak nevezik. Ezen a gyorsan fejlődő kutatási területen szükség van modell állatok használatára, amelyben a sertés potenciális jelölt az ember és a sertések közötti jelentős anatómiai hasonlóságok miatt.

Vizsgálatok igazolják, hogy az étrend módosítása során bekövetkező változások hatnak a sertés bél mikrobiom összetételére, akár csak az embernél, ami jelzi a sertés mint modell állat alkalmazhatóságát és relevanciáját. A legutóbbi eredmények arra utalnak, hogy a sertés mikrobiom értékes probiotikus baktériumok forrása, amelyek hasznosíthatók lehetnek az ember számára is. A sertésmodell alkalmazásával kapott eredmények felhasználhatók az ember esetében a tudatos táplálkozás és a bél mikrobiom közötti kölcsönhatások értékelésére.

Az ismertetett kutatási eredmények azt mutatják, hogy a bél mikroflórája és azok metabolitjai fontos tényezők az emésztőrendszer működésében és az egészség megőrzésében. A sertésmodell alkalmazásával kapott eredmények felhasználhatók az ember esetében is a tudatos táplálkozás és a bél mikrobiom közötti kölcsönhatások értékelésekor. Tervezett vizsgálatainkban a kifejezetten zsírsertésnek számító mangalica sertés faeces összetételét hasonlítjuk össze sovány, hústípusú fajtákéval.

MICROBIOME RESEARCH WITH PIG AS A MODEL ANIMAL

EMIL BALÁZS HERCEG - ERIKA LENCSES-VARGA - KLAUDIA SZALAI -
KÁROLY TEMPFLI - ÁGNES
BALI PAPP

Széchenyi István University, Faculty of agricultural and Food Sciences,
Mosonmagyaróvár

SUMMARY

This paper summarises some recent developments of human and pig microbiome research based on literature data. The intestinal microbiota and their metabolites are important factors in the function of the mammalian gastrointestinal tract and maintenance of health.

The knowledge on endogen human microbiota has been limited, as early human microbiological research focused mainly on pathological and pathogenic microbes. However, recent sequencing of human gut bacteria populations revealed considerable individual differences regarding the composition of gut microbiome which have been associated with health status, body fat percentage, or age. Considering that the cell count of bacteria in the human body is like that of the whole body, human gut microbiome is often referred to as the second genome. In need for model animals in this rapidly developing field of research, pig emerges as a potential candidate due to substantial anatomical similarities between humans and pigs.

Several results from dietetic treatments of humans and pigs demonstrate remarkably similar changes in the intestinal microbiota composition, which justify the applicability and relevance of pigs as a model animal. Recent findings indicate the significance of pig microbiota as a valuable source of probiotic bacteria for human use. Using the pig model, the results of the various experiments can also be used in humans to evaluate the interactions between conscious nutrition and intestinal microbiome.

Keywords: obesity, swine, microbiome

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

- Aas, J.A. – Paster, B.J. – Stokes, L.N. – Olsen, I. – Dewhirst, F.E. (2005):* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology.* 43, 5721–5732.
- Alizadeh, A. – Akbari, P. – Difilippo, E. – Schols, H.A. – Ulfman, L.H. – Schoterman, M.H. – Garssen, J. – Fink-Gremmels, J. – Braber, S. (2016):* The piglet as a model for studying dietary components in infant diets: effects of galacto-oligosaccharides on intestinal functions. *British Journal of Nutrition.* 115, 605–618.
- Bik, E.M. – Eckburg, P.B. – Gill S.R. – Nelson, K.E. – Purdom, E.A. – Francois, F. – Perez-Perez, G. – Blaser, M.J. – Relman, D.A. (2006):* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103, 732–737.
- Boutry, C. – Bos, C. – Matsumoto, H. – Even, P. – Azzout-Marniche, D. – Tomé, D. – Blachier, F. (2011a):* Effects of monosodium glutamate supplementation on glutamine metabolism in adult rats. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition).* 3, 279–290.
- Boutry, C. – Matsumoto, H. – Airinei, G. – Benamouzig, R. – Tomé, D. – Blachier, F. – Bos, C. (2011b):* Monosodium glutamate raises antral distension and plasma amino acids after a standard meal in humans. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.* 300, G137–G145.
- Cui, Z. – Dibley, M.J. (2012):* Trends in dietary energy, fat, carbohydrate and protein intake in Chinese children and adolescents from 1991 to 2009. *British Journal of Nutrition.* 108, 1292–1299.
- Dymock, D. – Weightman, A.J. – Scully, C. – Wade, W.G. (1996):* Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of Clinical Microbiology.* 34, 537–542.

- 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.
- Egan, Á.M. – Sweeney, T. – Hayes, M. – O’Doherty, J.V. (2015):* Prawn shell chitosan has anti-obesogenic properties. influencing both nutrient digestibility and microbial populations in a pig model. *Public Library of Science*. 10, 1–16.
- Faveri, M. – Mayer, M.P. – Feres, M. – de Figueiredo, L.C. – Dewhirst, F.E. – Paster, B.J. (2008):* Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*. 23, 112–118.
- Feng, Z.M. – Li, T.J. – Wu, L. – Xiao, D.F. – Blachier, F. – Yin, Y.L. (2015):* Monosodium l-glutamate and dietary fat differently modify the composition of the intestinal microbiota in growing pigs. *Obesity Facts*. 8, 87–100
- Gao, Z. – Tseng, C.H. – Pei, Z. – Blaser, M.J. (2007):* Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 2927–2932.
- Gerritsen, J. – Smidt, H. – Rijkers, G T. - De Vos, W.M. (2011):* Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes and Nutrition*. 6, 209–240.
- Giovannoni, S.J. – Britschgi, T.B. – Moyer, C.L. – Field, K.G. (1990):* Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 345, 60–63.
- Guo, X. – Xia, X. – Tang, R. – Zhou, J. – Zhao, H – Wang, K. (:2008a):* 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.
- Guo, X. – Xia, X – Tang, R. – Wang, K. (2008b):* Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*. 14, 224–228.
- Handelsman, J. – Rondon, M.R. – Brady, S.F. – Clardy, J. – Goodman, R.M. (1998):* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*. 5, R245–R249.
- Handelsman, J. (2004):* Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68, 669–685.

- He, M. – Fang, S. – Huang, X. – Zhao, Y. – Ke, S. – Yang, H. – Li, Z. – Gao, J. – Chen, C. – Huang, L.* (2016): Evaluating the contribution of gut microbiota to the variation of porcine fatness with the cecum and fecal samples. *Frontiers in Microbiology* . 7, 1–13.
- Heinritz, S.N. – Weiss, E. – Eklund, M. – Aumiller, T. – Heyer, C.M.E. – Messner, S. – Rings, A. – Louis, S – Stephan S.C. – Mosenthin, R.* (2016): Impact of a high-fat or high-fiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients*. 5, 1–16.
- Hoeflinger, J.L. – Coleman, D.A. – Oh, S. – Miller, M.J. – Hoyer L.L.* (2014): A piglet model for studying *Candida albicans* colonization of the human oro-gastrointestinal tract. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 357, 10-15
- Hyman, R.W. – Fukushima, M. – Diamond, L. – Kumm, J. – Giudice, L.C. – Davis, R.W.* (2005): Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 7952–7957.
- Kim, H.B. – Isaacson, R.E.* (2015): The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high through put sequencing. *Veterinary Microbiology*. 177, 242–251.
- Kim, H.B. – Borewicz, K. – White, B.A. – Singer, R.S. – Sreevatsan, S. – Tu, Z.J – Isaacson, R.E.* (2011): Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*. 153, 24–133.
- Lederberg, J. – McCray, A.T.* (2001): 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist*. 7, 8.
- Ley, R.E. – Turnbaugh, P.J. – Klein, S. – Gordon, J.I.* (2006): Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 444, 1022–1023.
- Linden, D.R.* (2014): Hydrogen Sulfide Signaling in the Gastrointestinal Tract. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20 (5): 818–30.
- Looft, T. – Heather, K.A. – Brandt, L.C. – Uri, Y.L. – Darrell, O.B. – Alt, D.P. – Henrissat, B. – Stanton, T.B.* (2014): Bacteria, Phages and Pigs: The Effects of in-Feed Antibiotics on the Microbiome at Different Gut Locations. *ISME Journal* 8 (8). Nature Publishing Group: 1566–76.
- Luo, Y.H. – Su, Y. – Wright, A.D. – Zhang, L.L. – Smidt, H. – Zhu, W.Y.* (2012): Lean breed Landrace pigs harbor fecal methanogens at higher diversity and density than obese breed Erhualian pigs. *Archaea*. 605289.

- Mariat, D. – Firmesse, O. – Levenez, F. – Guimaraes, V. – Sokol, H. – Dore, J. (2009):* The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *Biomedcentral Microbiology*. 9, 123-126.
- Moreira, A.P. – Teixeira, T.F. – Ferreira, A.B. – Peluzio Mdo, C. – Alfnas Rde, C. (2012):* Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *British Journal of Nutrition*. 108, 801–809.
- Nealson, K.H. – Venter, J.C. (2007):* Metagenomics and the global ocean survey: What's in it for us and why should we care? *Journal of Microbial Ecology*. 1, 185–187.
- Pajarillo, E.A. – Chae, J. – Balolong, M.P. – Kim, H.B. – Kang D.K. (2014):* Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *Journal of General and Applied Microbiology*. 60, 140–146.
- Palmer, C. – Bik, E.M. – Digiulio, D.B. – Relman, D.A. – Brown, P.O. (2007):* Development of the human infant intestinal microbiota. *Public Library of Science*. 5, e177.
- Pei, Z. – Bini, E.J. – Yang, L. – Zhou, M. – Francois, F. – Blaser, M.J. (2004):* Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 4250–4255.
- Peterson, J. – Garges, S. – Giovanni, M. – McInnes, P. – Wang, L. – Schloss, J.A. – Bonazzi, V. – McEwen, J.E. – Wetterstrand K.A. – Deal C. et al. (2009)* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* 19 (12): 2317–23.
- Quilodrán-Vega, S.R. – Villena, J. – Valdebenito, J. – Salas, M.J. – Parra, C. – Ruiz, A. – Kitazawa, H. – García, A. (2016):* Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 62, 514-524
- Relman, D.A. – Falkow S. (2001):* The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in Microbiology*. 9, 206–208.
- Relman, D.A. (2002):* New technologies. human–microbe interactions. and the search for previously unrecognized pathogens. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 186, S254–S258.
- Ren, X. – Ferreira, J.G. – Yeckel, C.W. – Kondoh, T. – de Aranjó, I.E (2011):* Effects of ad libitum ingestion of monosodium glutamate on weight gain in C57BL6/J mice. *Digestion*. 83, 32-36.

- Savage, D.C.* (1977): Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*. 31. 107–133.
- Schmidt, T.M. – Delong, E.F. – Pace, N.R.* (1991): Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*. 173, 4371–4378.
- Sender, R. – Fuchs, S. – Milo, R.* (2015): Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *Public Library of Science*. 14(8): e1002533.
- Shi, Z. – Luscombe-Marsh, N.D. – Wittert, G.A. – Yuan, B. – Da, i Y. – Pan, X. – Taylor, A.W.* (2010): Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. *British Journal of Nutrition*. 104, 457–463.
- Stahl, D.A. – Lane, D.J. – Olsen, G.J. – Pace, N.R.* (1984): Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*. 224, 409–411.
- Tringe, S.G. – Rubin, E.M.* (2005): Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*. 6. 805–814.
- Tyson, G.W. – Chapman, J. – Hugenholtz, P. – Allen, E.E. – Ram, R.J. – Richardson, P.M. – Solovyev, V.V. – Rubin, E.M. – Rokhsar, D.S. – Banfield, J.F.* (2004): Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. 428, 37–43.
- Verhelst, R. – Verstraelen, H. – Claeys, G. – Verschraegen, G. – Delanghe, J. – Van Simae, y L. – De Ganck, C. – Temmerman, M. – Vanechoutte, M.* (2004): Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BioMed Central Microbiol.* 4, 16–20.
- Winkler, H.* (1920): Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen- und Tierreiche. Jena Verlag Von Gustav Fischer.
- Woese, C.R. – Olsen, G.J.* (1986): Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *Systematic and Applied Microbiology*. 7, 161–177.
- Zhou, L. – Fang, L. – Sun, Y. – Su, Y.* (2016): Effects of the dietary protein level on the microbial composition and metabolomic profile in the hindgut of the pig. *Anaerobe*. 38, 61–69.

Zhou, X. – Bent, S.J. – Schneider, M.G. – Davis, C.C. – Islam, M.R. – Forney, L.J. (2004): Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 150, 2565–2573.

Internetes hivatkozás:

URL: <https://www.hmpdacc.org>

A szerző címe – Adress of the author:

HERCEG Emil Balázs* – LENCSEÉS-VARGA Erika – SZALAI Klaudia – TEMPFLI Károly – BALI PAPP Ágnes

Széchenyi István Egyetem,

Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,

Állattudományi Tanszék,

H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.

*E-mail: herceg.balazs@sze.hu