

## Akadeemiline loeng Tartu Ülikooli arstiteaduskonna 386. aastapäevale pühendatud teaduskonverentsil 11. oktoobril 2018

### Mikrobiota – inimese vältimatu partner

Agu Tamm – Tartu Ülikooli emeriitprofessor



Agu Tamm

Inimese mikrobiotaks (MB) nimetakse inimkeha kõikide mikroorganismide kogumit. Arvutuslikult on neid niisama palju kui inimkeha muid rakke (1 : 1). Seega pakuvad uurimused rikkalikult detaile, aga vähem üldisi vaateid, MB-töodes domineerivad enamasti mõju negatiivsed aspektid. Ka autori enda varasemad uuringud on piirdunud soole mikrofloora aktiivsuse suurenemise ning vähiriski ja toitainete imendumise häirete seoste uurimisega.

Tänu uute meetodite kasutuselevõtule on viimasel aastakümnel plahvatuslikult aktiveerunud mikrobiaalsete mõjude uurimine inimesel. Verstapostidena sellel teel peaks nimetama kaht suurt projekti: USA National Institutes of Health Human Microbiome Project (HMP 2007) ja Euroopa Liidu seitsmenda raamprogrammi projekt *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT 2008). Mikrobiomiks nimetakse kõikide nende mikroorganismide genoomide kogumit. See suhe olevat (1) inimese genoomiga võrreldes 1 : 150 mikrobiota kasuks!

Mõlema projekti eesmärgiks seati uurida meie kehas ja kehal elavate mikroobide kogukondi ning selgitada nende rolli inimeste tervisele ja haigustele. HMPs käsitleti mikroobe enam kui 15 paikmest, sh nahalt ja igemetaskutest kuni tupe tagumise võlvini. MetaHIT-s keskenduti soolestikule kui mikroobide suurimale reservuaarile, selle seostele kahe Euroopas olulise häirega – põletikulise soolehaigusega (*inflammatory bowel disease*, IBD) ja rasvumisega. Olulise tulemusena suudeti isikuid väljaheiteproovide metagenoomilise sekveneerimise alusel (1) rühmitada ühte kolmest enterotüübist, mis on määratletud domineeriva mikroobiperekonna *Bacteroid*'i, *Prevotella* või *Ruminococcus*'e alusel (2, 3). Teised uurijad

on soovitanud liigitada uuritavaid isikuid vastavalt nende mikrobiomide geneetilisele n-ö liigirikkusele: kas arvukus on alla või üle 480 000 geeni (4). Vaesemat MBd on leitud soolepõletikuga haigetel ja rasvunutel.

#### UUED UURIMISMEETODID

Viimasel aastakümnel on mikrobioomi uurimise meetodeid – lisaks klassikalistele kultuuridele – arendatud kolmes põhisuunas: DNA järjestuse uuringud (16S rRNA, DNA nn hajus tulistamine, ingl *shotgun*), RNA ekspresiooni uuringud ja väikeste molekulide uuringud (metaboloomika). Senini on esiplaanil olnud püüdlused selgitada, millised organismid võib leida sooles ja milline on nende suhteline arvukus, vähem on uuritud, millised on selle koosluse funktsioonid.

Mikrobioomi uurimused on andnud rohkesti infot metaboolsete radade kohta sooles. On suudetud kirjeldada vähemalt 50 metaboolset rada MB kui koosluse genoomis, näiteks laktoosi ja teiste suhkrute ning aromaatsete aminohapete lammutamisest kuni Fe(II) oksüdatsioonini. Üks nende geneetiliste meetodite suurimaid puudusi on, et ei suudeta näidata isiku MB tegelikku metaboolset aktiivsust, kuna tuvastatakse nii ekspresseeritud kui ka mitteekspresseeritud geene. Infot võib genereerida ka surnud rakkudest (5). Samas on teada, et rohkem kui pooled roojaproovides olevatest rakkudest ei ole elujõulised või on tugevalt kahjustatud. Kui RNA-põhiselt rakke sortida ning MB mikroobide koguarvu ja aktiivseid populatsioone eristada, võib leida suuri erinevusi. Seetõttu, kui kasutatakse töötlemata roojaproove, ei tohiks funktsionaalset mikrobioomi tuletada ainuüksi DNA-põhiste eksperimentide andmete testide alusel (6). Seevastu väikeste molekulide uurimine

(lühikese ahelaga rasvhapped, fenoolid, polüamiinid, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> jpt) annab küllaltki hea kvantitatiivse ülevaate toimuvast konkreetsel isikul.

Kokkuvõttes on metabooloomi uuringud osutanud MB mõjule vähemalt 5 koele-elundile (sool, maks, aju, rasvkude, skeletilihased), kuid ka energia ainevahetusele ja paljudele immuunprotsessidele. Samas tuleb arvestada inimese MB koostise tohutut individuaalset erinevust (7).

## SOOLE MIKROBIOOTA JA PEREMEHE DIEET

Tundub loogiline, et esmane küsimus on ikka, milline on dieedi mõju soole MB-le, ja sealt edasi, kas MB kaudu saaks mõjustada peremeest. On selge, et sama dieet ei mõjuta erinevaid inimesi ühtviisi. Kui võrreldi geneetiliselt rasvunud hiirte soolte MBd nende lahjade pesakonnakaaslaste omaga, samuti rasvunud ja lahjasid vabatahtlikke inimesi, selgus, et rasvumine on seotud kahe domineeriva bakteriaalse hõimkonna *Bacteroidetes*'e ja *Firmicutes*'e suhtelise arvukuse muutustega. Ilmnes, et rasvunu mikrooboomil on suurem võime saada dieedist energiat. Enamgi, see tunnus osutus ülekantavaks: kui iduvabu hiiri koloniseerida rasvunud inimese MBga, suurendab see nende hiirte keharasva kogust oluliselt enam kui n-ö lahja MBga koloniseerimine (8). Taanlastel tehtud uurimus näitas, et inimese rasvumisega seotud signaal seedetrakti mikrooboomist võib olla palju tugevam kui inimese praegu teadaolevast genoomist saadav signaal, kui püütakse eristada rohke ja vähese geeniarvuga isikuid (4). Praktilise rakendusena: sel osal rasvunuist, kelle organism allub püüdlustele kehakaalu vähendada mingit tüüpi dieediga, on MB geenisagedus väiksem ja suurema variaablusega.

Üheks soole mikrooboomi uuringute silmapaistvaks tulemuseks on *Akkermansia muciniphila* lugu. *A. muciniphila* avastati 2004. aastal. Uue generatsiooni uuringute alusel osutus ta kõige arvukamaks üksikliigiks inimese sooles (0,5–5% kogu bakterite hulgast). Ta on gramnegatiivne anaeroobne bakter, spoore ei moodusta ja on spetsialiseerunud lima kasutamisele. Kui teda on vähe, on soole limakiht õhem, kuid enam on rasvumust, diabeeti, kardiometaboolseid haigusi ja madala intensiivsusega põletikku (9). Arvukatel prekliinilistel mudelitel on

näidatud, et *A. muciniphila* manustamine kaitseb hiiri toidust põhjustatud rasvumise eest, suurendab soole limaskestast barjääri funktsiooni ja vähendab insuliiniresistentust, samuti soole- ja süsteemset põletikku (10). *A. muciniphila* välismembraanis esinev spetsiifiline valk (Amuc\_1100), millel on samasugune toime kui bakteril, võib osutada tugevaks kandidaadiks edasiste ravimite väljatöötamiseks ja sel ravimil oleks lai kasutusvaldkond.

## MIKROBIOOTA JA ALATOITLUS KVAŠIORKORI NÄITEL

Nagu teada, pole maailma tervishoiu suurim probleem ülekaalusisus, vaid nälg. Esimestel eluaastatel on suurim lapse surma põhjustaja alatoitumus. Kvašiorkor, tõsine ägeda alatoitluse salapärase vorm, on ebapiisavate toitainete tarbimise ja täiendava keskkonnamuutuse tagajärg. On selgunud, et üksnes kasutusvalmis terapeutiline toidu (KVTT) laialdasest rakendamisest ei piisa suurema vältimiseks (11). Toidu mõju, ükskõik kui rikas see on, sõltub olulisel määral vastuvõtva peremehe soolestiku mikroobidest, mis võivad muutuda ka vaenulikuks (12, 13). Malawi on üks selliseid maid, kus umbes 46 protsenti alla viieaastastest lastest on kängu jäänud, 21 protsenti on alakaalulised. Leiti, et amoksitsilliini või tsefdiniiri lisamine KVTT-le kvašiorkoriga laste ravi parandas märgatavalt taastumist, vähendas suremust ja suurendas kehakaalu. Raviefekti selgitades uuriti 317 Malawi kaksikute paari, kellest 43%-l oli KVTT lahkneva raviefektiga (14). Kui lahkevate tulemustega kaksikute fekaalset MBd siirati gnotobiootilistele hiirtele, ilmnes, et Malawi toidul oleva kvašiorkori MB põhjustas retsiipienthiirte märkimisväärset kehakaalu kaotust, millega kaasnesid häired aminohapete ja süsivesikute metabolismis. Selleks, et kaalukaotust vältida, pidi MBs leiduma mikroobide kombinatsioon (*R. gnavus* + *C. symbiosum*), mis soodustaks insuliinisarnase kasvufaktori produktsiooni (13). Need leiud viitavad soolestiku MB-le kui kvašiorkorit põhjustavale teguritele. Tugeva alatoitluse ravi antibiootikumidega võib mõjutada selle inimese MB koostist, et soodustada toitainete paremat kasutamist.

## MIKROBIOOTA JA AJU

Prekliinilised ja kliinilised uuringud on näidanud kahesuunalist koostoimet

aju-soole-mikrobioomi teljel. Soolestiku mikroobid edastavad impulsse kesknärvisüsteemi (KNS) vähemalt kolme paralleelse ja interaktiivse kanali kaudu, mis hõlmavad närvisüsteemi, sisesekretsiooni ja immuunsüsteemi signaale. Aju võib mõjutada soolestiku mikrobiootika koostist ja funktsiooni autonoomse närvisüsteemi kaudu, moduleerides teatud sooleosade mootorikat, soolepassaazi ja -sekretsiooni ning soole limaskesta läbilaskvust, samuti (potentsiaalselt) hormoonide luminaalse sekretsiooni kaudu, kui moduleeritakse otseselt mikroobset geeniekspressiooni.

Prekliinilised uuringud kirjeldavad seost soole-mikrobioomi ja ärritatud soole sündroomi ja rasvumise vahel, aga ka seoseid mitmete psühhiaatriliste ja neuroloogiliste haiguste patogeneesi tasandil (15). Selliseid varasemaid viiteid enamasti ignoreeriti, kuni Sudo kaasautoritega (16) näitas 2004. aastal esimesena, et soole normaalse MB puudumine varajases eas mõjutab märkimisväärselt täiskasvanud hiire stressitundlikkust ja et neid muutusi võib osaliselt vähendada soolestiku varajase koloniseerimisega tavapärase MBga, isegi ühe liigiga.

Edasised uuringud on iseloomustanud MBst lähtuvaid neurokeemilisi muutusi. Muutub ajukoore ja hipokampuse poolt toodetud neurotroopsete faktorite tase, väheneb hipokampuse serotoniini (5-HT) retseptori 1A ekspressioon, suureneb võotkeha monoamiini käive ja sünapside plastilisus väheneb (17, 18). KNSi ja mikrobiota suhtlust vahendavad mitmesugused mikroobide toodetud molekulid, sh lühikese ahelaga rasvhapped, sekundaarsed sapphapped ja trüptofaani metaboliidid. MB võib iseseisvalt toota või kaasa aidata mitmete neuroaktiivsete molekulide, sealhulgas, kuid mitte ainult  $\gamma$ -aminovõihappe, serotoniini, noradrenaliini ja dopamiini tootmisele. Siiski pole seni teada, kas virgatsid jõuavad asjakohastesse retseptoritesse või kas saavutavad piisava taseme, et peremehel reaktsiooni esile kutsuda.

Mitmete psühhiaatriliste (depressioon, ärevus) ja neuroloogiliste haiguste (Parkinsoni tõbi, autismispektri häired) puhul kaasnevad patsientidel märkimisväärsed seedetraktivaevused. Seetõttu viitavad hiljutised uuringud soolestiku MB tähtsusele mitte ainult gastrointestinaalsete sümptomite patofüsioloogias, vaid ka MB potentsiaal-

sele rollile esimeses haiguses. Kaks erinevat tüüpi uuringut võiksid viidata põhjuslikule seosele. Esiteks, *E. coli* alatüüpide puhangud viisid tabandatud elanikkonnas Kanadas ja Saksamaal depressioonist ja ärevusest põhjustatud sümptomite sagenemiseni (19). Teiseks, depressiivse inimese väljaheite mikroobide transplantatsioonid põhjustasid rotimudelites depressiivset käitumist (20). Võimalikule põhjuslikule seosele viitavad need andmed, mis näitavad, et Parkinsoni tõve mudeli närilistel suurenevad liikumishäired, kui neile üle kanda Parkinsoni tõvega patsientide MB, aga seda toimet ei ole, kui üle kanda tervete kontrollisikute MB (21). Sel juhul võivad seedetrakti sümptomid olla juba haiguse prodroomiks. Selline võimalus muudab soolestiku MB paljutõotavaks teabeallikaks Parkinsoni tõve diagnoosimisel ja prognoosimisel.

Kokkuvõttes, kliiniliste andmete kogunedes võib selguda MB mitmekesine ja oluline mõju KNSi fenotüüpidele. Mõistatavalt on käimas olevate teadusuuringute eesmärk tuvastada uusi ravimärklaudu ja töötada välja ravistrateegiaid.

## MIKROBIOOTA JA KARTSINOGENEES

Arvestades soole mikrofloora ülisuurt metabolismet võimekust, on ammu arvatud, et mõnel juhul suudaks mikrofloora ka kokartsinogeene toota (22). Siiski pole sellised otsese teguri otsingud suutnud selgitada soolevähi teket isegi perekondliku polüpoosi korral. Alles viimastel aastatel, kui on fekaalse MB kõrval hakatud uurima jämesoole limaskestaga seotud mikroobe (23) või mikrobiome (24), on tekkinud selgem ettekujutus jämesoolevähi patogeneesist. Dejea kaasautoritega (2018) tuvastas perekondliku adenomatoosiga patsientide jämesoole limaskestal koldelisi bakteriaalseid biofilme, mis koosnesid peamiselt *Escherichia coli*'st ja *Bacteroides fragilis*'est. Võrreldes tervete inimestega oli patsientide jämesoole limaskestal väga rikkalikult geene, mis kodeerivad onkotoksiinide sekretsiooni (kolibaktiini ja *Bacteroides fragilis*'e toksiini). Tuumorile vastuvõtlike hiirte koloniseerimine nende kahe tüvega suurendas interleukiin-17 sisaldust sooles ja DNA kahjustust soolepiteelis. Neil hiirtel kiirenes kasvaja tekkimine ja suurenes suremus, võrreldes ainult ühe bakteritüvega koloniseeritud

hiirtega. Seega, tuumori tekkeks on vaja mitme kahjustava teguri üheaegset toimet otse limaskestale, lisaks mõjutab organismi veel peremeesorganismi geneetiline eelsoodumus haiguse suhtes.

Analoogne on olnud maovähi patogeneesi selgitamine. *Helicobacter pylori* krooniline infektsioon on kõige tugevam teadaolev riskitegur mao adenokartsinoomi tekkeks, kuid siiski mitte ainus. Üllatusena on mikrobioomi uuringud tõestanud mao limaskesta rohket kolonisatsiooni (8 hõimkonna mikroobidega!), viidates *H. pylori*'le kui olulisele mao MB regulaatorile (25).

*H. pylori* on gramnegatiivne bakter, mis selektiivselt koloniseerib mao epiteeli ja mida peetakse mao MB endogeenseks liikmeks, sest populatsioonides on 30–94% (26) nakatunud *H. pylori*'ga. Samas vaid 1–3%-l *H. pylori*'ga koloniseeritud isikutest areneb mao adenokartsinoom (27, 28). Selles protsessis on vaja arvestada nii *H. pylori* tüvede erineva virulentsuse ja adhesiivsusega kui ka peremehe interleukiini1-beeta ja tuumori nekroosifaktor-alfa polümorfismidega, samuti keskkonnateguritega nagu suure soolasisaldusega ja rauavaene dieet.

Seega, olukordi, kus MB seostub peremehe haiguste riski suurenemisega või häire tekkega, tuleks käsitleda kui kõrvalekallet MB ja peremehe vastastikusest kasulikust koostööst (29).

## MIKROBIOOTA POSITIIVNE MÕJU

On leitud, et soole mikroobid toovad peremehele kasu õige mitmel viisil. Nende seni teadaolevad soodsad mõjud hõlmavad järgmisi protsesse (8):

- soodustatakse kasulike toidukomponentide muundamist ja hõlbustatakse nende kasutuselevõtmist;
- valmistatakse kasulikke fermentatsiooniprodukte, mis mõjutavad soolesisaldise pH-d ja mõjustavad soole limaskesta epiteelirakke;
- tõrjutakse välja patogeene, konkureerides nendega kinnituskohdade pärast soole limaskestal;
- vastastikustes mõjutustes soole immuunsüsteemiga aidatakse kaasa nii loomuliku kui ka omandatud immuunfunktsiooni kujunemisele ja reguleerimisele;
- mürgiseid aineid kas muundatakse, lahjendatakse või eemaldatakse;
- väljaheite hulga moodustamises osaledes vähendatakse mao-soole passaaži aega.

## KOOSTÖÖVAJADUS MIKROBIOOTA UURIMISEL JA RAKENDAMISEL

MB seoste ja võimalike mõjude tulemusliku uurimistöö üks eeldusi on erialade koostöö. Ülalpool kõneks olevais MB uurimise meetodikais tunnevad end mugavamalt prekliiniliste erialade spetsialistid, kuid kaugem eesmärk on tulemusi saada kliinilistes olukordades, mida valdavad täies ulatuses üksnes nende erialade spetsialistid. Tänapäevase teadustöö üldine tendents aga on pea igal alal süvenemine üpris kitsale lõigule omaenda erialas. Parima lõpptulemuse saavutamiseks on aga vaja käsitluse konkreetsust võimalikult kõigis valdkondades.

Kuna suur osa (kuni 80%) MBst on seni osutunud mittekultiveeritavaks, on kultuurist sõltumatute molekulaarsete meetoditega saadud palju uusi teadmisi soolestiku MB koostise ja mitmekesisuse kohta. On ilmnunud, et inimese soole MB on veelgi keerulisem ökosüsteem, kui varem eeldati. Enamik kultuurist sõltumatutest meetoditest tuginevad väga konservatiivse 16S ribosomaalse RNA (rRNA) geeni järjestusele bakteritel ja arhedel. Andmete hiiglaslik hulk omakorda nõuab mikrokiipide kasutamist ning uusi biostatistika meetodeid. Samas peab arvestama, et vaatamata oma nimetatud eelistele ei suuda metagenoomika määrata mikroobse geeni ekspressiooni. Soolestiku mikrobioomi funktsionaalse aktiivsuse määramiseks on vaja kasutada teisi meetodeid nagu ainevahetuse vahe- ja lõpp-produktide määramist (metaboloomika).

## MIKROBIOOTA JA TSÜKLILISTE AMINOHAPETE METABOLIIDID NEERUHAIGUSTE NÄITEL

Alljärgnevalt on püütud viidata vajadusele taotleda konkreetsust nii meetodites, eksperimendi seadetes, kliinilistes andmetes kui ka terminites.

Aastakümneid olid teada ja kliinilistes uuringutes rakendatud sellised soolest pärinevad bakteriaalsed metaboliidid nagu indool ja p-kresool. Neid tunti tüüpiliste ureemia toksiinidena. Samas ei seostatud nende tekkimist kindlate mikroobidega ega aminohapetega, vaid lihtsalt nn valkude bakteriaalse fermentatsiooniga. Siis aga selgus, et nende ühendite suurem sisaldus veres seostub kroonilise neeruhaigusega patsientide suurema suremusega südame-veresoonkonna haigustesse (30, 31).



Järgneval põhjalikumal analüüsil osutus p-kresool selliste südame-veresoonkonna haiguste ennustajaks, mis ei sõltunud ei glomerulaarsest filtratsioonikiirusest ega traditsioonilistest Framinghami riskiteguritest (32). Autorid küll ei teadnud, kas p-kresool kui kardiovaskulaarne riskitegur on patsientidel modifitseeritav. Vastav katse prebiootilise oligofruktoosinuliini manustamisega 4 nädala jooksul vähendas oluliselt p-kresüülsulfaadi tekkimise kiirust ja seerumi kontsentratsiooni hemodialüüsipatsientidel. Samal ajal indoksüülsulfaadi vastavad näitajad märkimisväärselt ei muutunud (33). Nende leidude põhjal järeldasid autorid, et indoksüülsulfaat ja p-kresüülsulfaat pärinevad teineteisega mitteseotud bakteriaalse ainevahetuse radadelt, jättes lahtiseks küsimuse nende produktide potentsiaalsetest tootjatest.

Indooliga erilist vaidlust ei teki, et selle tootjad on paljud indoolpositiivsed mikroobid, mille toksiline produkt sulfaateeritakse maksas. P-kresooliga oli asi keerukam. Selle artikli autori tööühm on juba varem avaldanud andmed türosiini kohta ning p-hüdroksü-fenüüläädikhapest p-kresooli tootvate mikroobide kohta nii *in vitro* (22, 34, 35) kui ka *in vivo* (36, 37). Tööühm leidis rohkem seoseid katseloomade soole limaskestal resideeruvate mikroobidega kui soolevalendiku mikroobidega. P-kresooli eeldatavate produtseerijate hulgas on nii aeroobe nagu stafülokokid kui ka anaeroobe nagu klostriidid, bakteroidid ja bifidobakterid (22, 37, 38). Bakke (39) on postuleerinud, et efektiivseks tootmiseks olgu vastavaid mikroobiliike keskkonnas kaks, kuna protsess kulgeb vaheühendite kaudu. Erineva ja selektiivse toimespektoriga antibiootikumide manustamise järel käitused p-kresool ja indool täiesti erinevalt, mistõttu on alust kinnitada, et nende tootjad on valdavalt erinevad (36). Hiljutised ülevaated tõendasid, et p-kresooli tootjad paigutuvad hõimkonda *Firmicutes* (*Clostridia*, *Ruminococcaceae* jms), indoolpositiivseid aga leidub lisaks veel 5 muus hõimkonnas (40). Saito 2018. aasta *in vitro* katsetes täpsustati, et p-kresooli tootsid rohkesti *Coriobacteriaceae* ja *Clostridium*'i klastritest XI ja XIVa testitud liigid, teised liigid vähem (41). Kui siia lisada, et just *Clostridium*'i klatri XIVa rühm võib moodustada kuni 60% limasihiga kinnitatud MBst, siis saame taas viite jämesoole limaskesta

MB spetsiifilise rolli kohta, kuid ka täpsema määratluse, kust otsida p-kresooli tootjaid.

Teiseks on niisama oluline kliiniliste andmete konkreetsus. Allpool mõned vastavad näited. Neeruhaiguste puhul on selged kriteeriumid haiguse raskuse kohta. Neid staadiume tuleb uurijail seoste otsimisel kindlasti arvestada. Annab ju metaboliitide määramine hetkeseisu biokeemiliste sündmuste kohta kroonilise neeruhaiguse progresseerumisel. Shah ja kaasautorid (42) tuvastasid läbilõikelises metaboliitide uuringus, et plasma metaboliitide profiilid on 2., 3. ja 4. faasis kroonilistel neeruhaigetel oluliselt erinevad. Muutused puudutasid arginiini ainevahetust, koagulatsiooni ja põletiku suurenemist, karboksülaadi anioonide transportimist ja steroidhormoonide tootmise vähenemist neerupealistes. Nende erinevuste arvestamisega võib jõuda neeruhaigustega seotud etapispetsiifiliste biomarkeriteni. Rhee kaasautoritega (43), kasutades plasmaproove 1434-lt Framinghami uuringus osalenud inimeselt, kellel 8 aastat varem polnud kroonilise neeruhaiguse tunnuseid, leidis, et haiguse ilmumist võib prognoosida ainult 9 metaboliidi alusel (kromato-mass-spektromeetiline määramine). Siinkohal tuleb ka lisada, et ainult osa neist metaboliitidest pärinesid MBst, ülejäänud aga peremehe ainevahetusest. Seega, üht olulist faktorit – MB korrelatsioone – uurides ei või tähelepanuta jätta ka muid samal ajal toimivaid tegureid.

Poesen kaasautoritega (44) uuris samal ajal nelja rühma (hemodialüüsi saavad patsiendid, terved isikud, vanusega sobitatud terved ja isikud, kes sõid sama toitu kodus). Kuigi hemodialüüsi ja mõlema terve kontrollrühmaga patsientide väljaheiteprofiilid eristusid selgesti, vähenes see erinevus sama toitumisharjumusega leibkonna tulemuste arvesse võtmisel. Seevastu ilmnesid märkimisväärsed erinevused rottide väljaheiteproovide vahel 6 nädalat pärast 5/6-nefrektoomiat, võrreldes nefrektoomiata opereeritud rottidega ning see viitab siiski sõltumatule neerufunktsiooni kahjustuse mõjule katseloomadel. Seega saab seostada kroonilist neeruhaigust jämesoole spetsiifilise mikroobse ainevahetusega, kuigi neerufunktsiooni kahjustuse mõju inimesel võib iseenesest olla vähema tähtsusega võrreldes toidu ja muude neeruhaigusega seotud tegurite (ravimid, kaasnevad haigused) mõjuga.

Selgemad erinevused soole mikroobioomis ilmnevad lõppstaadiumis neeruhaiguse korral (45). Võrreldes sadu toimivaid taksonoomilisi ühikuid (Ttü, ingl *OTU*), leiti, et patsientidel oli *Brachybacterium*'i, *Catenibacterium*'i, *Enterobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Nesterenkonia*, *Polyangiaceae*, *Pseudomonadaceae* ja *Thiothrix*'i perekonna taksonoomilisi ühikuid tunduvalt enam. Eelmisele viitele analoogsed nefrektoomiaga rotikatses leiti bakteriaalsete Ttü-de suurim erinevus ureemiliste ja kontroll-loomade vahel, eriti *Lactobacillaceae* ja *Prevotellaceae* perekondade vähenemine. Seega esineb ureemia korral soolestiku mikroobioomis ulatuslikke muutusi. Selle nähtuse bioloogiline mõju ei ole teada ja ootab edasist uurimist, et jõuda kliinilise rakenduseeni.

Seni jääb ka lahtiseks, kumb neist muutustest on primaarne, kas düsbiootiline mikroobioom on kroonilise neeruhaiguse põhjus või tagajärg. Kui vastastikuste stimulatsioonide *circulus vitiosus* on juba käivitunud, genereeritakse suuremas koguses ureemia toksine sooles. Kuidas neid protsesse maha suruda, peavad näitama edaspidised laiaulatuslikud uuringud, enne kui saab soovitada mõnd meetodit kliiniliselt rakendada (46). Ameerika Ühendriikide diabeedi, seede- ja neeruhaiguste instituut (NIDDK) ongi käivitanud kaks sellist projekti, et kombineerida metagenoomika ja metabooloomika võimalusi neeruhaigete uurimisel (47). Praeguseks on näha, et metagenoomika võimaldab avastada olulisi suundi MB koostises, sh ulatuslikus seni kultiveerimata MB osas, metabooloomika aga dešifreerida seni tundmatuid funktsionaalseid seoseid peremeesorganismi ja MB vahel. Siiski tuleb arvestada, et nendel paljutöötavatel meetoditel on nii oma eelised kui ka oma piirangud.

## TULEMUSTE SÕLTUVUS MEETODITEST

Hugon jt (48) võrdlesid tänapäevaseid meetodeid väljaheite MB uurimisel. Nende analüüs hõlmas Grami järgi värvimist, voolutsütoomeetriat, transmissioon-elektronmikroskoopiat (TEM), *Bacteroidetes*'e ja *Firmicutes*'e hõimkonna kvantitatiivset reaalaajalist PCRi (qPCR) ja V6-piirkonnale suunatud 16S rRNA geenimaterjali pürosekvenceerimist. Autorite arvates näitas uuring, et inimese soole mikrobioota kogu mitmekesisus ei ole

teada, sest erinevate tehnikatega saadakse väga erinevaid tulemusi. Nad järeldasid põhjendatult, et bakterikogukondade üldise koostise hindamiseks tuleb kombineerida mitmeid meetodeid ja et igast meetodist tulenevate lahknevuste tundmine võiks olla kasulik molekulaarsete uuringutega leitud oluliste erinevuste selgitamisel.

## KONKREETSUST JA TÄPSUST KA TERMINITES

Lõpuks on soovitatav taotleda konkreetset ja täpsust ka terminites. Planeeritud rahvusvahelisi projekte nimetatakse „hästi määratletud uuringuteks“ (47). Nende jälgitavust soodustab konkreetsus ka terminites. Ka käesolevas tekstis on eespool sageli kasutatud soole mikrobioota sünonüümina väljaheite materjali MBga, nagu paljud autorid kasutavad. Tegelikult on siiski tegemist vaid jämesoole valendiku distaalse osa MBga, mis on kõige kergemini kättesaadav materjal. Samas võib väljaheitest saadud MB uurimise tulemus erineda jämesoole limaskestal limakihis resideeruvast kooslusest, kindlasti erineb see suuresti peensoole MBst. Nii ongi selle artikli sissejuhatuses kirjeldatud MB „enterotüüpe“ soovitatud (49) nimetada pigem „fekotüüpideks“, sest peensooles domineerivad hoopis perekonnad *Streptococcus*, *Clostridium* ja *Veillonella*.

## MIKROBIOOTA UURIMISE PERSPEKTIIVID

MB uurimise perspektiividest tuleks nime- tuda soovi a) avastada uusi olulisi seoseid, sh positiivseid teineteist toetavaid suhteid MB ja peremeesorganismi vahel; b) mõjustada MBd peremehele soodsas suunas; c) metoodilisi probleeme, mille lahendamine kiirendaks kliiniliste seoste uurimist ja rakendusi.

Arvestades uute andmete rohkust, on uute seni kirjeldamata seoste avastamine ootuspärane. Siis peab ainevahetusradade uurimine näitama uusi sihtmärke, mille kaudu saaks süsteemi mõjustada. Siinkohal oleme tõesti vaid tee hakul. Peamiselt on hästi teada võimalused mõjustada MBd erineva toimespektriga antibiootikumidega. Nende vajaduses akuutsetel juhtudel pole kahtlust. Väga vähe on seni uuritud tegevuste pikaajalisi tagajärgi ja kõrvaltoimeid, sh antibiootikumide kaugtagajärgi. Kuidas targalt juhtida seda nõrka põletikureaktsiooni inimese organismis, mida

seostatakse ka soole MBga ja on tõsise huvi objektiks nii südame-veresoonkonna- kui ka liigesehaiguste puhul? Osa tuleviku-loomatuse on pandud prebiootikumidele, mis järgivad looduslikke mõjutusi MB-le. Eeldatakse, et inuliinitüüpi fruktaanidel ja galakto-oligosahhariididel võiks olla mõju metaboolse endotokseemia raviks või väikese aktiivsusega põletiku vähendamiseks ülekaalulistel ja rasvunud inimestel (50, 51). Samas ei ole tõenäoline, et üks ja sama prebiootikum (või mis tahes muu faktor) sobib ühtviisi kõikidel juhtudel.

Tõendus põhine ravi eeldab vastavat diagnostikat. Kui praegu on teada, et MBs saab eristada vähemalt 3 põhimõtteliselt erinevat MB tüüpi, siis on ootuspärane, et igale neist võib (võivad) olla ainult temale sobiv(ad) mõjustaja(d). Esimene väga suur probleem on see, kuidas ja millal suudetakse lahendada metoodilised raskused MB ja peremehe suhete hindamisel nüüd, mil tänu keerukatele MB kultiveerimiseta molekulaarsetele tehnikatele on täielikult muutunud ettekujutus MB koostisest ja rollist. Kas need MB tüübid on inimesel aastatepikku püsivad või saab neid ka muuta soovitavas suunas? Kas nende variantidest sõltub toitainete ja ravimite käsitlus? Alustuseks püütakse välja selgitada n-ö terve inimese MB koostis. Kuidas defineerida tervist ja tervet inimest? Kindlasti leitakse siin piirkondlikke ja etnilisi erinevusi.

Probleem on seegi, et esialgu käsitletakse nii pre- kui ka probiootikumide toidulisandina, mille puhul – erinevalt ravimite testimisest – isegi juhuslikustatud kliinilistes katsetustes üldse ei uurita võimalikke kõrvaltoimeid (52). Kui soovime kasutada teadmisi kolmest MB tüübist, siis selle teabe kasutamiseks on esmalt vaja kliiniliselt rakendatavaid meetodeid nii inimese MB lähteseisundi hindamiseks kui ka ravitulemuste jälgimiseks. Sarnaselt kosmoseteadustega on siin kindlasti parimaks viisiks laialdane rahvusvaheline koostöö. Nüüdne kiiresti laienev tööpõld ootab vaimukaid uurijaid.

## KIRJANDUS

1. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65.
2. Arumugam M, Raes J, Pelletier, E et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174–80.
3. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 2018;3:8–16.

4. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;500:541–6.
5. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00104
6. Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D'Auria G. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PLoS One* 2011;6: e22448.
7. Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front Microbiol* 2016;7:1144.
8. Hullar MA, Burnett-Hartman AN, Lampe JW. Gut microbes, diet, and cancer. *Cancer Treat Res* 2014;159:377–99.
9. Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of akkermansia muciniphila. *Front Microbiol* 2017;8:1765.
10. Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 2017;23:107–113.
11. Trehan I, Goldbach HS, LaGrone LN, et al. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N Engl J Med* 2013;368:425–35.
12. Ley RE. Nutrition: when guests turn HS. *Nature* 2013;494:437–8.
13. Chu DM, Aagaard KM. Microbiome: eating for trillions. *Nature* 2016;532:316–7.
14. Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science* 2013;339:548–54.
15. Martin CR, Osadchiv V, Kalani A, Emeran A, Mayer EA. The brain-gut-microbiome axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;6:133–48.
16. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004;558:263–75.
17. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster J.A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:255–64.
18. Diaz HR, Wang S, Anuar F, Qian Y, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3047–52.
19. Kelly JR, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. *Ann Epidemiol* 2016A;26:366–72.
20. Kelly JR, Borre Y, O'Brien C, et al. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res* 2016;82:109–18.
21. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* 2016;167:1469–80.
22. Bone E, Tamm A, Hill M. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am J Clin Nutr* 1976;12:1448–54.
23. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* 2018;359:592–7.
24. Thomas AM, Jesus EC, Lopes A, et al. Tissue-associated bacterial alterations in rectal carcinoma patients revealed by 16S rRNA community profiling. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:179.
25. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS US* 2006;103:732–7.
26. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2014;Suppl 1:1–5.
27. Mégraud F, Bessède E, Varon C. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect* 2015;11:984–90.
28. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Coburn LA. The role of the microbiome in gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2016;45:543–56.
29. Candela M, Turrioni S, Biagi E, et al. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol* 2014;20:908–22.
30. Meijers BK, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2008;73:1174–80.
31. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1551–8.
32. Meijers BK, Claes K, Bammens B, Henriette de Loo, et al. p-cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1182–9.
33. Meijers BK, De Preter V, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:219–24.
34. Yokoyama MT, Carlson JR. Production of skatole and p-cresol by a *Rumen Lactobacillus* sp. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:71–6.

35. Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 1996;81:288–302.
36. Tamm AO, Vija MP, Pihl VO, Kuusk IE. Biochemical methods in control of the efficiency of oral antibacterial therapy. In: *Human Gastrointestinal Microflora*. H. Bernhardt, M. Knoke (Eds). Leipzig: JA Barth Verlag; 1982:236–42.
37. Tamm AO, Siigur UH, Mikelsaar ME. Vlijanie antibiotikov na kišetšnuju mikrofloru i produkciju metabolitov. *Antibiotiki i himioterapija (Moskva)* 1989;34:409–14.
38. Tamm A, Siigur U, Mikelsaar M, Vija M. Output of bacterial metabolites as a diagnostic means. *Nahrung* 1987;31:485–92.
39. Bakke OM. Studies on degradation of tyrosine by rat caecal contents. *Scand J Gastroenterol* 1969;4:603–8.
40. Kaur H, Das C, Mande SS. In Silico analysis of putrefaction pathways in bacteria and its implication in colorectal cancer. *Front Microbiol* 2017;8:2166.
41. Saito Y, Sato T, Nomoto K, Tsuji H. Identification of phenol- and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiology Ecology* 2018, doi: 10.1093/femsec/fiy125.
42. Shah VO, Townsend RR, Feldman HI, Pappan KL, Kensicki E, Vander Jagt DL. Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:363–70.
43. Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1330–8.
44. Poesen R, Karen Windey K, Ellen Neven E. The Influence of CKD on colonic microbial metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:1389–99.
45. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* 2013;83:308–15.
46. Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS. Role of the gut microbiome in uremia: a potential therapeutic target. *Am J Kidney Dis* 2016;67:483–98.
47. Nallu A, Sharma S, Ramezani A, Muralidharan J, Raj D. Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. *Transl Res* 2017;179:24–37.
48. Hugon P, Lagier JC, Robert C, et al. Molecular studies neglect apparently gram-negative populations in the human gut microbiota. *J Clin Microbiol* 2013;51:3286–93.
49. Siezen RJ, Kleerebezem M. The human gut microbiome: are we our enterotypes? *Microb Biotechnol* 2011;4:550–3.
50. Fernandes R, do Rosario VA, Mocellin MC, Kuntz MGF, Trindade EBSM. Effects of inulin-type fructans, galacto-oligosaccharides and related synbiotics on inflammatory markers in adult patients with overweight or obesity: A systematic review. *Clin Nutr* 2017;36:1197–206.
51. Nicolucci AC, Hume MP, Martínez I, Mayengbam S, Walter J, Reimer RA. Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology* 2017;153:711–22.
52. Bafeta A, Koh M, Riveros C, Ravaud P. Harms reporting in randomized controlled trials of interventions aimed at modifying microbiota: a systematic review. *Ann Intern Med* 2018;169:240–7.