

1. Uvod

Pretilost je veliki zdravstveni izazov koji zahvaća više od **1.9 milijardi** odrasle populacije. Tijekom prošlog desetljeća, **crijevna mikrobiota** je prepoznata kao komponenta koja direktno utječe na naše zdravlje te se implicira da je stvarni uzrok pretilosti. Standardne računalne metode za ispitivanje mikrobni zajednica ne uzimaju u obzir ponašanje i promjenu bakterijskih vrsta kroz vrijeme. **Dinamičko modeliranje** pruža **alternativan i učinkovit mehanizam** za izravnu analizu podataka mikrobioma pružajući mogućnost predviđanja budućih obrazaca ponašanja ekosustava. Inspirirani modelima korištenim u ekologiji, proširujemo **generalizirane jednadžbe Lotka-Volterra** kako bi modelirali crijevni mikrobni ekosustav i njegovu dinamiku u ovisnosti o vanjskim faktorima.

2. Opis problema

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi **dinamičke interakcije** sastava crijevne mikrobiote kod **pretilih** osoba sa i bez **probiotičkih i prebiotičkih perturbacija**.

3. Metodologija

Fekalni uzorak zdrave pretila žene korišten je kao izvor mikrobne kulture za inokulaciju hranjivog medija. Provedene su **četiri uzastopne kultivacije** u bioreaktoru, **dva kontrolna uzgoja** i **dva tretirana uzgoja** pod utjecajem probiotika i prebiotika. Uzorci iz svaka od 4 bioreaktorska uzgoja uzeti su svakih **12 sati** tijekom razdoblja od **72 sata**, ukupno **28 uzoraka**.

Kako bi se istražila mogućnost utjecaja na "ravnotežu", odnosno omjer ključnih mikrobni zajednica, crijevne mikrobiote pomoću dodatka hranjivoj podlozi (prebiotika i probiotika), korišten je **BACI** (Before After Control Impact) dizajn. Uzevši u obzir prirodne faktore promjene mikrobiote u procesu kultivacije bioreaktora, uzgoj tretiran probiotikom i prebiotikom uparen je s ne tretiranim uzgojem.

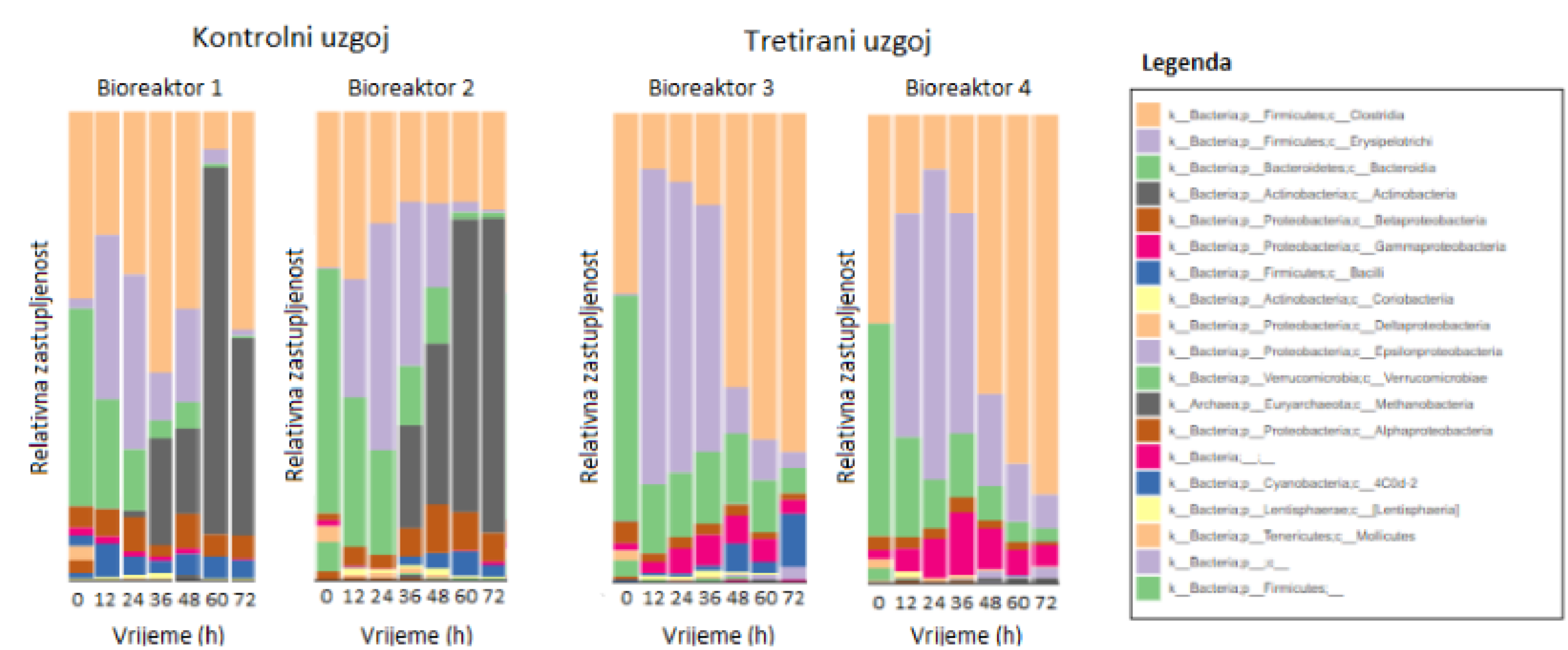
Najčešći pristup mikrobnom modeliranju u ekologiji zasnovan je na tradicionalnim **predator-plijen sustavima**, poznatim i kao **generalizirani Lotka-Volterra modeli** (gLVM). gLVM se temelje na **običnim diferencijalnim jednadžbama** (ODE) koje modeliraju **logistički** rast vrsta, **prirodno opisuju** predator-plijen kretanja, a koriste se za proučavanje dinamike mikrobni ekosustava od jednostavnog sira do ljudske mikrobiote.

U ovom istraživanju korišten je **BEEM algoritam** kako bi se generaliziranim Lotka-Volterra modelom modelirala dinamika crijevne mikrobne zajednice na temelju sekvencioniranih metagenomskih podataka (16S).

Prirodno, sekvencioniranje mikrobioma pruža relativnu zastupljenost vrsta u uzorku, umjesto apsolutnog broja, što je osnovni uvjet za primjenu gLVM.

BEEM, osim gLVM, uključuje **iterativni algoritam maksimizacije očekivanja** za istodobno dobivanje faktora rasta (mikrobna biomasa) i varijabli modela (brzina rasta mikroba i uvjeti interakcije) iz longitudinalnih podataka i stoga izravno koristi relativne vrijednosti dobivene sekvencioniranjem.

4. Rezultati



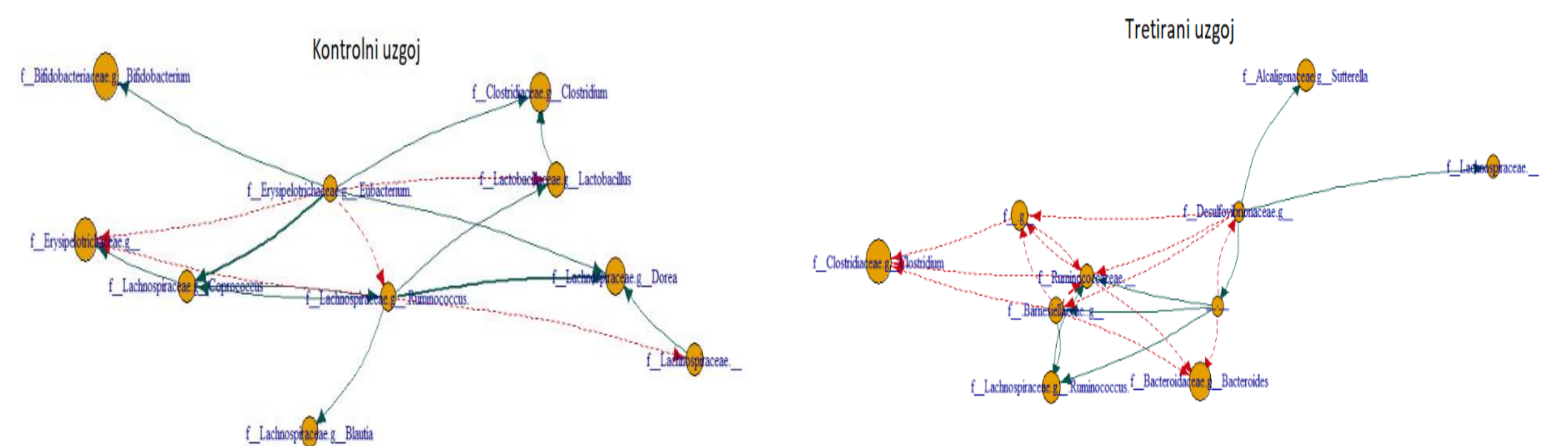
Slika 1. Taksonomska raznolikost kontrolnih i tretiranih uzgoja

MANOVA tablice pokazuju **značajan učinak** dodatka probiotika i prebiotika u proces bioreaktorskog uzgoja mikrobiote. Rezultati BACI testiranja su dani u tablici 1 i 2.

MANOVA results - Probiotic impact						MANOVA results - Prebiotic impact							
	Df	Pillai	Approx F	num DF	den DF	Pr (>F)		Pillai	Approx F	num DF	den DF	Pr (>F)	
Before/After	1	0.87861	10.8570	10	15	3.498e-05 ***	Before/After	1	0.75361	4.588	10	15	0.0041975 **
Case/Control	1	0.90639	14.5246	10	15	5.549e-06 ***	Case/Control	1	0.85322	8.7193	10	15	0.0001314 ***
Before/After*Case/Control	1	0.77078	5.0439	10	15	0.002634 **	Before/After*Case/Control	1	0.66869	3.0274	10	15	0.0260858 *
Residuals	24						Residuals	24					

Tablica 1. i 2. MANOVA BACI probiotičkog i prebiotičkog utjecaja

Dinamičko modeliranje kontrolnih i tretiranih kultivacije prikazuju različite mreže mikrobni interakcija u skladu s njihovom različitom dinamikom biomase, kao što je prikazano na slikama 2 i 3.



Slika 2. i 3. Mrežni dijagram kontrolnog i tretiranog uzgoja na razini roda. Isprekidani i puni bridovi predstavljaju redom pozitivne i negativne interakcije. Debljina brida proporcionalna je snazi interakcije, a veličine čvorova prosječnoj zastupljenosti bakterijskog roda.

5. Zaključak

Dodatak probiotika *Lactobacillus plantarum* i prebiotika NUTRIOSE® FB06 stabiliziranoj mikrobioti **značajno utječe** na promjenu sastava i dinamike mikrobiote.

Iako dinamičko modeliranje longitudinalnih metagenomskih podataka pokazuje veliki potencijal istraživanja mikrobioma, razvoj pouzdanih i točnih modela predviđanja za kliničke primjene zahtijevat će dodatni rad, a bitna poboljšanja na ovom polju nesumnjivo će se vidjeti u narednih nekoliko godina.

6. Zahvala projektu

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta **MicroEquilibrium** na **Prehrambeno-biotehničkom fakultetu** Sveučilišta u Zagrebu i u sklopu **Cotutelle stipendije** u suradnji s **Macquarie University**, Sydney (Aus). Istraživanje je odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Dječje bolnice **Srebrnjak**.