



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Ecology meets human health: studies on human gut microbiota in health and disease

Pinto, S.

Citation

Pinto, S. (2025, November 20). *Ecology meets human health: studies on human gut microbiota in health and disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4283645>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

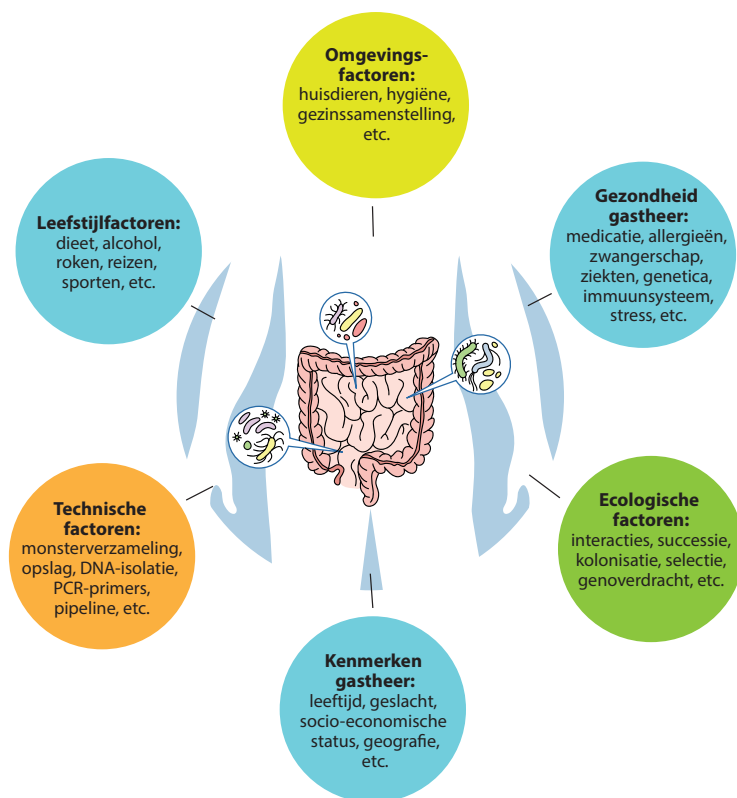
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4283645>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

De darmmicrobiota

Het menselijk lichaam herbergt als gastheer talloze micro-organismen, een groot deel daarvan bevindt zich in het spijsverteringsstelsel. De bacteriën en andere micro-organismen in onze darmen, zoals schimmels en virussen, worden samen de darmmicrobiota genoemd. Een rijke en diverse darmmicrobiota is in staat om bij te dragen aan een goede gezondheid van de gastheer, bijvoorbeeld door schadelijke bacteriën te onderdrukken. Daarnaast helpen de bacteriën ook bij de vertering van voedingsstoffen en het instrueren van het immuunsysteem. De micro-organismen beïnvloeden continu elkaar en hun menselijke gastheer. Microben passen zich aan de specifieke omstandigheden van hun gastheer aan, waarbij factoren zoals dieet, leefstijl, hormonale regulatie en het immuunsysteem een rol spelen (Figuur 1). Hierdoor verandert de samenstelling van de microbiota regelmatig, bijvoorbeeld na een buitenlandse reis of tijdens een antibioticabehandeling. Tijdens deze aanpassingen verliest de microbiota hopelijk geen functies, zodat de integriteit van de darmwand behouden blijft.



Figuur 1. Factoren die van invloed zijn op de samenstelling van de darmmicrobiota. Hoewel de technische factoren niet de samenstelling van de darmmicrobiota zelf beïnvloeden, hebben deze wel effect op zowel de soorten als de hoeveelheid micro-organismen die kunnen worden gevonden in de fecale monsters.

Doordat de darmmicrobiota zo belangrijk is voor onze gezondheid, wordt er uitgebreid onderzoek gedaan naar dit ecosysteem. Vaak worden ontlastingsmonsters verzameld om met DNA-analysetechnieken zoals 16S rRNA-sequencing de samenstelling en diversiteit van darmbacteriën te onderzoeken. Technische factoren, zoals de kwaliteit van het monster, de gebruikte DNA-extractiemethode en de keuze van primers, kunnen echter invloed hebben op welke soorten worden gedetecteerd en in welke mate ze worden gerepresenteerd in de resultaten (Figuur 1). Daarnaast maken incomplete databases, de enorme microbiële diversiteit, het dynamische karakter van de microbiota en de beperkte kennis over veel soorten de analyses extra uitdagend. De verkregen gegevens zijn hierdoor complex en vereisen geavanceerde methoden om nauwkeurig geïnterpreteerd te worden.

De dynamiek en stabiliteit van microbiële gemeenschappen, in relatie tot gezondheid en ziekte, is te onderzoeken met behulp van technieken zoals netwerkanalyses en tijdreeksmodellen. Netwerkanalyses brengen in kaart welke bacteriën vaak samen voorkomen binnen een ecosysteem. Dit kan een aanwijzing zijn voor hoe microben elkaar mogelijk beïnvloeden en samenwerken. Tijdreeksmodellen helpen om veranderingen in de microbiële gemeenschappen over de tijd te volgen en patronen te ontdekken. Het onderzoek van de microbiota is ook uitdagend, omdat het niet rechtstreeks in het lichaam kan worden bestudeerd en er vaak slechts een beperkt aantal monsters beschikbaar is. Een klein aantal monsters, zowel qua deelnemers als meetmomenten, bemoeilijkt het vaststellen van robuuste verbanden en maakt het lastig om onderscheid te maken tussen individuele variatie en algemene patronen.

Binnen het project '[Ecology meets human health](#)' onderzochten we eerst de betrouwbaarheid van netwerkanalyses en alternatieve methoden om de relaties tussen microben in kaart te brengen. Vervolgens combineerden we klinische, microbiologische en ecologische concepten om beter te begrijpen hoe microbiële dynamiek samenhangt met darmaandoeningen, specifiek de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa, en met het succes van fecale microbiota-transplantatie (FMT) als behandeling. Hierbij onderzochten we de ecologische factoren die de darmmicrobiota beïnvloeden en de werking van dit complexe ecosysteem bepalen.

Ecologische structuren in de darmmicrobiota

Het darmecosysteem omvat tal van soorten waarvan het voorkomen afhankelijk is van variaties in de omgeving en functionele vereisten, zoals de afbraak van voedsel, productie van vitamines of de bestrijding van ziekteverwekkers. Daarnaast zijn er ook vaak interacties tussen bacteriën, die positieve (winst) of negatieve (verlies) effecten hebben op de betrokken soorten. Inzicht in deze onderlinge interacties is belangrijk voor het begrijpen van ecologische processen en veranderingen in de microbiota. Vaak worden correlatiemethoden gebruikt om het netwerk in kaart te brengen.

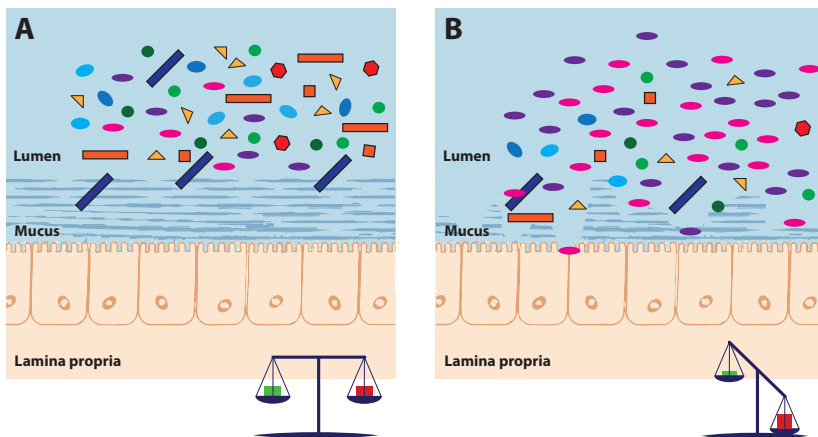
In [Hoofdstuk 2](#) onderzochten we de betrouwbaarheid van correlatiemethoden bij het afleiden van de interactienetwerken. We hebben voor ons onderzoek het gegeneraliseerde Lotka-Volterra (gLV) model gebruikt om bacteriële gemeenschappen te simuleren. Dit model biedt inzicht in microbiële dynamieken zonder echte darmmicrobiota monsters nodig te hebben en maakt het mogelijk om parameters, zoals de groeisnelheid van de bacteriën, te variëren. Bovendien konden we een bekend interactienetwerk als referentie gebruiken, wat bij echte monsters niet mogelijk is.

We onderzochten onder andere de invloed van interindividuele variatie (verschillen in microbiota-samenstelling tussen individuen) en steekproefgrootte (de hoeveelheid beschikbare gegevens) op de nauwkeurigheid van netwerkreconstructies. Hoewel correlaties in microbiële aantallen vaak indicatief zijn voor ecologische interacties, toonden we aan dat meetruis, zoals variaties in monsterverwerking, het waarnemen van echte interacties bemoeilijkt. Daarnaast onderscheiden correlaties niet specifieke interactietypen, waardoor verificatie met laboratoriumstudies noodzakelijk blijft om de relatie te begrijpen. Het gLV-model biedt waardevolle inzichten, maar benadrukt ook dat studies met echte data onmisbaar zijn. Veel microbiota studies bij mensen zijn echter momentopnames waardoor schijnbare correlaties veroorzaakt kunnen worden door externe factoren, zoals schommelingen in voedingsstoffen (nutriënten), zonder dat er sprake is van echte interacties tussen soorten. Longitudinale studies, die microbiële gemeenschappen door de tijd volgen, stellen ons veel meer in staat om consistentie en patronen beter te begrijpen. Er bestaan echter maar weinig van dergelijke datasets, waarschijnlijk door praktische uitdagingen zoals herhaalde monsterafnames, aangezien dit sterk afhankelijk is van de toestemming en bereidheid om mee te werken aan onderzoek van de gastheer.

In [Hoofdstuk 3](#) hebben we aangetoond hoe de microbiota in de loop van de tijd verandert en welke informatie deze variaties bevatten over verbanden tussen soorten. Hiervoor analyseerden we de tijdseries van twee individuen, verzameld door onderzoeker Caporaso en zijn collega's in 2011. Deze twee mensen hebben gedurende een jaar bijna dagelijks hun ontlasting ingeleverd, waardoor de variatie in de microbiota goed zichtbaar wordt. Met wavelet clustering hebben we vervolgens de patronen onthuld in deze gegevens. Wavelet clustering, al bekend in ecologische en epidemiologische studies, bleek bijzonder geschikt voor niet-stationaire tijdseries van microbiota en bood meer inzicht in collectief temporeel gedrag van de bacteriën dan gangbare correlatiemethoden. Met de waveletspectra bouwden we 'bomen' die verbanden tussen bacteriesoorten laten zien. Deze toonden aanzienlijke verschillen met bomen gebaseerd op correlatiemethoden, zoals een grotere totale taklengte (wijzend op meer functionele diversiteit) en duidelijke subgroepen. Dit laat zien dat wavelet clustering gevoeliger is voor subtiele verschillen in gemeenschapsstructuren dan correlatiemethoden. Onze resultaten benadrukken het belang van de methode die de onderzoeker kiest voor het analyseren van microbiota gegevens.

Darmmicrobiota en inflammatoire darmziekten

De interactie tussen mensen en de microbiota is het resultaat van meer dan een miljard jaar co-evolutie, wat heeft geleid tot een symbiotische relatie. Onze microben zijn betrokken bij tal van essentiële functies, waardoor verstoringen in hun soortensamenstelling, bekend als dysbiose, zijn gerelateerd aan verschillende ziekten. Dysbiose kan de mucuslaag in de darmwand verzwakken. Deze laag bedekt en beschermt de binnenkant van de darmen en helpt om schadelijke stoffen en micro-organismen buiten het lichaam te houden. Verzwakking van de mucuslaag kan leiden tot kolonisatie door schadelijke organismen, een verhoogd risico op ontstekingen en metabolische verstoringen. Dit brengt de gezondheid van de gastheer in gevaar (Figuur 2).



Figuur 2. Illustratie van het verschil tussen een darm met een gezonde microbiota en een verstoorde microbiota.

A) Een gezond darmmicrobiota is divers en in evenwicht. De mucus laag verzorgt de voeding voor de bacteriën en beschermt tegelijkertijd de darmcellen. B) Wanneer het evenwicht verstoord wordt kunnen sommige bacteriën uitgroeien en andere bacteriën verdrijven. Als het evenwicht verstoord is kan de mucuslaag worden aangetast, hierdoor kunnen bacteriën de darmwand beschadigen.

Inflammatoire darmziekten, waaronder de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa, zijn chronische ontstekingen van de slijmvliezen van het darmkanaal. Deze zijn geassocieerd met een afwijkende samenstelling en diversiteit van de darmmicrobiota. In [Hoofdstuk 4](#) tot en met [6](#) onderzoeken we de relaties tussen bacteriële dysbiose en het ziekteverloop van patiënten met inflammatoire darmziekten. In het verleden is hier al veel onderzoek naar gedaan, maar de resultaten tussen studies kwamen vaak niet met elkaar overeen. De verschillen in bevindingen over betrokkenheid van microben bij inflammatoire darmziekten kunnen waarschijnlijk worden toegeschreven aan technische variaties in onderzoeksmethoden en diversiteit tussen patiënten, inclusief variaties in ziektebeoordeling, medicatiegebruik en leefstijlfactoren. Daarnaast maakt ook de variabiliteit van de microbiota bij maag-darm aandoeningen, zoals natuurlijke fluctuaties in samenstelling, het uitdagend om consistente biologische signalen te identificeren.

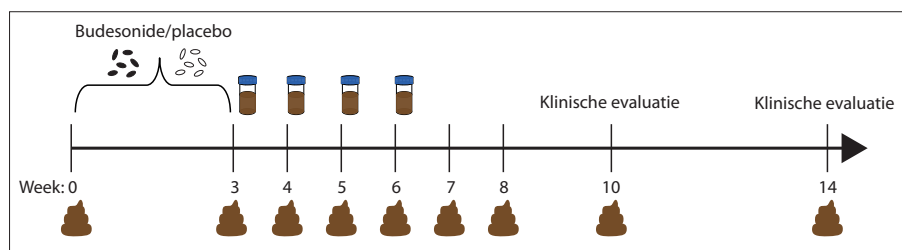
In [Hoofdstuk 4](#) analyseerden we ontlastingsmonsters van patiënten met de ziekte van Crohn om associaties te beschrijven tussen bacteriële abundantie en remissie of exacerbatie van de ziekte. We gebruikten een kwantiel regressie model om relaties bloot te leggen die niet beperkt zijn tot de gemiddelde respons van alle patiënten. Kwantiel regressie maakt het mogelijk om een completer beeld te krijgen van de relaties tussen bacteriële abundantie en ziekte. Associaties met specifieke bacteriële families zijn mogelijk alleen waarneembaar bij een minderheid van de patiënten. Generieke associaties kunnen ook worden vastgesteld met methoden die zich richten op de gemiddelde respons, maar het is ook belangrijk om de minder algemene verschillen in de microbiota te begrijpen, omdat ze inzicht zouden kunnen geven in gepersonaliseerde benaderingen van behandeling. We koppelden de relatieve abundantie van bacteriële families ook aan bekende biomarkers van ziekteactiviteit, zoals fecale calprotectine en serum C-reactief proteïne. Onze bevindingen onthulden vooral significante negatieve associaties tussen verschillende bacteriële families en de ziekte, zoals Pasteurellaceae en Ruminococcaceae.

Bij het vergelijken van regressies met klinisch gedefinieerde verergering ontdekten we dat de associaties met fecale calprotectine sterker waren dan met de andere indicatoren. Samenvattend benadrukt ons onderzoek de heterogeniteit van de ziekte van Crohn en de relatie daarvan met het darmmicrobiota.

Ecologische bepalende factoren voor het succes van FMT-behandeling

Microbiota-gerelateerde therapieën zijn gericht op het doelgericht veranderen van de microbiota van patiënten, zodat deze van een dysbiotische naar een gezonde toestand gaan. Fecale microbiota-transplantatie (FMT), beter bekend als een poeprtransplantatie, is een experimentele behandeling, waarbij fecaal materiaal, inclusief de microbiota van gezonde donoren aan de patiënt wordt overgebracht om het verstoorde microbiota te herstellen. FMT heeft zich gepositioneerd als een veelbelovende behandeling voor microbiota-gerelateerde aandoeningen, vooral in de behandeling van terugkerende *Clostridioides difficile*-infectie. Bij colitis ulcerosa wordt het succes van FMT bepaald door het bereiken van klinische remissie. Een van de uitdagingen bij FMT is de inconsistentie in de uitkomsten met betrekking tot de uiteindelijke samenstelling van de microbiota in de patiënt. Dit betekent dat elke persoon anders reageert op bepaalde donor bacteriën en dat er diverse immuunreacties kunnen worden geactiveerd bij patiënten met verschillende aandoeningen. Hypothetische uitkomsten zijn onder andere een terugkeer naar de oorspronkelijke dysbiotische toestand, een alternatieve dysbiotische toestand, een langdurige verandering met gunstige eigenschappen, of een blijvende verschuiving naar een gezonde microbiota met donorsoorten.

In ons onderzoek hebben we de microbiële families onderzocht die geassocieerd zijn met het succes van FMT-behandeling bij colitis ulcerosa. Hierdoor konden we de dynamiek van het darmmicrobiota onderzoeken. Deze longitudinale benadering bood inzicht in wekelijkse veranderingen (Figuur 3), een perspectief dat vaak ontbreekt in gerandomiseerde gecontroleerde proeven die voornamelijk gericht zijn op klinische uitkomsten.



Figuur 3. Opzet van de FECBUD-studie (gegevens gebruikt in Hoofdstukken 5 en 6). De patiënten werden eerst drie weken vooraf behandeld met budesonide ($n = 12$), een medicijn dat vaak wordt gebruikt om ontstekingen te verminderen, of een placebo ($n = 12$), een inactieve stof die geen therapeutische werking heeft. Daarna kregen de patiënten viermaal opeenvolgend van de Netherlands Donor Feces Bank (NDFB) een feces transplantatie van een gezonde donor. De evaluatie van de behandeling vond plaats na 10 en 14 weken na de start van de studie. Een subgroep van de patiëntengroep (9 van de 24 patiënten) bereikte een succesvolle gecombineerde klinische en endoscopische remissie na de FMT-behandeling. Fecesmonsters van de patiënten werden verzameld aan het begin van de studie, na de voorbehandeling, wekelijks na de feces transplantatie en twee, vier en acht weken na de FMT.

In [Hoofdstuk 5](#) hebben we de associaties bestudeerd met betrekking tot het klinische succes van FMT bij patiënten en daarna de ontwikkeling van de microbiota tijdens en na de behandeling. We hebben een breed scala aan analytische technieken gebruikt om mogelijke associaties tussen bacteriële families en klinische uitkomsten te onderzoeken, waaronder een ordinatie analyse, Dirichlet multinomial mixture-analyse en longitudinale modellering. Het gebruik van deze benaderingen stelde ons in staat om significante verschillen in microbiële samenstelling en diversiteit te identificeren tussen patiënten die wel en geen baat hadden bij de behandeling. Zo vonden we dat het succes van FMT bij colitis ulcerosa patiënten lijkt samen te hangen met een beperkte groei van Prevotellaceae en de aanwezigheid van de families Lachnospiraceae en Ruminococcaceae. Het monitoren van de dynamiek van deze microbiële families zou mogelijk vroegtijdig inzicht kunnen geven in het succes van de behandeling tijdens FMT.

Er wordt algemeen aangenomen dat kolonisatie van donorsoorten in de microbiota van de ontvanger een sleutelmechanisme is achter het succes van FMT. Een interessante bevinding van ons onderzoek in [Hoofdstuk 5](#) is dat we geen indicatie vonden voor een verschuiving in de microbiële samenstelling van de ontvanger naar de donormicrobiota onder de patiënten met een klinisch succes van FMT. In [Hoofdstuk 6](#) onderzochten we daarom of de donor-gecentreerde visie van FMT klopt, door te analyseren of de microbiota-dynamiek gerelateerd is aan het behalen van remissie bij patiënten na FMT-behandeling. Hiervoor categoriseerden we de soorten op basis van hun oorsprong en temporele aanwezigheid: al aanwezig in de gastheer vóór FMT, afgeleid van de donor, of nieuwe soorten die tijdens de FMT-behandeling werden geïntroduceerd. Daarna modelleerden we het aantal soorten per categorie (gastheer-geassocieerd, donor-afgeleid en nieuw) voor patiënten die wel of geen baat hadden bij FMT. Onze resultaten tonen aan dat de patiënten die baat hadden bij de behandeling een hoger aantal gastheersoorten behielden in vergelijking met patiënten die niet profiteerden van de behandeling. Hoewel donorsoorten aanvankelijk meer koloniseerden bij de patiënten die geen baat hadden bij de behandeling, nam deze kolonisatie in de loop van de tijd af, waardoor het niveau gelijk werd aan dat van de patiënten die wel baat hadden bij de behandeling. Dit suggereert dat een succesvolle klinische reactie op FMT mogelijk wordt vergemakkelijkt door een microbiota die receptief is voor kolonisatie zonder de residentiële microbiota in gevaar te brengen. We ontdekten ook dat gastheersoorten met hogere relatieve abundanties vóór FMT beter in staat zijn om na FMT te blijven bestaan.

Tot slot

Er zijn talrijke omgevingsfactoren en gewoonten (voeding, leefstijl, enzovoort) die de samenstelling en functie van microben beïnvloeden. Deze complexiteit kan soms overweldigend zijn, maar kennis uit verschillende disciplines biedt waardevolle inzichten. Door te begrijpen hoe systemen reageren op veranderingen en weer in balans komen, vergroten we onze kennis van de complexe dynamiek binnen de menselijke darmmicrobiota. Deze inzichten kunnen microbiota-modulerende strategieën zoals FMT verbeteren en innovatie in persoonlijke therapeutische benaderingen stimuleren. Dit leidt tot een nieuw perspectief, waarbij de microbiota niet alleen wordt gezien als een strijdtoneel tegen pathogene microben, maar als een complexe ecologische gemeenschap. Beheerstrategieën zoals habitattherstel spelen hierbij een belangrijke rol. Om dit te bereiken zijn er uitgebreide (longitudinale) datasets nodig die een breed scala aan individuen met diverse achtergronden en levensstijlen omvatten. Dergelijke gegevens zijn essentieel om de mechanismen te begrijpen die de dynamiek van ecosystemen in gezondheid en ziekte beïnvloeden. Daarnaast moeten er geschikte methoden beschikbaar zijn om de complexe microbiota-data effectief te kunnen onderzoeken.

De beperkingen van een 'one-size-fits-all'-benadering worden steeds duidelijker, vooral door de diversiteit, genotypen (de genetische samenstelling) en fenotypen (de waarneembare eigenschappen en kenmerken) van de darmmicrobiota. Dit benadrukt de noodzaak van een meer op maat gemaakte benadering in (klinisch) wetenschappelijk onderzoek. Bijvoorbeeld het afstemmen van donor en ontvanger op basis van leefstijl en dieet kan de kans vergroten dat getransplanteerde bacteriën zich effectief vestigen en dat de aanwezige bacteriën de juiste voedingsstoffen krijgen. Dit kan bijdragen aan een effectievere verbetering van de microbiota van de ontvanger, aangepast aan de unieke behoeften van de patiënt. Maar om echt inzicht te krijgen in het functioneren van microben, moeten we het ecologisch perspectief van bacteriën in de gaten houden. Dit houdt in dat we begrijpen dat bacteriën hun omgeving, hulpbronnen en interacties waarnemen op een veel kleinere ruimtelijke schaal, met constante aanpassing aan hun directe omgeving. Dit betekent dat zelfs binnen een enkele steekproef verschillende bacteriën verschillende gedragingen, functies of interacties kunnen vertonen. Bovendien hebben binnen de darmmicrobiota verschillende bacteriën vaak overlappende functies. Dit houdt in dat als een bepaalde soort wordt verstoord of verwijderd, andere soorten die functie kunnen overnemen. Dit mechanisme is cruciaal voor het behoud van een gezonde darmmicrobiota en hiernaar is nog te weinig onderzoek gedaan. Een ecologische benadering, geworteld in theorie, is essentieel om de impact van de microbiota op gezondheid of ziekte te interpreteren. Dit perspectief stelt ons in staat om de complexe interacties binnen de microbiota beter te begrijpen, wat cruciaal is voor het ontwikkelen van effectieve therapeutische strategieën.