Mikrobiota jelitowa człowieka – jej zróżnicowanie i wpływ na nasze zdrowie

Human gut microbiota – its diversity and impact on our health

Sebastian Wardak

MEDGEN Kamila Czerska i wsp. Sp. K. Warszawa

Przewód pokarmowy człowieka stanowi środowisko życia dla miliardów komórek różnorodnych mikroorganizmów wchodzących w skład ludzkiej mikrobioty. Zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej takich jak np. NGS (Next Generation Sequencing) umożliwiło szczegółowe poznanie drobnoustrojów zamieszkujących jelita i badanie ich wpływu na zdrowie człowieka. Mikrobiota jelitowa odgrywa znaczącą rolę w syntezie oraz metabolizmie wielu składników odżywczych i metabolitów, w tym krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), aminokwasów, lipidów, kwasów żółciowych i witamin. Na jej zróżnicowanie wpływa wiele czynników takich jak np. dieta, wiek człowieka, klimat i warunki socjo-ekonomiczne. Gwałtowne zmiany w składzie mikrobioty (zaburzenie homeostazy) mogą prowadzić do dysbiozy – stanu związanego nie tylko z zaburzeniami jelitowymi, ale także z licznymi chorobami pozajelitowymi. Przedmiotem obecnej pracy jest przegląd aktualnych doniesień na temat: technik badawczych stosowanych do analizy mikrobioty, wpływu różnych czynników na jej zróżnicowanie oraz oddziaływania mikrobioty na nasze zdrowie.

Słowa kluczowe: *mikrobiota jelitowa, mikrobiom, dysbioza, SCFA, NGS, 16SrRNA, stany zapalne jelit, zakażenia C. difficile, alergie pokarmowe, rak jelita grubego, celiakia, transfer mikrobioty, probiotyki, prebiotyki.*

ABSTRACT

The human digestive tract is the living environment for billions of cells of various microorganisms that are part of the human microflora. The use of modern molecular biology techniques, such as NGS (Next Generation Sequencing), made it possible to study the microorganisms inhabiting the intestines and to understand their impact on human health. The gut microbiota plays a significant role in the synthesis and metabolism of

many nutrients and metabolites, including short-chain fatty acids (SCFA), amino acids, lipids, bile acids and vitamins. Many factors such as diet, age, climate, and socioeconomic conditions influence the diversity of the microbiota. Rapid changes in the composition of the microbiota (disturbance of homeostasis) can lead to dysbiosis - a condition associated not only with intestinal disorders, but also with numerous extraintestinal diseases. The present work is a review of current reports on: research techniques used to analyze microbiota, the impact of various factors on its diversity and the impact of microbiota on our health.

Key words: *gut microbiota, microbiome, dysbiosis, SCFA, NGS, 16SrRNA, intestinal inflammation, C.difficile infections, food allergies, colorectal cancer, celiac disease, microbiota transfer, probiotics, prebiotics*

WPROWADZENIE

Ostatnie dziesięciolecia były obfite w liczne odkrycia w różnych dziedzinach naukowych. Szczególnie na tym polu wyróżnia się genetyka, gdzie poznano nowe, szybkie i relatywnie tanie techniki analizy materiału genetycznego. Przyczyniły się one do lepszego poznania naszego genomu i ustalenia molekularnych podstaw wielu chorób. Umożliwiły także lepsze zrozumienie otaczającego nas świata istot żywych, w tym niewidocznych gołym okiem mikroorganizmów. Od pierwszych odkryć *Ludwika Pasteura i Roberta Kocha* minęło już prawie 150 lat, jednak dopiero pierwsze dwudziestolecie XXI wieku pozwoliło na scharakteryzowanie mikroorganizmów zamieszkujących nasze ciało. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej stwierdzono, że człowiek stanowi środowisko życia dla miliardów komórek różnorodnych mikroorganizmów. Wszystkie te drobnoustroje stanowią ludzką mikrobiotę nazywaną także mikrobiomem lub mikroflorą. Pomimo wymiennego stosowania w piśmiennictwie naukowym terminów „mikrobiota” i „mikrobiom” terminy te mają inne znaczenia (17). „Mikrobiotą” określa się ogół mikroorganizmów zamieszkujących dane środowisko np. skórę, żołądek czy jelita. Termin „mikrobiom” z kolei wprowadził laureat Nagrody Nobla *Jos-hua Lederberg* w 2001 roku określając nim zbiór genomów tych drobnoustrojów (51). Dodatkowo stosowany jest jeszcze termin „mikroflora”, który związany jest z dawnym przekonaniem o pochodzeniu drobnoustrojów z królestwa roślin. Pomimo, że mikroorganizmy mają niewiele wspólnego z roślinami, termin ten jest bardzo często stosowany zarówno w publikacjach naukowych jak i piśmiennictwie popularnonaukowym. W skład mikrobiomu ludzkiego wchodzi bakterie, archeony, wirusy oraz należące do eukariontów grzyby i pierwotniaki. Organizm człowieka razem z zamieszkującymi go mikroorganizmami stanowi tzw. „superorganizm” (30). W ostatnich latach opublikowano tysiące prac naukowych dotyczących ludzkiej mikrobioty. Wynika z nich olbrzymie bogactwo gatunkowe zamieszkujących organizm człowieka drobnoustrojów oraz ich duży wpływ na nasze zdrowie. Większą część mikrobiomu stanowią bakterie i to one są przedmiotem niniejszego opracowania. W ludzkich jelitach żyje ponad 1000 gatunków bakterii z czego u każdego człowieka wykrywanych jest około 160 różnych gatunków (17, 71, 75). Opublikowane w 2019 roku badania przeprowadzone przez *Almeida* i wsp. wskazują, że poza

wcześniej już opisanymi 553 gatunkami bakteryjnymi, które mogą być wyhodowane w sztucznych warunkach, liczba nowych, niesklasyfikowanych jak do tej pory gatunków bakteryjnych wykrytych w jelitach u ludzi wynosi aż 1952 (2). Według najnowszych szacunków liczba wszystkich komórek bakteryjnych zamieszkujących organizm człowieka dorównuje liczbie komórek naszego ciała (10^{13} komórek bakteryjnych) (86). Natomiast liczba unikatowych genów bakteryjnych wchodzących w skład mikrobiomu ponad stukrotnie przewyższa liczbę naszych własnych genów (71). Dodatkowe bakteryjne geny kodujące enzymy, które wchodzi w skład wielu szlaków metabolicznych, pozwala nam m.in. na wykorzystanie nierozkładanych przez ludzkie enzymy związków organicznych jak błonnik, polifenole, polisacharydy i wytwarzanie niezbędnych dla naszego zdrowia substancji, które z kolei wpływają na procesy metaboliczne i immunologiczne zachodzące w naszym organizmie (89, 122)

TECHNIKI BADAWCZE W BADANIACH MIKROBIOTY

Skład ludzkiej mikrobioty jelitowej poznano dokładniej dopiero w ostatnim dwudziestolecu, głównie dzięki zastosowaniu w badaniach nowoczesnych technik biologii molekularnej. Wcześniej liczba i gatunki drobnoustrojów występujących w naszym jelicie była mocno niedoszacowana ze względu na brak możliwości hodowli większości gatunków mikroorganizmów występujących w przewodzie pokarmowym. Szacuje się, że nawet 80% drobnoustrojów wykrytych w badaniach z zastosowaniem metod genetycznych nie można hodować w sztucznych warunkach (50). W metodach klasycznych, w celu identyfikacji wyhodowanego szczepu stosuje się wiele technik opartych na fenotypowych cechach danego gatunku bakteryjnego. Bada się kształt i skład ściany komórkowej komórki bakteryjnej (barwienie met. Grama), różnice w budowie antygenów powierzchniowych, cechy biochemiczne takie jak np. aktywność enzymatyczna bakterii i ich zdolność do wzrostu w różnym zakresie pH (96). Znane metody hodowli drobnoustrojów zamieszkujących nasze jelita selektywnie promują wzrost tylko ich części umożliwiając wykrywanie konkretnych patogenów, a pomijając obecność pożytecznych mikroorganizmów. Dopiero badania genetyczne umożliwiły wykrycie materiału genetycznego wielu innych gatunków bakterii niezależnie od ich hodowli. W badaniach mikrobioty najczęściej wykorzystywana jest technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS Next Generation Sequencing), która umożliwia identyfikację gatunków bakteryjnych na podstawie porównania wysoce konserwatywnej sekwencji genu 16S rDNA kodującym cząsteczkę 16SrRNA drobnoustrojów obecnych w danym materiale (np. w kale) do sekwencji wzorcowych tego genu dostępnych w specjalistycznych bazach danych. W genie 16SrDNA wykazano 9 regionów zmiennych, od V1 do V9 (90). Ze względów technicznych najczęściej wykonuje się analizę regionów V3 i V4 co często jest wystarczające do identyfikacji większości mikroorganizmów. Badania mikrobiomu wymagają analizy bioinformatycznej ogromnej ilości danych (17, 90). Obecnie dostępnych jest wiele narzędzi do przetwarzania otrzymanych danych z sekwencjonowania jak program QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology – qiime.org) i MOTHUR (mothur.org) (33, 90). Analiza ta polega m.in. na tzw. odsumianiu sekwencji (ang. denoising) poprzez usuwanie odczytów niskiej jakości oraz filtrowaniu chimer i innych artefaktów. Przyporządkowanie sekwencji (ang. alignment) do poziomu taksonomicznego (np. do gatunku lub

rodzaju) odbywa się poprzez ich dopasowanie do reprezentatywnych sekwencji w wyniku czego uzyskuje się operacyjne jednostki taksonomiczne (Operational Taxonomic Units – OTU) (33). Dopasowanie to odbywa się przy pomocy referencyjnej bazy danych mikroorganizmów, a najczęściej stosowane bazy to Silva, GreenGenes i NCBI (5). Zazwyczaj za gatunek bakterii uważa się zidentyfikowane OTU, których sekwencje wykazują 97% i więcej podobieństwa. Jednak często przy zastosowaniu tej techniki jednoznaczne przyporządkowanie otrzymanych OTU do danego gatunku nie jest możliwe, wówczas określa się rodzaj lub rodzinę bakteryjną. Technika sekwencjonowania umożliwia m.in. określenie jednego z najważniejszych wskaźników stanu mikrobioty czyli oznaczenie poziomu jej zróżnicowania (poziom bogactwa mikrobioty). Najczęściej zróżnicowanie mikrobioty jest opisywane za pomocą wskaźnika alfa (alfa diveristy) czyli liczbą gatunków/rodzajów bakteryjnych/OTU wykrywanych u danego pacjenta. Do oznaczania wskaźnika zróżnicowania stosowany jest głównie indeks *Shannon*. Badane jest także zróżnicowanie beta, dotyczące różnic w składzie mikrobioty między różnymi próbkami lub między danymi populacjami. Zróżnicowanie to analizuje się za pomocą różnych indeksów jak np. *Bray–Curtis dissimilarity*, *Jaccard distance*, *UniFrac*. Kolejną techniką opierającą się na technologii NGS jest tzw. sekwencjonowanie metagenomowe typu shotgun. Metoda ta umożliwia nie tylko oznaczenie szczegółowego składu gatunkowego mikroflory w danej próbce ale także umożliwia badanie funkcjonalne poszczególnych genów bakterii. Jednak wysokie koszty analizy metagenomowej w porównaniu do analizy genu cząsteczki 16SrRNA powodują, że metoda ta jest stosunkowo rzadko stosowana. Niestety wyniki badań mikrobiomu oparte na technologii NGS często obarczone są błędami powstałymi podczas różnych etapów wykonywanych badań. Uzyskane wyniki zależne są w dużej mierze od poziomu wyszkolenia personelu w metodach biologii molekularnej, różnej metodyki pobierania (rodzaj wymazówki, stosowanie podłoża transportowego i jego rodzaj) i przechowywania próbek kału (czas przechowywania i temperatura – temp. otoczenia, +4°C, -20°C, -70°C), metody izolacji DNA (kolumnkowa, automatyczna), amplifikacji i protokołu sekwencjonowania NGS (wybór fragmentu genu cząsteczki 16SrRNA) (14, 28, 46, 67). Część laboratoriów nie weryfikuje uzyskanych wyników badań i nie stosuje odpowiednich kontroli w tym kontroli czystości genetycznej stosowanych odczynników. Powoduje to częste różnice i błędy w uzyskanych wynikach oraz brak możliwości porównania otrzymanych wyników badań pomiędzy różnymi laboratoriami. Niewątpliwie w celu wyeliminowania ewentualnych błędów pomocne byłoby ujednolicenie warunków przeprowadzanych badań, wprowadzenie kontroli jakości oraz wykonywanie badań tylko w certyfikowanych jednostkach z wyszkolonym do tego celu personelem.

SKŁAD ZDROWEJ MIKROBIOTY JELITA CZŁOWIEKA

Pośród różnych części ludzkiego ciała zamieszkanych przez drobnoustroje takich jak np. skóra, narządy płciowe, jama ustna, żołądek, jelita, układ oddechowy, największa liczba bakterii oraz największa ich różnorodność występuje w jelicie grubym człowieka. Tak wysoka koncentracja mikroorganizmów jest spowodowana głównie sprzyjającymi warunkami ich rozwoju dzięki dużej powierzchni pofałdowanych jelit, stabilnej temperaturze i wilgotności oraz stałemu dopływowi pokarmu (78). Uważa się, że przewód pokarmowy noworodka zostaje zasiedlony mikroorganizmami podczas porodu, choć pewna

część naukowców dowodzi, że jelita jak i środowisko życia płodu w łonie matki nie są jałowe (10, 104). Mikrobiota u dzieci karmionych mlekiem matki zawiera głównie bakterie należące do rodzajów: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacteroides* (44). Mikrobiota dzieci podlega następnie dynamicznym zmianom. Dopiero w wieku 2-3 lat staje się bardziej stabilna i w swoim składzie zaczyna być podobna do mikrobiomu osoby dorosłej. Większość gatunków bakteryjnych (około 90%) występujących w jelitach dorosłych osób należy do dwóch typów - *Firmicutes* (do których zalicza się głównie rodzaje: *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*) i *Bacteroidetes* (głównie *Bacteroides* i *Prevotella*). W mniejszej ilości występują także bakterie należące do typów: *Actinobacteria* (głównie *Bifidobacterium*), *Proteobacteria* (głównie *Escherichia*), *Verrucomicrobia* i *Euryarchaeate* (78). King i wsp. w 98 badanych próbkach kału zdrowych osób z USA stwierdzili obecność 8 typów, 18 rodzin, 23 klas, 38 rzędów, 59 rodzajów i 109 gatunków bakterii (123). Najliczniejsze typy stanowiły odpowiednio: *Bacteroidetes* 73,13 $\pm$ 22,16%, *Firmicutes* 22,2 $\pm$ 18,6%, *Proteobacteria* 2,15 $\pm$ 10,39%, *Actinobacteria* 1,82 $\pm$ 3%. Pośród rodzin bakteryjnych najliczniejsze były: *Bacteroidaceae* 65,58 $\pm$ 10,48%, *Lachnospiraceae* (11,46 $\pm$ 11,06%, *Ruminococcaceae* 8,35 $\pm$ 10,48% ponadto wykryto także kilka innych rodzin bakteryjnych z częstością występowania powyżej 1% - *Odoribacteraceae*, *Rikenellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Tannerellaceae*. Najliczniejszym rodzajem był *Bacteroides* 65,58 $\pm$ 21,84%, a najliczniejszym gatunkiem był *Bacteroides dorei* 17,44 $\pm$ 8,74%. Duże badania metagenomowe *Radjabzadeh* i wsp. opublikowane w 2020 roku przeprowadzone w populacji holenderskiej u 1427 dorosłych w wieku od 46 do 88 lat oraz 2111 dzieci w wieku od 9 do 12 lat wskazują, w odróżnieniu od badań King i wsp., że w populacji tej w obu grupach badanych osób najwięcej gatunków bakteryjnych/OTU należało do typu *Firmicutes* (74). Autorzy stwierdzili różnice w składzie mikrobioty jelitowej w obu grupach osób, u holenderskich dzieci 57% gatunków/OTU bakterii należała do typu *Firmicutes*, 30% do *Bacteroidetes*, 6% *Proteobacteria*, 4% *Actinobacteria*, 2% *Verrucomicrobia* oraz 1% do innych typów. Natomiast u dorosłych osób stwierdzono, że aż 75% gatunków/OTU bakterii należała do typu *Firmicutes*, tylko 13% do *Bacteroidetes*, 5% *Proteobacteria*, 4% *Actinobacteria*, 1% *Verrucomicrobia* oraz 2% do innych typów. Autorzy wykazali także większe zróżnicowanie alfa mikrobioty u osób dorosłych i przewagę rodzaju *Blautia* natomiast w grupie badanych dzieci zaobserwowany wyższy udział rodzaju *Bacteroides*. Niektóre z badań sugerują występowanie u ludzi różnych typów mikrobioty tzw. enterotypów, różniących się dominującym rodzajem bakteryjnym (13, 19). Opisano trzy enterotypy: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) i *Ruminococcus* (enterotyp 3). Przewaga ilościowa danego gatunku/rodzaju bakterii może wiązać się z przewagą procesów metabolicznych związanych z tymi bakteriami a co za tym idzie wpływać na zdrowie gospodarza z danym enterotypem. Enterotyp *Bacteroides* powiązany jest z dietą bogatą w białka zwierzęce i tłuszcze, natomiast enterotyp *Prevotella* łączony jest z dietą z przewagą węglowodanów. Koncepcja występowania enterotypów u człowieka w środowisku naukowym ma swoich zwolenników oraz przeciwników i wymaga przeprowadzenia wielu dodatkowych badań.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA MIKROBIOTĘ I JEJ ZRÓŻNICOWANIE

Przez tysiące lat organizm człowieka ewoluował wspólnie z zasiedlającymi go mikroorganizmami. Jelita wykazują specjalne przystosowania do obecności w nich drobnoustrojów, dzięki którym nie dochodzi do odpowiedzi układu immunologicznego przeciwko naszej mikrobiocie i wytworzeniu stanu zapalnego. Najważniejszymi czynnikami zapobiegającymi przekroczeniu przez komensalne mikroorganizmy bariery nabłonka jelita są ściśle połączenie enterocytów i wytwarzany w jelicie śluz bogaty w mucynę (108). Drobnoustroje indukują także tolerancję immunologiczną, przez co nie wywołują odpowiedzi układu odpornościowego. Mikrobiota zdrowego człowieka nie jest stała. W ciągu naszego życia podlega różnorodnym dynamicznym zmianom i modyfikacjom pod wpływem zarówno czynników wewnętrznych, takich jak: rodzaj porodu, płeć, dieta, wiek, jak i zewnętrznych jak np.: klimat środowiska, higiena, warunki socjo-ekonomiczne. Z tego względu nie jesteśmy w stanie opisać wzorcowej mikrobioty osoby zdrowej. Zauważalna jest różnica w składzie mikrobioty już w początkowej fazie życia człowieka. Szczególnie duże różnice obserwowane są u noworodków urodzonych siłami natury i urodzonych cięciem cesarskim. Podczas naturalnego porodu noworodek ma kontakt z mikroorganizmami zasiedlającymi drogi rodne kobiety jak i tymi znajdującymi się w kale. U tych noworodków stwierdza się większy odsetek *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Bacteroides*. Natomiast u noworodków urodzonych przez cięcie cesarskie obserwowane jest mniejsze zróżnicowanie mikrobioty, w której dominują mikroorganizmy bytujące głównie w środowisku szpitalnym i na ludzkiej skórze jak np. *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* (78). Wpływ na mikrobiotę w tym okresie życia człowieka ma także sposób karmienia noworodka. U noworodków karmionych mlekiem matki stwierdza się większą ilość *Bifidobacterium* natomiast u noworodków karmionych specjalnymi mieszankami wykrywa się więcej bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* i *Clostridium*. Uważa się, że mikrobiota dziecka w wieku około 3 lat przypomina już składem mikrobiotę osób dorosłych. Wzrasta stopniowo udział *Bacteroides* i innych rodzajów bakteryjnych przy obniżeniu udziału *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. U dorosłego człowieka skład mikroflory ulega pewnej stabilizacji, choć wpływa na nią każda, nawet krótkotrwała zmiana diety lub stosowane leczenie (101). U osób starszych powyżej 65 roku życia zmniejsza się liczba gatunków bakteryjnych i zaczynają przeważać te o prozapalnych właściwościach (np. *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*) (78). Jest to związane z obniżeniem odporności i sprawności u ludzi z tej grupy wiekowej oraz częstszej hospitalizacji i zwiększonej ilości przyjmowanych leków. Uważa się, że szczególnie negatywny wpływ na skład mikrobioty jelitowej człowieka wykazują antybiotyki. Substancje te stosuje się do walki z zakażeniami wywołanymi przez patogenne bakterie, jednak ich użycie, zwłaszcza doustne, powoduje zniszczenie naturalnej mikrobioty. Niebezpieczne pod tym względem są antybiotyki i chemioterapeutyki o szerokim spektrum działania, które wykazują również aktywność wobec korzystnych dla naszego zdrowia gatunków bakteryjnych (21, 55, 78). Często w miejsce pożytecznych drobnoustrojów pojawiają się patogenne lub względnie patogenne bakterie i grzyby mogące powodować stany chorobowe jelit.

Szczególnie ważnym czynnikiem wpływającym na skład mikrobioty człowieka jest rodzaj spożywanego pokarmu. Na świecie występuje wiele różnorodnych diet, które

uksztaltowały się na podstawie dostępu do żywności na danym obszarze, uwarunkowań religijnych i kulturowych. Uważa się, że szczególnie zdrowa jest dieta bogata w duże ilości spożywanych warzyw, owoców, nasion roślin, tłuszczów nienasyconych oraz uboga w tłuste, czerwone mięso, cukry proste i sól. U osób spożywających duże ilości produktów roślinnych w składzie mikrobioty obserwuje się większy udział bakterii z rodzaju *Prevotella* (52, 78), natomiast u osób spożywających duże ilości tłuszczu i białek zwierzęcych przeważają bakterie z rodzaju *Bacteroides*. Badania przeprowadzone przez Moraes i wsp. na grupach osób wszystkożernych, wegetarian ścisłych i wegetarian spożywających produkty mleczne oraz jaja wskazują na większy udział enterotypu *Prevotella* u wegetarian w porównaniu do innych analizowanych grup (19). Udział procentowy enterotypu *Prevotella*, *Bacteroides* i *Ruminococcus* u wegetarian wynosił odpowiednio 40%, 20,7% i 20,6%, podczas gdy u innych grup częstości te były do siebie porównywalne. Autorzy powiązali enterotyp *Prevotella* z korzystnym profilem kardiometabolicznym. Oznaczenie frakcji cholesterolu LDL wskazało na jego niższy poziom u osób posiadających enterotyp *Prevotella*, bez względu na dietę tych osób w porównaniu do poziomu LDL u osób posiadających inne enterotypy. Postępująca globalizacja i urbanizacja wpływają na przejmowanie w krajach rozwijających się Azji, Afryki i Ameryki Północnej zachodniego sposobu odżywiania z ułatwionym dostępem do wysoce kalorycznego pokarmu, co określa się mianem „westernizacji diety”. Naukowcy uważają, że przejmowanie nieodpowiednich zachodnich wzorców dietetycznych, jak spożywanie wysoce przetworzonych produktów spożywczych bogatych w wysokoenergetyczne nasycone tłuszcze, produktów typu fast-food i cukrów prostych, ma wpływ na pogorszenie się stanu zdrowia i rozwój tzw. chorób cywilizacyjnych. Westernizacja diety ma także wpływ na skład i zróżnicowanie mikrobioty człowieka. Badania przeprowadzone przez Shin i wsp. dowodzą wpływu „westernizacji diety” na kształt mikrobioty w społeczności mieszkańców Korei Południowej odżywiających się w sposób typowy dla tradycyjnej kuchni koreańskiej (dieta bogata w warzywa, nasiona i produkty fermentowane z niskim spożyciem mięsa i tłuszczu zwierzęcych) oraz w sposób typowy dla zachodniej diety (88). Autorzy zaobserwowali u Koreńczyków odżywiających się w sposób tradycyjny występowanie wysokiego odsetka gromady *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroidetes*. Zmniejszenie ilości gromady *Bacteroidetes* w tym rodzaju *Bacteroides* może być związane z niskim spożyciem pokarmów zwierzęcych przez Koreńczyków. Stwierdzono także znaczące zwiększenie w tej grupie obecności w kale korzystnej dla zdrowia probiotycznej bakterii z rodzaju *Weissella*, co może być związane z konsumpcją fermentowanych warzyw takich jak kimchi. U osób spożywających typową dietę koreańską wykryto także w kale duże ilości bakterii *Coproccoccus* powiązanej z produkcją korzystnych dla zdrowia SCFA. Może mieć to wpływ na rzadsze występowanie chorób układu krążenia u Koreńczyków odżywiających się w sposób tradycyjny. Natomiast u Koreńczyków odżywiających się zgodnie z zachodnią dietą stwierdzono obniżenie ilości *Lachnospira*. Niski poziom obecności tej bakterii jest wg tych naukowców powiązany ze zwiększonym poziomem cholesterolu LDL we krwi i otyłością. Vangay i wsp. zbadali wpływ na mikrobiotę migracji osób zamieszkujących dotychczas Tajlandię, kraj rolniczy, słabo uprzemysłowiony, do wysoce rozwiniętego kraju jakim jest USA (102). W populacji imigrantów zauważalny jest wzrost liczby osób z nadwagą i chorobami powszechnymi w krajach rozwiniętych w porównaniu do populacji zamieszkującej kraj pochodzenia. Autorzy dowodzą, że poza zmianą diety

i stylu życia związanych z „westernizacją” sposobu życia u imigrantów za rozwój chorób cywilizacyjnych może być odpowiedzialna także zmiana mikrobioty. Społeczności imigrantów z Tajlandii (populacje Hmong i Karen), początkowo charakteryzowały się obecnością innej kompozycji mikrobioty w kale, która dodatkowo jest bardziej zróżnicowana w porównaniu do mikrobioty kału u osób urodzonych w USA. Autorzy zaobserwowali stopniowe zmniejszenie udziału bakterii *Prevotella* w badanej mikrobiocie wraz z utratą niektórych gatunków bakteryjnych i zastępowanie jej przez *Bacteroides* w kale społeczności pochodzącej w kolejności z Tajlandii, imigrantów z Tajlandii w pierwszym i drugim pokoleniu oraz Amerykanów urodzonych w USA. Analiza metagenomowa wykazała także spadek ilości bakteryjnych genów związanych z produkcją enzymów rozkładających roślinny błonnik. Nawet krótki pobyt migrantów w USA powodował obserwowany spadek w kale ilości bakterii z rodzaju *Prevotella* na rzecz *Bacteroides*. Autorzy podkreślają, że na uzyskane wyniki zmiany składu mikrobioty u migrantów może mieć wpływ poza zmianą diety także wiele niebadanych dodatkowych czynników jak np. stres, jakość wody pitnej, leczenie przeciw pasożytom itd. Jednakże utrata niektórych gatunków bakteryjnych ze składu mikrobioty, tzw. „znikająca mikrobiota”, szczególnie gatunków z rodzaju *Prevotella* zdolnych do rozkładu różnego rodzaju węglowodanów, a co za tym idzie utrata funkcjonalnej różnorodności mikrobioty może mieć wpływ na zdrowie gospodarza i może tłumaczyć wg autorów zjawisko występowania przewlekłych chorób cywilizacyjnych u mieszkańców krajów wysoce rozwiniętych. Wysoko przetworzone produkty spożywcze, charakterystyczne dla diety zachodniej, poza dużą ilością tłuszczu i soli często zawierają także dodatki takie jak np. związki stabilizujące, zagęszczające i konserwujące, emulgatory, różnego rodzaju słodziki i wzmacniacze smaku. Mają one na celu wydłużenie czasu przydatności produktów do spożycia oraz poprawę ich smaku, konsystencji i koloru. Substancje te nie powinny wpływać na nasze zdrowie jednak liczne badania naukowe potwierdzają szkodliwy efekt stosowania przynajmniej niektórych z tych substancji. Badania przeprowadzone przez *Copy Chassaing* i wsp. (16) na modelu mysim potwierdzają wpływ emulgatorów takich jak polisorbit80 i karboksymetyloceluloza na spadek zróżnicowania mikrobioty oraz przepuszczalność błony śluzowej jelita prowadząc m. in. do powstania stanów zapalnych jelita i zespołu metabolicznego w tym otyłości. Niektórzy naukowcy wskazują także na wpływ słodzików (low/no-calorie sweeteners - LNCS) na skład mikrobioty. Spożywanie tych substancji może prowadzić do rozwinięcia się nietolerancji glukozy i zespołu metabolicznego (95), choć zdania na temat wpływu słodzików na mikroflorę jelitową są podzielone (Zmora N i wsp. 2019). W ostatnich latach bada się także wpływ na nasze zdrowie spożywanego mięsa i innych produktów zawierających duże ilości białka zwierzęcego. Czerwone mięso bogate jest w związki L-karnityny i cholinę. Mikroflora jelitowa odgrywa także rolę w procesie metabolizmu tych związków. Substancje te są przekształcane przez mikroflorę jelitową do trimetyloaminy (trimethylamine - TMA), a następnie w wątrobie ulegają przekształceniu do tlenku trimetyloaminy (trimethylamine-N-oxide - TMAO). Zaobserwowano, że podwyższone stężenie TMAO stanowi czynnik ryzyka chorób układu krążenia (zawał serca, udar), miażdżycy tętnic i niealkoholowego stłuszczenia wątroby (12, 22, 121).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na skład i zróżnicowanie mikrobioty jest środowisko życia człowieka. Stale zmieniające się warunki związane z globalizacją i migracją ludności z terenów wiejskich do wielkich miast pociągają za sobą wiele zmian w życiu

człowieka, w jego diecie i stylu życia. Uważa się, że ludzie żyjący w obecnie nielicznych, pierwotnych populacjach (tzw. społeczeństwa zbieracko-łowieckie) wykazują większe zróżnicowanie mikrobioty (większy wskaźnik zróżnicowania alfa) niż społeczeństwa rolnicze i przemysłowe w krajach rozwiniętych. W jelitach osób z populacji pierwotnych występują także unikalne rodzaje bakterii nie występujące w populacjach rozwiniętych. Schnorr i wsp wykazali duże zróżnicowanie mikrobioty jelitowej w kale osób pochodzących z plemienia Hadza tworzącego pierwotną, niewielką populację zbieracko-łowiecką zamieszkującą region Wielkiego Rowu Afrykańskiego w Tanzanii w porównaniu do składu mikrobioty w kale osób pochodzących z Bolonii we Włoszech (84). Autorzy stwierdzili większy udział bakterii *Prevotella*, *Treponema*, *Ruminococcaceae*, niektórych gatunków *Bacteroides* i *Clostridium* w kale osób z populacji Hadza. Bakterie te mogą wspomagać trawienie składników roślinnych wchodzących w skład pożywienia tego plemienia. Smits i wsp badający mikrobiotę w kale osób pochodzących z tego samego plemienia stwierdzili ponadto dużą sezonowość składu mikrobioty na którą ma wpływ pora sucha i wilgotna (89). Autorzy zaobserwowali większe zróżnicowanie mikrobioty w porze suchej, co jest powiązane z rodzajem spożywanego wówczas pokarmu. Ponadto naukowcy zaobserwowali także zróżnicowanie mikrobioty u członków plemienia Hadza w zależności od płci. Kobiety należące do tej społeczności, które spożywały głównie rośliny, owoce i bulwy zbierane wokół osady, wykazywały większy odsetek krętek *Treponema*. Natomiast u mężczyzn, u których dieta zawierała większy udział mięsa pozyskanego w wyniku łowów z dala od osady, stwierdzono obecność w kale większego odsetka bakterii z rodzaju *Blautia* i *Eubacteria*. Nie odnotowano tego rodzaju różnic w składzie mikrobioty w kale u osób pochodzących z Włoch, prawdopodobnie ze względu na podobną dietę u obu płci. Wyniki badań uzyskane metodą sekwencjonowania metagenomowego próbek kału pochodzących od osób z plemienia Hadza w porównaniu do grupy kontrolnej z USA wykazały większy udział kodowanych przez geny mikrobioty enzymów rozkładających węglowodany (carbohydrate active enzyme - CAZymes) w populacji Hadza. Wskazuje to na większe przystosowanie mikrobioty tego plemienia do trawienia składników roślinnych wchodzących w skład ich diety. Naukowcy porównali także skład mikrobioty plemienia Hadza ze składem mikrobioty pochodzącej z próbek uzyskanych od osób z kilkunastu różnych społeczności świata, zarówno tradycyjnych i rozwiniętych. Stwierdzono, że populacje z krajów rozwiniętych charakteryzują się występowaniem w kale większej ilości bakterii *Bacteroidaceae* (średnio 20,9% vs 0,8 w populacjach tradycyjnych) natomiast populacje pierwotne (tradycyjne) wykazywały większy udział bakterii *Prevotellaceae* (średnio 29,8 vs 7,6 w społecznościach rozwiniętych). Stwierdzono także obecność *Spirochaetaceae* i *Succinivibrionaceae* w tradycyjnych społecznościach, podczas gdy w społecznościach rozwiniętych rodzaje te są rzadkie lub nie występują w ogóle. Natomiast *Verrucomicrobia* występowały w znacznej ilości jedynie w społecznościach rozwiniętych. Badanie przeprowadzone u dzieci europejskich odżywiających się zgodnie z tzw. dietą zachodnią oraz u dzieci z Burkina Faso (państwo w Afryce Zachodniej) stosujących dietę zawierającą bardzo mało lipidów i białek zwierzęcych, natomiast bogatą w produkty roślinne takie jak proso, sorgo i lokalne warzywa) ujawniło, że afrykańska mikroflora dziecięca jest niezwykle bogata w rodzaje *Prevotella* i *Xylanibacter*, które są zdolne do rozkładu celulozy i ksylanów (18). Rodzaje te nie były wykrywane u dzieci europejskich, u których wykazano także niższy poziom obecności SCFA i wyższy odsetek

rodzaju *Escherichia* w porównaniu do dzieci z Burkina Faso. Wg autorów dieta dzieci afrykańskich może przyczynić się do ochrony przed niezakaźnymi chorobami zapalnymi jelit. Jha i wsp. badali różnice w składzie mikrobioty w kale u czterech różnych wiejskich himalajskich populacji zamieszkujących Nepal (43). Populacje te zamieszkiwały podobny obszar geograficzny Himalajów, różniły się jednak poziomem transformacji społeczeństwa z formy zbieracko łowieckiej (populacja Chepang) do nowoczesnej rolniczej gospodarki (populacje Raji, Raute i Tharu). Choć nie stwierdzono znaczących zmian w ogólnej liczbie gatunków bakteryjnych (zróżnicowanie alfa) między populacjami, to wykazano duże różnice w składzie mikrobioty w poszczególnych populacjach przez obecność lub brak danych taksonów bakteryjnych w danej grupie. Autorzy dokonali także porównania mikrobioty himalajskich populacji do grupy kontrolnej pochodzącej z USA. Wszystkie cztery populacje zamieszkujące Himalaje wykazywały mniejsze różnice w składzie mikrobioty między sobą niż w porównaniu do mikrobioty grupy osób z USA. Stwierdzono większy udział bakterii z gromady *Proteobacteria* w badanych populacjach, szczególnie w populacji pierwotnej Chepang w porównaniu do grupy próbek pochodzących od osób zamieszkujących USA. Z kolei w kale osób z grupy kontrolnej z USA dominowały gromady *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Verrucomicrobia*, które wykrywano w mniejszej ilości w kale u osób pochodzących z nowoczesnej, rolniczych populacjach himalajskich (Raji, Raute i Tharu) i najmniejszej w populacji pierwotnej Chepang. Autorzy wykazali, że większy udział przedstawicieli gromady *Proteobacteria* i niższy udział bakterii z gromady *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* w kale dotyczy także innych pierwotnych populacji zamieszkujących różne rejony świata. Ponadto wykazano, że populacje himalajskie, które relatywnie niedawno przekształciły się ze społeczeństw pierwotnych w społeczeństwa rolnicze charakteryzowały się m.in. obecnością w kale bakterii z rodzaju *Ruminobacter* i *Treponema*, które są powiązane z metabolizmem składników pokarmów roślinnych. Stwierdzono także większy udział bakterii *Prevotella* i *Eubacterium* powiązanych z dietą wegetariańską w kale osób z populacji himalajskich. Osoby te tradycyjnie, jak w całym regionie, spożywają głównie produkty roślinne w porównaniu do grupy osób z USA. Natomiast rodzaje *Bacteroides* i *Blautia*, które są powiązane z dietą bogatą w białka i tłuszcze zwierzęce w większej ilości występowały w kale osób z grupy kontrolnej z USA. Badacze stwierdzili ponadto duży wpływ źródła wody pitnej na skład mikrobioty. Populacje korzystające z wody pitnej pobieranej z rzeki wykazywała w próbkach kału obecność większego odsetka krętek *Treponema* w porównaniu do populacji korzystających z wody głębinowej, które z kolei wykazywały większy udział w składzie mikrobioty bakterii z rodzaju *Fusobacterium*.

Niektórzy naukowcy postulują, że wśród czynników wpływających na zróżnicowanie mikroflory poza czynnikami zewnętrznymi, ważny jest także genotyp człowieka. Jednym z genów wymienianych jako modyfikator mikrobioty jest *FUT2* kodujący fukozylotransferazę 2, która bierze udział w tworzeniu antygeny H w płynach ustrojowych i błonie śluzowej jelit (99, 103). W zależności od obecności polimorfizmu G428A (W143X) - rs601338, wyróżnia się u ludzi typ sekrecyjny i niesekrecyjny *FUT2*. Typ sekrecyjny charakteryzuje się obecnością formy heterozygotycznej lub homozygotycznej nukleotydu G – guaniny w miejscu rs601338 (genotypy SeSe (GG) lub Sese (GA)). Typ niesekrecyjny natomiast charakteryzuje się obecnością adeniny w miejscu rs601338 w postaci homozygotycznej (genotyp sese (AA)) i może mieć związek z niektórymi chorobami jak np. cho-

roba Leśniowskiego-Crohna, cukrzycą typu 1, kandydozą pochwy, zapaleniami układu moczowo-płciowego (99, 103). Zaobserwowano także różnice między składem populacji mikroflory między poszczególnymi genotypami m.in. z większą ilością bakterii z rodzaju *Blautia*, *Dorea formicigenerans*, *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium sphenoides* i mniejszym zróżnicowaniem mikrobioty u ludzi z genotypem niesekrecyjnym. Bakterie te oraz niskie zróżnicowanie mikrobioty są powiązane z występowaniem nieswoistych zapalnych chorób jelit oraz zespołu jelita nadwrażliwego (103). Szczególnie pomocne w poznaniu zależności między danym genotypem i składem mikrobioty człowieka są badania typu GWAS (Genome-Wide Association Studies), w których analizuje się związek polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w ludzkim genomie z wybraną cechą np. konkretnym składem mikrobioty. W ten sposób stwierdzono związek między występowaniem u osób z genotypem CC (C13910C, rs4988235) w regionie promotorowym genu *LCT* (w obrębie intronu genu *MCM6*) w chromosomie 2 zwiększonej ilości bakterii z rodzaju *Bifidobacteria* w porównaniu z osobami genotypem CT i TT (32). Gen *LCT* koduje enzym laktazę rozkładający cukier mleczny laktozę do glukozy i galaktozy. Obecność genotypu CC wpływa na ekspresję genu *LCT* i związana jest z nietolerancją laktozy u dorosłych, co przy spożyciu produktów mlecznych powoduje przedostanie się niestrawionej laktozy do jelita grubego, gdzie cukier ten jest wykorzystywany m.in. przez *Bifidobacteria* jako źródło energii. Postuluje się, że obecność *Bifidobacteria* nadaje pewien stopień tolerancji laktozy u osób z nietolerancją na ten cukier (32). W badaniach Hughes i wsp. z 2020 roku potwierdzono wpływ polimorfizmu CC (rs4988235) w regionie promotorowym genu *LCT* na obfitość występowania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a ponadto zidentyfikowano kilka nowych loci związanych z modyfikacją mikrobioty (41). Najsilniejszy związek wykazano między występowaniem bakterii z rodzaju *Ruminococcus* i rs150018970 blisko genu *RAPGEF1* w chromosomie 9 i pomiędzy bakteriami z rodzaju *Coprococcus* i rs561177583 w genie *LINC01787* w chromosomie 1. Potrzebne są dalsze badania, które pozwolą w pełni zrozumieć zakres wpływu genotypu gospodarza na skład i funkcję mikrobiomu jelitowego oraz ewentualne związki między genotypem a możliwością wystąpienia wybranych chorób.

PROZDROWOTNE FUNKCJE MIKROBIOTY JELITOWEJ

Mikrobiota jelitowa pełni w naszym organizmie wiele ważnych funkcji. Zapobiega kolonizacji jelit przez bakterie chorobotwórcze; hamując ich wzrost (bakterie komensalne modyfikują pH jelit, wytwarzają toksyczne bakteriocyny i antybakteryjne peptydy), zajmując przestrzeń życiową (niszę), zużywając dostępne składniki odżywcze, wpływając na różnorodne szlaki sygnalizacji komórkowej organizmu oraz biorąc udział w dojrzewaniu i regulacji komórek odpornościowych (9, 17, 47, 76, 78). Mikrobiota i wytwarzane przez nią metabolity wpływają na integralność nabłonka jelitowego regulując ściśle połączenia międzykomórkowe nabłonka (ang. tight junctions) (26). Mikroflora jelitowa bierze także udział w produkcji i metabolizmie mucyny wchodzącej w skład śluzu jelitowego (20). Poprzez utrzymanie integralności nabłonka jelit zapobiega inwazji chorobotwórczych bakterii oraz zapobiega przedostawaniu się szkodliwych składników bakteryjnych jak toksyny czy składniki błony komórkowej do krwioobiegu i innych narządów co mogłoby przyczynić się do rozwoju w nich stanów zapalnych (27). Istotne znaczenie mikro-

biomu dla zdrowia człowieka sprawiło, że część naukowców uważa zbiorowisko mikroorganizmów za nowy ludzki „narząd” (63). Mikroorganizmy zamieszkujące ludzkie jelita tworzą między sobą skomplikowaną sieć zależności, w których produkty metabolizmu jednego gatunku mogą stanowić pokarm dla innych. Jedną z najważniejszych funkcji bakterii jelitowych jest zdolność do wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA – short chain fatty acid) jak np. octany, propioniany i maśłany (81). Substancje te, szczególnie maśłany, stanowią źródło energii dla enterocytów - komórek nabłonka jelita. Maśłany wzmagają proliferację i dojrzewanie enterocytów, przez co wpływają na ewentualną przepuszczalność bariery śluzówkowej jelita. Maśłany posiadają też funkcję antynowotworową przez ich zdolność do indukowania apoptozy nowotworowych komórek jelita oraz regulacji ekspresji genów przez inhibicję (inhibiting histone deacetylases). Propioniany także odżywiają enterocyty, ponadto są transportowane do wątroby gdzie wchodzą w skład szlaku metabolicznego glukoneogenezy oraz oddziałują na receptory związane z sytością. Octany z kolei stanowią źródło pokarmu dla wielu bakterii oraz biorą udział w metabolizmie cholesterolu i tłuszczu. Bakteriami produkującymi maśłany są głównie rodzaje należące do *Firmicutes* jak np. niektóre rodzaje z rodziny *Lachnospiraceae* i gatunek *Faecalibacterium prausnitzii*, z kolei propioniany są produkowane przede wszystkim przez gatunki należące do *Bacteroides* oraz niektóre gatunki *Clostridium*, natomiast octany produkuje wiele różnorodnych mikroorganizmów. Mikrobiota jelita bierze także udział w syntezie witamin z grupy B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 i B12), K, biotyny i kwasu foliowego oraz w absorpcji jonów wapnia, żelaza i magnezu. Szczególnie gatunki należące do *Bacteroides* posiadają potencjał do wytwarzania witamin z grupy B, choć witamina B12 jest wytwarzana głównie przez bakterie należące do *Fusobacteria* (81, 117). Mikrobiota odgrywa rolę w modulowaniu prawidłowego działania osi mózgowo-jelitowej (27, 29). Niektóre gatunki bakterii biorą udział w gospodarce kwasów żółciowych, tłuszczu, karnityny i fosfatydylocholiny. Mikroflora stymuluje zarówno swoiste jak i nieswoiste mechanizmy odporności, działa na tkankę limfatyczną związaną jelitem (GALT), pobudza syntezę przeciwciał, wpływa na ekspresję receptorów Toll-like (64, 65, 122). Wśród naukowców zajmujących się tematyką mikrobioty ludzkiej przeważa pogląd mówiący, że im większe jest zróżnicowanie mikrobioty tym jesteśmy zdrowsi.

MIKROBIOTA JELITOWA W CHOROBIE

Gwałtowne zmiany w składzie i/lub liczebności (zaburzenie homeostazy) mikroflory jelitowej prowadzą do tzw. „dysbiozy” (107). Za jej powstanie odpowiada wiele różnorodnych czynników jak np. zmiana diety, stres, styl życia, stosowanie antybiotyków lub używek. Ze względu na problemy z odpowiednim doбором grup kontrolnych pacjentów w badaniach mikrobioty wynikające ze znacznego zróżnicowania diety i środowiska życia człowieka, w badaniach tych stosuje się głównie modele zwierzęce. Modele te, choć nie są w stanie w pełni odwzorować organizmu człowieka (62), przyczyniły się do poznania wpływu mikrobioty na ludzkie zdrowie. Badania prowadzone są często na zwierzętach gnotobiotycznych (germ free), które są wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów. Zaobserwowano, że jelita takich zwierząt mają mniejszą powierzchnię, wykazują nieprawidłową perystaltykę i upośledzone wchłanianie składników pokarmowych (17, 78). Dysbiozę mikrobiomu u człowieka wiąże się z występowaniem różnorodnych

problemów zdrowotnych jak np. zapalnymi chorobami jelitowymi (inflammatory bowel disease - IBD) w tym chorobą Leśniowskiego-Crohna, zespołem jelita drażliwego (IBS) i schorzeniami metabolicznymi (14, 17, 59, 78, 109). Niektórzy naukowcy wiążą dysbiozę z objawami zespołu chronicznego zmęczenia, depresji, autyzmu i zaburzeń endokrynologicznych oraz z rozwojem nowotworów przewodu pokarmowego, niealkoholowego stłuszczenia wątroby, a nawet alergii (1, 49, 83, 98). Zaobserwowano, że schorzenia te są powiązane z występowaniem różnorodnych objawów gastrycznych jak biegunka, zaparcia, ból brzucha i wzdęcia. Dieta bogata w cukry proste, tłuszcze nasycone i emulgatory a uboga w roślinny błonnik może sprzyjać rozwojowi nieodpowiedniej flory bakteryjnej i przyczynić się do wystąpienia chorób zapalnych. W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na rolę mikroflory jelitowej w patogenezie chorób cywilizacyjnych takich jak otyłość, cukrzyca typu 2 i miażdżyca (12, 36, 48). Mikroflora wpływa także na zwiększoną przepuszczalność jelita, co może prowadzić do przedostania się fragmentów bakterii i ich toksyn (jak np. endotoksyny, lipopeptydy) do układu krwionośnego prowadząc do uogólnionej endotoksemii objawiającej się m.in. przewlekłym stanem zapalnym, co także uważa się za możliwy czynnik sprawczy otyłości, chorób neurodegeneracyjnych i nowotworów jelita grubego (11, 27, 42, 57). W dalszej części publikacji przedstawiono szczegółowe informacje na temat wybranych chorób powiązanych z zaburzeniami ilościowymi i jakościowymi mikrobioty.

NIESWOISTE ZAPALNE CHOROBY JELIT ORAZ ZESPÓŁ JELITA NADWRAŻLIWEGO

Nieswoiste zapalne choroby jelit (Inflammatory Bowel Diseases - IBD) jest to grupa przewlekłych enteropatii o złożonej patogenezie, charakteryzujących się długotrwałymi lub nawracającymi objawami (z okresami remisji i nawrotów) ze strony przewodu pokarmowego o niewyjaśnionej przyczynie, powiązana ze zmianami histopatologicznymi oraz z przewlekłym stanem zapalnym na terenie błony śluzowej jelit cienkiego oraz grubego (15, 111, 112). Do nieswoistych zapalnych chorób jelit zalicza się m.in. chorobę Leśniowskiego-Crohna (Crohn's Disease – CD) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (Colitis Ulcerosa – CU). Szczyt zachorowań na nieswoiste zapalne choroby jelit przypada między 16 a 25 rokiem życia. Drugą grupą co do częstości zachorowań są dzieci przed 16 rokiem życia, a następnie dorośli z początkiem wystąpienia objawów w starszym wieku - między 55 i 65 rokiem życia (15). Najczęściej występujące objawy IBD to przewlekła biegunka, gorączka, bóle brzucha, wzdęcia, niedowaga i ogólne osłabienie. Etiologia nieswoistych zapaleń jelit do tej pory nie jest w pełni poznana. Uważa się, że czynniki: mikrobiologiczne (zaburzenia mikrobioty jelitowej), środowiskowe, predyspozycje genetyczne, autoimmunologiczne mają największy wpływ na rozwój choroby. Za jedną z przyczyn powstawania nieswoistych zapalnych chorób, uważa się poprawę stanu sanitarno-higienicznego środowiska życia człowieka ze zmniejszoną ekspozycją na infekcję oraz stosowanie antybiotyków w dzieciństwie, co może mieć wpływ na późniejszy rozwój choroby (59, 92). Uważa się, że na rozwój zespołu Leśniowskiego-Crohna mają wpływ m.in. mutacje w ludzkim genie *NOD2* oraz obecność w jelitach zwiększonej ilości bakterii *Fusobacterium* i należących do gromady *Proteobacteria* (rodzina *Enterobacteriaceae*) enteroadhezyjnych pałeczek *E. coli* oraz pałeczek *Klebsiella*. Zaobser-

wowano także zmniejszenie ilości potencjalnie ochronnych dla jelit bakterii należących do gromady *Firmicutes*, w tym *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus sp.* i *Clostridium* klastery IV i XIVa (15, 66). Postulowany jest także wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego przewlekłym stanem zapalnym na zachwianie równowagi mikrobioty poprzez zmniejszenie liczby prawidłowej beztlenowej mikroflory na rzecz fakultatywnie beztlenowych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* w tym patogennych szczepów *Escherichia coli* (109). U osób z zespołem Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano również znaczne (powyżej 25%) zmniejszenie różnorodności mikroflory jelita grubego w stosunku do zdrowych osób, co z kolei może powodować zmniejszenie ilości produkowanych przez pożyteczne mikroorganizmy witamin i prozdrowotnych związków, takich jak np. SCFA (15, 66). Ponieważ nie każdy przypadek dysbiozy prowadzi do powstania niespecyficznych zapaleń jelita, postulowany jest duży wpływ indywidualnych predyspozycji chorych osób na rozwój tego typu schorzeń. Obecnie nie jest znana skuteczna metoda leczenia eliminująca całkowicie objawy choroby. Stosuje się leki przeciwzapalne, immunosupresyjne oraz leczenie biologiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, postuluje się także możliwość prozdrowotnej modulacji mikrobioty jelitowej (15, 66). Stwierdzono, że zmiana diety chorego na tzw. dietę eliminacyjną Low FODMAP (Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides And Polyols), wpływa na złagodzenie objawów chorobowych jak wzdęcia, ból brzucha i biegunki (111). Jest to dieta o niskiej zawartości fermentujących węglowodanów jak np. fruktoza, laktoza, czy też alkohole cukrowe (np. glikol, sorbitol, ksylitol, mannitol), FOS (fruktooligosacharydy) i GOS (galaktooligosacharydy), które są źródłem pokarmu dla bakterii jelitowych. Bakterie rozkładając te związki wytwarzają jako produkt uboczny gazy (wodór, metan, siarczki) wywołujących wzdęcia, ból i dyskomfort. Niestety konsekwencją stosowania diety Low FODMAP są zaburzenia składu mikrobioty jelitowej a co za tym idzie niedobory niektórych składników odżywczych (związków mineralnych i witamin) a przede wszystkim upośledzenie wytwarzania korzystnych dla organizmu SCFA odżywiających enterocyty oraz osłabienie perystaltyki jelita i trudności z wypróżnianiem. Stosowanie niektórych probiotyków także łagodzi objawy nieswoistych chorób zapalnych jelita (111). Wymaga to jednak dalszych badań pod względem doboru odpowiedniego składu jakościowego i ilościowego stosowanych probiotyków. Kolejną dysfunkcją jelit w której doszukuje się związku pomiędzy jej rozwojem a zaburzeniami składu mikrobioty jest zespół jelita nadwrażliwego (Irritable Bowel Syndrome – IBS). W odróżnieniu od nieswoistych zapaleń jelita do których należą groźne dla życia choroby takie jak opisane powyżej zespół Leśniowskiego – Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelita, IBS stanowi zespół objawów chorobowych jak np. ból brzucha, zmiana ilości wypróżnień, biegunki, zaparcia, bez uchwytnych diagnostycznie zmian zapalnych jelita. Szacuje się, że IBS może dotyczyć nawet ok. 20% dorosłych osób (61). Przyczyny zespołu nie są do końca poznane, choć za jedną z powodów jego powstania wymienia się stres i inne czynniki psychologiczne, stąd zainteresowanie naukowców tzw. osią jelito-mózg i dwukierunkowym wpływem mikrobioty jelita na układ nerwowy. Zaobserwowano, że w przypadku zespołu jelita drażliwego na wystąpienie objawów wpływa nadmierny rozrost flory bakteryjnej w jelicie cienkim (Small Intestinal Bacterial Overgrowth - SIBO) (97). SIBO można potwierdzić m.in. przez posiew aspiratu z jelita cienkiego i wykrycie $>10^3$ jednostek tworzących kolonię [CFU] na 1 ml aspiratu. Ponadto SIBO charakteryzuje się obecnością w mikrobiocie jelita

cienkiego gatunków bakterii normalnie występujących w jelicie grubym jak np. *E.coli*, *Klebsiella* sp., *Enterococcus* oraz dodatnim wynikiem wodorowego testu oddechowego z glukozą. U osób wykazujących objawy IBS z dominującymi zaparciami wykrywany jest także drobnoustrój należący do archeonów - *Methanobrevibacter smithii*. Archeon ten odpowiedzialny jest za wytwarzanie metanu, który może być wykryty w wodorowo-metanowym teście oddechowym. Podobnie jak w przypadku zespołu Leśniowskiego-Crohna trwają obecnie prace nad modulacją mikrobioty jelita osób chorych np. przez stosowanie probiotyków i odpowiedniej diety, w celu zmniejszenia uciążliwości objawów IBS (61). Zarówno nieswoiste zapalne choroby jelit jak i zespół jelita nadwrażliwego stanowią uciążliwy problem dla dotkniętych tymi chorobami ludzi na całym świecie. Dalsze badania nad przyczynami powstawania chorób zapalnych jelita mogą pozwolić na zaprojektowanie właściwego ich leczenia i zapobiegania.

RZEKOMOBŁONISTE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO

Rzekomobloniaste zapalenie jelita grubego jest związane z zakażeniem bezwzględnie beztlenową Gram-dodatnią laseczką toksynotwórczego szczepu *Clostridioides difficile* (dawna nazwa *Clostridium difficile*). Choroba występuje głównie u pacjentów, u których zakażenie nastąpiło w środowisku szpitalnym lub w domach opieki po antybiotykoterapii, szczególnie po stosowaniu cefalosporyn II i III generacji oraz fluorochinolonów. Antybiotyki te wyniszczają naturalną mikrobiotę jelitową, co skutkuje zwolnieniem niszy dla patogennych *Clostridioides* (45, 54). Najbardziej narażone na zakażenie są osoby powyżej 65 roku życia, długotrwale leczone antybiotykami, stosujące leczenie inhibitorami pompy protonowej, pacjenci długotrwale przebywający w szpitalu, szczególnie na oddziałach onkologicznych. Toksynotwórcze laseczki *C. difficile* wydzielają toksynę A (enterotoksynę) i toksynę B (cytotoksynę), które odpowiedzialne są za powstanie objawów chorobowych u zakażonej osoby. Szczególnie niebezpieczny dla zdrowia jest hiperwirulentny szczep *C. difficile* NAP1/BI/027 (54). Część szczepów *C. difficile* w tym hiperwirulentne szczepy, mogą wytwarzać dodatkowo toksynę binarną CDT, o aktywności aktywno-zależnej ADP-rybozylotransferazy. Głównym objawem zakażenia *C. difficile* jest wodnista biegunka o różnym nasileniu, może także wystąpić ból brzucha i gorączka oraz w cięższych przypadkach charakterystyczny obraz endoskopowy jelita grubego w postaci tzw. błony rzekomej. Rzekomobloniaste zapalenie jelita grubego jest poważaną chorobą, która nieleczone może prowadzić do ciężkiego zapalenia jelita grubego z niedrożnością jelit, posocznicy i wstrząsu, co z kolei może spowodować śmierć pacjenta. Standardowe leczenie zakażeń *Clostridioides* za pomocą antybiotyków takich jak metronidazol, wankomycyna lub fidaksonomycyna u części chorych jest nieskuteczne i prowadzi do nawrotów choroby (54). Odmienny skład jelitowej mikrobioty w tym stan dysbiozy może sprzyjać zakażeniu *Clostridioides difficile* oraz innymi patogenami, a nawet powodować zaostrzenie objawów choroby. Prawidłowa, wysoce zróżnicowana mikrobiota jelit chroni przed nawrotami CDI, należy więc dążyć do jej odbudowania. Od kilku lat z powodzeniem stosowany jest przeszczep mikrobioty kałowej (ang. fecal microbiota transplantation - FMT), który przywraca prawidłowy skład mikroflory jelitowej pacjenta. Zgodnie z polskimi zaleceniami ekspertów Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków metodę tą należy stosować

wać w przypadku pacjentów z co najmniej trzecim nawrotem choroby (54). Temat prze-szczepu mikrobioty jelitowej został szerzej opisany w dalszej części artykułu.

OTYŁOŚĆ I NADWAGA

Według ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (ang. WHO – World Health Organization) otyłość stanowi istotny problem zdrowotny, ekonomiczny i społeczny. Szczególnie w krajach rozwiniętych choroba ta stanowi prawdziwą epidemię XXI wieku. W 2016 roku wg WHO prawie 2 miliardy dorosłych ludzi na świecie (około 40% populacji) cierpiało na nadwagę a około 650 milionów na otyłość (11% mężczyzn i 15% kobiet) (115). Według Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) z 2014 r. w Polsce osoby w wieku powyżej 15 lat z nadwagą i otyłe stanowiły odpowiednio 36,6% i 16,7% populacji, ponadto odsetek osób z tego typu nieprawidłowościami w naszym kraju stale rośnie (118). Otyłość jest czynnikiem ryzyka wielu innych chorób takich jak nadciśnienie, powikłania sercowo-naczyniowe, udar mózgu, bezdech senny, choroby zwyrodnieniowe stawów, cukrzyca typu II, depresja i nowotwory. Głównym czynnikiem sprawczym nadwagi i otyłości jest przyjmowanie zbyt dużej ilości kalorii w stosunku do ilości kalorii zużywanych przez organizm (zachwianie bilansu energetycznego). Wiele dodatkowych czynników wpływa na zwiększenie masy ciała człowieka, szczególnie nieaktywny tryb życia, spożywanie żywności bogatej w proste węglowodany, nieodpowiednie godziny spożywania pokarmu i czynniki genetyczne. Postuluje się także udział zaburzeń mikrobioty w rozwoju otyłości (8, 36, 58). Szczególnie interesujące okazały się eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. W jednym z wielu tego typu badań przeniesiono mikrobiotę otyłych myszy DIO (DIO - diet-induced obesity) do mysz gnbio-tycznych o prawidłowej masie ciała, co doprowadziło do powstania u szczupłych myszy podobnych zmian jak u mysz otyłych (100). Wpływ mikrobioty na gospodarkę węglowodanów i tłuszczy odbywa się na wielu poziomach w zależności od obecności korzystnej lub niekorzystnej flory bakteryjnej. W licznych badaniach naukowych stwierdzono różny skład i zróżnicowanie mikrobioty u osób szczupłych i otyłych oraz niższe zróżnicowanie mikrobioty u osób otyłych (8, 32, 48, 58). Million i wsp. w badaniach wykonanych techniką Real Time PCR dotyczących wybranych mikroorganizmów u otyłych i szczupłych dorosłych osób zaobserwowali zwiększony udział *Methanobrevibacter smithii* i *Bifidobacterium animalis* u osób szczupłych natomiast *Lactobacillus reuteri* był liczniejszy u osób otyłych (58). W wielu badaniach stwierdzono zależność zwiększonego udziału bakterii z rodziny *Christensenellaceae* u osób szczupłych względem osób otyłych (32). Bervoets i wsp. w badaniach, w których analizie poddano skład mikrobioty jelita u otyłych i szczupłych dzieci stwierdzili, że dieta bogata w tłuszcze i proste węglowodany powoduje wzrost ilości mikroorganizmów zaliczanych do gromady *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroidetes* (8). Autorzy zaobserwowali także u otyłych dzieci zwiększoną obecność drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* i jednocześnie zmniejszenie ilości bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Obecność większej ilości bakterii należących do gromady *Firmicutes* prawdopodobnie umożliwia zwiększone pozyskiwanie energii z pokarmu m.in. przez zwiększoną produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych SCFA. Związki te są nie tylko źródłem energii dla komórek nabłonkowych jelita ale stanowią także źródło energii dla całego organizmu człowieka odpowiadając za dodatkowe ok. 200 kcal/dzien-

nie (48). Propioniany są wchłaniane przez wątrobę gdzie są wykorzystywane w cyklach glukoneogenezy, lipogenezy i syntezy białek, natomiast octany są wykorzystywane przez komórki różnych tkanek i są substratem do syntezy cholesterolu. U osób otyłych zaobserwowano obecność większego stężenia SCFA ze zwiększonym udziałem propionianów w porównaniu z osobami o prawidłowej wadze ciała. (85). SCFA aktywują receptory związane z białkiem G (GPR – G Protein Coupled Receptor) co wpływa na wydzielanie peptydu PYY, który spowalnia pasaż jelitowy i zwiększa poziom pobranej z pokarmu energii ale też wpływa na uczucie sytości. Część naukowców uważa, że dysbioza poprzez uszkodzenie integralności błony śluzowej jelita i nabłonka jelita (tzw. „leaky gut” – przepuszczalne jelita/ jelito przesiąkliwe) powoduje przenikanie do krwiobiegu niektórych składników komórkowych bakterii jak LPS (lipopolisacharyd wchodzący w skład błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych), co może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego. Stan taki objawiający się m.in. podniesionym poziomem białka C-reaktywnego, niektórych cytokin i interleukin oraz czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α) łączony jest z nadwagą i otyłością (42). Badania Cani i wsp. przeprowadzone na myszach dowiodły, że już 4-tygodniowe wlewy roztworu zawierającego LPS doprowadził do podwyższenia wagi ciała, rozwoju stłuszczenia wątroby, stężenia glukozy we krwi i insulinooporności podobnie jak u myszy karmionych przez 4 tygodnie dietą wysokotłuszczową (11). W badaniach na modelu mysim dowiedziono także, że otyłość połączona z nieprawidłową mikroflorą może przyczynić się do modyfikacji ekspresji niektórych genów w komórkach jelita m.in. na drodze epigenetycznej acetylacji i metylacji, co z kolei może być powodem rozwoju chorób związanych z otyłością (72). Kolejnym ważnym czynnikiem badanym w ostatnich latach, któremu przypisuje się ważną rolę m.in. w regulacji metabolizmu energetycznego człowieka jest arylowy receptor węglowodorowy (AHR – aryl hydrocarbon receptor). Receptor ten wpływa na ekspresję skorelowanych z metabolizmem białek kodowanych przez m.in. geny: *CYP1B1*, *PPAR α* , *SCD1* i *SPPI* przez co jest brany pod uwagę jako potencjalny cel terapeutyczny u osób otyłych i chorych na zespoły metaboliczne. Aktywacja receptorów AHR powoduje otyłość, a ich hamowanie jej zapobiega. Zablockowanie aktywności receptora AHR u myszy karmionych pokarmem wysokokalorycznym (tzw. „Western Diet”) z dużą ilością tłuszczu zmniejszyło wagę myszy oraz zapobiegało otyłości i stłuszczeniu wątroby, podobnie do myszy karmionych dietą niskokaloryczną. Natomiast karmienie myszy dietą wysokokaloryczną bez zmian w działaniu receptora AHR prowadziło do ich otyłości (79). W aktywowaniu receptora AHR ważną rolę może pełnić flora bakteryjna. Niektóre gatunki bakteryjne poprzez metabolizm tryptofanu mogą aktywować receptory arylove w komórkach odpornościowych jelita człowieka (31). Obecnie trwają intensywne badania w których poszukiwane są zależności między składem mikrobioty u osób otyłych i szczupłych, a procesem aktywacji i hamowania receptorów AHR oraz różnorodne badania nad innymi ludzkimi receptorami i metabolitami bakteryjnymi wpływającymi na nasz metabolizm.

CELIAKIA

Celiakia (choroba trzewna) to autoimmunologiczna choroba spowodowana nietolerancją organizmu człowieka na gliadynę, białko wchodzące w skład glutenu, występujące w ziarnach zbóż takich jak m.in. pszenica (68). Schorzenie to prowadzi do zaniku

kosmków jelitowych, co powoduje upośledzenie funkcji jelit. Objawy celiakii jak: ból i wzdęcia brzucha, biegunki, utrata masy ciała, osłabienie, anemia, występują w różnym wieku. Choroba jest uwarunkowana genetycznie i występuje u osób wykazujących obecność alleli HLA-DQ2 i/lub DQ8. Nadal niewyjaśnione są w pełni przyczyny powstania choroby. Niewiadome jest dlaczego celiakia może rozwinąć się w różnym etapie życia człowieka, pomimo wprowadzenia glutenu we wczesnym dzieciństwie, nie wyjaśniono także przyczyn rosnącego odsetka chorych w krajach zachodnich pomimo braku wzrostu spożycia pokarmów bogatych w gluten oraz powodu rozwoju choroby tylko u małego odsetka osób z genetyczną predyspozycją do celiakii (obecność alleli HLA-DQ2/8), która występuje u ponad 30% społeczeństwa (82). Stąd poszukiwanie innych czynników, które mogą wpływać na powstanie objawów choroby. Postuluje się wpływ mikrobioty na rozwój celiakii poprzez zaburzenie ilościowego i jakościowego składu flory bakteryjnej jelita. *Cristofori* i wsp. w pracy przeglądowej z 2018 roku zaobserwowali, że pomimo dużych różnic między stosowanymi w poszczególnych badaniach metodami analiz i liczbą badanych w nich osób zauważalne jest, że u osób chorujących na celiakię zachwiana jest równowaga w składzie mikrobioty między bakteriami kojarzonymi z wywoływaniem stanów zapalnych oraz pożytecznymi drobnoustrojami łagodzącymi te stany na korzyść tych pierwszych. W badaniach stwierdzono wzrost ilości bakterii Gram-ujemnych względem Gram-dodatnich a szczególnie wzrost odsetka *E. coli* i *Bacteroides* wobec spadku odsetka *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w porównaniu do składu mikrobioty osób zdrowych (68). U osób z celiakią zaobserwowano także zwiększoną ilość obligatoryjnych patogenów jak *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, i *Neisseria flavescens* oraz genów związanych z wirulencją w tym genów związanych z pozyskiwaniem żelaza (82). Badany jest także możliwy wpływ mikrobioty na dostępność immunogennego glutenu. Uważa się, że bakterie *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogą pełnić rolę ochronną przed powstawaniem objawów celiakii ze względu na produkowany przez te bakterie enzym proteazę rozkładający gluten na mniejsze peptydy, które są mniej immunogenne dla jelit w porównaniu do glutenu. Z kolei *Pseudomonas aeruginosa* ze względu na produkcję elastazy zaostrza objawy chorobowe tej choroby (68, 82). Stan dysbiozy wpływający na przepuszczalność jelit także przyczynia się do przedostawania nie w pełni strawionej gliadyny do błazki właściwej jelita. Postuluje się, że stosowanie u chorych na celiakię dokładnie wyselekcjonowanych probiotycznych szczepów bakteryjnych, o udowodnionych prozdrowotnych właściwościach, może wpłynąć na poprawę stanu zdrowia chorych, choć niewątpliwie wymaga to dalszych badań (68).

MIKROBIOTA A NOWOTWORY

Eksperti WHO wskazują, że drugim co do częstości powodem śmierci na świecie, po chorobach serca, z liczbą 9,6 mln przypadków w roku 2018, są nowotwory (114). Jest to bardzo zróżnicowana grupa chorób różnych narządów i części ciała człowieka. Wśród czynników powodujących powstanie nowotworu, poza zmianami genetycznymi, wymienia się czynniki: fizyczne (np. promieniowanie UV), chemiczne (np. azbest, alkohol, składniki dymu tytoniowego) i biologiczne (zakażenia patogennymi drobnoustrojami) (114). Związek niektórych mikroorganizmów z powstaniem nowotworów jest znany i potwierdzony w licznych badaniach naukowych. Uznany czynnikiem etiologicznym,

drobnokomórkowego raka wątroby, raka żołądka, białaczki typu T dorosłych i raka szyjki macicy są odpowiednio wirusy *HCV* i *HBV*, pałeczki *Helicobacter pylori*, wirus *HTLV-1* oraz wirus *HPV*. Wśród nowotworów, trzecim co do częstości występowania na świecie po raku płuc i piersi jest rak jelita grubego. Za jeden z czynników sprawczych powstania nowotworu, poza nieodpowiednimi nawykami żywieniowymi, stylem życia i predyspozycjami genetycznymi uważa się dysbiozę wraz ze zmianą ilościową i jakościową mikrobioty, która jest związana z nieprawidłowym sposobem odżywiania (34, 57, 83, 91). Opublikowana w 2019 roku metaanaliza wykazała, że między innymi bakterie takie jak *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* i *Clostridium* są liczniejsze u osób z rakiem jelita grubego niż u osób zdrowych i mogą mieć wpływ na rozwój tego nowotworu (110). Bakterie te wytwarzają toksyny i inne czynniki zjadliwości, które mogą odgrywać krytyczną rolę w kancerogenezie. Szczególną rolę odgrywa przewlekły stan zapalny, który prowadzi do nadmiernej i długotrwałej odpowiedzi immunologicznej mogącej prowadzić do uszkodzenia nabłonka jelita. Przewlekły stan zapalny może także dodatkowo (promować) nadmierny wzrost bakterii patogennych jak np. genotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* oraz *F. nucleatum*. Jak wykazano szczepy pałeczki *E. coli* posiadające zdolność do wytwarzania kolibaktyny (*pks+* *E.coli*) mogą prowadzić do nowotworzenia (69). Kolibaktyna to genotoksyna, która powoduje uszkodzenia materiału genetycznego poprzez tworzenie dwuniciowych pęknięć łańcucha DNA, co może przyczyniać się do indukcji procesu kancerogenezy. *F. nucleatum* może przyłączać się do powierzchni i dokonać inwazji kolonocytów przy pomocy białka adhezyjnego FadA. Białko to łączy się i wytwarza kompleks z E-kadheryną i aneksyną A1 co wzmacnia szlak sygnałowy β -kateniny powodując nadekspresję czynników transkrypcyjnych i onkogenów. Kolejnym drobnoustrojem którego obecność jest wiązana z nowotworzeniem jest enterotoksynogeny *B. fragilis* produkujący metalproteazę, która m.in. wpływa na β -kateninę, co prowadzi do proliferacji enterocytów i zwiększenia przepuszczalności nabłonka jelitowego (34, 83). Omawiane powyżej mikroorganizmy mogą tworzyć mikrośrodowisko sprzyjające powstaniu raka jelita grubego, jednak pośród wielu różnorodnych gatunków bakteryjnych zamieszkujących przewód pokarmowy człowieka znajdują się także takie, które chronią nas przed powstaniem tego nowotworu. Ekspersi Amerykańskiego Instytutu Badawczego nad Rakiem (American Institute for Cancer Research – AICR) oraz Światowej Fundacji Badań nad Rakiem (World Cancer Research Fund – WCRF) wskazują, że dieta bogata w błonnik może chronić przed zachorowaniem na raka jelita grubego (113). Błonnik pokarmowy stanowi źródło pokarmu dla bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które pozytywnie wpływają na proliferację enterocytów i homeostazę immunologiczną. Ponadto błonnik zwiększa objętość treści jelitowej, wiążąc potencjalne kancerogeny oraz zmniejszając czas tranzytu masy kałowej przez jelita co skraca czas kontaktu szkodliwych substancji z błoną śluzową jelita (raport WCRF). Następnym przykładem korelacji między stanem mikrobiomu, a nowotworzeniem jest wpływ składu mikrobioty jelitowej na leczenie immunologiczne nowotworów przeciwciałami anty PD1 i PD-L1. Komórki nowotworowe posiadają zdolność ucieczki spod kontroli immunologicznej, wykorzystując w tym celu punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej (checkpoints) PD1. Punkty kontroli u zdrowych ludzi umożliwiają m.in. unikanie odpowiedzi komórek odpornościowych przeciw własnym prawidłowym komórkom ciała. Ligandy PDL1 na powierzchni komórek nowotworowych łączą się z receptorami PD1 na

limfocytach T hamując ich aktywność i wytwarzanie cytokin. Odblokowanie receptorów PD1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych anty PD-1 i anty PD-L1 umożliwia ich aktywację przeciw antygenom nowotworowym, co umożliwia eliminację komórek nowotworowych przez komórki odpornościowe organizmu. W ostatnich latach prowadzonych jest wiele badań naukowych, które mają na celu określenie wpływu mikrobioty, stosowanej antybiotykoterapii i probiotyków na skuteczność leczenia inhibitorami PD1 i PD-L1 (77, 80, 116). Routy i wsp. dowodzą, że stosowanie antybiotyków jest związane ze słabą odpowiedzią na leczenie inhibitorami przeciwko immunologicznym punktom kontroli (80). Autorzy przeprowadzili doświadczenie na wolnych od drobnoustrojów myszach chorych na nowotwory oraz myszach leczonych antybiotykami, którym przeszczepiono kał od ludzi chorych na nowotwory reagujących na leczenie lub na nie opornych. Stwierdzono, że przeciwnowotworową skuteczność leczenia przeciwciałami anty-PD1 wykazywały myszy, u których przeszczepiono kał wraz z mikroflorą od chorych odpowiadających na leczenie. Najbardziej istotne w procesie odpowiedzi na leczenie immunologiczne okazały się bakterie *A. muciphilia*. Zwiększona ilość tej bakterii w kale osób z nowotworem była wykrywana u osób pozytywnie odpowiadających na leczenie. Wśród innych pożytecznych dla terapii immunologicznej bakterii wymienia się gatunki z rodzaju *Bifidobacterium* i *Bacteroides* oraz gatunki *Enterococcus hirae*, *E. faecium* i *Burkholderia cepacia* (77). Potrzebne są dalsze badania nad przyczynami powstawania nowotworu jelita grubego jak również wpływu mikrobioty na leczenie różnych nowotworów.

ALERGIE POKARMOWE

Alergie to choroby charakteryzujące się nadmierną reakcją ze strony układu odpornościowego człowieka po kontakcie z alergenem. Nieprawidłowa odpowiedź ze strony tego układu powoduje zaburzenia w obrębie różnych narządów i układów w organizmie człowieka. Wśród alergenów pokarmowych najczęściej wymienia się jaja kurze i mleko krowie. W ostatnich latach stwierdza się wzrost zachorowań na alergie szczególnie u dzieci. Zaobserwowano różnice w składzie mikrobioty jelitowej u osób z alergiami w porównaniu do osób zdrowych. Fazlollahi i wsp. stwierdzili w grupie 141 dzieci w wieku od 3 do 16 miesięcy z alergią na kurze jaja znaczne różnice w ilości bakterii - zwiększoną ilość bakterii należących do rodzin *Lachnospiraceae*, *Streptococcaceae* i zmniejszoną ilość *Leuconostocaceae* u dzieci z alergią w stosunku do dzieci zdrowych (25). Natomiast w badaniach Berni Canani i wsp. u dzieci z alergią na mleko krowie zaobserwowano większy udział bakterii z rodzin *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Blautia*, *Roseburia* i *Coprococcus* (7). Postuluje się wpływ składu mikrobioty, szczególnie w okresie wczesnego dzieciństwa, na rozwój niektórych alergii. Wykazano związek między składem mikroflory w okresie niemowlęcym a rozwojem alergii pokarmowych. Azad i wsp. w badaniach niemowląt w wieku od 3 miesięcy do 1 roku życia z alergią na przynajmniej jeden składnik pokarmowy wykazali zwiększony udział bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, a zmniejszony udział *Bacteroidaceae* (4). Ponadto autorzy zaobserwowali zmniejszone bogactwo mikroflory u dzieci z alergiami. Badania naukowe dowodzą, że odpowiedni skład mikrobioty jelitowej i jej metabolity oraz wczesna ekspozycja na ewentualne alergeny (różnorodne składniki pokarmowe) mają podstawowy wpływ na ustalenie tolerancji immunologicznej na alergeny pokarmowe (1). Wpływ na rozwinięcie objawów alergii ma

m.in. niedobór limfocytów T regulatorowych (Treg) lub ich nieodpowiednia indukcja. Limfocyty te są indukowane przez mikrobiotę i odpowiadają w zależności od subpopulacji, m.in. za wytwarzanie jądrowych czynników transkrypcyjnych np. ROR γ t, które wpływają na tolerancję na mikroflorę oraz wytwarzanie interleukiny 10, która odgrywa dużą rolę w regulacji procesu zapalnego (1, 64). Uważa się także, że duży wpływ na powstanie niektórych alergii ma nieodpowiednio wykształcona odpowiedź ludzkiego układu odporności na czynniki zewnętrzne. Tak zwana hipoteza „higieniczna” sformułowana przez Strachana tłumaczy, że za zwiększoną w ostatnich dekadach liczbę alergii odpowiada znaczna poprawa poziomu higieny i życie w niemal „sterylnych” warunkach (93). Odsetek chorób autozapalnych w krajach ubogich jest znacznie niższy niż w krajach wysoce rozwiniętych. Postuluje się, że kontakt z alergenami oraz patogenami bakteryjnymi i pasożytami we wczesnym dzieciństwie może odpowiednio modulować nasz układ odpornościowy i następnie zmniejszać w okresie dorosłym ryzyko wystąpienia skłonności do alergii. Zaobserwowano, że m.in. w rodzinach z dużą liczbą dzieci, młodsze dzieci, które mają częsty „niehigieniczny” kontakt ze starszym rodzeństwem rzadziej chorują na choroby alergiczne takie jak np. katar sienny. Podobnie, mniej chorób alergicznych zaobserwowano w rodzinach żyjących w środowisku wiejskim, posiadających zwierzęta domowe oraz u dzieci uczęszczających do przedszkoli (92). Obecnie prowadzonych jest wiele badań mikrobioty u osób z alergiami, co w przyszłości może pozwolić na opracowanie nowych rekomendacji dotyczących leczenia jak i zapobiegania tej grupy chorób.

ZABURZENIA PSYCHICZNE

Wiele badań naukowych sugeruje, że mikrobiom jelitowy może wpływać na zdrowie psychiczne człowieka (29, 40, 87, 94, 105). Uważa się, że mikrobiota ma wpływ na ośrodkowy układ nerwowy poprzez oś komunikacji „mikrobiota-jelito-mózg” (105). Zachwianie równowagi składu mikrobioty (dysbioza) łączy się z objawami depresji, autyzmu, zaburzeń lękowych, anoreksji, choroby Parkinsona i Alzheimer. Bakterie produkują bądź pośredniczą w produkcji szeregu substancji w tym acetylocholino, melatoniny, serotoniny (metabolizm tryptofanu), kwasu gammamasłowego, histaminy, SCFA oraz neurotoksyn, które pośrednio lub bezpośrednio mogą wpływać na ośrodkowy układ nerwowy. Wiele badań wskazuje, że zdrowa dieta jak np. dieta śródziemnomorska powiązana jest z dobrym nastrojem i chroni przed depresją. Jednocześnie dieta ta pozytywnie wpływa na mikrobiom promując namnażanie pożytecznych dla organizmu człowieka mikroorganizmów (40). Szczególnie zainteresowanie naukowców budzi korelacja mikrobioty i chorób ze spektrum autyzmu (ASD). U niemal połowy przypadków dzieci z ASD stwierdza się różnego rodzaju objawy gastryczne jak zaparcia i biegunki (38). Strati F i wsp. zaobserwowali u osób z ASD wzrost odsetka *Firmicutes* względem *Bacteroides* w tym rodzajów *Collinsella*, *Corynebacterium*, *Dorea*, i *Lactobacillus* (94). Jednocześnie stwierdzono także obniżony odsetek rodzajów *Alistipes*, *Bilophila*, *Dialister*, *Parabacteroides* i *Veillonella*. Autorzy zaobserwowali także u autystycznych dzieci z zaparciami znaczny wzrost ilości bakterii z rodzajów *Escherichia*, *Clostridium* klaster XVIII oraz grzybów z rodzaju *Candida*. U dzieci z autyzmem stwierdzono również niższy poziom SCFA wytwarzanych przez pożyteczne rodzaje bakterii w porównaniu do populacji ogólnej. Zaobserwowano także nasilenie objawów autyzmu u osób z cięższymi objawami gastrycznymi (29). Część

naukowców uważa, że zwiększona przepuszczalność jelit i przedostawanie się metabolitów bakteryjnych do krwi a następnie do mózgu może odgrywać rolę w rozwoju objawów choroby. W badaniach wykazano, że u osób z autyzmem występuje zwiększoną ilość zonuliny, białka odpowiedzialnego za regulację połączeń komórkowych między komórkami nabłonka jelita cienkiego (23). W badaniach przeprowadzonych przez *Fiorentino* i wsp. zaobserwowano z kolei zmienioną ekspresję genów związanych z barierą krew-mózg w przypadku osób z ASD (27). Mogłoby to umożliwić dostęp substancji neurotoksycznych przenoszonych przez krew do tkanki mózgowej chorych osób. *Seo* i wsp. w pracy przeglądowej dotyczącej zespołu Alzheimera z 2020 roku także postulują możliwość wpływu dysbiozy na rozwój stanu zapalnego, co w konsekwencji ma prowadzić do powstania neurozapalnych zmian w mózgu (87). Zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg oraz umożliwienie wnikania czynników zapalnych i fragmentów bakterii do mózgu ma powodować nadmierną aktywację komórek mikrogleju a w konsekwencji zaostrezenie neurodegeneracji (87). Konieczne są dalsze badania wpływu mikrobioty na zespół neurodegeneracyjne.

PRZYSZŁOŚĆ BADAŃ NAD MIKROBIOMEM

Światowa Organizacja zdrowia (WHO) definiuje zdrowie nie tylko jako brak choroby lub kalectwa ale także jako stan pełnego fizycznego, psychicznego i społecznego dobrostanu. Na dobrostan ten może mieć wpływ m.in. mikrobiota człowieka. Przytoczone powyżej przykłady wskazują na duży wpływ mikroflory jelitowej na nasze zdrowie, stąd zainteresowanie wykorzystaniem badania stanu zdrowia za pośrednictwem analizy mikrobiomu. Nieinwazyjne i nie niosące żadnego ryzyka zdrowia dla pacjenta badanie mikrobioty, połączone z wynikami innych badań, skonsultowane z lekarzem lub dietetykiem mogą umożliwić odpowiednią, spersonalizowaną diagnostykę różnych dolegliwości. Kluczowa wydaje się odpowiednia standaryzacja badań mikrobioty. Poszukiwane są markery mikrobiologiczne określające prawidłową i prozdrowotną mikrobiotę (3, 108). *Almonacid* z zespołem w badaniach mikrobioty kału przeprowadzonych z zastosowaniem sekwencjonowania techniką NGS u 897 zdrowych osób wskazali kluczowe znaczenie 28 jednostek taksonomicznych (14 gatunków i 14 rodzajów bakteryjnych) dzieląc je na 20 częstych komensalnych, 3 prozdrowotnych i 5 chorobotwórczych gatunków lub rodzajów drobnoustrojów (3). Autorzy sugerują, że celowane badania ilościowe tych właśnie drobnoustrojów mogą stanowić przykład zdrowej, referencyjnej mikrobioty jelitowej człowieka i mogą być wykorzystane w diagnostyce klinicznej. Na rynku diagnostycznym w Polsce dostępne są już komercyjne badania mikrobiomu, określające skład i zróżnicowanie mikroflory, choć często oparte są na klasycznych posiewach mikrobiologicznych, zamiast na technice sekwencjonowania NGS, przez co mało prawdopodobne jest uzyskanie w nich rzetelnej informacji o składzie mikrobioty jelitowej badanej osoby. Poza ustaleniem składu mikroflory, kluczowa jest możliwość jej „naprawy”, stąd badania nad modulowaniem składu mikroflory, a co za tym idzie zapobieganiem i leczeniem wielu chorób, których podłożem są zaburzenia mikrobioty. Szczególne zainteresowanie wśród naukowców budzi transfer mikrobioty jelitowej między osobą zdrową a chorą. Pierwsze doniesienia o przeniesieniu kału chorym od osoby zdrowej pochodzą z Chin z czwartego wieku naszej ery. Ge Hong opisał podawanie roztworu kału ludzkiemu osobom z zatrue-

ciem lub ostrą biegunką (120). Obecnie transfer mikrobioty kałowej (FMT - fecal microbiota transplantation) szczególnie znalazł zastosowanie w leczeniu zakażeń laseczką *C. difficile* (CDI – *Clostridioides difficile* infection). W celu odtworzenia tzw. stanu eubiozy czyli prawidłowego składu jakościowego i ilościowego mikrobioty u chorych na CDI, zaczęto stosować przeszczep flory bakteryjnej, który polega na transferze kału od zdrowego dawcy do jelita chorego biorcy (35). Różnorodne bakterie bytujące w przeszczepianym kale mogą wypierać laseczki *Clostridioides* zajmując dotychczasową niszę tej bakterii w jelicie chorego, ponadto prawidłowa mikrobiota poprzez produkcję różnego rodzaju metabolitów zmienia warunki środowiskowe na niekorzystne dla *C. difficile*. Zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych (Infectious Diseases Society of America – IDSA) przeszczep mikrobioty powinien być rozważany szczególnie u osób z co najmniej trzecim nawrotem zakażenia *C. difficile*. Podobnie zalecenia Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ESCMID) z 2018 roku oraz polskich rekomendacji Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, dotyczących diagnostyki, leczenia i profilaktyki zakażeń *Clostridium difficile* rekomendują stosowanie przeszczepu mikrobioty jelitowej u chorych z wielokrotnym nawrotem CDI u których nie powiodło się leczenie antybiotykami (54). Metoda FMT z eksperymentu medycznego przeistoczyła się w poważną opcję terapeutyczną. Liczne badania naukowe dowodzą, że przeszczep mikrobioty jest bezpiecznym i wysoce efektywnym sposobem terapii nawracających CDI, ze skutecznością sięgającą 90% (106). Obecnie brak jest jednak rekomendacji dotyczących przygotowania transferu kału jak i jego przeprowadzenia. Standardowo wykonuje się zawiesinę kału w soli fizjologicznej od zdrowego dawcy, choć używany jest także liofilizowany kał w kapsułkach. Obecnie prowadzone są liczne badania naukowe dotyczące stosowania FMT do leczenia innych chorób jak: choroby Crohna, zespołu jelita drażliwego, zakażeń wielolekoopornymi bakteriami czy otyłości (39, 56). Kolejnymi ważnymi czynnikami modulującymi mikroflorę są probiotyki i prebiotyki (37, 76, 122). Prowadzone są różnorodne badania na modelach zwierzęcych i kontrolowane badania kliniczne z udziałem chorych ludzi wykorzystujące te substancje w leczeniu ludzi. Szczególnie zainteresowanie budzą probiotyki (37, 70). Mianem tym określamy żywe mikroorganizmy, które po spożyciu przez człowieka dają mu korzyści zdrowotne. Aktualnie najczęściej stosowanymi są szczepy bakterii takich jak *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* oraz drożdże – *Saccharomyces spp.* Probiotyki posiadają udowodnione kliniczne zastosowanie w leczeniu biegunki podróżnych. Prowadzone są prace nad wykorzystaniem jako probiotyków szczepów bakterii, które w badaniach mikrobiomu stwierdzono u osób zdrowych, a brak ich występowania lub znaczące zmniejszenie ilości wykryto u osób chorych np. *Akkermansia sp.* i *Facelibacterium sp.* (53, 119). Modulowanie mikrobioty jest także możliwe przez spożywanie prebiotyków czyli substancji, które nie ulegają trawieniu jednak stanowią pokarm dla pożytecznych mikroorganizmów bytujących w jelicie grubym człowieka (37). Dieta bogata w warzywa, owoce, zboża i orzechy zawiera dużo prebiotycznych związków takich jak: inuliny, fruktany, galaktooligosacharydy, fruktooligosacharydy oraz skrobia oporna. Postuluje się regularne spożywanie produktów bogatych w te substancje co z kolei ma wpływać na obfitość pożytecznych mikroorganizmów jelitowych (122). Kolejną grupą produktów pokarmowych promujących rozwój pożytecznych mikroorganizmów i działających korzystnie na pracę przewodu pokarmowego są

kiszonki i mleczne produkty fermentowane. Stanowią one naturalny synbiotyki czyli substancje łączącą prebiotyki i probiotyki w jednym produkcie. Spożywanie warzywnych i owocowych kiszonek oraz fermentowanych produktów mlecznych jak kefir, jogurt czy maślanka ma pozytywnie wpływać na cały organizm ludzki. Dodatkowo w celu ochrony zdrowia i jednocześnie poprawy różnorodności pożytecznej mikroflory zalecane jest unikanie spożywania wysoce przetworzonej, bogatej w cukry proste i tłuszcze zwierzęce żywności, odpowiedni wypoczynek i sen oraz uprawianie ćwiczeń (6, 24, 60, 73, 122).

Niewątpliwie jest, że mikrobiota jelitowa pełni wiele korzystnych funkcji w organizmie człowieka wpływając na nasz dobrostan. Jednak pomimo dużych postępów w badaniach mikroflory jelitowej nadal brakuje nam pełnej wiedzy o jej wpływie na nasze zdrowie. Obecnie największe wyzwanie stanowi brak wzorców zdrowej mikrobioty jak i dysbiozy głównie ze względu na duże zróżnicowanie mikroflory w populacjach a nawet u indywidualnych pacjentów w danej populacji. Mimo to każdy kolejny rok badań naukowych przybliża nas do pełnego poznania sieci powiązań pomiędzy bogatym światem drobnoustrojów a naszym organizmem, co pozwoli na wykorzystanie diagnostyki mikrobioty do zapobiegania i leczenia wielu chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aitoro R, Paparo L, Amoroso A* i inni. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. *Nutrients*. 2017;9(7):672.
2. *Almeida A, Mitchell AL, Boland M* i inni. A New Genomic Blueprint of the Human Gut Microbiota. 2019;568(7753):499-504.
3. *Almonacid DE, Kraal L, Ossandon FJ* i nni. 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. *PLoS One*. 2017 May 3;12(5):e0176555.
4. *Azad MB, Konya T, Guttman DS* i inni CHILD Study Investigators. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy*. 2015 Mar;45(3):632-43.
5. *Balvočiūtė M, Huson DH*. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. 2017;18(Suppl 2):114.
6. *Benedict C, Vogel H, Jonas W* i inni. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals, *Molecular Metabolism*, 2016; 5(12):1175-86.
7. *Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT* i inni. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J*. 2016;10(3):742-50.
8. *Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I* i inni. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog*. 2013; 30;5(1):10.
9. *Brestoff JR i Artis D*. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol*. 2013;14:676–684.
10. *Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S*. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis*. 2018;9(6):590-97.

11. *Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M* i inni. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
12. *Chen ML, Yi L, Zhang Y* i inni. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*. 2016;7(2).
13. *Cheng M i Ning K*. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas, Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2019;17(1):4-12.
14. *Claassen S, du Toit E, Kaba M* i inni. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *J Microbiol Methods*. 2013;94(2):103-110.
15. *Colquhoun C, Duncan M, Grant G*. Inflammatory Bowel Diseases: Host-Microbial-Environmental Interactions in Dysbiosis. *Diseases*. 2020;10;8(2):13.
16. *Copy Chassaing B, Koren O, Goodrich JK* i inni. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519(7541):92-6.
17. *D'Argenio V, Salvatore F*. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta*. 2015;451:97-102.
18. *De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M* i inni. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:33.
19. *De Moraes AC, Fernandes GR, da Silva IT* i inni. Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:47.
20. *Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM* i inni. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 2016;167(5):1339-53.e21.
21. *Dethlefsen L, Relman DA*. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(Suppl 1):4554-61.
22. *Ding L, Chang M, Guo Y* i inni. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid metabolism. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):286.
23. *Esnafoglu E, Cirrik S, Ayyıldız SN* i inni. Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *J Pediatr*. 2017;188:240-44.
24. *Evans CC, LePard KJ, Kwak JW* i inni. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014;9(3):e92193.
25. *Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A* i inni. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy*. 2018;73(7):1515-24.
26. *Feng Y, Huang Y, Wang Y* i inni. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218384.
27. *Fiorentino M, Sapone A, Senger S* i inni. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2016;7:49.
28. *Fouhy F, Clooney AG, Stanton C* i inni. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):123.

29. *Fowlie G, Cohen N, Ming X.* The Perturbance of Microbiome and Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2251.
30. *Gill SR, Pop M, Deboy RT* i inni. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312(5778):1355-9.
31. *Girer NG, Tomlinson CR, Elferink CJ.* The Aryl Hydrocarbon Receptor in Energy Balance: The Road from Dioxin-Induced Wasting Syndrome to Combating Obesity with Ahr Ligands. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):49.
32. *Goodrich JK, Davenport ER, Clark AG, Ley RE.* The Relationship Between the Human Genome and Microbiome Comes into View. *Annu Rev Genet.* 2017;51:413-33.
33. *Goodrich JK, di Rienzi SC, Poole AC* i inni. Conducting a microbiome study. *Cell.* 2014;158(2):250-262.
34. *Grazioso TP, Brandt M, Djouder N.* Diet, Microbiota, and Colorectal Cancer. *iScience.* 2019;21:168-87.
35. *Gupta A, Saha S, Khanna S.* Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. *World J Gastroenterol.* 2020;26(8):777-88.
36. *Harsch IA, Konturek PC.* The Role of Gut Microbiota in Obesity and Type 2 and Type 1 Diabetes Mellitus: New Insights into “Old” Diseases. *Med Sci (Basel).* 2018;6(2):32.
37. *Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA.* Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients.* 2019 Jul 16;11(7):1613.
38. *Holingue C, Newill C, Lee LC* i inni. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Res.* 2018 Jan;11(1):24-36.
39. *Hsu WH, Wang JY, Kuo CH.* Current applications of fecal microbiota transplantation in intestinal disorders. *Kaohsiung J Med Sci.* 2019;35:327-31.
40. *Huang Q, Liu H, Suzuki K* i inni. Linking What We Eat to Our Mood: A Review of Diet, Dietary Antioxidants, and Depression. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(9):376.
41. *Hughes DA, Bacigalupe R, Wang J* i inni. Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. 2020. *Nat Microbiol.* 5, 1079-87.
42. *Janczy J, Kochan Z, Małgorzewicz S.* Endotoksemia i zaburzenia bariery jelitowej towarzyszące nadwadze i otyłości. *Post Mikrobiol.* 2019; 58 (4): 427-32.
43. *Jha AR, Davenport ER, Gautam Y* i inni. Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS Biol.* 2018 Nov 15;16(11):e2005396.
44. *Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C.* Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.* 2015; 73: 426–37.
45. *Kachrimanidou M, Tsintarakis E.* Insights into the Role of Human Gut Microbiota in *Clostridioides difficile* Infection. *Microorganisms.* 2020;8(2):200.
46. *Kennedy NA, Walker AW, Berry SH* i inni. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One.* 2014;9(2):e88982.
47. *Khosravi A i Mazmanian SK.* Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013;16:221–7.
48. *Kim KN, Yao Y, Ju SY.* Short chain fatty acids and fecal microbiota abundance in human with obesity: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients,* 2019;11:1-14.

49. Knezevic J, Starchl C, Tmava Berisha A, Amrein K. Thyroid-Gut-Axis: How Does the Microbiota Influence Thyroid Function? *Nutrients*. 2020;12(6):1769.
50. Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P i inni. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(12):1185-93.
51. Lederberg J., McCray A. Ome Sweet 'Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The scientist*. 2001;15:8.
52. Lobach AR, Roberts A, Rowland IR. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food Chem Toxicol*. 2019;124:385-99.
53. Martín R, Miquel S, Benevides L i inni. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. *Front Microbiol*. 2017;30;8:1226.
54. Martirosian G, Hryniewicz W, Ozorowski T i inni. Zakażenia *Clostridioides (Clostridium) difficile*: epidemiologia, diagnostyka, terapia, profilaktyka. W: Narodowy Program Ochrony Antybiotyków. 2018, Narodowy Instytut Leków.
55. Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*. 2013;152(1-2):39-50.
56. Mcilroy JR, Segal JP, Mullish BH i inni. Current and future targets for faecal microbiota transplantation, *Human Microbiome Journal*. 2019:11.
57. Messaritakis I, Vogiatzoglou K, Tsantaki K i inni. The Prognostic Value of the Detection of Microbial Translocation in the Blood of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(4):1058.
58. Million M, Maraninchi M, Henry M i inni. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(6):817-25.
59. Miyoshi J, Bobe AM, Miyoshi S i inni. Peripartum Antibiotics Promote Gut Dysbiosis, Loss of Immune Tolerance, and Inflammatory Bowel Disease in Genetically Prone Offspring. *Cell Rep*. 2017;20(2):491-504.
60. Monda V, Villano I, Messina A i inni. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:3831972.
61. Nelkowska DD. Treating irritable bowel syndrome through an interdisciplinary approach. *Ann Gastroenterol*. 2020;33(1):1-8.
62. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16.
63. O'Hara AM; Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006;7:688-93.
64. Ohnmacht C. Microbiota, regulatory T cell subsets, and allergic disorders. *Allergo J Int*. 2016;25(5):114-23.
65. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem*. 2016;159(2):151-60.
66. Oka A, Sartor RB. Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):757-88.
67. Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A i inni. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep*. 2018;8(1):5143.

68. *Pecora F, Persico F, Gismondi P* i inni. Gut Microbiota in Celiac Disease: Is There Any Role for Probiotics?. *Front Immunol.* 2020;11:957.
69. *Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A* i inni. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks⁺ *E. coli*. *Nature.* 2020 Apr;580(7802):269-273.
70. *Puebla-Barragan S, Reid G.* Forty-five-year evolution of probiotic therapy. *Microb Cell.* 2019;1;6(4):184-96.
71. *Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M* i inni. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285): 59-65,
72. *Qin Y, Roberts JD, Grimm SA* i inni. An obesity-associated gut microbiome reprograms the intestinal epigenome and leads to altered colonic gene expression. *Genome Biol.* 2018;19(1):7.
73. *Quiroga R, Nistal E, Estébanez B, Porras D* i inni. Exercise training modulates the gut microbiota profile and impairs inflammatory signaling pathways in obese children. *Exp Mol Med.* 2020; 52:1048–61.
74. *Radjabzadeh D, Boer CG, Beth SA* i inni. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Nature research. Scientific reports.* 2020. 10:1040.
75. *Rajilić-Stojanović M, de Vos WM.* The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):996-1047.
76. *Rajoka MSR, Shi J., Mehwish HM* i inni. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness*6, 2017:121-30.
77. *Rezasoltani S, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H* i inni Modulatory effects of gut microbiome in cancer immunotherapy: A novel paradigm for blockade of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Med.* 2021;10(3):1141-54.
78. *Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F* i inni. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* 2019; 7(1):14.
79. *Rojas IY, Moyer BJ, Ringelberg CS, Tomlinson CR.* Reversal of obesity and liver steatosis in mice via inhibition of aryl hydrocarbon receptor and altered gene expression of CYP1B1, PPAR α , SCD1, and osteopontin. *Int J Obes (Lond).* 2020;44(4):948-63.
80. *Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM* i inni. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.* 2018;359(6371):91-7.
81. *Rowland I, Gibson G, Heinken A* i inni. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 2018;57(1):1-24.
82. *Sacchetti L, Nardelli C.* Gut microbiome investigation in celiac disease: from methods to its pathogenetic role. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(3):340-9.
83. *Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR* i inni. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med.* 2019;69:93-106.
84. *Schnorr SL, Candela M, Rampelli S* i inni. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun.* 2014 Apr 15;5:3654.
85. *Schwiertz A, Taras D, Schäfer K* i inni. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(1):190-5.

86. *Sender R, Fuchs S, Milo R.* Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533.
87. *Seo D-O., Holtzman DM, Masternak M.* Gut Microbiota: From the Forgotten Organ to a Potential Key Player in the Pathology of Alzheimer's Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020;75(7):1232–41.
88. *Shin JH, Jung S, Kim SA i inni.* Differential Effects of Typical Korean Versus American-Style Diets on Gut Microbial Composition and Metabolic Profile in Healthy Overweight Koreans: A Randomized Crossover Trial. *Nutrients.* 2019;11(10):2450.
89. *Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED i inni.* Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science.* 2017 Aug 25;357(6353):802-6.
90. *Song EJ, Lee ES, Nam YD.* Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *J Microbiol.* 2018;56(10):693-705.
91. *Song M, Chan AT.* Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(2):275-89.
92. *Stiemsma LT, Reynolds LA, Turvey SE, Finlay BB.* The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *Immunotargets Ther.* 2015;4:143-57.
93. *Strachan DP.* Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989;299(6710):1259-60.
94. *Strati F, Cavalieri D, Albanese D i inni.* New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome.* 2017;5(1):24.
95. *Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G i inni.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514(7521):181-6.
96. *Szewczyk E.* Aneks. Podłoża, próby i metody diagnostyczne. Schematy diagnostyczne. W: Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN. Red. E. Szewczyk. Warszawa 2019 ,wyd. 3, 505-73.
97. *Takakura W, Pimentel M.* Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome - An Update. *Front Psychiatry.* 2020;11:664.
98. *Tan X, Liu Y, Long J i inni.* Trimethylamine N-Oxide Aggravates Liver Steatosis through Modulation of Bile Acid Metabolism and Inhibition of Farnesoid X Receptor Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Sep;63(17):e1900257.
99. *Tong M, McHardy I, Ruegger P i inni.* Reprograming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. *ISME J.* 2014;8(11):2193-206.
100. *Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI.* Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3(4):213-23.
101. *Uhr GT, Dohnalová L, Thaïss CA.* The Dimension of Time in Host-Microbiome Interactions. *mSystems.* 2019 Feb 19;4(1):e00216-18.
102. *Vangay P, Johnson AJ, Ward TL i inni.* US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell.* 2018 Nov 1;175(4):962-972.e10.
103. *Wacklin P, Tuimala J, Nikkilä J i inni.* Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secretor status. *PLoS One.* 2014;9(4):e94863.
104. *Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJJ.* The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes.* 2017 Aug;12 Suppl 1(Suppl 1):3-17.

105. Wang H-X i Wang Y-P. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)*. 2016; 129(19): 2373-80.
106. Wang JW, Kuo CH, Kuo FC i inni. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*. 2019 Mar;118 Suppl 1:S23-S31.
107. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(16):2959-77.
108. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M i inni. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(3):G171-G193.
109. Winter SE, Bäumlér AJ. Dysbiosis in the Inflamed Intestine: Chance Favors the Prepared Microbe Gut Microbes. 2014;5(1):71-3.
110. Wirbel J, Pyl PT, Kartal E i inni. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat. Med*. 2019;25:679–89.
111. Włochal M i Grzymisławski M. Nowe trendy leczenia żywieniowego w przypadku nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Piel. Zdr. Publ*. 2016; 6(2):149–58.
112. Wojtuś S, Gil J, Szwed Ł, Dyrła P. Podstawowe objawy i różnicowanie nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Pediatr Med Rodz* 2014, 10 (1):61–6.
113. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer. Available at: wcrf.org/colorectal-cancer-2017. All CUP reports are available at wcrf.org/cupreports. 2017.
114. World Health Organization (WHO). Światowa organizacja Zdrowia. Cancer sheets. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer
115. World Health Organization (WHO). Światowa organizacja Zdrowia. Obesity and overweight. Fact sheets. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
116. Yi M, Yu S, Qin S i inni. Gut microbiome modulates efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):47.
117. Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. *Front Nutr*. 2019;6:48.
118. Zgliczyński WS. Nadwaga i otyłość w Polsce. Wydawnictwo Sejmowe dla Biura Analiz Sejmowych, nr 4(227). 2017.
119. Zhai Q, Feng S, Arjan N, Chen W. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(19):3227-36.
120. Zhang F, Luo W, Shi Y i inni. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol*. 2012;107(11):1755; author reply p.1755-6.
121. Zhu W, Gregory JC, Org E i inni. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 2016;165(1):111-24.
122. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35-56.
123. King CH, Desai H, Sylvestsky AC i inni. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard repartiny template. *Plos one* 2019;14(9) e.0206484.

Otrzymano: 4 V 2021

Adres Autora: 02-954 Warszawa, ul. Wiktorii Wiedeńskiej 9a, MEDGEN Kamila Czerska i wsp. Sp. K. Warszawa