

ROLA MIKROFLORY JELITOWEJ W ZDROWIU I CHOROBI

Role of intestinal microflora in health and disease

Streszczenie

Przewód pokarmowy człowieka zasiedlają liczne mikroorganizmy, z tysiącami gatunków bakterii, grzybów i wirusów. Mikroflora jelitowa tworzy złożony ekosystem, pozostający w wielu symbiotycznych relacjach z makroorganizmem. Drobnoustroje odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu zdrowia, a niekiedy także w powstawaniu chorób u gospodarza, poprzez modulowanie jelitowego systemu immunologicznego oraz udział w procesach metabolicznych. W artykule przedstawiono niektóre ogólne aspekty dotyczące mikroflory jelitowej oraz jej możliwego udziału w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit, zespołu jelita nadwrażliwego i otyłości.

Abstract

Human gastrointestinal tract is colonized by numerous microorganisms, comprising thousands of species of bacteria, fungi and viruses. Intestinal microflora forms a highly complex ecosystem with multiple symbiotic relations with the macroorganism. Microbiota play a key role in the health and disease of the host, by modulating the intestinal immune system and controlling many metabolic functions. This overview focuses on the some general aspects of the intestinal microorganisms and their possible contribution to the development of inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome and obesity

Piotr Radwan

Barbara Skrzydło-Radomańska

Katedra i Klinika Gastroenterologii z Pracownią Endoskopią Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Maria Słomka

Przewód pokarmowy (p.p.) człowieka, podobnie jak i innych ssaków, jest środowiskiem bytowania olbrzymiej liczby drobnoustrojów, przede wszystkim bakterii, ale także – chociaż w mniejszym stopniu – wirusów, grzybów i pierwotniaków. Mikroorganizmy te tworzą złożony ekosystem pozostający w ścisłych interakcjach z organizmem gospodarza i są niezbędne dla zachowania jego prawidłowej homeostazy. Wzajemne relacje gospodarza i drobnoustrojów p.p. należy określić jako symbiotyczny mutualizm, tzn. układ obustronnie korzystny, podczas gdy komensalizm zakłada osiąganie korzyści tylko przez jeden z elementów układu (bakterie), pozostając bez wpływu na drugi z nich (makroorganizm) [1, 2].

Saprofityczna mikroflora p.p. obejmuje ok. 10^{13} - 10^{14} bakterii, liczbowo 10-krotnie przekraczając całkowitą liczbę komórek ustroju człowieka [1]. Rozmieszczenie mikroorganizmów w różnych odcinkach p.p. wykazuje różnicowanie, a ich liczba stopniowo wzrasta od 10^2 do 10^3 /g zawartości w jelicie czczym i proksymalnym

odcinku jelita krętego aż do 10^{11} - 10^{12} /g w okrężnicy [3]. Spośród ponad 50 typów bakterii znanych w ogólnej biosferze jedynie kilka reprezentowanych jest w obrębie p.p., szczególnie w jelicach, a wśród nich ponad 90% stanowią *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [4, 5]. Badania mikroflory jelitowej początkowo napotykały na znaczne trudności, gdyż ok. 80% gatunków tych bakterii nie udaje się wyhodować konwencjonalnymi metodami *in vitro* [6]. Dopiero zastosowanie genetycznych metod biologii molekularnej i zaawansowanych technik sekwencyjnych kwasów nukleinowych pozwoliło na szybki rozwój tej dziedziny badawczej. Umożliwiło to dostarczenie wiarygodnych wyników poszukiwań mających na celu precyzyjne określenie składu i roli mikroflory jelitowej w warunkach zdrowia i niektórych chorób. Analiza sekwencji nukleotydowych bakteryjnego rybosomalnego RNA (16SRNA) uzyskanego z materiału pozyskanego od 124 osób pozwoliła na zidentyfikowanie ok. 1000-1150 gatunków bakterii, z przeważającą dominacją *Firmicutes*

Słowa kluczowe:

mikroflora jelitowa, nieswoiste zapalenia jelit, zespół jelita nadwrażliwego, otyłość

Key words:

intestinal microflora, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, obesity

i *Bacteroidetes*. Inne gatunki, należące do typów *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, stanowiły znaczną mniejszość [7]. Dalszy postęp w badaniach biologii molekularnej wyraża się w próbach sekwencjonowania całych genomów bakterii zasiedlających p.p. z możliwością identyfikacji genów kodujących funkcje biologiczne i metaboliczne. Analiza liczby, składu i funkcjonalnej różnorodności drobnoustrojów, oparta na badaniach całości genów środowiska p.p., określona została mianem metagenomiki. Natomiast termin *mikrobiom* odnosi się do wszystkich mikroorganizmów środowiska, określanych na podstawie ich materiału genetycznego. Okazuje się, że liczba genów mikrobiomu ok. 150 razy przekracza liczbę genów człowieka [1, 4, 6]. Szereg reakcji metabolicznych i immunologicznych niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka zachodzi jedynie dzięki obecności saprofitów. Dlatego też całość komórek ludzkich, bakteryjnych oraz ich genomów należy rozpatrywać łącznie jako fizjologiczną jedność, określaną niekiedy mianem „superorganizmu” [8].

Skład mikroflory jelitowej zależy od wielu czynników, takich jak genotyp gospodarza, wiek, dieta, region geograficzny, stosowane leki czy warunki sanitarne [6]. Już na samym początku życia sposób porodu warunkuje rodzaj bakterii zasiedlających p.p. Moment narodzin jest zwykle związany z pierwszą ekspozycją na mikroorganizmy. Wykazano, że u dzieci narodzonych drogami naturalnymi stwierdza się drobnoustroje przypominające fizjologiczną florę pochwy matki, takie jak: *Lactobacillus* czy *Prevotella*, natomiast u dzieci, które przyszły na świat drogą cięcia cesarskiego dominują bakterie *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*, bytujące przeważnie na powierzchni skóry [9]. W okresie niemowlęcym skład mikroflory zależy głównie od sposobu karmienia. U dzieci karmionych piersią dominują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, natomiast u karmionych sztucznymi mieszankami stwierdza się przewagę *Bacteroides* i *Clostridium* [8]. W ciągu pierwszych lat życia skład mikroflory stopniowo zaczyna przypominać typowy zestaw mikroorganizmów człowieka dorosłego. Następuje przy tym stopniowy wzrost udziału gatunków *Bacteroides*, przy zmniejszeniu liczebności *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Skład drobnoustrojów dorosłego człowieka pozostaje stosunkowo stabilny, chociaż w wieku podeszłym obserwowane jest obniżenie odsetka *Bacteroides*, zwiększenie natomiast bakterii *Enterococcus* i *Escherichia coli* [4, 5]. W dzieciństwie i w okresie starości

stosunek *Firmicutes* do *Bacteroidetes* jest niski, znacznie wyższy natomiast w okresie wieku dorosłego [10]. Badania mikroflory u bliźniąt jednojajowych, dwujajowych, u członków tych samych rodzin oraz u osób niespokrewnionych wskazują na wpływ uwarunkowań genetycznych gospodarza na skład i liczebność bakterii jelitowych [11]. Potwierdzać to mogą obserwowane odmienności mikrobiomu w różnych grupach etnicznych [12]. Należy tu jednak wziąć pod uwagę możliwy udział czynników środowiskowych, przede wszystkim diety. Stwierdzono, że u dzieci z wiejskich rejonów Burkina Faso (Afryka), spożywających głównie dietę opartą na złożonych węglowodanach, wśród drobnoustrojów jelitowych dominowały bakterie rodzaju *Bacteroidetes*, szczególnie rodzaju *Prevotella* i *Xylanibacter*, zdolne do degradacji włókna roślinnego, w porównaniu z dziećmi z miejskich obszarów we Włoszech (Europa), gdzie w diecie znaczny udział mają tłuszcze i białka. Ponadto skład mikroorganizmów jelitowych dzieci afrykańskich wykazywał znacznie większe bogactwo gatunków w porównaniu z dziećmi europejskimi, co może wskazywać na niekorzystny wpływ diety „zachodnioeuropejskiej” na liczebność i zróżnicowanie flory saprofitycznej [13].

Poszukiwania jednego zestawu mikroorganizmów będącego podstawą określenia „normalnego” składu mikroflory, a więc także tzw. rdzeniowego mikrobiomu (*core microbiome*) człowieka nie dały jednoznacznych rezultatów. Nie stwierdzono ani jednego gatunku bakterii występującego w przewodzie przynajmniej 1% u wszystkich ludzi. Podobny skład bakterii stwierdza się jedynie w tych samych rodzinach, a także w małych wybranych populacjach [4, 10, 14].

Organizm gospodarza posiada ze swej strony szereg mechanizmów ochronnych i regulujących udział poszczególnych rodzajów drobnoustrojów kolonizujących jelita poprzez substancje o charakterze przeciwbakteryjnym, takie jak produkowane w komórkach Panetha α -defenzyny, kryptydyny, wolne rodniki tlenowe, czy wydzielnicza immunoglobulina A (IgA), mające na celu ograniczenie ekspansji patogenów [1].

Skład i liczebność saprofitycznej mikroflory mogą ulegać znacznym zaburzeniom pod wpływem stosowania różnych leków, przede wszystkim antybiotyków. Wykazano, że 5-dniowa kuracja cyprofloksacyną powodowała bardzo wyraźne zmniejszenie liczby i zróżnicowania flory bakteryjnej jelit, z jej normalizacją po ok. 4 tygodniach od momentu zakończenia leczenia. Jednakże u niektórych leczonych osób zmiany

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. **Piotr Radwan**
Katedra i Klinika Gastroenterologii,
ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin
Tel./faks: (81) 72 44 535
e-mail: piotr_radwan@wp.pl

te utrzymywały się nawet przez okres 6 miesięcy [15]. Jeszcze bardziej nasilone zaburzenia obserwowano po kuracji klindamycyną, co stwierdzano nawet po 2 latach od podania antybiotyku [16]. Zaobserwowano także, że palenie tytoniu i jego zaprzestanie ma wpływ na skład mikroflory jelit. Może to mieć istotne znaczenie w procesie przybierania masy ciała w pierwszym okresie po rzuceniu tego nałogu, a także wiązać się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wrzodzącego zapalenia jelita grubego [14].

FUNKCJE METABOLICZNE MIKROFLORY JELITOWEJ

Mikroorganizmy jelitowe odgrywają zasadniczą rolę w zachowaniu zdrowia i homeostazy organizmu gospodarza dzięki bardzo wielu funkcjom metabolicznym. Rozkładanie nieprzyswajalnych lub trudno przyswajalnych przez człowieka węglowodanów złożonych, takich jak celuloza, hemiceluloza, pektyny, lignina czy skrobia do cukrów prostych i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (*short-chain fatty acids* – SCFA) dostarcza 5-15% energii uzyskiwanej z pożywienia. SCFA stanowią główny środek odżywczy dla nabłonka jelitowego, stymulując jego wzrost i różnicowanie, wpływając przez to na prawidłowe ochronne funkcjonowanie bariery jelitowej. SCFA posiadają także własności immunomodulujące, głównie poprzez hamowanie nieprawidłowych reakcji zapalnych w błonie śluzowej [1]. Bakterie jelitowe dokonują trawienia złuszczonej komórki nabłonka, śluzu, metabolizują składniki żółci, ksenobiotyki, niektóre leki oraz potencjalne kancerogeny. Biorą one również udział w biosyntezie wielu koniecznych dla organizmu gospodarza witamin, takich jak witamina K, B1, B6, B12 czy kwas foliowy [4, 17].

ROLA MIKROFLORY I JELITOWEGO SYSTEMU IMMUNOLOGICZNEGO W REGULACJI FIZJOLOGICZNYCH MECHANIZMÓW ODPORNOŚCIOWYCH

Saprofityczna mikroflora stanowi źródło niezliczonych antygenów stale stymulujących jelitowy system immunologiczny (*gut associated lymphoid tissue* – GALT) [18]. Zadaniem GALT jest rozpoznawanie i odróżnianie inwazyjnych patogenów od nieszkodliwych, a nawet niezbędnych

dla prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza saprofitów. W warunkach prawidłowych mikroflora jelitowa i GALT pozostają w stanie wzajemnej równowagi. Zachowanie tzw. homeostazy jelitowej polega na braku wzbudzenia lub hamowaniu odpowiedzi immunologicznej w stosunku do drobnoustrojów saprofitycznych przy jednoczesnej identyfikacji inwazyjnych patogenów i ich likwidacji poprzez stymulowanie odpowiedniej reakcji odpornościowej. Odpowiedzialnych jest za to szereg mechanizmów, wśród których szczególnie istotne są:

- prawidłowa struktura i funkcja nabłonka jelitowego,
- właściwe rozpoznanie poszczególnych antygenów bakteryjnych,
- mechanizmy regulacyjne odpowiedzi immunologicznej.

Warstwa nabłonka wraz z pokrywającym go śluzem stanowi barierę oddzielającą mikroflorę światła jelitowego od aparatu immunologicznego blaszki właściwej. Dla prawidłowego funkcjonowania tej bariery niezbędne jest zachowanie jej nieprzepuszczalności, głównie poprzez tzw. ścisłe połączenia międzykomórkowe (*tight junctions*). Saprofity jelitowe, współzawodnicząc z patogenami o składniki odżywcze światła jelitowego oraz o przestrzeń niezbędną do przylegania do nabłonka, zapobiegają rozprzestrzenianiu się i namnażaniu drobnoustrojów chorobotwórczych. Działanie ochronne mikroflory polega również na produkcji substancji antybakteryjnych, wzmacnianiu połączeń międzykomórkowych, pobudzaniu procesów naprawczych i regeneracyjnych komórek nabłonkowych [19].

Właściwe rozpoznanie drobnoustrojów światła jelitowego i ich zróżnicowanie jest niezbędne dla wzbudzenia adekwatnej odpowiedzi immunologicznej w przypadku patogenów lub hamowania niepożądanego, a nawet szkodliwej reaktywności na komensale. Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywają tzw. receptory *Toll*-podobne (*Toll-like receptors* – TLR) identyfikujące elementy struktur bakteryjnych, takich jak lipopolisacharydy, peptydoglikany, flageliny, określane jako MAMPs (*microbial-associated molecular patterns*) [1]. Receptory *Toll*-podobne są zlokalizowane w dużej liczbie na komórkach prezentujących antygen, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne (DC). Dzięki obecności TLR na swojej powierzchni DC zdolne są do precyzyjnego odróżniania patogenów i saprofitów. Kontakt DC z antygenami drobnoustrojów komensalnych stymuluje powstanie DC o właściwościach regulatorowych. W konsekwencji dochodzi do pobudzenia i podtrzymania stanu

pokarmowej tolerancji oraz braku efektorowej reakcji odpornościowej. Jest to dominująca aktywność DC w warunkach fizjologicznych [20], bowiem, jak wiadomo, większość antygenów światła jelitowego stanowią saprofity i antygeny pokarmowe, nieszkodliwe, a nawet niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza. Obecnie wiadomo, że TLR są również obecne na komórkach nabłonka jelitowego będących w stałym kontakcie z zawartością jelita, w tym z komensalami, których struktura jest bardzo podobna do patogenów. Dla uniknięcia zatem stałego pobudzania GALT i wywoływania reakcji zapalnej przez florę saprofityczną TLR na powierzchni nabłonka zwróconej do światła jelita, po kontakcie z komensalami nie stymulują ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję białek prozapalnych, natomiast pobudzają wzmocnienie bariery śluzówkowej [21].

Dla zachowania homeostazy jelitowej flora saprofityczna w warunkach zdrowia stymuluje tolerogenną odpowiedź ze strony GALT, objawiającą się zmniejszoną reaktywnością TLR makrofagów i DC blaszki właściwej na ligandy bakteryjne, aktywację limfocytów regulatorowych, a także zwiększoną produkcję IgA. DC produkują więcej przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10) w stosunku do prozapalnej interleukiny 12 (IL-12) i interleukiny 23 (IL-23) [18]. Wykazano, że niektóre rodzaje bakterii, określane jako SFB (*segmented filamentous bacteria*), stymulują prozapalne limfocyty Th17 odgrywające ważną rolę w walce z patogenami, natomiast inne, takie jak *Bifidobacterium infantis* czy *Faecalibacterium prausnitzii*, indukują rozwój limfocytów regulatorowych Treg, zapobiegających nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej [8]. Równowaga pomiędzy limfocytami Th17 i Treg, uwarunkowana odpowiednim składem i udziałem poszczególnych drobnoustrojów, decyduje o homeostazie immunologicznej jelita. Zaburzenia proporcji między tymi drobnoustrojami, określane mianem **dysbiozy**, mogą prowadzić do powstawania chorób będących wynikiem zaburzonych reakcji odpornościowych, jak np. wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) czy choroba Leśniowskiego-Crohna (ChL-C), obejmowanych wspólnie nazwą nieswoistych zapaleń jelit (NZJ) [8, 22, 23].

UDZIAŁ MIKROFLORY JELITOWEJ W ROZWOJU NZJ

Według jednej z najnowszych teorii patogeneznych NZJ są wynikiem nieprawidłowej reakcji immunologicznej organizmu w stosunku do niektórych grup saprofitycznych bakterii jelitowych, wywołanej prawdopodobnie przez czynniki środowiskowe u predysponowanego genetycznie osobnika [2]. O udziale mikroflory w powstawaniu NZJ może świadczyć szereg obserwacji, m.in. takich jak:

- lokalizacja zmian zapalnych obejmująca najczęściej końcowy odcinek jelita cienkiego i okrężnicę, gdzie stwierdza się największą koncentrację bakterii jelitowych [18],
- zmniejszenie nasilenia, a nawet ustępowanie zapalenia w odcinku jelita chirurgicznie wyłączonego z pasażu treści jelitowej oraz nawrót zmian zapalnych po ponownej ekspozycji tego fragmentu jelita na zawartość jelitową [24],
- odmienności udziału poszczególnych rodzajów drobnoustrojów, a także występowanie szczepów o zwiększonej adhezji i wirulencji u chorych z NZJ, szczególnie z ChL-C w porównaniu z osobami zdrowymi [25],
- skuteczność antybiotykoterapii (metronidazol, ciprofloksacyna, rifaksymina) w niektórych postaciach aktywnego NZJ, zapalenia zbiornika jelitowego (*pouchitis*) po kolektomii czy zmniejszeniu nawrotowości ChL-C po zabiegach resekcyjnych [26],
- niewystępowanie zapalenia jelit w modelach doświadczalnych NZJ u zwierząt hodowanych w warunkach sterylnych (*germ-free*) [18],
- nieprawidłowości genetyczne (mutacje) w zakresie genów kodujących białka odpowiedzialne za rozpoznawanie i „obróbkę” antygenów bakteryjnych, takich jak NOD2, powodują zwiększoną podatność na rozwój ChL-C [27].

U chorych z NZJ stwierdza się szereg nieprawidłowości świadczących o zaburzeniach homeostazy jelitowej. Ważną rolę odgrywają tu następujące elementy:

- dysbioza,
- uszkodzenie bariery śluzówkowej,
- upośledzone rozpoznanie i eliminacja bakterii w procesie autofagii,
- zaburzona immunoregulacja,

DYSBIOZA W NIESWOISTYCH ZAPALENIACH JELIT

Badania mikroflory u chorych z NZJ wykazują istotne różnice w porównaniu z osobami zdrowymi. Skład drobnoustrojów jelitowych w NZJ charakteryzuje się zmniejszonym zróżnicowaniem gatunków, niestabilnością i wyraźnym obniżeniem udziału *Firmicutes* przy zwiększonej reprezentacji *Proteobacteria*. U chorych z ChL-C szczególnie wyraźny jest zmniejszony udział gatunku *Faecalibacterium prausnitzii*, o udowodnionym *in vitro* i w modelach zwierzęcych działaniu przeciwzapalnym [25, 28]. Wśród zwiększonej liczby bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* często spotykany jest adhezyjno-inwazyjny szczep *E. coli* (AIEC) oraz inne fakultatywne patogeny [29]. AIEC stwierdzane w końcowym odcinku jelita krętego (*ileum terminale*) u pacjentów z ChL-C z tą lokalizacją choroby namnażają się w nabłonku i makrofagach, powodując zwiększone wydzielanie prozapalnego czynnika martwicy guza (*tumor necrosis factor* α – TNF- α) [30].

Z kolei obniżony udział *Clostridium* grupy IV i XIV ma o tyle istotne znaczenie, że to właśnie bakterie *Clostridium* dostarczają SCFA, które są głównym źródłem energii dla kolonocytów. Obniżone stężenie SCFA w kale chorych na NZJ, szczególnie WZJG, wraz z upośledzoną utylizacją SCFA wskutek wzmożonej produkcji siarkowodoru przez zwiększoną liczbę szczepów redukujących siarczany, ma prawdopodobnie kluczowe znaczenie w rozwoju choroby [18]. Siarczki będące końcowym produktem fermentacji aminokwasów siarkowych powodują uszkodzenie śluzówki w NZJ poprzez zwiększenie apoptozy komórek nabłonkowych, zmniejszenie liczby komórek kubkowych i hamowanie oksydacji maślanów przez kolonocyty [31].

UPOŚLEDZENIE BARIERY ŚLUZÓWKOWEJ W NZJ

Uszkodzenie warstwy śluzu pokrywającego nabłonek jelit, obserwowane u chorych z NZJ, może być wynikiem zwiększonego namnażania bakterii mukolitycznych bądź pierwotnego lub wtórnego defektu komórek kubkowych [2]. Wykazano, że we WZJG grubość warstwy śluzu jest zmniejszona nawet w okresie remisji choroby, co łączy się ze zwiększonym kontaktem bakterii z nabłonkiem [10]. Zwiększona przepuszczalność nabłonka, stwierdzana u chorych

z ChL-C, może powodować wnikanie antygenów bakteryjnych do blaszki właściwej, ze wzbudzeniem nieprawidłowej reakcji odpornościowej z udziałem limfocytów T nawet przeciwko saprofitom, a w konsekwencji reakcji zapalnej wskutek uwolnienia mediatorów zapalnych [2, 18]. Wyrazem tego jest obserwowana w tej grupie pacjentów śluzówkowa nadprodukcja immunoglobuliny G (IgG), wskazująca na nadreaktywność GALT w stosunku do mikroflory jelitowej. Co ciekawe, zwiększona przepuszczalność błony śluzowej jelita stwierdzana jest też u zdrowych krewnych osób z ChL-C, wskazując na możliwe podłoże genetyczne zwiększające podatność na rozwój choroby [2, 18].

UPOŚLEDZONE ROZPOZNANIE I ELIMINACJA BAKTERII W PROCESIE AUTOFAGII

Autofagia jest podstawowym mechanizmem wrodzonego systemu odpornościowego mającym za zadanie zapobieganie wnikaniu bakterii do ściany jelita i wszystkim związanym z tym konsekwencjom. Aktywacja genu NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) w komórkach Panetha powoduje wzbudzenie aktywności antybakteryjnej przez ograniczenie adherencji, penetracji i ekspansji drobnoustrojów, głównie poprzez produkcję α -defenzyny [2]. W procesie autofagii bierze udział gen NOD2 we współdziałaniu z genem ATG16L1 poprzez tworzenie tzw. autofagosomu zawierającego drobnoustroj, podlegający następnie degradacji i prezentacji antygenów bakteryjnych z udziałem cząsteczek MHC klasy II. Powoduje to wzbudzenie immunologicznych reakcji adaptacyjnych [32]. NOD2 bierze udział w stymulowaniu procesu zapalnego poprzez aktywację jądrowego czynnika NF- κ B (*nuclear factor- κ B*). Stwierdzono, że mutacje w zakresie genów NOD2 i ATG16L1 związane są ze zwiększoną podatnością na rozwój ChL-C o lokalizacji zmian zapalnych w końcowym odcinku jelita krętego i kątnicy [2, 33]. Z drugiej jednak strony mutacje w zakresie NOD2 obserwuje się jedynie u ok. 30% chorych na ChL-C i u ok. 10% zdrowej populacji, co wskazuje na dodatkowy udział czynników środowiskowych mających znaczenie w wywoływaniu choroby [34].

ZABURZONA IMMUNOREGULACJA W NZJ

Dysbioza stwierdzana u chorych z NZJ, polegająca m.in. na wzroście liczby bakterii prozapalnych, przy zmniejszonym udziale drobnoustrojów o charakterze przeciwzapalnym prowadzi do zaburzonej równowagi pomiędzy limfocytami Th17 i limfocytami Treg. Powoduje to upośledzenie fizjologicznych mechanizmów tolerogennych i wzbudzenie nieprawidłowej reakcji zapalnej jelit, ze wszystkimi jej konsekwencjami patomorfologicznymi i objawami klinicznymi [35]. Jak już wspomniano powyżej, DC błony śluzowej w warunkach prawidłowych po kontakcie z komensalami stymulują głównie aktywność tolerogenną. Potencjalnie szkodliwe antygeny patogenne powodują natomiast szereg przemian morfologiczno-strukturalnych w DC, określanym mianem dojrzewania. Podczas kontaktu dojrzałych DC z limfocytami obok prezentacji antygeny następuje także interakcja tzw. cząsteczek kostymulatorowych, obecnych na powierzchni dojrzałych DC z ich receptorami na komórkach T, w wyniku czego dochodzi do aktywacji i generowania efektorowych limfocytów T. Rozwija się wtedy odpowiedź immunologiczna typu Th1 lub Th2. O ile taka reakcja pojawi się w stosunku do saprofitów, mamy do czynienia z załamaniem stanu tolerancji immunologicznej, a w konsekwencji z procesem zapalnym, obserwowanym w przebiegu NZJ [26].

Przykładem wykorzystania wiedzy na temat udziału mikroflory w patogenezie NZJ są próby tzw. transplantacji stolca od zdrowych osobników pacjentom z chorobami zapalnymi jelit, mające na celu normalizację zaburzonego ekosystemu jelitowego z korzystnymi efektami klinicznymi [36].

ROLA MIKROFLORY JELITOWEJ W ETIOPATOGENEZIE ZESPOŁU JELITA NADWRAŻLIWEGO (ZJN)

Jak już wspomniano, mikroflora jelitowa w przewodzie pokarmowym człowieka bierze udział w regulacji wielu fizjologicznych czynności i szlaków metabolicznych. W ostatnich latach wykazano, że istnieje powiązanie pomiędzy funkcjonowaniem jelitowego ekosystemu a występowaniem takich stanów patologicznych, jak otyłość, zespół metaboliczny, cukrzyca, zaburzenia gospodarki lipidowej, choroba trzewna czy nieswoiste choroby zapalne jelit [37]. Zaburzenia składu i funkcji mikroflory jelitowej niewątpliwie uczestniczą

także w patogenezie zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego, a zwłaszcza w zespole jelita nadwrażliwego (ZJN) [38, 39].

Częstość występowania ZJN w krajach europejskich i w Stanach Zjednoczonych wynosi od 7 do 30%, przy czym jest on dwukrotnie częstszy u kobiet [40]. Wprawdzie dolegliwości nim spowodowane nie stanowią zagrożenia dla życia ani nie zwiększają prawdopodobieństwa wystąpienia choroby organicznej, ale są powodem bardzo znacznego obniżenia jakości życia i wydajności pracy, absencji chorobowej i dużych kosztów leczenia oraz często nadmiernej ilości badań diagnostycznych. Etiopatogeneza ZJN jest złożona i nie do końca poznana, ale wśród mechanizmów patofizjologicznych współuczestniczących podkreślić należy zaburzenia motoryki zarówno jelita grubego, jak i cienkiego, nadwrażliwość trzewną, zaburzenia funkcjonowania osi mózgowo-jelitowej, a w świetle nowych badań – przewlekły słabo nasilony stan zapalny błony śluzowej oraz udział mikroflory jelitowej i stresu w połączeniu z czynnikami psychospołecznymi [38, 41, 42].

Wiele danych wynikających z badań na zwierzętach, badań *ex vivo* i u pacjentów z chorobami czynnościowymi przewodu pokarmowego wskazuje, że bakterie mogą odgrywać rolę w patogenezie i patofizjologii tych zaburzeń: populacja bakterii bytujących w świetle jelita poprzez swoje procesy metaboliczne oraz populacja związana z błoną śluzową ściany jelitowej poprzez aktywację interakcji immunologicznych z gospodarzem i wywoływanie przetrwałego, o niewielkim nasileniu, przewlekłego stanu zapalnego (*minimal inflammatory bowel state*) [5, 42, 43, 44]. Jak już wiadomo, w badaniach eksperymentalnych u zwierząt hodowanych w warunkach sterylnych i pozbawionych całkowicie flory jelitowej (tzw. *germ-free animals*) zapalenie nie występuje, lecz pasaż jest zaburzony – występuje gastropareza, zwolnienie pasażu jelitowego i rozdęcie kątnicy, ustępujące po kolonizacji mikroflorą jelitową [45]. U pacjentów z ZJN, w wyniku badań z zastosowaniem wspomnianych uprzednio technik biologii molekularnej, stwierdza się istotne, zarówno ilościowe, jak i jakościowe zaburzenia w obrębie ekosystemu jelitowego: zmniejszenie liczby pałeczek *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz wzrost ilości bakterii spośród patogennych gatunków oraz szczepów *Clostridia* i *Enterobacteriaceae* [46, 47]. Dodatkowo podkreślić należy, że populacje bakterii ekosystemu jelitowego u chorych z ZJN w porównaniu z osobami zdrowymi wykazują małą stabilność i w wyniku nawet niezbyt nasilonych

czynników, jak stres, stosowanie diety obfitującej w nasycone tłuszcze zwierzęce i syntetyczne węglowodany, zabiegi chirurgiczne w znieczuleniu ogólnym, przyjmowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, inhibitorów pompy protonowej i blokerów receptora H₂, prokinetyków, opioidów, a zwłaszcza antybiotyków z różnych wskazań – mogą ulegać znacznym zaburzeniom określanym, jak już wspomniano, mianem dysbiozy [5, 48]. W świetle badań ostatnich lat podkreśla się szczególnie znaczenie przebytych infekcji żołądkowo-jelitowych w wywoływaniu dysbiozy i objawów ZJN określanego mianem poinfekcyjnego zespołu jelita nadwrażliwego (P-ZJN) [49]. Infekcyjne zapalenie żołądkowo-jelitowe wywołuje głębokie zaburzenia wśród drobnoustrojów będących komensalami przewodu pokarmowego zarówno pod względem ich składu, jak i metabolizmu [5]. Zachorowania na infekcje przewodu pokarmowego są częste, przykładowo w Anglii ich częstość szacowana jest na 19/100 osobolat [50]. Wystąpienie nowych objawów świadczących o wystąpieniu ZJN po przebyciu takiej infekcji również jest względnie częstym zjawiskiem – sięgającym według ostatnich doniesień do 18% pacjentów z tym zespołem, przy czym około 40% to przypadki będące następstwem biegunki podróżnych [49]. Najczęstsze przyczyny infekcji, w następstwie których może rozwinąć się P-ZJN, to wirusy (*Norovirus/Rotavirus*) oraz bakterie: *Campylobacter* i *Salmonella* oraz *Shigella*, po których następstwa w postaci zaburzeń czynnościowych są jednak częstsze, a czynniki ryzyka o największym znaczeniu to toksyczność bakterii, przedłużający się czas trwania biegunki, krwawienia z dolnego odcinka przewodu pokarmowego podczas jej trwania oraz gorączka, a także młody wiek i płeć żeńska [51, 52]. Jak wynika z metaanalizy 18 opublikowanych badań, względne ryzyko wystąpienia P-ZJN w ciągu roku po infekcji wynosi RR = 6,5 CI (2,6-15,4), z czasem trwania objawów do 36 miesięcy [RR = 3,9 CI (3,0-5,0)], z tendencją do samoistnego zmniejszania się lub ustępowania dolegliwości przez 6 lat [51]. Dyskusyjną kwestią w leczeniu infekcji przewodu pokarmowego pozostaje empiryczna antybiotykoterapia i jej wpływ na wystąpienie P-ZJN. Badanie przeprowadzone przez autorów włoskich wśród pacjentów pediatrycznych 3 miesiące po przebytej infekcji wywołanej przez pałeczki *Salmonella* wykazało większą częstość przetrwałych dolegliwości bólowych i biegunki w grupie leczonej antybiotykami (9,5%) w porównaniu z leczonymi objawowo (2,9%), bez antybiotykoterapii empirycznej [53]. Z drugiej

strony dostępne są coraz szersze dane wskazujące na to, że antybiotykoterapia, zwłaszcza przy infekcji wywołanej *Campylobacter*, może wpływać na zmniejszenie częstości P-ZJN [54]. Obecnie uważa się, że w konsekwencji przebycia ostrej infekcji jelitowej dochodzi do nieprawidłowej aktywacji układu immunologicznego w błonie śluzowej i do utrzymywania się przewlekłego słabo nasilonego odczynu zapalnego ze wzrostem liczby nagromadzonych w jej obrębie komórek tucznych, neutrofilów, limfocytów T oraz komórek enterochromafinowych połączonego ze wzrostem przepuszczalności bariery jelitowej, ze zwiększeniem stężenia w tkance jelitowej histaminy, serotoniny, prostaglandyn i prozapalnych cytokin, krążących również w zwiększonym stężeniu we krwi obwodowej [44, 55]. Zwiększoną ilość aktywnych mastocytów, limfocytów CD3, CD4 i CD8 stwierdzono jednak zarówno w poinfekcyjnym, jak i w niespecyficznym ZJN, co świadczy o tym, że nie tylko patogenne jelitowe mikroorganizmy mogą być czynnikami sprawczymi tego prozapalnego alertu z całą gamą klinicznych następstw, przy uszkodzonej jelitowej barierze [42, 56]. Wykazano, że nagromadzone komórki uwalniające mediatory stanu zapalnego gromadzą się blisko sensorycznych zakończeń nerwowych aferentnych włókien splotu trzewnego, zwiększając nadwrażliwość trzewną i wpływając na zaburzenia motoryki, co koreluje bezpośrednio z natężeniem odczuwanego przez pacjentów z ZJN bólu i innych dolegliwości sensorycznych [57].

W etiopatogenezie ZJN niezaprzeczalną rolę odgrywa również stres, zarówno fizyczny, jak i psychiczny, na co istnieją znane od dawna dowody. Należy podkreślić, że rola stresu w wywoływaniu ZJN może zaznaczać się już we wczesnym okresie życia (*early life stress events*) na drodze epigenetycznej, gdyż u chorych z tym zespołem stwierdzono istotne zaburzenia metylacji genu dla receptora glikokortykosteroidowego [58]. Rola stresu w etiopatogenezie zespołu jelita nadwrażliwego polega nie tylko na zaburzeniu harmonijnego funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka/nadnercza/jelita (czego skutkiem są zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego i czucia trzewnego oraz nieprawidłowa funkcja błony śluzowej, gdyż uszkodzona zostaje jej integralność), ale dodatkowo stres wywiera wpływ nawet na skład mikroflory jelitowej [59]. Spadek integralności i zwiększona przepuszczalność biologicznej bariery, jaką jest błona śluzowa jelita, ułatwia dostęp antygenów i metabolitów bakteryjnych do jelitowego układu immunologicznego, powodując również aktywację procesów

zapalnych w błonie śluzowej, jak to omówiono powyżej. Jeśli zaś chodzi o zmianę składu mikroflory jelitowej, to z jednej strony jest ona w przebiegu przewlekłego stresu wynikiem zmian motoryki jelita i dysfunkcji bariery jelitowej, z drugiej zaś – następstwem znacznego wzrostu stężenia katecholamin w dorzeczcu naczyń kręgowych. Jak wykazano *in vitro*, katecholaminy stymulują wzrost bakterii *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolica* i *Pseudomonas aeruginosa*, a także u pacjentów z ZJN dochodzi do rozrostu bakterii beztlenowych i Gram-ujemnych, w tym *Bacterioidetes fragilis*, z istotnym spadkiem liczby drobnoustrojów z gatunków *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [60]. Zmiany te przy obniżonej oporności bariery jelitowej sprzyjają kolonizacji przez bakterie patogenne nabłonka jelitowego i aktywacji procesów zapalnych, które pozostając w przewlekłym przebiegu i słabym nasileniu biorą udział w etiopatogenezie ZJN.

Należy pamiętać, że przejawem dysbiozy w przewodzie pokarmowym jest także zespół rozrostu bakteryjnego (*small intestinal bacterial overgrowth* – SIBO) w jelicie cienkim, gdzie w prawidłowych warunkach gęstość bakterii sięga od 10^3 w proksymalnym odcinku do 10^7 CFU (*colony forming unit*)/g treści jelitowej z wyraźnie zaznaczonym gradientem wzrostu w dystalnym kierunku [61]. U części chorych z ZJN, według różnych danych nawet u 65-84%, także opisywano zespół rozrostu bakteryjnego w jelicie cienkim, podkreślając korelację między jego występowaniem a nasileniem objawów klinicznych, zwłaszcza wzdęć [62, 63]. W zespole SIBO dochodzi do nieprawidłowej kolonizacji nabłonka proksymalnej części jelita cienkiego przez bakterie produkujące duże ilości wodoru i metanu, co jest możliwe do stwierdzenia w testach oddechowych: laktulozowym o negowanej obecności lub glukozowym oraz poprzez ilościową ocenę bakterii w aspiratach jelitowych. Według wstępnych badań za punkt odliczenia przyjęto liczbę drobnoustrojów powyżej 10^3 CFU/ml treści jelita cienkiego, ale z całą pewnością istnieje konieczność dalszych dobrze zaplanowanych badań wobec faktu trudnej dostępności materiału z jelita cienkiego oraz małej wiarygodności wyników najczęściej do niedawna stosowanego oddechowego testu laktulozowo-wodorowego, którego rezultat raczej odzwierciedla czas pasażu jelitowego niż obecność SIBO [64, 65]. Zastosowanie badań molekularnych i hodowli bakteryjnych stwarzają możliwości diagnostyczne w tym zakresie, należy jednak pamiętać o trudnościach oraz wyeliminowaniu dodatkowych czynników, które mogą wpływać na ich wyniki, a głównie odstawieniu inhibitorów pompy protonowej, antybiotyków, probiotyków i prebiotyków [5]. Problem związku ZJN i SIBO pozostaje więc kuszącym tematem i polem do dalszych badań, tym

bardziej że może stwarzać atrakcyjne możliwości terapeutyczne, o czym świadczą dobre wyniki leczenia niezaparciowej postaci ZJN antybiotykiem nie wchłaniającym się z przewodu pokarmowego, takim jak rifaksymina [66].

ROLA MIKROFLORY JELITOWEJ W OTYŁOŚCI

Wobec narastającego zdrowotnego problemu, jakim jest otyłość i związane z nią choroby – problemu dotyczącego głównie krajów wysoko rozwiniętych, ale występującego nawet u pacjentów pediatrycznych – wiele zainteresowania poświęcono roli, jaką mogą w nim odgrywać drobnoustroje ekosystemu przewodu pokarmowego człowieka [67]. W pierwszej połowie pierwszej dekady XXI wieku opublikowano wyniki badań, które wykazały, że u myszy hodowanych w sterylnych warunkach (*germ free* – GF) całkowita ilość tkanki tłuszczowej była o 40% niższa niż u myszy z przewodem pokarmowym zasiedlonym normalnymi drobnoustrojami jelitowymi, mimo że te ostatnie otrzymywały dietę uboższą o 30% kalorii. Zasiedlenie jelit GF-myszy florą pobraną z kłanicy „normalnych” zwierząt tego gatunku prowadziło do wzrostu zawartości całkowitego tłuszczu w ich organizmie o 60% i do rozwoju insulinooporności w ciągu 2 tygodni, pomimo znacznie mniejszego dowozu pożywienia. Wnikliwe badania tego zjawiska wykazały, że bakterie ekosystemu jelitowego zwiększają wchłanianie węglowodanów prostych ze światła jelita z następową indukcją lipogenezy „de novo” w wątrobie [61, 68]. Odbywa się to z udziałem białkowego czynnika z rodziny angiopoetynopodobnych nazwanego „indukowanym głodem czynnikiem adipocytów” – FIAF (*fasting-induced adipocyte factor*), który jest obecny w nabłonku jelitowym i którego supresja pod wpływem mikroflory jelitowej powoduje spichrzanie triglicerydów w adipocytach [61]. Porównując dwie grupy zwierząt: GF-myszy oraz te z przywróconą mikroflorą karmioną wysokotłuszczową i bogatą w węglowodany dietą „zachodnią”, stwierdzono po 8 tygodniach mniejszy przyrost wagi i masy tłuszczowej w grupie GF z jednoczesną ochroną tej grupy doświadczalnej przed nietolerancją glukozy i insulinoopornością. Co ciekawe, obie grupy myszy miały tę samą zawartość energetyczną w próbkach stolca, co sugeruje że dowóz energii z diety nie jest jedyną przyczyną przyrostu masy tłuszczowej [69]. Rezultaty te świadczą po raz pierwszy, że czynnik środowiskowy, jakim jest jelitowy ekosystem, może być regulatorem magazynowania energii.

Dalsze badania doświadczalne na modelu zwierzęcym potwierdziły związek pomiędzy otyłością

a zaburzeniami składu i właściwości drobnoustrojów jelitowych. Wykazano, że rozwój otyłości u myszy karmionych wysokotłuszczową i bogatą w cukier dietą „zachodnią” koreluje ze zmianą proporcji typów bakterii: z 50-procentową redukcją Gram-ujemnych *Bacteroidetes* i proporcjonalnym wzrostem liczby Gram-dodatnich *Firmicutes* [70]. Zaburzenie to skutkuje wzbogaceniem ekosystemu jelitowego w geny zwiększające pobór energii pochodzącej z diety, ale opisane zmiany składu drobnoustrojów okazały się całkowicie odwracalne po powrocie do naturalnej diety [71]. Aby wykazać, że zaburzenia składu mikroflory jelitowej są przyczyną, a nie skutkiem nieprawidłowej diety czy wręcz otyłości, dokonano transplantacji treści okrężnicy od otyłych i szczupłych myszy do jelita zwierząt GF. Po 2 tygodniach myszy GF posiadające florę od zwierząt otyłych wykazywały znacznie większy pobór energii z diety i znamienne wyższy przyrost masy tłuszczowej połączone z insulinoopornością, pozostając na tej samej pod względem ilości kalorii diecie [71, 72].

Badania u ludzi potwierdzają rezultaty uzyskane na drodze doświadczalnej. W grupie otyłych pacjentów z obniżonym w stosunku do grupy kontrolnej odsetkiem *Bacteroidetes* i przewagą *Firmicutes* w dystalnym jelicie, po randomizacji na diecie ubogotłuszczowej lub ubogowęglowodanowej uzyskano wzrost proporcji *Bacteroidetes* z redukcją wagi [73]. Badanie metagenomu u 154 bliźniąt również wykazało znaczące zmiany proporcji drobnoustrojów przewodu pokarmowego z relatywnym zmniejszeniem *Bacteroidetes*, ale z wyższą proporcją *Actinobacteria* u otyłych w porównaniu ze szczupłymi, ze skłonnością do rodzinnego dziedziczenia [74]. Manipulacje składu i proporcji ekosystemu jelitowego z użyciem probiotyków, antybiotyków i prebiotyków mogą okazać się nowym obszarem działań terapeutycznych wobec wielu chorób, w tym otyłości, gdyż związek między mikroflorą a homeostazą energetyczną i ich rola w patogenezie otyłości pozostają przedmiotem szeroko prowadzonych badań.

Piśmiennictwo

1. Neish A.: Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009, 136, 65-80.
2. Cario E.: Commensal-innate immune miscommunication in IBD pathogenesis. *Dig Dis* 2012, 30, 334-340.
3. Sekirov I., Russel S.L., Antunes C.M., Finlay B.B.: Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010, 90, 859-904.
4. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Human microbiome project – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol* 2012, 51, 243-256.
5. Simren M., Barbara G., Flint H., Spiegel B.M.R., Spiller R.C., Vanner S. et al.: Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013, 62, 159-176.
6. Dave M.D., Higgins P.D., Middha S., Rioux K.P. et al.: The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res* 2012, 160, 246-257.
7. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C. et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010, 464, 59-65.
8. Festi D., Schiumerini R., Birtolo C., Marzi L., Montrone L., Scafoli E. et al.: Gut microbiota and its pathophysiology in disease paradigms. *Dig Dis* 2011, 29, 518-524.
9. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Frier N. et al.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107, 11971-5.
10. Damman C.J., Miller S.I., Surawicz C.M., Zisman T.L.: The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 2012, 107, 1452-1459.
11. Stewart J.A., Chadwick V.S., Murray A.: Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal flora of children. *J Med Microbiol* 2005, 54, 1239-1242.
12. Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh K., Toyoda A. et al.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007, 14, 169-81.
13. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poulet J.B., Massart S. et al.: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107, 14691-14696.
14. Biedermann L., Rogler G.: Environmental factors and their impact on the intestinal microbiota: a role for human disease? *Dig Dis* 2012, 30 (suppl 3), 20-27.
15. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. et al.: The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008, 6, 280.
16. Jernberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K.: Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *Isme J* 2007, 1, 56-66.
17. Sobieszkańska B.M.: The influence of intestinal dysbiosis on human health. *Gastroenterol Pol* 2008, 15, 287-290.
18. Sartor R.B.: Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008, 134, 577-594.
19. Chung H., Kasper D.L.: Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol* 2010, 22, 455-460.
20. Radwan P., Radwan-Kwiatek K., Tabarkiewicz J., Skrzydło-Radomańska B., Roliński J.: Rola komórek dendrytycznych w nieswoistych zapaleniach jelit. *Gastroenterol Pol* 2007, 14, 123-126.

21. Vijay-Kumar M., Gewirtz A.T.: Guardians of the gut: newly appreciated role of epithelial Toll-like receptors in protecting the intestine. *Gastroenterology* 2008, 135, 351-354.
22. Lee Y.K., Mazmanian S.K.: Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010, 330, 1768-1773.
23. Radwan P., Radwan-Kwiatak K., Skrzydło-Radomańska B.: Rola mikroflory jelitowej w nieswoistych zapaleniach jelit. *Przegląd Gastroenterol* 2009, 4, 1-6.
24. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M. Baert F., Pennickx F., Rutgeerts P.: Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998, 114, 262-267.
25. Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S. Doolittle W.F., Veldhuyzen van Zanten S.J.: Differences between tissue-associated intestinal microflora in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2006, 44, 4136-4141.
26. Sartor R.B.: Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology* 2004, 126, 1620-1633.
27. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N., Nicolae D.L., Chen F.F., Ramos R. et al.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, 411, 603-606.
28. Sokol H., Seksik P., Furet J.P., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L. et al.: Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15, 1183-1189.
29. Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N. et al.: High prevalence of adherent - invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127, 412-421.
30. Glasser A.L., Boudeau J., Barnich N., Perruchot M.H., Colombel J.F., Darfeuille-Michaud A. et al.: Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immunol* 2001, 69, 5529-5537.
31. De Wouters T., Dore J., Lepage P.: Does our food (environment) change our gut microbiome ('in-vironment'): a potential role for inflammatory bowel disease? *Dig Dis* 2012, 30 (suppl), 33-39.
32. Travassos L.H., Carneiro L.A., Ramjeet M., Hussey S., Kim Y.G., Magalhaes J.G. et al.: Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010, 11, 55-62.
33. Abreu M.T., Taylor K.D., Lin Y.C., Hang T., Gaiennie J., Landers C.J. et al.: Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002, 123, 679-688.
34. Cooney R., Jewell D.: The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009, 27, 428-442.
35. Lee Y.K., Mazmanian S.K.: Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010, 330, 1768-1773.
36. Aroniadis O. C., Brandt L.J.: Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol* 2013, 29, 79-84.
37. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology DNA. *Res* 2009, 16, 1-12.
38. Ducrotte P.: Microbiota and irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol* 2010, 34 (suppl.1), S52-S56.
39. Codling C., O'Mahony L., Shanahan F., Quigley E.M.M., Marchesi J.R.: A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2010, 55, 392-397.
40. Chang J.Y., Locke G.R., Mc Nally M.A.: Impact of functional gastrointestinal disorders on survival in the community. *Am J Gastroenterol* 2010, 105, 822-832.
41. Gunnarsson J., Simren M.: Peripheral factors in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009, 41, 788-793.
42. Ohman L., Simren M.: Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 7, 163-173.
43. Parkes G.C., Brostoff J., Whelan K., Sanderson J.D.: Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: their role in its pathogenesis and treatment. *Am J Gastroenterol* 2008, 103, 1557-1567.
44. Dos Santos V.M., Muller M., de Vos W.M.: Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal interface. *Curr Opin Biotechnol* 2010, 21, 539-550.
45. Stanghellini V., Barbara G., Cremon C., Cogliandro R., Antonucci A., Gabusi V. et al.: Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med.* 2010, 5 (supl. 1), S57-S63.
46. Craig O.F., Quigley E.M.: Bacteria, genetics and irritable bowel syndrome. *Exper Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 4(3), 271-276.
47. Rajilic-Stojanovic M., Biagi E., Heilig H.G., Kajander K., Kekkonen R.A., Tims S. et al.: Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011, 141, 1792-1801.
48. Wilson I.D. Drugs, bugs and personalized medicine: Pharmacometabonomics enters the ring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106(34), 14187-14188.
49. Spiller R., Garsed K.: Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009, 136, 1979-1988.
50. Wheeler J.G., Sethi D., Cowden J.M., Wall P.G., Rodrigues L.C., Tompkins D.S. et al.: Study of infectious intestinal disease in England rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ* 1999, 318, 1046-1050.
51. Thabane M., Kottachchi D.T., Marshall J.K.: Systematic review and meta-analysis the incidence and prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2007, 26, 535-544.
52. Porter CK., Gormley R., Tribble DR., Cash B.D., Riddle M.S.: The incidence and gastrointestinal infectious risk of functional gastrointestinal disorders in a healthy US adult population. *Am J Gastroenterol* 2011, 106, 130-138.
53. Barbara G., Stangellini V., Berti-Ceroni C., De Giorgio R., Salvioli B., Corradi F. et al.: Role of antibiotic therapy on long-term germ excretion in faeces and digestive symptoms after *Salmonella* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2000, 14, 1127-1131.
54. Ternhag A., Askikainen T., Giesecke J., Ekdahl K.: A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection of *Campylobacter* species. *Clin Infect Dis* 2007, 44, 696-700.
55. Goral V., Kucukoner M., Buyukbayram H.: Mast cells count and serum cytokine levels in patients with irritable bowel syndrome. *Hepatogastroenterology* 2010, 57(101), 751-754.
56. Barbara G., Cremon C., Carini G., Bellacosa L., Zecchi L., De Giorgio R. et al.: The immune system in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 2011, 17, 349-359.
57. Barbara G., Stangellini V., De Giorgio R., Cremon C., Cottrell G.S., Santini D. et al.: Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004, 126, 693-702.

58. Dinan T.G., Cryan J., Shanahan F., Keeling PN., Quigley EM.: IBS: an epigenetic perspective. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 7, 465-471.
59. Tache Y., Bonaz B.: Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* 2007, 117, 33-40.
60. Lyte M., Vulchanova L., Brown D.R.: Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res* 2011, 343, 23-32.
61. Krznarić Ž., Vranesić-Bender D., Kunović A., Kekez D., Štimać D.: Gut microbiota and obesity. *Dig Dis* 2012, 30, 196-200.
62. Pimentel M.: Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome, a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2003, 98, 412-419.
63. Quigley E.M.: A 51-year-old with irritable bowel syndrome: test or treat for bacterial overgrowth? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007, 5, 1140-1143.
64. Kerckhoffs A.P., Visser M.R., Samsom M.: Critical evaluation of diagnosing bacterial overgrowth in the proximal small intestine. *J Clin Gastroenterol* 2008, 42, 1095-1102.
65. Yu D., Cheeseman F., Vanner S.: Combined oro-caecal scintigraphy and lactulose hydrogen breath testing demonstrate that breath testing detects oro-caecal transit, not small intestinal bacterial overgrowth in patients with IBS. *Gut* 2011, 60, 334-340.
66. Pimentel M., Lembo A., Chey W.D., Zakko S., Ringel Y., Yu J. et al.: Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *NEJM* 2011, 364, 22-32.
67. Biederman L., Rogler G.: Environmental factors and their impact on the intestinal microbiota: a role of human disease? *Dig Dis* 2012, 30 (Suppl. 3), 20-27.
68. Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A. et al.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 15718-15723.
69. Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104, 979-984.
70. Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 11070-11075.
71. Turnbaugh P.J., Backhed F., Fulton L., Gordon J.I.: Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008, 3, 213-223.
72. Turnbaugh P.J., Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., Knight R., Gordon J.I.: The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009, 1, 1-10.
73. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006, 444, 1022-1023.
74. Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E. et al.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009, 457, 480-484.