

# Mikrobiota organizmu ludzkiego i jej wpływ na homeostazę immunologiczną – część I

## Human microbiota. The impact on immune homeostasis – part I

KATARZYNA GREGORCZYK-MAŚLANKA, RYSZARD KURZAWA

Klinika Alergologii i Pneumonologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc O.T. w Rabce-Zdroju

### Streszczenie

Mikrobiota organizmu ludzkiego stanowi w ostatnich dziesięcioleciach temat inspirujący badaczy. Dynamiczny rozwój metod diagnostycznych, zwłaszcza opartych o diagnostykę molekularną, zaowocował także rozwojem wiedzy o mikrobiota i stworzeniem baz danych gromadzących informacje o rodzajach i gatunkach naszej flory komensalnej, jak np. *Human Microbiome Project*. Pozwolił na potwierdzenie, że rozwój mikrobiota rozpoczyna się już w okresie prenatalnym, utworował drogę dalszym badaniom nad wpływem przebiegu i czasu trwania ciąży, drogi porodu, sposobu karmienia oraz ekspozycji na czynniki środowiskowe. Mikrobiota jelitowa zdrowego dziecka kształtuje się do 3. roku życia, w piśmiennictwie podkreślana jest kluczowa rola pierwszych 1000 dni życia dziecka.

Interesujące są również doniesienia na temat możliwości komunikacji mikrobioty z układem immunologicznym gospodarza, jej wpływu na dojrzewanie limfocytów T naiwnych w T regulatorowe, produkcję cytokin przeciwzapalnych jak IL-10 czy TGF- $\beta$ , które pełnią kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy Th1/Th2, rozwoju tolerancji immunologicznej, w tym również autotolerancji, a zaburzenia w tym zakresie prowadzą do chorób alergicznych oraz autoimmunologicznych.

**Słowa kluczowe:** *mikrobiom, mikrobiota, immunotolerancja*

### Summary

Human microbiota has been the inspiration for scientists within the last decades. Our concept of microbiota has expanded with the dynamic emerge of diagnostic methods, especially molecular, and enabled to create databases of commensal flora, for example *Human Microbiome Project*. It confirmed that human microbiota begins to develop before the infant is born, and gave way to further investigations. It evidenced the influence of delivery time (pregnancy duration), mode of delivery, choice of breastfeeding against formula feeding and exposure to environmental factors. Gut microbiota of a healthy child is formed until 3rd year of life; the key role of the first 1000 days is underlined.

Communication between microbiota and immune system is also an extremely interesting issue, as well as its influence on T-naive lymphocyte and T-reg lymphocyte maturation, production of the anti-inflammatory cytokines like IL-10 or TGF- $\beta$ , thus its key role in Th1/Th2 homeostasis, immunotolerance and autotolerance. Any disturbances to this field may lead to allergic and autoimmunologic diseases.

**Keywords:** *mikrobiom, mikrobiota, immunotolerance*

© Alergia Astma Immunologia 2016, 21 (3): 146-150

www.alergia-astma-immunologia.pl

Przyjęto do druku:

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr med. Katarzyna Gregorczyk-Maślanka

Klinika Alergologii i Pneumonologii

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

O.T. w Rabce-Zdroju

ul. Prof. J. Rudnika 3b, 34-700 Rabka-Zdrój

tel. 18 2676060 wewn. 281; e-mail: kgregor@interia.pl

### Wprowadzenie

Ostatnie dwudziestolecie jest okresem intensywnych badań nad florą komensalną zasiedlającą ludzki organizm oraz związkami pomiędzy jej jakościowymi i ilościowymi zaburzeniami (zakłóceniem homeostazy mikrobiologicznej) a chorobami zaliczanymi do grupy cywilizacyjnych, zwłaszcza chorób alergicznych, układowych o podłożu autoimmunologicznym - w tym zapalnych chorób jelit - chorób metabolicznych i nowotworowych.

Dynamiczny rozwój badań nad genomem ludzkim przyniósł informację o tym, że organizm człowieka w aspekcie genetycznym to jedynie 1% genów ludzkich wobec 99% genów mikroorganizmów go zasiedlających [1]. Skłania to do traktowania naszego organizmu, jako całego ekosystemu, zbioru pozostających ze sobą w ścisłej zależności komórek ludzkich oraz mikroorganizmów.

Termin „mikrobiom” został zaproponowany w 2001r. przez Joshua Lederberg’a dla określenia całości ekologicznego środowiska złożonego z drobnoustrojów komensalnych, symbiotycznych oraz chorobotwórczych, które dzielą z nami naszą przestrzeń życiową [2,3]. Aktualnie termin „mikrobiota” oznacza zbiór wszystkich drobnoustrojów bytujących w określonym środowisku (organizmie człowieka - gospodarzu), czyli bakterii, grzybów, wirusów i archeonów, natomiast termin „mikrobiom” oznacza zbiór ich genomów. Ilościowe i jakościowe określanie mikrobiomu stało się możliwe dzięki dynamicznemu rozwojowi technik biologii molekularnej i diagnostyki genetycznej.

### Molekularne metody badania mikrobiota

Liczba gatunków flory komensalnej była przez dziesięciolecie niedoszacowana z uwagi na ograniczenia w możliwości

izolacji i hodowli. Przy braku możliwości izolacji, stosowano metody detekcji substancji pochodzących ze ścian komórkowych drobnoustrojów (lipopolisacharydy i endotoksyny bakterii Gram-ujemnych, peptydoglikany bakterii Gram-dodatnich, polisacharydy i  $\beta$ -glukany grzybów) [4].

W roku 1977 Woese i Fox ustalili, że na podstawie sekwencji zasad genu kodującego części komponenty 30S podjednostki rybosomów bakterii można dokonywać identyfikacji drobnoustrojów poprzez porównanie z bazą danych [cyt. za 5]. Fragment komponenty rybosomalnej (część genów kodujących, czyli sekwencja kodująca 16S rybosomalnego RNA) wykazuje dużą odporność na zmiany, dzięki czemu może służyć do identyfikacji. Jest obecny w każdej komórce bakteryjnej i komórce archeonów, nie występuje w komórkach zwierzęcych. Jego analiza (ekstrakcja materiału, amplifikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy, (*polymerase chain reaction*, PCR), porównanie z bazą danych) pozwala na ujawnienie obecności mikroorganizmów niezdolnych do wzrostu [2,3,6].

Aktualnie wiedza na temat bioróżnorodności naszego organizmu ulega rozbudowaniu, podobnie jak zakres pojęć służących określeniu poszczególnych aspektów mikrobiomu. I tak metagenomem określana jest całość DNA i RNA populacji hodowlanych i niehodowlanych mikroorganizmów człowieka, metatranskryptom to całość mitochondrialnego RNA, metabolom to całość produktów metabolizmu.

Według aktualnie dostępnych danych, „supergenom człowieka” to jedynie 1% genów ludzkich wobec 99% genów mikroorganizmów zasiedlających organizm [1]. Szacunkowo w przewodzie pokarmowym Europejczyka znajduje się 3300000 genów, 1800 rodzajów i 15-36000 gatunków drobnoustrojów [7].

W celu zbadania mikrobiomu opracowano szereg programów badawczych, z których najszerzej zakrojony jest amerykański *Human Microbiome Project* (HMP) prowadzony przez *National Institutes of Health* [3]. Jest to inicjatywa ogólnosięciowa mająca na celu scharakteryzowanie ludzkiego mikrobiomu na poziomie sekwencji nukleotydowej całego genomowego DNA populacji hodowlanych i niehodowlanych organizmów człowieka (metagenom), syntetyzowanych białek bakteryjnych (metaproteom), produktów metabolizmu (metabolom). Program opiera się na pobraniu próbek z 5 lokalizacji (kał, skóra, nos i jama ustna, układ moczowo-płciowy) od 250 zdrowych ochotników. Celem HMP jest ustalenie kwestii posiadania przez ludzi wspólnej rdzeniowej mikroflory („*core microbiota*”), sprawdzenie korelacji zmian ludzkiej mikroflory ze zmianami stanu zdrowia oraz skonstruowanie nowych narzędzi technologicznych do realizacji ww. celów.

Należy też wspomnieć o programach badających mikrobiom przewodu pokarmowego (*Metagenics of the human gastrointestinal tract*), oraz układu oddechowego (*Lung HIV Microbiome Project*) [1].

Nie wykryto dotąd (w projekcie *Human Microbiome Project*) jednego gatunku licznie występującego u wszystkich badanych. Analizy pozwoliły jednak zidentyfikować wspólny zestaw genów – być może wspólna część istnieje na poziomie genetycznym.

## Zróżnicowanie mikrobioty w zależności od lokalizacji w organizmie człowieka

### Mikrobiota układu pokarmowego

Najliczniejsza część mikrobioty zasiedla przewód pokarmowy – to  $10^{14}$  komórek bakteryjnych (10x więcej niż komórek organizmu człowieka, o łącznej wadze ok. 1,5 kg); 1800 rodzajów i 15-36000 gatunków oraz 3,3 mln genów [7].

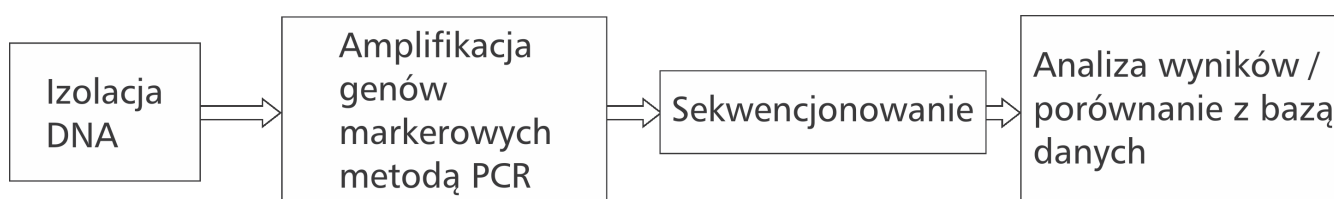
Według tradycyjnych podziałów można te mikroorganizmy podzielić na: beztlenowce (*Bacteroides*, *Acinetobacter*, *Firmicutes* a w obrębie tego rodzaju *Clostridium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Peptococcus sp.*, *Ruminococcus sp.*) i względne tlenowce (*Firmicutes* a w ich obrębie *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* i *Firmicutes* a wśród nich *E. coli* i inne *Enterobacteriaceae*) [7].

W zależności od odcinka przewodu pokarmowego natomiast:

- jama ustna - drobnoustroje pochodzące z żywności;
- żołądek (pH - 1,0-2,0 - wpływ enzymów proteolitycznych) - niewiele bakterii względnie beztlenowych: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori* i drożdże *Candida albicans*;
- dwunastnica - *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*;
- jelito czcze - wyższe pH, lepsze warunki dla rozwoju związane ze zwiększeniem liczebności do  $10^7$ /gram treści jelitowej;
- jelito kręte -  $10^9$ /gram treści jelitowej, dominacja beztlenowców i względnych tlenowców: *Bifidobacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veilonella sp.*, *Streptococcus sp.* oraz rodzina *Enterobacteriaceae*;
- jelito grube i odbytnica - pH – 8;  $10^{10-12}$ /gram treści jelitowej: *Bacterioide sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.*, drożdże - *Candida*.

### Mikrobiota układu oddechowego

Pierwsze badania mikrobiomu układu oddechowego pochodzą z roku 2010 (Hilty i wsp.) [cyt. za 1]. Dotyczyły pacjentów z mukowiscydozą, astmą oskrzelową oraz zdrowych ochotników palących i niepalących, potem dołączono grupy z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc i chorych po przeszczepach płuc. Pobranie materiału do badania wy-



Ryc. 1. Molekularna identyfikacja drobnoustrojów

magą inwazyjnej fiberobronchoskopii z pobraniem BAL (*bronchoalveolar lavage* - płukanie oskrzelowo-płucne) [cyt. za 1]. Niezmiernie cennym źródłem informacji były też badania molekularne materiału pobranego z każdego płata płuc usuniętych podczas transplantacji płuc (Erb-Downward i wsp. „*Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD*”, 2011). Przełomowe wnioski są następujące [cyt. za 1]:

- drzewo oskrzelowe nie jest sterylne – zawiera >2 000 genomów bakteryjnych/cm<sup>2</sup>
- każdy pacjent ma inny właściwy sobie mikrobiom
- mikrobiom górnych dróg oddechowych różni się od dolnych
- każdy płat płuca u tego samego chorego ma odrębny mikrobiom

### Mikrobiota skóry

Na skórze najczęściej identyfikowane były rodzaje *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, i gatunki: *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*. Jest to 10<sup>6</sup> bakterii/cm<sup>2</sup> skóry oraz 10<sup>10</sup> bakterii na całej powierzchni skóry (2 m<sup>2</sup>), przy czym są 4 dominujące rodzaje: *Acinetobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*. Wykazano, że bakterie komensalne np. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* mają zdolność hamowania rozwoju innych bakterii. Wykazano również, że mikrobiota skóry pacjentów z atopowym zapaleniem skóry ma dramatycznie niższą różnorodność w miejscach typowych (zgięcia kolanowe i łokciowe) w porównaniu z pacjentami zdrowymi. Czy zaburzenie bioróżnorodności jest przyczyną czy też skutkiem przewlekłego stanu zapalnego – pozostaje nadal pytaniem otwartym. Wiadomo, że skład mikrobiomu w atopowym zapaleniu skóry różni się w zależności od fazy choroby. W zaostrzeniu dominuje *S. aureus* i *S. epidermidis*; w okresie remisji *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*.

### Rozwój mikrobioty od okresu prenatalnego

Badania molekularne i genetyczne zmodyfikowały nasze podejście do kwestii „powstawania” czy „nabywania” indywidualnego ludzkiego mikrobiomu. Funkcjonuje już nawet teoria o prenatalnej kolonizacji dziecka przez bakterie obecne w środowisku wewnątrzmacicznym [7,8], poparta potwierdzeniem obecności DNA bakterii w łożysku, płynie owodniowym, błonach płodowych, obecności bakterii w smółce (*E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Staph. epidermidis*); na modelu mysim natomiast - po podaniu myszom ciężarnym *Enterococcus faecium* - potwierdzano ich obecność w płynie owodniowym.

Podstawową jednak rolę odgrywa droga porodu. Poród siłami natury wiąże się z kolonizacją dziecka względnymi beztlenowcami i tlenowymi bakteriami jak *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* i *Bifidobacteriae*. Po wykorzystaniu tlenu, przewod pokarmowy zmienia się w środowisko beztlenowe, sprzyjające względnym beztlenowcom *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacterioides*, *Ruminococcus* [9].

Natomiast cięcie cesarskie wiąże się z opóźnioną kolonizacją jelita, wpływem flory szpitalnej, brakiem bakterii beztlenowych, dominacją *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium spp.*, i obniżoną bioróżnorodnością [7,9], opóźnioną i mniejszą liczebnie kolonizacją *Bacteroidetes*, co zaburza homeostazę Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> [7].

Istotnym czynnikiem warunkującym kolonizację jest też dojrzałość noworodka [10]. Zaobserwowano różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy dziećmi urodzonymi o czasie (dominacja *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) i przedwcześnie (*Enterobacteriaceae*, *Clostridium*) z mniejszą w tej grupie zmiennością międzyosobniczą, sugerującą wpływ kontaktu z florą tzw. szpitalną. Dalszy rozwój mikrobioty jelitowej zależy od wielu czynników. Antybiotykoterapia w okresie okołoporodowym zmniejsza liczebność *Bifidobacterium* i *Bacteroides* a zwiększa *Enterobacteriaceae* i *Enterococcus* [10].

Kolejny niezmiernie istotny aspekt to metoda karmienia noworodka i niemowlęcia. Pokarm naturalny zawiera sekretoryną immunoglobulinę A (działającą przeciw drobnoustrojom patogennym), białka i peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej (laktoferyna), oligosacharydy o właściwościach prebiotycznych jak również bakterie: kwasu mlekowego *Lactobacillus* (*L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. fermentum*) oraz *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* w ilości 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>/ml mleka [7]. Źródłem bakterii jest nie tylko skóra matki, ale najprawdopodobniej jej mikrobiota jelitowa – drobnoustroje prawdopodobnie mogą być transferowane za pośrednictwem komórek dendrytycznych i makrofagów do krwiobiegu i gruczołów mlekowych [9].

Karmienie mieszanką mlekozastępczą wiąże się z kolonizacją *Bacterioides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Enterobacteria*, *Veilonella spp.*

Kolejnym czynnikiem, mającym decydujący wpływ na formowanie mikrobioty jest antybiotykoterapia. Wpływ tego typu interwencji badano m.in. na modelach mysich. W eksperymentalnym modelu astmy alergicznej, przeprowadzonym przez Shannon L. Russell i wsp., dokonano oceny wpływu antybiotykoterapii (wankomycyną i streptomycyną) w okresie „noworodkowym” i dorosłym, na stopień ciężkości astmy u myszy [11]. Wpływ na mikroflorę jelitową oceniano wówczas poprzez porównanie całkowitej liczby komórek bakterii i oceny różnorodności gatunkowej (sekwencjonowanie 16S rRNA). Wykazano brak wpływu antybiotykoterapii na całkowitą liczbę komórek bakteryjnych, ale istotne ograniczenie różnorodności w grupie leczonej wankomycyną.

### Związek mikrobioty z funkcjonowaniem układu immunologicznego

Znane są aktualnie pojedyncze mechanizmy biochemiczne i molekularne takiego oddziaływania drobnoustrojów na ludzki układ odpornościowy. Kluczową rolę odgrywa kontakt w obrębie przewodu pokarmowego. W przewodzie pokarmowym dochodzi z jednej strony do eliminacji bakterii patogennych a z drugiej - do uzyskania tolerancji obcych białek i kolonizacji bakteriami komensalnymi.

Bariera jelitowa to bariera „dwupłaszczyznowa:” fizyczna (200 m<sup>2</sup> nabłonka) oraz immunologiczna: (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) czyli węzły chłonne krezkowe (*mesenteric lymph nodes*, MLNs), izolowane węzły chłonne, krypty i kępki Peyera. Międzykomórkowy kompleks połączeń enterocytów, łączący funkcję immunologiczną z fizyczną, składa się z trzech komponent: połączeń zamykających „*tight junctions*”, połączeń przylegających „*adherent junctions*” oraz desmosomów. W świetle aktualnych wyników badań, mikrobiota pozostaje w ścisłej zależności z budową i funkcją ww. połączeń [12].

Rolę drobnoustrojów komensalnych w przewodzie pokarmowym można również, podobnie jak rolę bariery jelitowej, rozpatrywać wielopłaszczyznowo:

- 1) udział w metabolizmie organizmu (przekształcanie składników pokarmowych złożonych w proste np. błonnika, mucyny w cukry proste, tłuszczów złożonych w krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*short FAT chain acid*, SFCA) głównie octan, propionian, maślan, przeprowadzanie procesów fermentacji dostarczające nawet 10% energii, wpływ na metabolizm kw. żółciowych, bilirubiny, cholesterolu, witamin;
- 2) wpływ na rozwój błony śluzowej, aktywność enzymatyczną, perystaltykę;
- 3) wpływ na barierę jelitową: utrudnienie kontaktu powierzchni nabłonka z innymi bakteriami (patogennymi), wpływ na wzrost produkcji defensyn, zmniejszenie przepuszczalności (emisja sygnałów do produkcji mucyny, wzmacnianie integralności nabłonka jelit, wzmocnienie międzykomórkowych połączeń „*tight junctions*”, stymulowanie tempa proliferacji enterocytów;
- 4) neutralizacja patogenów bakteryjnych
  - współzawodnictwo o niszę ekologiczną i składniki pokarmowe,
  - konkurencja o receptory błonowe: *Lactobacillus plantarum* wykorzystuje receptory mannozowe niezbędne do adhezji dla *Escherichia coli*
  - emisja sygnałów pobudzających do produkcji sekrecyjnej immunoglobuliny A: (zwl. *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacteriaceae*), która eliminuje bakterie patogenne, wspomaga adhezję bakterii komensalnych, wzmacnia połączenia „*tight junctions*”, wybiórczo „faworyzuje” bakterie komensale, których sygnały pobudziły jej produkcję,
  - emisja sygnałów do produkcji kationowych peptydów antybakteryjnych (CAMPs);
- 5) wpływ na układ odpornościowy (na dojrzewanie limfocytów, różnicowanie, rozwój immunotolerancji, utrzymanie równowagi cytokinowej, tolerancji pokarmowej).

Kolonizacja mikrobiotą „fizjologiczną” prowadzi do różnicowania limfocytów naiwnych w limfocyty regulatorowe (T reg) oraz do produkcji IL-10, które pełnią kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>; rozwoju tolerancji immunologicznej - w tym również autotolerancji - a zaburzenia w tym zakresie prowadzą do chorób alergicznych oraz autoimmunologicznych.

U podstaw tych reakcji leży zdolność komunikacji drobnoustrojów z komórkami nabłonka oraz z tkankami limfoidalnymi poprzez przekazywanie sygnałów metabolicznych konkretnym receptorom. Receptory PRR (*pattern recognition receptors*) na powierzchni wybranych komórek rozpoznają wzory molekularne bakterii (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) takie jak lipopolisacharydy (LPS), flagelinę, kw. nukleinowe bakterii G(-), lub mannan i zymosan grzybów, peptydoglikany, kw. lipoteicholowy bakterii G(+). Rodzajem receptorów PRR są receptory błonowe Toll-like (TLR), które inicjują stan zapalny lub w większości przypadków rozpoznania komensali prowadzą do tolerancji obcych białek [13].

Substancje takie jak LPS, peptydoglikany, kwasy lipoteichojowe są produkowane, zarówno przez bakterie komensale, jak i patogenne, ale receptory rozróżniają ich pochodzenie.

Wykazano, że całkowity brak stymulacji bakteryjnej umożliwia przekazywanie sygnałów z komórek dendrytycznych do limfocytów T regulatorowych i obniża zdolność produkcji IL-10 oraz TGFβ [14].

Limfocyty regulatorowe Treg są supresyjnie działającym rodzajem limfocytów wspomagających (Th) o ekspresji CD4+. Pełnią funkcję dzięki ekspresji czynnika transkrypcyjnego „*forkhead box protein 3 (FOXP3)*” po demetylacji locus genu FOXP3.

Proces komunikacji mikroorganizmu komensalnego z układem immunologicznym gospodarza poprzez indukcję ekspresji w zakresie Treg, udokumentowano dotychczas jedynie dla nielicznych gatunków mikroorganizmów, ale spośród tych, którym poświęcono wiele uwagi należy wymienić *Bacterioides fragilis* – względnie beztlenową bakterię Gram-ujemną, stanowiącą element fizjologicznej flory jelita grubego człowieka. Drobnoustroje te wydzielają maślan, propionian i unikalne dla siebie polisacharydy A (PSA), które kierują dojrzewaniem układu immunologicznego, regulując liczbę Th<sub>17</sub> i Treg. Komórki dendrytyczne „wychytują” PSA, pobudzone tym połączeniem indukują limfocyty T CD4+ do produkcji IL-10/TGFβ. Równoległe maślan i propionian hamują deacetylazę histonów (HDAC), co prowadzi do wzmożonej acetylacji histonu H3 w rejonie promotorowym genu FOXP3 i aktywacji Treg [15].

Wpływ mikroflory jelitowej na rozwój bariery immunologicznej dokumentują badania eksperymentalne na szczepach zwierząt laboratoryjnych pozbawionych jakiegokolwiek flory, tzw. „*germ free animals*”. W aspekcie rozwoju GALT dowiedziono że myszy jałowe cechują [15]:

- mniejsze kępki Peyera [16],
- zmniejszona liczba komórek w *lamina propria*,
- zmniejszona liczba komórek T CD4+ i komórek produkujących IgA w przewodzie pokarmowym,
- ograniczona sieć kapilarna,
- struktura i rozwój śledziony i węzłów chłonnych – zaburzone, słabo wykształcone strefy komórek T i B,
- brak tolerancji antygenów podawanych „doustnie”,
- brak odpowiedzi Th1, silniejszą odpowiedź Th2 wykazaną przez wzrost produkcji IL-4.

Niezwykle ciekawe są wyniki badań eksperymentalnych Kozakovej i wsp., którzy spośród 24 szczepów bakteryjnych wyizolowanych ze stolca zdrowych niemowląt własnej populacji, wybrali 3 gatunki kierując się ich opornością na kwas żołądkowy i sole żółciowe, zdolnością hamowania rozwoju innych patogenów bakteryjnych oraz synergistycznym (po badaniu pilotażowym - inkubacja z ludzkimi komórkami krwi) efektem na indukcję produkcji przeciwalergicznych cytokin Th1 i TGFβ [12]. Wybrano *Lactobacillus rhamnosus* LOCK0900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK0908 oraz *Lactobacillus casei* LOCK0919. Ośmiotygodniowe myszy germ-free (n=12) podzielono na 2 grupy, z których jedna pozostała jałowa, drugiej dożyłkowo podano ww. mieszanke bakteryjną L mix, po 3 tygodniach dootrzewnowo podano rekombinowaną komponentę Bet v 1.

Wykazano nie tylko zmniejszenie stężenia całkowitego IgE, zwiększenie IgA w surowicy oraz popłuczynach z jelit, ale również zaburzenia rejonu szczytowego enterocytów oraz zaburzenia w zakresie połączeń zamykających i przylegających w grupie jałowej w przeciwieństwie do grupy kontrolnej oraz idealne uporządkowanie ww. elementów

w grupie skolonizowanej *Lmix*. Dodatkowo, w homogenacie jelita wykazano istotnie wyższe stężenia białek strukturalnych połączeń „tight junctions” - okludyny ZO-1 i  $\beta$ -aktyny (mierzone metodą Western-blot) w grupie kontrolnej i grupie skolonizowanej *Lmix* w stosunku do grupy germ-free.

### Podsumowanie

Coraz szerzej dostępne i coraz bardziej zaawansowane metody badań, pozwoliły nie tylko na tworzenie baz danych gatunków kształtujących mikrobiota organizmu ludzkiego w zakresie poszczególnych jego rejonów, ale również na potwierdzenie, że rozwój mikrobiota rozpoczyna się już

w okresie prenatalnym, że istotny wpływ ma przebieg i czas trwania ciąży, droga porodu, sposób karmienia oraz ekspozycja na czynniki środowiskowe. Fascynujące są doniesienia na temat zdolności komunikacji mikrobioty z układem immunologicznym gospodarza na poziomie biochemicznym, jej wpływu na proces dojrzewania limfocytów T oraz rozwój immunotolerancji. Istnieją również dowody na związek pomiędzy zaburzeniami bioróżnorodności mikrobiota organizmu ludzkiego i rozwojem chorób cywilizacyjnych, a co za tym idzie - koncepcje na temat możliwości prewencji wybranych zaburzeń poprzez zastosowanie probiotyków.

### Piśmiennictwo

- Górecka D, Nowiński A, Augustynowicz-Kopeć E. Mikrobiom układu oddechowego. *Pneumonol Alergol Pol* 2014; 82: 481-5.
- Kaczmarek J, Kuna P. Rola mikrobiomu w rozwoju alergii - czy możemy to zmodyfikować? *Terapia* 2015; 23: 51-5.
- Olszewska J, Jagusztyn-Krynicka E. Human Microbiome Project - mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol* 2012; 51: 243-56.
- von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 137: 680-9.
- Legatzki A, Rosler B, von Mutius E. Microbiome diversity and asthma and allergy risk. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14: 466.
- Panzer AR, Lynch SV. Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. *Curr Opin Rheumatol* 2015; 27: 373-80.
- Cukrowska B, Klewicka E. Programowanie makrobiotyczne - homeostaza mikrobioty jelitowej a ryzyko chorób cywilizacyjnych. *Standardy Med Pediatría* 2014; 11: 913-22.
- Weiss ST, Litinju A. Vitamin D, the gut microbiome and the hygiene hypothesis. How does asthma begin? *Am Respir Crit Care Med* 2015; 191: 492-3.
- Arrieta M, Stiemsma L, Amenyogbe N i wsp. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* 2014; 5: 427.
- Pac-Kożuchowska E, Krawiec P. Wpływ mikrobioty jelitowej na stan zdrowia dzieci *Standardy Med Pediatría* 2014; 11: 89-95.
- Russel S, Gold M, Hartmann M i wsp. Early-life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep* 2012; 13: 440-7.
- Kozakova H, Schwarzem M, Tuckova L i wsp. Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cell Mol Immunol* 2015, 13: 251-62.
- Lifschitz C. Mikrobiota przewodu pokarmowego i jej wpływ na zdrowie człowieka. *Standardy Med. Pediatría* 2014; 11: 525.
- Byoung-Ju K, So-Yeon L, Hyo-Bim K i wsp. Environmental changes, microbiota and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014; 6: 389-400.
- Hoeppli R, Wu D, Cook L i wsp. The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites and the microbiome. *Front Immunol* 2015; 6: 61.
- Levast B, Li Z, Madrenas J. The role of Il-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance. *Cytokine* 2015; 75: 291-301.