

Joanna Olszewska<sup>1</sup>, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego  
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. HMP – ogólna charakterystyka. 3. Mikroflora jelit. 3.1. Różnorodność taksonomiczna mikroflory jelit człowieka. 3.2. „Core microbiome” jelit. 3.3. Zmiany mikroflory jelit w zależności od wieku. 3.4. Wpływ diety i genotypu gospodarza na różnorodność mikroflory jelit. 3.5. Wybrane funkcje mikroflory jelit. 3.6. Mikroflora jelit człowieka a choroby. 3.6.1. Nowotwory. 3.6.2. Otyłość. 4. Podsumowanie

#### Human Microbiome Project – influence of gut microbiota on human physiology and health

**Abstract:** The HMP (Human Microbiome Project) is one of several international projects which use metagenomic analysis to study human health. The HMP is a logical conceptual and experimental extension of Human Genome Project. The first part of the review presents general characteristic of the project, its goals and implementation phases.

The gastrointestinal tract microbiota is extremely dense and diverse. Microbiota genes encode many biochemical pathways that humans have not evolved. Gut microbiota composition is influenced by human age, diet and genotype and its shifts are associated with many diseases. This review summarizes the latest research concerning the association of gut microbial ecology with the mechanisms by which microbes in the gut may mediate host physiology and metabolism in the context of obesity and cancer.

1. Introduction. 2. HMP – general characteristic. 3. Gut microbiota. 3.1. Microbial diversity of the human gut microbiota. 3.2. Gastrointestinal tract core microbiome. 3.3. Intestinal microbiota composition over human life. 3.4. Influence of diet and human genotype on gut microbiota. 3.5. Selected activities of gut microbiota 3.6. Gut microbiota and diseases. 3.6.1. Cancer. 3.6.2. Obesity. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** HMP (Human Microbiome Project), mikrobiom jelit, nowotwory, otyłość

**Key words:** HMP (Human Microbiome Project), gut microbiota, cancer, obesity

## 1. Wstęp

Przed ukończeniem realizacji projektu HGP (Human Genome Project), niektórzy badacze przewidywali identyfikację około 100 000 genów w genomie człowieka. Zaskoczeniem okazał się fakt, że genom ludzki zawiera tylko ok. 20 000 kodujących białka genów, co nie różni go zbyt od genomu muszki owocowej. Jeżeli jednak rozszerzymy nieco nasze spojrzenie na ludzki organizm, okaże się, że liczba 100 000 genów to o wiele za mało, aby go scharakteryzować [86]. Wynika to z faktu, że ciało dorosłego, zdrowego człowieka jest środowiskiem życia dla co najmniej 10 razy więcej komórek bakterii niż naszych własnych, a większość z nich zasiedla nasz przewód pokarmowy, głównie jelito ( $10^{13}$ – $10^{14}$  komórek bakterii i archeonów) [1, 79], nie wspominając już o związanych z nimi bakteriofagach, których liczbę szacuje się na rząd wielkości wyższą niż liczba bakterii [1].

Jeżeli rozpatrywalibyśmy organizm człowieka jako połączenie komórek ludzkich i mikroorganizmów, genom jako sumę ludzkich genów i genów mikroorganizmów, a wypadkowe właściwości metabolizmu jako mieszanek cech metabolizmu człowieka i mikroorganizmów zasiedlających go, wyłoni się nam obraz

człowieka stanowiącego spójnie funkcjonujący „super-organizm”, gdzie mikroorganizmy nadają mu cechy, których sam nie byłby w stanie rozwinąć [29, 86]. Jeszcze przed zakończeniem realizacji Human Genome Project zdawano sobie sprawę z tego faktu i postulowano, że chociaż zsekwencjonowanie genomu ludzkiego będzie ogromnym osiągnięciem biologii, nie będzie kompletne, dopóki nie zrozumiemy synergistycznych powiązań pomiędzy człowiekiem a mikroorganizmami zasiedlającymi nasz organizm [11]. Wiedząc, jak słabo poznana jest nasza endogenna flora bakteryjna, sugerowano wtedy stworzenie „second human genome project” zakładającego zsekwencjonowanie genomów mikroorganizmów z czterech istotnych miejsc bytowania drobnoustrojów w ciele człowieka: jamy ustnej, jelita, pochwy i skóry. Realizacja takiego projektu miałaby pomóc w wypełnieniu kluczowej luki w zrozumieniu ewolucji, rozwoju, funkcji układu immunologicznego i chorób człowieka [74, 75].

Dzięki staraniom wielu wybitnych naukowców światowej potrzeby wnikliwego zbadania mikroflory człowieka, w 2007 roku został zainicjowany Human Microbiome Project – ogólnosięciowa inicjatywa mająca na celu poznanie genomów mikroorganizmów jako

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: [kjkryn@biol.uw.edu.pl](mailto:kjkryn@biol.uw.edu.pl)

składników genomu człowieka, kształtujących jego metabolizm i ich wpływu na procesy fizjologiczne oraz predyspozycje do zapadalności na różne choroby [86].

Pojęcie mikrobiomu człowieka zostało po raz pierwszy zaproponowane przez J. Lederberga w 2001 roku, dla opisu ekologicznej społeczności komensalnych, symbiotycznych i patogennych mikroorganizmów, które w dosłownym sensie dzielą naszą przestrzeń życiową [52]. Jednak dziś, zgodnie z pierwszym oficjalnie wydanym opisem założeń HMP, termin ten częściej stosuje się w odniesieniu do wszystkich genomów mikroorganizmów żyjących w i na ciele człowieka, samemu zaś zespołowi tych mikrobów nadając pojęcie „mikrobiota” [86, 93]. Co zrozumiałe, na początku większość badań była skoncentrowana na analizie mikroorganizmów chorobotwórczych, mniej z nich dotyczyło korzyści wynikających z obecności niepatogennej mikroflory w ludzkich organizmach [72]. Jednak dość szybko zaczęto uświadamiać sobie, że nie wszystkie oddziaływania pomiędzy mikroorganizmami a człowiekiem doprowadzają do powstawania chorób, że nasze organizmy są zamieszkiwane przez wiele komensalnych mikroorganizmów, które często nie tylko nie wywołują chorób, ale nawet przynoszą nam widoczne korzyści [13]. Przykładem interesującego podejścia z początku XX wieku do mikroflory człowieka może być działalność Arthura I. Kenna, który już w 1909 r., czyli ponad 100 lat temu, w *Journal of Biological Chemistry* opublikował artykuł *Some observations on the study of the intestinal bacteria*, w którym koncentruje się na analizie wpływu diety na naszą mikroflorę i efektach jakie ta mikroflora wywiera na zdrowie człowieka [1]. Również laureat Nagrody Nobla z 1908 roku, Elie Metchnikoff, w artykule *Prolongation of life: optimistic studies* postulował, że pewne bakterie mogą polepszać stan zdrowia gospodarza [9]. Co istotne, prace tak dawne jak m.in. ta autorstwa Kenna zawierały wiele pytań, które dziś nadal są aktualne i próbuje się je wyjaśnić poprzez realizację zadań HMP.

Korzystne zależności oddziaływań pomiędzy mikroorganizmami a gospodarzem były badane przez ponad wiek, ale dopiero odkrycia biologii molekularnej umożliwiły dokładniejsze zrozumienie problemu. Należy pamiętać, że większość naszej dotychczasowej wiedzy opierała się na badaniach mikroorganizmów, które potrafiliśmy hodować. Ocenia się, że nawet 20–80% mikroorganizmów związanych z człowiekiem (w zależności od miejsca bytowania w organizmie człowieka), nie jesteśmy w stanie wyhodować, co prawdopodobnie skutkuje niedocenianiem znaczenia ich różnorodności [18, 72].

Początkowe próby określenia liczby i filogenetycznego pokrewieństwa mikroorganizmów człowieka polegały na analizie stosunkowo dobrze konserwowanej sekwencji nukleotydowej 16S rRNA w preparatach pochodzących z mieszaniny organizmów [72]. Przez długi czas, do peł-

nego scharakteryzowania ich biologicznej i genetycznej natury, były konieczne czyste kultury bakterii, a analizy 16S rRNA pozwalały jedynie na ujawnienie obecności tych niezdolnych do wzrostu *in vitro* mikroorganizmów, nie zapewniając informacji o funkcjonowaniu ich społeczności. Aktualnie poza analizami 16S rRNA bada się złożoność próbek na drodze sekwencjonowania materiału genetycznego uzyskanego bezpośrednio ze środowiska. To podejście jest nazywane „metagenomiką”. Termin metagenomika został zaproponowany przez prof. J. Handelsmana w roku 1998 [31].

Już teraz wiadomo, że ogromną rolę w przyszłych badaniach odegrają, oprócz metagenomiki, również badania mRNA (metatranskryptomika), białek (metaproteomika) i sieci metabolicznych (metainteraktomika), gdyż sama metagenomika nie zapewnia bezpośrednich informacji o tym, które geny są w danych warunkach funkcjonalne [86].

## 2. HMP – ogólna charakterystyka

Wcześniejsze badania analizujące mikroflorę człowieka stały się inspiracją do rozpoczęcia przedsięwzięć realizowanych na dużo większą skalę. W listopadzie 2005 roku w Paryżu odbyło się międzynarodowe spotkanie zorganizowane przez French National Institute for Agricultural Research (INRA), które zaowocowało podjęciem decyzji o utworzeniu Human Intestinal Metagenome Initiative (HIMI), w celu dokładniejszego poznania wpływu mikroflory jelitowej człowieka na nasze zdrowie i choroby, oraz zaleceniem powołania International Human Microbiome Consortium (IHMC), aby gromadzić wyniki badań płynących z laboratoriów całego świata (<http://human-microbiome.org/>). W niedługo potem, miała miejsce dyskusja na temat zalet powstania sponsorowanego przez NIH (The National Institutes of Health, a part of the U.S. Department of Health and Human Services) Human Microbiome Project (HMP), który miałby zająć się tematem mikroflory człowieka nieco szerzej – uwzględniając nie tylko mikroorganizmy kolonizujące jelito, ale też inne nisze ekologiczne, takie jak: jama ustna, układ moczowo-płciowy (śluzówka pochwy), skóra oraz układ oddechowy (śluzówka jamy nosowej).

Zainicjowany w 2007 roku HMP jest 5-letnim projektem, realizowanym z dużym nakładem finansowym, którego głównym celem jest wykonanie charakterystyki mikroflory człowieka w stopniu, który umożliwi badanie jej zmian w odniesieniu do populacji, genotypu, stanu zdrowia, wieku, składników pokarmowych, stosowanych leków i środowiska życia oraz jej wpływu na różne choroby. Uznano, że dzięki wystandaryzowaniu metod i źródeł pobieranych prób i zastosowaniu najnowszych strategii badawczych, będziemy w stanie

poprawiać nasze zdrowie przez monitorowanie i manipulację mikroflorą [72].

HMP jest w sensie logicznym, pojęciowym i eksperymentalnym rozszerzeniem Human Genome Project i stanowi interdyscyplinarne połączenie różnych projektów realizowanych jednocześnie na kilku kontynentach, a jego powstanie było możliwe głównie dzięki zastosowaniu najnowszych metod laboratoryjnych. Opracowanie technik globalnych analiz materiału genetycznego czy białek umożliwiło mikrobiologii wejście w nową erę, rozszerzając obiekt jej badań z właściwości pojedynczo wyizolowanych organizmów do całych społeczności mikroorganizmów [86]. W ramach HMP założono sekwencjonowanie około 1000 referencyjnych genomów mikroorganizmów powszechnie występujących w organizmie człowieka, w tym około 600 bakteryjnych, a następnie prowadzenie analiz metagenomowych, które pozwolą na scharakteryzowanie społeczności bakteryjnych kolonizujących konkretne nisze ekologiczne: drogi oddechowe (nos), skórę, przewód pokarmowy i drogi moczowo-płciowe. W ciągu 5 lat, od 2009 do 2014 roku, przewidywane jest zsekwencjonowanie całych mikrobiomów 250 ochotników [97].

Główne cele HMP są następujące:

- Ustalenie kwestii posiadania przez ludzi wspólnej, „rdzeniowej” („core”) mikroflory,
- Sprawdzenie korelacji zmian ludzkiej mikroflory ze zmianami stanu zdrowotnego człowieka,
- Skonstruowanie nowych i udoskonalanie już obecnych narzędzi technologicznych i bioinformatycznych potrzebnych do zrealizowania celów HMP, aby umożliwić hodowlę większej liczby mikroorganizmów lub opracować inne rozwiązania użyteczne do ich analiz oraz umożliwić uporządkowanie i pracę nad ogromną liczbą danych zbieranych w czasie trwania projektu,
- Rozwiązanie etycznych, prawnych i społecznych problemów związanych z badaniami nad mikroflorą człowieka [97].

HMP zakładał realizację projektu w trzech etapach. Pierwszy etap to pozyskiwanie próbek i ich wstępna analiza. Pierwszym stadium tego etapu jest stworzenie referencyjnych zestawów genomów mikroorganizmów człowieka, które występują w określonych częściach ciała: nosie, jamie ustnej, skórze, przewodzie pokarmowym i drogach moczowo-płciowych, przez wykorzystanie danych eksperymentalnych zsekwencjonowanych wcześniej genomów mikroorganizmów, głównie zdolnych do wzrostu *in vitro*. Bardzo istotne na tym etapie badań jest przeprowadzenie analiz porównawczych wybranych genomów na poziomie 16S rRNA i stworzenie ogólnodostępnych baz danych. Analizom tym towarzyszą poszukiwania nowych metod hodowli mikroorganizmów, które do tej pory uchodziły za niezdolne do wzrostu *in vitro* i ulepszanie metod już sto-

sowanych. Drugie stadium to uzyskiwanie metodami metagenomowymi referencyjnych zestawów ludzkiego mikrobiomu, gdzie uwaga skupia się w dużej mierze na analizach mikroflory organizmów mono- i dzygotycznych bliźniąt oraz ich matek. Trzecie stadium obejmuje uzyskiwanie próbek od ludzi klasyfikowanych na podstawie różnych kryteriów, a badania obejmują nieco dalszych członków rodziny (np. ojców, rodzeństwo) oraz ludzi w różnym wieku, uwzględniając też różnice demograficzne, socjo-ekonomiczne, kulturowe i mieszkańców krajów, gdzie następuje szybki rozwój technologiczny i gwałtowne zmiany trybu życia. Przedsięwzięciom tym nieustannie towarzyszy rozwój narzędzi, w tym bioinformatycznych niezbędnych do analizy transkryptomów, proteomów i metabolomów.

Na drugi etap składają się dokładniejsze badania mikroflory wybranych ludzi spełniających wyznaczone kryteria. Określenie poziomu szczegółowości prowadzenia analiz sekwencyjnej oraz liczby badanych osób jest kluczowe w celu scharakteryzowania „pełnego” ludzkiego mikrobiomu. Na tym etapie poszukuje się też gatunków drobnoustrojów blisko spokrewnionych z tymi związanymi z ludzkim organizmem albo posiadających wspólne z nimi geny, które występują w organizmach innych ssaków oraz swobodnie w środowisku, w celu zsekwencjonowania ich genomów i zdefiniowania nisz ich bytowania.

Celem trzeciego etapu nazywanego „global human microbiome diversity project” jest porównanie dużej liczby prób pobranych od ludzi z rejonów oddalonych od siebie w sensie geograficznym, demograficznym i kulturowym. Niezwykle istotnym elementem tego etapu jest także wybranie osób o zróżnicowanym stanie zdrowotnym, cierpiących na różne choroby i odnalezienie związku tych dolegliwości z mikroflorą zasiedlającą ich organizmy, a także zsekwencjonowanie DNA próbek środowiskowych z miejsc będących rezerwuarami mikroorganizmów i powiązanie uzyskanych informacji z danymi dotyczącymi wymiany genów i całych mikroorganizmów między nimi a organizmem człowieka. Zdobyta wiedza znajdzie potencjalnie zastosowanie w tworzeniu testów diagnostycznych, terapiach, działaniach mających na celu polepszenie światowych sieci żywieniowych, a także edukacji zdrowotnej zarówno pojedynczych jednostek jak i całych społeczności [86].

Jednym z pierwszych istotnych problemów podczas badań prowadzonych w ramach HMP była kwestia, które próbki, od jakich ludzi, można uznać za ‘referencyjne’. Wiadomo było, że niemożliwym będzie uzyskanie tak dużej liczby, tak różnorodnych prób, aby stanowiły całkowicie wiarygodną reprezentację mikroorganizmów całej ludzkiej populacji. Można będzie jedynie dołożyć starań, żeby ta liczba i różnorodność, w sensie rasy, grupy etnicznej i innych demograficznych cech, jak najbardziej odzwierciedlała badane społeczeństwa.

Następnym ważnym krokiem podjętym w celu przyspieszenia, a może nawet umożliwienia prowadzenia analiz, było wprowadzenie terminu „normalny” zamiast „zdrowy” w odniesieniu do wolontariuszy, od których pobierano próbki. Gdyby się tak nie stało, istniałoby zbyt wiele klinicznych kryteriów ograniczających przyjmowanie do projektu nowych chętnych, gdyż brani byłiby pod uwagę tylko ludzie zdrowi w każdym aspekcie, w odniesieniu do każdego miejsca ciała człowieka.

Także ujednoczenie danych napływających z różnych laboratoriów ma znaczący wpływ na wyniki prowadzonych badań. Określono dokładnie metody pobierania prób i sekwencjonowania DNA, a także przeprowadzono eksperymenty, gdzie zrekonstruowano sztuczny zespół mikroorganizmów, żeby sprawdzić wiarygodność i porównywalność dostarczanych danych. Serie następujących kolejno po sobie eksperymentów z wykorzystaniem nowych narzędzi mają na celu wyeliminowanie wszelkich artefaktów [72].

Ważny element HMP stanowią aspekty etyczne, prawne i socjologiczne. Szczególnie istotna jest ochrona prywatności ochotników, od których pobierane są materiały do badań i informowanie ich o korzyściach i zagrożeniach uczestnictwa w projekcie. Dane gromadzone z analiz mikrobiomu stają się powszechnie dostępne, ale już do sekwencji nukleotydowych DNA ludzkiego genomu i informacji medycznych o uczestnikach dostęp mają wyłącznie naukowcy biorący udział w przedsięwzięciu. Jednak coraz częściej zadawane są pytania, czy nawet ten zestaw mikroflory nie jest unikatowy dla każdego człowieka i nie stanowi swoistego „odcisku palca”, co może być wykorzystywane w technikach śledczych. Kolejnymi sprawami są bezpieczeństwo badanych osób w sensie fizycznym, czy też kwestie etyczne – szczególnie dotyczy to prenatalnych i neonatalnych manipulacji ludzką mikroflorą. Potencjalne zastosowania zgromadzonej wiedzy w leczeniu i zapobieganiu chorobom są bardzo rozległe, lecz istnieje też obawa, że powszechnie dostępne wyniki badań mogą stać się groźnym narzędziem o potencjalnym wykorzystaniu w atakach bioterrorystycznych [72, 86, 97].

### 3. Mikroflora jelit

Stosunkowo najwięcej uwagi w badaniach nad mikrobiomem człowieka poświęca się analizie różnorodności mikroorganizmów obecnych w przewodzie pokarmowym (GI – gastrointestinal tract), a w szczególności w jelitach, nazywając często ich genomy trzecim głównym genomem ssaków, zaraz po jądrowym i mitochondrialnym [9]. I jest to w pełni uzasadnione. GI zapewnia doskonałe warunki do życia i wzrostu zarówno bakteriom komensalnym, normalnie tam występującym, ale też dostarczonym wraz z pożywieniem, które mogą

w znaczący sposób wpływać na procesy zachodzące w tej niszy ekologicznej. Istotnie, bogactwo mikroorganizmów w jelicie jest ogromne, stanowi ono najgęstszy naturalny ekosystem bakteryjny z dotychczas poznanych. Jak już zostało wspomniane na początku pracy, szacuje się, że liczba komórek mikroorganizmów w ciele człowieka dziesięciokrotnie przewyższa liczbę naszych własnych somatycznych i płciowych komórek, a największa i najbardziej złożona jest zawartość jelita, gdzie liczbę drobnoustrojów szacuje się nawet na  $10^{14}$  komórek, a 1 g kału człowieka zawiera  $10^{12}$  komórek bakterii [33, 54]. Ogromna przewaga liczebności i różnorodności taksonomicznej bakterii w przewodzie pokarmowym nad innymi niszami w ciele człowieka (skóra, jama ustna, drogi moczowo-płciowe) została potwierdzona w wielu badaniach [13]. Metagenomowe analizy ludzkiego mikrobiomu wykazały, że w jelicie znajduje się 3,3 miliona unikatowych genów, czyli 150 razy więcej niż w naszym własnym genomie, a różnorodność bakterii jelitowych jest szacowana na ponad 1000 gatunków [11, 93].

Mikroflora jelit wpływa na wiele aspektów naszej fizjologii i nadaje nam cechy, których sami nie byłibyśmy w stanie rozwinąć. Zawiera geny, które nie występują w komórkach ssaków, a pomimo to, są niezbędne dla utrzymania optymalnego poziomu zdrowia [9]. Zaburzenia i zmiany składu mikroflory przyczyniają się do powstawania wielu różnorodnych chorób. Część z nich zostanie przedstawiona w dalszej części tej pracy przeglądowej.

#### 3.1. Różnorodność taksonomiczna mikroflory jelit

Bakterie zasiedlają Ziemię od co najmniej 2,5 miliarda lat. Znane jest 55 typów bakterii, jednak w ludzkich jelitach występuje tylko część z nich (m.in. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*), a dwa typy: *Bacteroidetes* i *Firmicutes* są zdecydowanie dominujące [54].

Dane eksperymentalne pierwszej przeprowadzonej na dużą skalę molekularnej analizy różnorodności mikroflory jelit (13 335 sekwencji 16S rRNA ze śluzówki jelit trzech dorosłych osób i po jednej próbce kału od każdej z tych osób) zostały opublikowane w 2005 roku [18]. Rezultatem było powstanie największej bazy danych sekwencji nukleotydowych 16S rRNA z pojedynczego badania nad jakimkolwiek ekosystemem. Zidentyfikowano aż 395 gatunków bakterii i jeden gatunek archeonu, *Methanobrevibacter smithii*. Liczba poszczególnych sekwencji nukleotydowych reprezentujących każdy takson stanowiła miarę obfitości jego występowania w jelicie. Większość ze zidentyfikowanych w tym badaniu organizmów należała do dwóch typów: *Firmicutes* (301 z 395 gatunków) i *Bacteroidetes*

tes (65), co było zgodne z wcześniejszymi analizami sekwencji nukleotydowych 16S rRNA [34, 38, 91]. Najwięcej zaś (95%) sekwencji nukleotydowych w obrębie *Firmicutes* pochodziło z materiału genetycznego bakterii klasy *Clostridium*. W tym samym badaniu autorzy zasygnalizowali również, że około 80% gatunków bakterii zasiedlających ludzkie jelita nie potrafimy hodować, a nowo odkryte gatunki stanowiły w przeprowadzonej analizie aż 60% wszystkich wykrytych gatunków. Jednak już nawet wtedy przewidywano, że mała czułość analiz przeprowadzanych z wykorzystaniem 16S rRNA może zaniżyć różnorodność bakterii we florze jelit, co potwierdziły późniejsze badania nad mikrobiomem jelit opublikowane w 2010 roku, które szacowały to zróżnicowanie na 1000–1150 gatunków w całej puli bakterii uzyskanych od 124 osób [70]. Inna opublikowana w 2007 roku analiza ponad 45 000 bakteryjnych sekwencji nukleotydowych 16S rRNA dostarczyła podobnych danych, jeżeli chodzi o udział klas bakterii w mikroflorze jelit. Ponad 98% wszystkich gatunków należała do jednego z czterech typów: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%), natomiast udział innych grup taksonomicznych był raczej zmienny [23]. Chociaż w różnych badaniach pojawiają się czasem odmiennie proporcje liczebności pomiędzy poszczególnymi grupami taksonomicznymi bakterii, naukowcy są zgodni, co do dominacji w jelicie mikroorganizmów należących do dwóch typów: *Firmicutes* i *Bacteroidetes*.

Oprócz badań skupiających się na składzie mikroflory jelitowej w momencie pobierania próbki, prowadzone były długookresowe analizy trwające od kilku miesięcy do dwóch lat, mające na celu sprawdzenie zmian w składzie gatunkowym bakterii w różnych przedziałach czasu, dotyczące zarówno ogólnej proporcji pomiędzy grupami taksonomicznymi, jak i dokładniejszych analiz liczebności poszczególnych gatunków, których obecność jest obserwowana u większości ludzi (m.in. *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis*). Wykazały one, że skład mikroflory jelitowej dorosłego człowieka nie ulega drastycznym zmianom w czasie i jest dość stabilny [36, 63, 94].

Badania domeny *Archaea* w jelitach dotyczą głównie archeonów metanogennych. Nie występują one jednak w jelitach wszystkich ludzi [22]. Oprócz wspomnianego wcześniej gatunku *Methanobrevibacter smithii*, dość dokładnie udało się opisać i zsekwencjonować genom jeszcze jednego przedstawiciela *Archaea*, mianowicie *Methanospaera stadtmanea* [17, 25]. Gatunek ten ma najbardziej ograniczony metabolizm ze wszystkich metanogennych archeonów [25], co tłumaczy jego rzadsze występowanie niż *M. smithii* [18, 68, 80]. Podczas gdy *M. smithii* wykorzystuje  $H_2$  i  $CO_2$ , *M. stadtmanea* korzysta z metanolu do produkcji metanu i syntezy ATP [25]. Poziom metanolu wzrasta przy degradacji peptyn

przez bakterie beztlenowe np. niektóre gatunki *Bacteroides* [46], co umożliwia *M. stadtmanea* występowanie w środowisku jelit, gdzie znajduje się wiele gatunków bakterii tego rodzaju.

Dzięki zastosowaniu metod niezależnych od otrzymania czystych kultur zidentyfikowano również małą liczbę przedstawicieli rzędu *Methanosarcinales* oraz gatunek *Methanobrevibacter oralis* [80].

Stosunkowo nieduża liczba badań została przeprowadzona w celu zanalizowania różnorodności wirusów w ludzkich jelitach. Wykryto jednak, że w przeciwieństwie do społeczności bakteryjnych, których skład jest dużo bardziej podobny u ludzi spokrewnionych, różnorodność wirusów w jelitach jest unikatowa dla poszczególnych osób i nie zależy od stopnia pokrewieństwa. Jednak, pomimo znacznych interpersonalnych wariacji w zawartości wirusów i ich materiału genetycznego, ich różnorodność wewnątrz jednego organizmu jest bardzo mała, zdominowana przez zaledwie kilka fagów, które wykazują wysoki poziom genetycznej stabilności [76].

### 3.2. „Core microbiome” jelit

W momencie zainicjowania HMP zadawano sobie pytanie o istnienie rdzeniowego mikrobiomu człowieka (core microbiome), czyli zestawu genów, który będzie obecny u wszystkich/większości drobnoustrojów badanych osób. Badania przeprowadzone nad dużą pulą bakteryjnego 16S rRNA (prawie 10 tysięcy nukleotydowych sekwencji 16S rRNA niemal całej długości i 2 miliony fragmentów 16S rRNA) wykazały, że co prawda mikrobiom jest po części wspólny dla członków rodzin, jednak zestaw mikroorganizmów każdej osoby różni się pochodzeniem i składem gatunkowym z porównywalnym poziomem różnorodności pomiędzy dorosłymi monozygotycznymi i dzygotycznymi bliźniakami [88]. Co zaskakujące, nie wykryto jednego gatunku bakterii licznie (z założenia >0,5% zespołu mikroorganizmów) występującego u wszystkich badanych 154 osób. Jednakże analizy pozwoliły zidentyfikować zestaw genów mikroorganizmów obecny w badanych próbach, co mogłoby wskazywać na istnienie wspólnego dla ludzi mikrobiomu na poziomie nie gatunkowym, ale na poziomie materiału genetycznego. Otrzymane dane sugerują, że na poziomie taksonomicznym o wspólnej mikroflorze można mówić tylko w przypadku małej populacji lub biorąc pod uwagę niższą niż 0,5% częstość występowania danego gatunku. Przeprowadzone nieco później metagenomowe badania próbek zawartości jelit 124 Europejczyków wykryły 18 gatunków obecnych u wszystkich badanych osób i 57 gatunków u 90% osób tej samej populacji oraz udokumentowały, że większość zidentyfikowanych genów mikroorganizmów była wspólna dla wszystkich badanych [70]. Jednakże dalsze analizy częstości występowania tych popularnych gatunków

u innych osób wykazały dużą różnorodność pomiędzy mikroflorą poszczególnych osobników. Otrzymane dane pozwalają wnioskować, że „core microbiota” w ludzkich jelitach może istnieć jedynie w dość małej populacji o określonej wielkości, a zwiększając liczbę badanych do nieograniczenia dużych rozmiarów, powoduje się zanik „core microbiota”. Problemy dotyczące badań nad rdzeniowym mikrobiomem omawia praca przeglądowa *Shad e H a n d e l s m a n* [83].

### 3.3. Zmiany mikroflory jelit w zależności od wieku

Skład mikroflory jelit, chociaż nie wykazuje istotnych zmian w czasie życia dorosłego człowieka, ulega znacznym modyfikacjom w ciągu pierwszych miesięcy po urodzeniu, na co duży wpływ mają czynniki środowiska. Po osiągnięciu przez dziecko około roku skład ten chociaż ciągle unikatowy, upodabnia się do charakterystycznego zestawu mikroorganizmów obserwowanego u dorosłych [71]. Podstawowe funkcje wyrażane przez jelitowe mikroorganizmy, takie jak pobieranie składników odżywczych, fermentacja składników pożywienia, stymulacja układu odpornościowego gospodarza, ochrona przed patogenami zaczynają ujawniać się pod koniec drugiego roku życia [61]. Fakt ten potwierdziła opublikowana w 2007 roku praca japońskich naukowców prezentująca wyniki badań metagenomowych próbek kału 13 zdrowych osób, wśród których byli zarówno dorośli (w wieku 24–45 lat) jak i dzieci karmione jeszcze naturalnym pokarmem (3–7 miesięcy) oraz starsze (1,5 i 3 lata) [51]. Wykazano, że, podczas gdy skład mikroflory dzieci karmionych piersią był stosunkowo prosty, z dominacją niewielu gatunków, lecz ujawniał duże różnice zarówno w taksonomii bakterii jak i w zestawie genów pomiędzy osobnikami, to próbki pobrane od starszych dzieci i osób dorosłych były bardziej złożone gatunkowo, ale za to charakteryzowały się znaczną funkcjonalną jednorodnością (podobieństwo sekwencji nukleotydowych), bez względu na wiek czy płeć. W przeprowadzonych badaniach udokumentowano występowanie różnic pomiędzy zestawem genów obecnych w mikrobiomie ludzi dorosłych, w porównaniu do mikrobiomu noworodków, co w dużej mierze związane jest ze spożywanym pokarmem. Istotnym przykładem może być obecność bakterii gatunku *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* w mikrobiomie noworodków. Niedługo po urodzeniu jelita karmionych piersią dzieci są szybko kolonizowane przez konsorcja bakteryjne często zdominowane przez *Bifidobacterium*. Ten gatunek posiada zdolność wykorzystywania zawartych w mleku molekuł o małej wartości odżywczej dla noworodka (HMO – human milk oligosaccharides), które nie mogą być rozłożone przez enzymy trawienne gospodarza. Genom tej bakterii zawiera geny związane z katabolizmem, kodujące zewnątrzkomórkowe białka

wiązące i permeazy aktywowane pod wpływem HMO, co daje mu ogromną przewagę nad innymi, nieposiadającymi takich zdolności grupami bakterii występującymi w przewodzie pokarmowym noworodków [82]. Również inne badania wykazały związek mikroflory jelit z karmieniem piersią, potwierdzając duży udział w procesach katabolicznych bakterii rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [30, 32]. Źródła pochodzenia tych wczesnych kolonizatorów nie są do końca poznane, chociaż wiadomo, że pewne gatunki są przekazywane od matki do dziecka [21, 62, 64]. Pod koniec wieku dojrzewania zostaje osiągnięty pewien górny poziom składu mikroflory, który jest dość stabilny u zdrowych dorosłych ludzi [24], a *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* stanowią tu cztery dominujące grupy [61]. Kolejne zmiany widoczne są u ludzi starszych. Można m.in. zaobserwować wtedy zmniejszenie liczby *Bifidobacterium* i *Bacteroides*, czemu towarzyszy także spadek liczby rodzaju *Lactobacillus* oraz proporcjonalny wzrost liczby fakultatywnych beztlenowców, takich jak *E. coli* [37, 61]. Także stosunek *Firmicutes* do *Bacteroidetes* znacznie zmienia się w ciągu życia, na początku wzrastając wraz z wiekiem, aby potem znów obniżyć się u starszych osób [61]. Warto dodać, że zmiany tej proporcji mogą mieć także związek z otyłością, co wskazuje na inną fizjologię trawienia u starszych ludzi [55]. Jednak uogólniając, zarówno noworodki, ludzie w średnim wieku jak i osoby starsze mają ograniczony do dość małej liczby zestaw typów mikroorganizmów, co wskazuje na kształtowanie się różnorodności mikroflory w jelicie pod silną presją selekcyjną [33].

### 3.4. Wpływ diety i genotypu gospodarza na różnorodność mikroflory jelit

Różne czynniki środowiskowe mają wpływ na mikroflorę jelit. Do najistotniejszych można zaliczyć dietę gospodarza oraz jego status genetyczny. Wykazano na przykład, że próbki jelitowego mikrobiomu pobierane od dorosłych Japończyków i Amerykanów różnią się składem, głównie, jeżeli chodzi o gatunki *Bacteroides* i archeonów. U Amerykanów zawierały one bardzo mało sekwencji nukleotydowych i genów gatunków *Bacteroides* oraz znaczną liczbę genów należących do archeonów, podczas gdy u Japończyków było na odwrót: obserwowano wysoką liczbę sekwencji nukleotydowych i genów *Bacteroides* i prawie całkowity brak genów należących do archeonów [28, 51]. Również inne badanie, ograniczające się do przeprowadzenia analiz mikrobiota ludzi z jednego kontynentu, a nawet jednego kraju (Japonii) wykryło znaczne różnice w różnorodności mikroflory pomiędzy osobami mieszkającymi w mieście i na wsi [8], co mogło być spowodowane odmienną dietą i statusem genetycznym gospodarzy.

Oprócz wspomnianych wcześniej badań dotyczących różnic pomiędzy mikrobiotą karmionych mlekiem matki noworodków a starszych dzieci i dorosłych, przeprowadzono jeszcze wiele innych analiz wpływu pokarmu na mikroflorę. Wykazano na przykład, że popularne diety mające na celu spadek wagi, oparte na spożywaniu przede wszystkim białek i małej ilości węglowodanów, mogą powodować zmianę składu populacji bakterii w jelicie grubym człowieka i ich mikrobiologicznej aktywności, a co za tym idzie, ich wpływu na zdrowie gospodarza. Wprowadzając określone diety i pobierając próbki kału od badanych osób do analizy 16S rRNA przy pomocy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in-situ* (FISH), wykazano, że redukcja ilości węglowodanów w spożywanych posiłkach prowadzi do spadku zawartości w jelicie bakterii produkujących maślan: *Roseburia* spp., *Eubacterium recitale* oraz *Bifidobacterium* spp., ale nie stymuluje zmian liczby *Bacteroides* spp., zaś spożywanie większej ilości węglowodanów skutkuje zwiększeniem ogólnej liczby komórek bakterii [3, 16, 78]. Prowadzone było także wiele innych badań dotyczących wpływu różnych diet, np. niskokalorycznych, czy zawierających dużo oliwy z oliwek z dodatkiem liofilizowanych owoców i ekstraktu z warzyw, które zmieniały kompozycje mikroflory jelit, nie tylko zmniejszając masę ciała i zawartość tłuszczów, ale też redukując rozwój gruczołków w jelicie myszy [58, 59]. Być może, zmiany mikroflory związane ze spożywaniem określonych pokarmów mogą pośrednio przyczynić się do hamowania karcynogenezy w komórkach jelit [59, 66].

Warto wspomnieć, że poziom liczebności niektórych składowych ludzkiej mikroflory jelit może zostać pośrednio zmieniony przez dietę z powodu aktywności innych uczestników tej społeczności, które są już bezpośrednio zależne od spożywanego przez gospodarza pokarmu. W eksperymencie użyto szczepy *Bifidobacterium adolescentis* oraz wykorzystujące mleczan i produkujące maślan szczepy *Eubacterium hallii* i *Anaerostipes caccae*. Udokumentowano, że *E. hallii* i *A. caccae*, wysiane na podłoże ze skrobią, nie były w stanie same utworzyć czystych kultur, natomiast kiedy były hodowane we wspólnych kulturach z *B. adolescentis*, które dostarczały im metabolitów (mleczan, octan), pojawiały się maślan (cross-feeding) [7].

Coraz więcej dowodów wskazuje również na wyraźny wpływ statusu genetycznego gospodarza na kompozycję mikroflory jelit. Porównania sekwencji 16S rRNA bakterii z próbek kału ludzi dorosłych o różnym stopniu pokrewieństwa, pokazały m.in. wyraźnie wyższe podobieństwo mikroflory jelit pomiędzy monozygotycznymi bliźniakami niż przypadku niespokrewnionych osób żyjących w takich samych warunkach środowiskowych np. małżeństw [95]. Porównania zestawów mikrobiota pobranych od mono- i dizygotycznych bliźniąt jeszcze wyraźniej wskazały na duże znaczenie genotypu

gospodarza [85, 90]. Również badania dotyczące osób cierpiących na chorobę zwaną rodzinną gorączką śródziemnomorską (FMF – Familial Mediterranean Fever), warunkowaną występowaniem mutacji w genie MEFV (Mediterranean Fever), wskazały na znaczne zmiany kompozycji bakterii u osób chorych, objawiające się spadkiem ogólnej liczby bakterii, mniejszą różnorodnością i poważnymi zmianami w populacjach bakterii typów *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. FMF jest chorobą zapalną dziedziczącą się autosomalnie recesywnie, która charakteryzuje się krótkimi, samoustępującymi nawrotami gorączki i zapaleniem błon surowiczych. Najczęściej dotyka populacje pochodzące z okolic basenu Morza Śródziemnego i Bliskiego Wschodu, w tym Żydów sefardyjskich, Ormian, Arabów i Turków. Gen MEFV koduje białko odpowiadające za hamowanie procesu zapalnego. W okresie remisji, kiedy nie obserwowano objawów chorobowych, różnorodność bakterii była bardziej zbliżona do występującej u osób zdrowych, jednak wciąż znacznie odbiegała od normy, co wskazuje na zależność składu mikroflory jelit od odpowiednich alleli w genotypie gospodarza [48].

### 3.5. Wybrane funkcje mikroflory jelit

Rozszyfrowanie biologicznych funkcji tak różnorodnego taksonomicznie i dynamicznego kompleksu, jakim jest ludzka mikroflora jelit oraz interakcji pomiędzy nią a gospodarzem nadal stanowi duże wyzwanie. Powszechnie stosuje się w tych badaniach uproszczone modele ekosystemów, takie jak zwierzęta gnotobiotyczne, zwierzęta ze zdefiniowanym zestawem drobnoustrojów normalnie występujących w ich organizmach, lub z przeszczepionymi mikroorganizmami charakterystycznymi dla innych organizmów. Jako modele zwierzęce stosowane są do tego celu głównie myszy, świnię, kurczaki oraz ryby z rodziny karpowatych – *Danio rerio*.

Mikroorganizmy wpływają w znaczący sposób na równowagę energetyczną [5] i wspomagają biotransformacje licznych związków chemicznych, do których przeprowadzenia sam organizm człowieka nie jest przystosowany [51, 69]. Dzięki tym ogromnym metabolicznym zdolnościom umożliwiają nam przekształcanie złożonych składników pokarmowych, takich jak błonnik (składniki ścian komórek roślinnych: celuloza, pektyny, hemicelulozy, lignina) czy jelitowa mucyna w proste cukry, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SFCA, short chain fatty acid.), głównie octan, propionian, maślan i inne łatwo przyswajalne substancje [12, 28, 96]. Węglowodany zawarte w pożywieniu są trawione przez mikrobiota w jelicie grubym. Ocenia się, że ta mikrobiologiczna fermentacja może dostarczać nawet 10% energii uzyskiwanej z pożywienia, głównie w postaci SFCA, która jest wykorzystywana przez komórki gospodarza [67]. W genomie *B. thetaiotaomicron* odnaleziono

cztery razy więcej genów, których produkty uwikłane są w pozyskiwanie i metabolizm węglowodanów, w porównaniu do liczby podobnych genów obecnych w genomie człowieka [77]. Maślan jest preferowanym źródłem energii dla komórek nabłonkowych jelita grubego, a jego obecność ma związek z rozrostem śluzówki jelit i proliferacją komórek nabłonka. Może on także stanowić ochronę przed chorobami, takimi jak stany zapalne czy nowotwory jelit [14, 45, 92]. W 2006 roku została przeprowadzona analiza sekwencyjna typu „shoutgan” DNA uzyskanego z próbek kału pochodzących od dwóch dorosłych osób odmiennej płci, w której, aby szczegółowo zbadać metaboliczny potencjał mikroflory, użyto dwóch strategii – KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) oraz COGs (Clusters of Orthologous Groups) [28]. Oba systemy adnotacji zawierają kategorie funkcji metabolicznych zorganizowane w wiele poziomów hierarchii; analizy KEGG to mapowanie enzymów w znane ścieżki metaboliczne, a analizy COG wykorzystują pochodzenie ewolucyjne do grupowania funkcjonalnie spokrewnionych genów. Tak jak się spodziewano, wśród 11 zrekonstruowanych KEGG ścieżek metabolicznych dla mikrobiomu dystalnej części jelita, geny metabolizmu polisacharydów były szeroko rozpowszechnione. Potwierdziły to również analizy COG wskazujące na udział mikroorganizmów w trawieniu węglowodanów. Istotną rolę odgrywają w tym procesie mezofilne metanogenne archeony, albowiem akumulacja  $H_2$ , stanowiącego końcowy produkt bakteryjnej fermentacji, zmniejsza wydajność przetwarzania spożywanych polisacharydów, a wytwarzanie metanu przez te archeony jest główną drogą usuwania  $H_2$  z ludzkich jelit [84].

Mikroflora jelit pełni również istotną rolę w modulowaniu homeostazy śluzówkowych subpopulacji komórek układu immunologicznego. Przede wszystkim odpowiedzialna jest za zjawisko immunologicznej ignorancji, zapobiega bezpośredniemu kontaktowi bakterii z komórkami układu immunologicznego. Sygnały bakterii komensalnych wzmacniają integralność nabłonka jelit oraz chronią komórki przed uszkodzeniami kontrolując także tempo ich proliferacji. Dodatkowo drobnoustroje komensale indukują wytwarzanie i wydzielanie przez komórki nabłonkowe przeciwciał sekretoryjnych (sIgA) i kationowych peptydów o aktywności antibakteryjnej (CAMPs, cationic antimicrobial peptides). Stymulują także wytwarzanie mucyny. Wszystkie te mechanizmy utrudniają kontakt pomiędzy komórkami układu immunologicznego a mikroorganizmami i ułatwiają utrzymanie immunologicznej ignorancji [44].

Wiele badań udokumentowało, że skład mikrobiota wpływa na zjawiska immunologicznej homeostazy, regulując liczebność różnych subpopulacji limfocytów np. poziom limfocytów Th17, Treg czy ogólny stosunek limfocytów Th1 do Th2. Rolę w tych procesach poznano

jak dotychczas, dla nielicznych gatunków mikrobiota. Udokumentowano, że podczas kolonizacji zwierząt przez powszechnie występujący w środowisku jelit gatunek *Bacteroides fragilis*, unikatowe dla tego gatunku polisacharydy bakteryjne (PSA) kierują dojrzewaniem rozwijającego się układu immunologicznego. Analizy porównawcze ze zwierzętami GF wykazały, że PSA modelują procesy immunologiczne organizmu gospodarza, a mianowicie korygują równowagę pomiędzy limfocytami Th1 oraz Th2. Mutanty w genach biorących udział w syntezie PSA *B. fragilis* nie wykazywały tych właściwości [65].

Opisano również znaczącą rolę, jaką pełnią w oddziaływaniach z gospodarzem SFB (segmented filamentous bacteria), niezdolne do wzrostu *in vitro*, klasyfikowane jako *Candidatus arthromitis*, tworzące spory, przedstawiciele typu *Firmicutes*. Zidentyfikowano je w przewodach pokarmowych wielu zwierząt np. ptaków, myszy, królików. Rzadko kolonizują one GI ludzi. Jako nieliczne z mikrobiota GI wchodzi w bezpośredni kontakt z komórkami nabłonka jelit i wysyłając odpowiednie sygnały decydują o poziomie limfocytów Th17, regulując liczbę Th17 w stosunku do limfocytów Treg [26, 44]. Myszy pozbawione tych mikroorganizmów charakteryzowały się znacznie niższym poziomem limfocytów Th17, a przeszczepienie bakteryjnej zawartości jelit od myszy posiadających znaczną liczbę Th17, przywracało powstawanie tych komórek [42]. Co ciekawe, różnicowanie naiwnych limfocytów Th w Th17 zależne od SFB wydaje się być niezwiązane się z funkcją receptorów TLR/NOD. Kolonizacja jelit przez SFB ma również wpływ na wytwarzanie peptydów przeciwbakteryjnych i skutkuje zwiększoną odpornością np. na infekcje jelitowym patogenem *Citrobacter rodentium*, bakteriami rodzaju *Salmonella* oraz enterokokami opornymi na wankomycynę (VRE, vancomycin-resistant *Enterococcus*) [43].

Jak wiadomo, receptory TLR (Toll-like receptors) są sensorami infekcji drobnoustrojami i pełnią istotną rolę w inicjacji stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej. Bakteryjne ligandy, cząsteczki PAMP, rozpoznawalne przez te receptory nie są unikalne dla patogenów i występują też u komensalnych mikroorganizmów. Jednak komensale mikroorganizmy zatrzymywane na powierzchni nabłonka, często nie stymulują odpowiedzi immunologicznej. Natomiast bakterie patogene, wyposażone w różnorodne czynniki wirulencji, są w stanie ominąć barierę nabłonka i po przeniknięciu do warstwy podśluzówkowej zostają rozpoznane przez receptory TLR makrofagów i komórek dendrytycznych. Wykazano jednak, że niektóre produkty komensalnych bakterii także stymulują receptory TLR w normalnych warunkach, gdy nabłonek jelit jest nienaruszony. W przeprowadzonym eksperymencie, usunięcie komensalnej mikroflory w wyniku zastosowania antybiotyków



doprowadziło do całkowitego zatrzymania w jelicie syntezy cytokin zależnej od MyD88 (ang. myeloid-differentiation marker, białko adaptorowe, niezbędne do zaistnienia reakcji zapalnej powstałej w wyniku aktywacji receptorów Toll-like) [73].

Równie ciekawa u mikrobiota jelit jest kwestia redukcji genów odpowiedzialnych za syntezę silnie immunogennej flageliny rozpoznawanej przez receptory TLR5, co skutkuje obniżeniem poziomu odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Zaobserwowano także brak genów odpowiedzialnych za procesy chemotaksji. Stanowi to kolejne przystosowanie mikrobioty jelit do niszy, którą zajmuje, gdyż zdolność do ruchu i chemotaksja nie są bezwzględnie wymagane w środowisku jelit ze względu na perystaltykę jelit [51].

Zespół mikroorganizmów komensalnych jelit bezwzględnie stanowi barierę chroniącą nas przed patogenami. Poza blokowaniem dostępu patogenów do komórek nabłonka, mikrobiota chroni nas przed infekcjami, modulując skład dostępnych w jelitach składników odżywczych. Zawartość i jakość węglowodanów, podstawowych źródeł energii, zależna jest od kompozycji naszej mikrobioty. Zmiana składu mikrobioty; stosunku liczby *Firmicutes* do *Bacteroides*, skutkuje zwiększeniem podatności myszy na infekcję [81]. Z drugiej strony, bakterie patogenne w drodze adaptacji do konkretnej niszy ekologicznej zyskały zdolność wykorzystywania licznych źródeł węgla, co pozwala im na współzawodniczenie z komensalami. Tropizm enteropatogenów w odniesieniu do kolonizowanych fragmentów przewodu pokarmowego jest uzależniony od rezydujących tam komensali. Skład SCFA modulowany przez mikroflorę stanowi sygnał odbierany przez patogeny. Maślan obecny głównie w końcowym odcinku jelit sprzyja adhezji enterohemokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC) do kolonocytów (badania z wykorzystaniem linii komórkowej CaCo2) poprzez stymulację ekspresji genów wyspy patogenności odgrywających rolę w procesach adhezji. Dodatkowo w jelitach bydła, gdzie ta bakteria jest komensalem, wytwarzana przez niektóre szczepy typu *Bacteroides* cząsteczka sygnalizacyjna AHL (acyl homoserine lacton) tworząc kompleks z czynnikiem regulatorowym SdiA, hamuje ekspresję genów wyspy patogenności [40]. Odwrotnie, maślan blokuje ekspresję genów inwazyjności *S. Typhimurium*, a mrówczan obecny głównie w jelicie cienkim podnosi poziom ekspresji genów warunkujących wirulencję *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* [27, 39].

Co więcej, mikroflora jelit związana jest z produkcją niektórych niezbędnych dla człowieka witamin: K, B12, kwasu foliowego, B1, B6 oraz ma wpływ na recykulację kwasów żółciowych (poprzez wytwarzanie hydrolaz kwasów żółciowych). Rola kwasów żółciowych jako cząsteczek sygnalizacyjnych jest bardzo istotna w wielu procesach fizjologicznych – między innymi regulują one

własną biosyntezę, adsorpcję lipidów czy homeostazę cholesterolu. Mikroflora jelit bierze także udział w przekształcaniu potencjalnych mutagenów i karcynogenów takich jak heterocykliczne aminy i N-nitroso związki, których endogenna produkcja w jelitach wzrasta przy spożywaniu czerwonego mięsa. Bierze też udział w aktywacji bioaktywnych związków np. fitoestrogenów, które wykazują zdolność interakcji z układem hormonalnym i modulowania jego czynności w sposób charakterystyczny dla żeńskich hormonów płciowych. Nie są one wytwarzane przez system endokryny, a trafiają do naszego organizmu przez konsumpcję zawierających je roślin [47, 56, 60].

Co istotne, badania wykazały znaczący udział w genomach mikrobioty jelit ruchomych elementów genetycznych, prawdopodobnie z powodu dużej gęstości komórek tam obecnych. Szczególnie szeroko rozpowszechnione były transpozony zawierające geny homologiczne z genami niesionymi przez koniugacyjny transpozon Tn1549, kodujący systemy transportu ABC i intergazy/miejscowo specyficzną rekombinazę, a więc geny wpływające na horyzontalny transfer genów i mogące nadawać bakteriom nowe cechy przystosowawcze [51]. O wysokiej częstości przekazywania ruchomych elementów genetycznych pomiędzy mikroorganizmami tej niszy ekologicznej świadczą mogą badania, w których odkryto obecność w genomach jelitowej mikrobioty, wyłącznie Japończyków, porphyranaz, specyficznej grupy enzymów związanych z metabolizmem węglowodanów, które przekształcają porphyran zawarty w czerwonych glonach – powszechnie spożywanych właśnie w Japonii. Te CAZymy (carbohydrate-active enzymes) nie występują w żadnym z poznanych genomów mikroorganizmów środowiska lądowego, lecz obecne są w genomach kilku morskich bakterii i zostały także zidentyfikowane w genomie jelitowej bakterii *Bacteroides plebeius* wyizolowanej od Japończyków [35, 49].

### 3.6. Mikroflora jelit człowieka a choroby

Mikrobiota jelit jest prawdopodobnie niezbędną częścią składową ludzkiego organizmu, konieczną do utrzymania prawidłowego stanu zdrowia, a jej zmiany są związane z indukcją niektórych chorób jelitowych i podwyższeniem ryzyka wystąpienia schorzeń ogólnoustrojowych. Mutualistyczne zależności ssaków z ich jelitową mikroflorą są oparte na tolerancji. Zmniejszenie lub zmiana tolerancji gospodarza może prowadzić do przewlekłych stanów zapalnych, takich jak nieswoiste zapalenia jelit (IBD, inflammatory bowel diseases) czy zespół jelita drażliwego (IBS, irritable bowel syndrome). Co więcej, badania sugerują związek składu mikrobioty z chorobami ogólnoustrojowymi, np. nowotworami, cukrzycą i otyłością. Niżej podano kilka danych eksperymentalnych wskazujących na wpływ mikrobiomu

na rozwój chorób nowotworowych oraz związek pomiędzy mikrobiomem i otyłością. Zagadnienia dotyczące powiązań pomiędzy mikroflorą jelit a IBD omówione zostaną w odrębnej pracy przeglądowej.

### 3.6.1. Nowotwory

Szacuje się, że około 15% chorób nowotworowych stymulowanych jest przez infekcje bakteryjne. Ryzyko zachorowania na nowotwór jelita grubego i odbytu (CRC, colorectal cancer) również związane jest z mikroflorą jelit. Opisano wiele mechanizmów, dzięki którym komensalne bakterie mogą przekształcić prokarcynogeny znajdujące się w pożywieniu w związki uszkadzające DNA (np. etanol i heterocykliczne aminy) lub bezpośrednio wytwarzać karcynogeny (np. fecapentanes), czy też doprowadzić do rozwoju CRC poprzez silną zmianę potencjału redoks środowiska w sąsiedztwie komórek nabłonkowych jelita przez np. produkcję wolnych rodników tlenowych przez *Enterococcus faecalis* albo siarkowodoru przez bakterie redukujące siarczany [41]. Przeprowadzono wiele badań mających na celu przetestowanie roli pre- i probiotyków w zapobieganiu karcynogenezie i wiele z nich, chociaż nie wszystkie, wykazały ich skuteczność. Myszy nieprodukujące IL-10, pozbawione mikroorganizmów są mniej podatne na IBD, a co za tym idzie, późniejsze zachorowanie na CRC, a kolonizowane przez normalną mikroflorę jelit, są bardziej narażone na rozwój nowotworu [89]. Podobnie jest w przypadku myszy pozbawionych transformującego czynnika wzrostu beta1 (TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor beta 1) [19]. Podatność myszy z zaburzoną ścieżką sygnalizacyjną TGF- $\beta$ 1, np. pozbawionych genów: *smad3* (mothers against decapentaplegic homolog 3), *rag2* (recombinase-activating gene 2), czy *tgfb1* (transforming growth factor beta 1), na nowotwory jelit po zainfekowaniu mikroorganizmami wywołującymi zapalenie w jelicie znacznie wzrastała [20, 57].

Z drugiej strony, badania z wykorzystaniem myszy *Apc*<sup>Min</sup> (u których rozwija się dużo nowotworów jelit ze względu na mutacje w genie *apc* powodujących zespół rodzinnej polipowatości gruczolakowej) hodowanych w warunkach GF, wykazały brak silnego związku pomiędzy statusem mikrobiologicznym gospodarza a redukcją liczby jelitowych polipów, co wskazuje na to, że microbiota może mieć różny wpływ na nowotwory jelit o molekularnie odmiennych przyczynach [15]. W dodatku, flora bakteryjna może produkować maślan, silny inhibitor deacetylazy histonów, który może zmienić epigenetyczne programowanie kolonocytów i brać udział w ochronie przed nowotworami jelit [2].

Mając na uwadze fakt, że wystąpienie stanu zapalnego jest czynnikiem ryzyka nowotworu jelita grubego oraz powiązanie infekcji *Helicobacter pylori* z nowotworami żołądka, poszukiwano metodami metagenomicznymi ewentualnego mikroorganizmu odpowiedzialnego

za wzrost ryzyka rozwoju nowotworu jelita grubego. Analizując tkanki pobrane od chorych i zdrowych pacjentów, wykazano znaczącą nadreprezentację w tych pierwszych nukleotydowych sekwencji *Fusobacterium nucleatum*. Analizy potwierdzono, badając poziom nukleotydowych sekwencji 16S rDNA. Obecność *Fusobacterium* w tkankach nowotworowych wykazano także metodą FISH. Bakteria ta rzadko kolonizuje ludzki GI, a uprzednio kolonizacja *F. nucleatum* wykazywała powiązanie z paradontozą oraz zapaleniem woreczka żółciowego [10, 50].

### 3.6.2. Otyłość

Tradycyjne spojrzenie na problem otyłości koncentruje się na aspekcie odżywiania i genetycznych predyspozycjach gospodarza. Jednak wiele badań, stosując mysie modele otyłości, wykazało związek mikroflory jelit z otyłością. Według tych analiz, związane z dietą modyfikacje w mikroflorze jelit, jeżeli porównywać myszy normalne (*ob*/+, +/+) i cierpiące na otyłość (*ob*/*ob*), spowodowały znaczną różnicę stosunku dwóch głównych typów bakterii w tym środowisku: *Bacteroides* i *Firmicutes*. U myszy otyłych stwierdzono 50% spadek liczebności *Bacteroides* i proporcjonalny wzrost *Firmicutes*. Dodatkowo analizy sekwencyjne wykazały znaczący wzrost liczby genów związanych z wykorzystaniem energii z pożywienia w jelitowym mikrobiomie myszy otyłych [53]. Udokumentowano też, że u osób będących na niskokalorycznej diecie, wraz z utratą wagi, wzrasta liczba bakterii z typu *Bacteroidetes* [55]. Obserwacje te nie wykazały jednoznacznie, czy zmiana w zawartości *Bacteroidetes* jest przyczyną tycia, czy też był to efekt spożywania określonych składników pokarmowych, które selektywnie wspomagały wzrost jednych grup bakterii, nie wpływając lub hamując wzrost innych.

W innym eksperymencie wykazano, że w przeciwieństwie do myszy posiadających mikroflorę jelit, zwierzęta GF nie mają tendencji do tycia, pomimo spożywanej wysokotłuszczowej i wysokocukrowej diety [6, 87]. Ciekawe rezultaty przyniosło badanie, w którym przeszczepiono mikroflorę od myszy otyłych (z DIO, diet-induced obesity) myszom GF, u których, po tym zabiegu, zaobserwowano tendencję do szybszego odkładania się tłuszczu, niż w przypadku przeszczepu mikroflory od chudych myszy [87]. Jak wspomniano wcześniej, mikroflora jelit jest niezbędna do przetwarzania niektórych polisacharydów obecnych w pożywieniu. Ustalono, że przeszczepienie microbiota z jelit myszy dzikich, konwencjonalnie hodowanych myszom GF, może spowodować nawet 60% wzrost zawartości tłuszczu w ciele i oporność na działanie insuliny już w ciągu 14 dni, pomimo ograniczonego spożycia pokarmów. Mikroflora sprzyja wchłanianiu cukrów prostych ze światła jelita, co powoduje indukcję procesu lipogenezy w wątrobie. Powoduje też supresję ekspresji czynnika

adipocytów (fasting-induced adipose factor), należącego do grupy angiopoetyno-podobnych białek, który jest inhibitorem lipazy lipoproteinowej. Skutkuje to odkładaniem się triglicerydów w adipocytach. Myszy GF pozbawione czynnika adipocytów tracą „oporność” na otyłość wywołaną kaloryczną dietą [5, 6]. Potwierdza to hipotezę, że bakteryjna mikroflora nie tylko umożliwia wydajniejsze wykorzystywanie węglowodanów zawartych w pożywieniu, ale też ma zdolność do modulowania przetwarzania pokarmu i magazynowania tłuszczu przez gospodarza.

## 5. Podsumowanie

The Human Microbiome Project został stworzony, aby przez udoskonalanie i wprowadzanie do badań nowych narzędzi oraz generowanie rzetelnych baz danych rozszerzyć granice naszej wiedzy o mikroorganizmach kolonizujących różne nisze ekologiczne organizmu człowieka. Dostarczając wielu użytecznych informacji na temat roli, jaką pełnią mikroorganizmy w ludzkim ciele i wpływu zmian w ich składzie na nasze zdrowie, mikrobiologia stwarza nowe możliwości, które w przyszłości pozwolą medycynie na pełniejsze zrozumienie podstaw niektórych chorób człowieka, monitorowanie stanu zdrowia, prawidłowe diagnozowanie i skuteczniejsze, kompleksowe leczenie. Zastosowanie pre- i probiotyków w profilaktyce i terapii może okazać się w wielu przypadkach mniej inwazyjną alternatywą w stosunku do obecnie prowadzonych praktyk leczniczych.

Projekt HMP jest również jednym z elementów podejmowanych na całym świecie prób udokumentowania, zrozumienia i reagowania na skutki działalności człowieka – nie tylko odnoszące się do ludzkiego zdrowia, lecz także do ogólnej równowagi w biosferze. Istnieje założenie, że podobnie jak w przypadku mikrobiologicznego monitorowania zmian w lądowych i wodnych ekosystemach, tak i w przypadku organizmu człowieka będą prowadzone szczegółowe badania pozwalające na obserwacje różnic i zmian w ekologii mikroorganizmów ludzi z różnych obszarów geograficznych. Między innymi dzięki HMP nadszedł czas, aby wreszcie zniszczyć sztuczną barierę pomiędzy mikrobiologią medyczną a środowiskową i odnieść ogólne zasady z trudem gromadzone przez lata badań nad makro-światem do świata w skali mikro rezydującym w człowieku.

W badaniach HMP nieocenionym źródłem informacji jest przede wszystkim mikroflora jelit, która stanowi najgęstszy ekosystem na Ziemi i zdaje się mieć największy wpływ na różne aspekty fizjologii człowieka oraz tendencję do zapadalności na wiele chorób, nie tylko jelitowych, ale również ogólnoustrojowych, których związek z mikroflorą przez długi czas pozostawał nie-

poznany. Jelita stanowią więc, jeśli chodzi o badania nad „mikroewolucją” człowieka, swego rodzaju naturalne laboratorium.

Na zakończenie warto nadmienić, że HMP został zainicjowany w okresie olbrzymiego technologicznego postępu, gdy koszty sekwencjonowania DNA zaczęły gwałtownie spadać, a znacznie wzrastała przepustowość badań, co umożliwiła dziś prowadzenie kompleksowych analiz na ogromną skalę. Przyczynił się także do powszechnego, ogólnościatowego wkroczenia mikrobiologii w nową „erę” – erę metagenomiki, która stwarza nieskończone wręcz możliwości dla przyszłych badań nad mikro-światem.

## Piśmiennictwo

1. Aziz R.K.: A hundred-year-old insight into the gut microbiome. *Gut. Pathog.* **1**, 21 (2009)
2. Balamurugan R., Rajendiran E., George S., Samuel G.V., Ramakrishna B.S.: Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1298–1303 (2008)
3. Barcenilla A., Pryde S.E., Martin J.C., Duncan S.H., Stewart C.S., Henderson C., Flint H.J.: Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1654–1661 (2000)
4. Bauer E., Williams B.A., Smidt H., Verstegen M.W., Mosenthin R.: Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **7**, 35–51 (2006)
5. Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15718–15723 (2004)
6. Bäckhed 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*, **104**, 979–984 (2007)
7. Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G., Holtrop G., Louis P., Lobley G.E., Flint H.J.: Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3593–3599 (2006)
8. Benno Y., Endo K., Mizutani T., Namba Y., Komori T., Mitsuoka T.: Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1100–1105 (1989)
9. Carroll I.M., Threadgill D.W., Threadgill D.S.: The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome*, **20**, 395–403 (2009)
10. Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., Holt R.A.: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.126516.111 (2011)
11. Davies J.: In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, **291**, 2316 (2001)
12. Dethlefsen L., Eckburg P.B., Bik E.M., Relman D.A.: Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends. Ecol. Evol.* **21**, 517–523 (2006)

13. Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A.: An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, **449**, 811–818 (2007)
14. Di Sabatino A., Morera R., Ciccocioppo R., Cazzola P., Gotti S., Tinozzi F.P., Tinozzi S., Corazza G.R.: Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* **22**, 789–94 (2005)
15. Dove W.F., Clipson L., Gould K.A., Luongo C., Marshall D.J., Moser A.R., Newton M.A., Jacoby R.F.: Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res.* **57**, 812–814 (1977)
16. Duncan S.H., Belenguer A., Holtrop G., Johnstone A.M., Flint H.J., Lobley G.E.: Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1073–1078 (2007)
17. Duncan S.H., Louis P., Flint H.J.: Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 343–350 (2007)
18. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638 (2005)
19. Engle S.J., Ormsby I., Pawlowski S., Boivin G.P., Croft J., Balish E., Doetschman T.: Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice. *Cancer Res.* **62**, 6362–6366 (2002)
20. Erdman S.E., Fox J.G. i wsp.: Nitric oxide and TNF-alpha trigger colonic inflammation and carcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected, Rag2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1027–1032 (2009)
21. Favier C.F., de Vos W.M., Akkermans A.D.: Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*, **9**(5), 219–229 (2003)
22. Florin T.H., Zhu G., Kirk K.M., Martin N.G.: Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *Am. J. Gastroenterol.* **95**(10), 2872–2879 (2000)
23. Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–13785 (2007)
24. Franks A.H., Harmsen H.J., Raangs G.C., Jansen G.J., Schut F., Welling G.W.: Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3336–3345 (1998)
25. Fricke W.F., Seedorf H., Henne A., Krüer M., Liesegang H., Hedderich R., Gottschalk G., Thauer R.K.: The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis. *J. Bacteriol.* **188**, 642–658 (2006)
26. Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N. i wsp.: The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, **31**, 677–689 (2009)
27. Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Van Immerseel F.: Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 946–949 (2006)
28. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E.: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359 (2006)
29. Goodacre R.: Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* **137**, 259–266 (2007)
30. Haarman M., Knol J.: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2359–2365 (2006)
31. Handelsman J.: Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004)
32. Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G., Welling G.W.: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, 61–67 (2006)
33. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res.* **16**, 1–12 (2009)
34. Hayashi H., Sakamoto M., Benno Y.: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol.* **46**, 535–548 (2002)
35. Hehemann J.H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czjzek M., Michel G.: Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, **464**, 908–912 (2010)
36. Heilig H.G., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D., de Vos W.M.: Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 114–123 (2002)
37. Hébuterne X.: Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**, 49–54 (2003)
38. Hold G.L., Pryde S.E., Russell V.J., Furrie E., Flint H.J.: Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**, 33–9 (2002)
39. Huang Y., Suyemoto M., Garner C.D., Cicconi K.M., Altier C., Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. *J. Bacteriol.* **190**, 4233–4241 (2008)
40. Hughes D.T., Terekhova D.A., Liou L., Hovde C.J., Sahl J.W., Patankar A.V., Gonzalez J.E., Edrington T.S., Rasko D.A., Sperandio V.: Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9831–9836 (2010)
41. Huycke M.M., Gaskins H.R.: Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **229**, 586–597 (2004)
42. Ivanov I.I., Frutos Rde L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B., Finlay B.B., Littman D.R.: Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell. Host. Microbe*, **4**, 337–349 (2008)
43. Ivanov I.I., Littman D.R. i wsp.: Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, **139**, 485–98 (2009)
44. Ivanov I.I., Littman D.R.: Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **14**, 106–14 (2011)
45. Jacobasch G., Schmiedl D., Kruschewski M., Schmehl K.: Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int. J. Colorectal. Dis.* **14**, 201–11 (1999)
46. Jensen N.S., Canale-Parola E.: *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* **52**, 880–887 (1986)
47. Jones B.V., Begley M., Hill C., Gahan C.G., Marchesi J.R.: Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13580–13585 (2008)

48. Khachatryan Z.A., Ktsoyan Z.A., Manukyan G.P., Kelly D., Ghazaryan K.A., Aminov R.I.: Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One*, **3**, e3064 (2008)
49. Kitahara M., Sakamoto M., Ike M., Sakata S., Benno Y.: *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2143–2147 (2005)
50. Kostic A.D., Meyerson M. i wsp.: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.*, doi:10.1101/gr.126573.111 (2011)
51. Kurokawa K., Hattori M. i wsp.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* **14**, 169–81 (2007)
52. Lederberg J., McCray A.T.: 'Ome Sweet' Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*, **15**, 8 (2001)
53. Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11070–5 (2005)
54. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I.: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837–848 (2006)
55. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
56. Lunn J.C., Kuhnle G., Mai V., Frankenfeld C., Shuker D.E., Glen R.C., Goodman J.M., Pollock J.R., Bingham S.A.: The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, **28**, 685–690 (2007)
57. Maggio-Price L., Treuting P., Zeng W., Tsang M., Bielefeldt-Ohmann H., Iritani B.M.: *Helicobacter* infection is required for inflammation and colon cancer in SMAD3-deficient mice. *Cancer Res.* **66**, 828–38 (2006)
58. Mai V., Colbert L.H., Berrigan D., Perkins S.N., Pfeiffer R., Lavigne J.A., Lanza E., Haines D.C., Schatzkin A., Hursting S.D., Calorie restriction and diet composition modulate spontaneous intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mice through different mechanisms. *Cancer Res.* **63**, 1752–1755 (2003)
59. Mai V., Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr. Rev.* **62**, 235–42 (2004)
60. Mai V., Draganov P.V.: Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J. Gastroenterol.* **15**, 81–85 (2009)
61. Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.P.: The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.*, **9**, 123 (2009)
62. Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* **143**, 754–758 (2003)
63. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R.: Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7220–7228 (2004)
64. Matsumiya Y., Kato N., Watanabe K., Kato H.: Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* **8**, 43–49 (2002)
65. Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L.: An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, **122**, 107–118 (2005)
66. McGarr S.E., Ridlon J.M., Hylemon P.B.: Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, 98–109 (2005)
67. McNeil N.I.: The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 338–342 (1984)
68. Mihajlovski A., Alric M., Brugère J.F.: A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* **159**, 516–521 (2008)
69. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D.: Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 431–438 (2005)
70. Qin J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
71. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O., Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**, 177 (2007)
72. Peterson J., Guyer M. i wsp.: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
73. Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R.: Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, **118**, 229–241 (2004)
74. Relman D.A., Falkow S.: The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends. Microbiol.* **9**, 206–208 (2001)
75. Relman D.A.: New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J. Infect. Dis.* **186**, S254–258 (2002)
76. Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I.: Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, **466**, 334–338 (2010)
77. Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S., Matteuzzi D.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6150–6158 (2005)
78. Salyers A.A., West S.E., Vercellotti J.R., Wilkins T.D.: Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 529–533 (1977)
79. Savage D.C.: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133 (1977)
80. Scanlan P.D., Shanahan F., Marchesi J.R.: Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol.* **8**, 79 (2008)
81. Sekirov I., Tam N.M., Jogova M., Robertson M.L., Li Y., Lupp C., Finlay B.B.: Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect. Immun.* **76**, 4726–4736 (2008)
82. Sela D.A., Mills D.A.: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18964–18969 (2008)
83. Shade A., Handelsman J.: Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x. (2011)
84. Sams A.J.: Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**, 271–294 (1994)
85. Stewart J.A., Chadwick V.S., Murray A.: Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria

- in the faecal microflora of children. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1239–42 (2005)
86. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
87. Turnbaugh P.J., Bäckhed 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*, **3**, 213–223 (2008)
88. Turnbaugh P.J., Gordon J.I. i wsp.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**, 480–484 (2009)
89. Uronis J.M., Mühlbauer M., Herfarth H.H., Rubinas T.C., Jones G.S., Jobin C.: Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One*, **4**, e6026 (2009)
90. Van de Merwe J.P., Stegeman J.H., Hazenberg M.P.: The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 119–124 (1983)
91. Wang X., Heazlewood S.P., Krause D.O., Florin T.H.: Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 508–20 (2003)
92. Watson A.J., An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **57**, 107–121 (2006)
93. Zhu B., Wang X., Li L.: Human gut microbiome: the second genome of body. *Protein Cell*, **1**, 718–725 (2010)
94. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., De Vos W.M.: Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854–3859 (1998)
95. Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., Akkermans-van Vliet W.M., de Visser J.A.G.M., de Vos W.M.: The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health. Dis.* **13**, 129–134 (2001)
96. Zoetendal E.G., Vaughan E.E., de Vos W.M.: A microbial world within us. *Mol. Microbiol.* **59**, 1639–1650 (2006)
97. <http://commonfund.nih.gov/Hmp/>