

Mirosława Gałęcka,  
Anna M. Basińska, Anna Bartnicka  
Instytut Mikrobiologii, Poznań

# Znaczenie mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka — implikacje w praktyce lekarza rodzinnego

## The importance of intestinal microbiota in shaping human health — implications in the practice of the family physician

### STRESZCZENIE

Mikrobiota jelitowa jest niezwykle istotna, nie tylko w procesach trawienia, wchłaniania, metabolizmie, ale również w kształtowaniu odporności organizmu człowieka. Powstają liczne publikacje opisujące związki jednostek chorobowych z dysbiozą jelitową oraz ich mechanizmy. W związku z powyższym celem pracy jest synteza doniesień naukowych dotyczących roli i struktury ilościowej i jakościowej mikrobioty jelitowej, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii: ochronnych, immunostymulujących, odżywiających nabłonek jelitowy oraz proteolitycznych. Zaburzenia mikrobioty jelitowej, czyli dysbioza jelitowa, ma poważne konsekwencje w funkcjonowaniu układu pokarmowego oraz bariery jelitowej, co z kolei może prowadzić do rozwoju zaburzeń metabolicznych, chorób autoimmunizacyjnych i psychicznych. Dlatego z punktu widzenia praktyki lekarza rodzinnego zasadnym jest poznanie nowoczesnych metod diagnostyki mikrobioty jelitowej oraz metod jej odtwarzania, co może być podstawą leczenia lub wspierania terapii zasadniczej wielu chorób. Najsilniej negatywnie na mikrobiotę jelitową wpływają antybiotyki, inhibitory pompy protonowej, niesteroidowe leki przeciwzapalne, silny stres, alkohol, zanieczyszczenie środowiska i żywności. Dysbiozę jelitową stwierdzono u pacjentów z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego (biegunkami, wzdęciami, zaparciami), w zespole jelita drażliwego, atopowym zapaleniu skóry oraz zaburzeniach psychicznych (depresji, schizofrenii) i neurorozwojowych (autyzmie). Postuluje się związek zaburzeń mikrobioty jelit z chorobami cywilizacyjnymi, na przykład cukrzycą typu 2, otyłością, nadciśnieniem i ryzykiem wystąpienia zaburzeń układu sercowo-naczyniowego. Jednocześnie rośnie liczba piśmiennictwa dotyczącego związku procesów autoimmunizacyjnych z mikrobiotą jelitową, w chorobach (np. celiakii, cukrzycy typu 1, reumatoidalnym zapaleniem stawów i nieswoistych chorobach zapalnych jelit IBĐ). Na podstawie badania mikrobioty (KyberKompakt Pro) można zastosować celowaną

**Adres do korespondencji:**  
dr n. biol. Anna M. Basińska  
Instytut Mikrobiologii  
Sp. z o.o. & Co Sp. Komandytowa  
ul. Sielska 10,  
60-129 Poznań  
tel. 61 862 63 15, faks. 61 862 63 35  
e-mail: nauka@instytut-mikrobiologii.pl

Copyright © 2018 Via Medica  
ISSN 1897-3590

probiotykoterapię i indywidualnie dobrać leczenie w przypadku zróżnicowanych chorób. Badanie mikrobioty jelitowej pozwala rozszerzyć rutynową diagnostykę i wspomóc lekarza w holistycznym podejściu do pacjenta.

Forum Medycyny Rodzinnej 2018, tom 12, nr 2, 50–59

**Słowa kluczowe:** mikrobiota jelitowa, dysbioza, eubioza, bakterie immunostymulujące, KyberKompakt Pro

#### **ABSTRACT**

Gut microbiota is highly important, not only in the processes of digestion, absorption and metabolism, but also affect the immune responses of the human organisms. Numerous publications are describing the links between different diseases and intestinal dysbiosis as well as its mechanisms. Hence the aim of the article is to synthesize scientific knowledge on the role and the quantitative and qualitative structure of the gut microbiota, with particular emphasis on the following bacteria: protective, immunostimulatory, proteolytic and nourishing the intestinal epithelium. Alterations in the gut microbiota, i.e. intestinal dysbiosis, have serious consequences in the functioning of the digestive system and intestinal barrier, which may cause metabolic, autoimmune and psychological disorders.

Therefore, from the point of view of the general practitioner practice, it is reasonable to know a new diagnostics of intestinal microbiota and methods of its recovery, which may be the basis for treatment or support of the main therapy of many diseases. High consumption of antibiotics, proton pump inhibitors, nonsteroidal anti-inflammatory drug, alcohol, intensive stress, environmental and food pollution have the greatest negative impact on the gut microbiota. Intestinal dysbiosis was found in patients with functional gastrointestinal disorders (diarrhea, flatulence, constipation), irritable bowel syndrome, atopic dermatitis and psychological (depression, schizophrenia) and neurodevelopmental disorders (autism). The relationship between intestinal microbiota alterations and civilization diseases is postulated, for example in type 2 diabetes, obesity, hypertension and the risk of cardiovascular disorders. Simultaneously, we observe the growth of article numbers regarding the relationship between autoimmune processes and intestinal microbiota, e.g. celiac disease, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases (IBD). On the basis of the result a microbiota examination (KyberKompakt Pro), the individual treatment can be used with attention of patient disease and targeted probiotic therapy. Examination of intestinal microbiota allow to outspread routine diagnostics and support the gut microbiota which is helpful in a holistic approach of general practitioner to the patient health.

Forum Medycyny Rodzinnej 2018, vol 12, no 2, 50–59

**Key words:** intestinal microbiota, dysbiosis, eubiosis, immunostimulating bacteria, KyberKompakt Pro

#### **WSTĘP**

W ostatnich latach szybko wzrasta liczba publikacji naukowych dotyczących roli mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka, a także występowania dysbiozy jelitowej

w rozmaitych jednostkach chorobowych. Obecnie wiadomo, że mikrobiota jelitowa nie uczestniczy wyłącznie w procesach związanych z trawieniem i wchłanianiem substancji pokarmowych. Bakterie wchodzące w skład

mikrobioty jelitowej pełnią rozmaite funkcje, a ich prawidłowa struktura ilościowa i jakościowa (określana jako stan eubiozy) wspiera homeostazę całego organizmu, kształtując odporność, metabolizm i syntezę wielu związków chemicznych, na przykład serotoniny i prekursorów neuroprzekazników. W związku z faktem, że niektóre gatunki lub rodzaje bakterii bytujących w jelicie mogą mieć właściwości chorobotwórcze, istotne jest, aby przewagę ilościową zachowały bakterie korzystnie wpływające na procesy przebiegające w jelitach, wpływające prozdrowotnie na cały organizm pacjenta [1–3]. Celem niniejszej pracy jest przegląd i podsumowanie informacji literaturowych dotyczących roli mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka. Ponadto charakterystyka nowoczesnych metod diagnostycznych oceny mikrobioty oraz jej znaczenie i zastosowanie w leczeniu lub wspieraniu leczenia wybranych jednostek chorobowych.

### EKOSYSTEM UKŁADU POKARMOWEGO

Poszczególne odcinki układu pokarmowego, ze względu na panujące w nich warunki oraz ich zróżnicowane funkcje, charakteryzują się odmiennym składem ilościowym i jakościowym bakterii, grzybów i archeonów. Jama ustna jest zasiedlana przez  $10^8$  jtk/g (jednostek tworzących kolonie w jednym gramie treści), z dominacją z rodzajów: *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* oraz *Fusobacterium*. Przełyk i górne odcinki przewodu pokarmowego charakteryzują się stosunkowo szybkim transportem treści pokarmowej, co hamuje rozwój mikroorganizmów. Z kolei w żołądku i dwunastnicy bardzo niskie pH dodatkowo ogranicza występowanie wielu gatunków bakterii. Bytują tu głównie *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* oraz drożdżak *Candida albicans*, w niewielkich liczebnościach ( $10$  jtk/g do  $10^1$ – $10^3$  jtk/g). W jelitach liczba bakterii stopniowo rośnie od  $10^5$  jtk/g w jelicie czczym (*Bacteroides*, *Lactobacillus* oraz *Streptococcus*) do  $10^8$  jtk/g w jelicie krętym (głównie

*Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Veillonella*, *Enterobacteriaceae*).

Jednak najliczniejszy i najbardziej aktywny zespół mikroorganizmów zamieszkuje jelito grube. Obliczono, że łączna masa bakterii w jelicie wynosi 1,5–2 kg i należą one do czterech typów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Publikacje sugerują, że liczebność bakterii w gramie treści jelita grubego wynosi do  $10^{12}$  komórek, a łączna ich liczba gatunków sięga 800–900 bakterii i archeonów [4–6]. Stwierdzono, że w jelicie grubym bytują:

- w większości bakterie bezwzględnie beztlenowe: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Butyrivibrio*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* oraz *Bifidobacterium*;
- bakterie tlenowe i względnie beztlenowe: Gram-ujemne pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki Gram-dodatnie *Lactobacillus*, ziarniaki z rodzaju *Enterococcus* i *Streptococcus*;
- niewielkie ilości grzybów z rodzaju *Candida spp.* ( $10^2$ – $10^4$  komórek w 1 gramie kału).

Obliczono że, blisko 80% to bakterie niehodowlane tradycyjnymi metodami mikrobiologicznymi [4]. Jednak dla 30% gatunków mikrobioty jest możliwe określenie stałych przedziałów liczebności, stanowią one uniwersalny i stabilny rdzeń (ang. *core*) zespołu mikroorganizmów obecny u większości ludzi. Reszta mikroorganizmów jest modyfikowana przez procesy fizjologiczne, w tym układ immunologiczny, genotyp, styl życia (dietę, wysiłek fizyczny) oraz środowisko życia gospodarza [7–9]. Warto zaznaczyć, że w bogatym ekosystemie jelitowym mikroorganizmy symbiotyczne, komensalne i patogenne, konkurują ze sobą zarówno o miejsce adhezji do nabłonka jelitowego, jak i o substancje odżywcze. Stwierdzono, że podawanie niektórych szczepów probiotycznych pacjentom może chronić ich przed infekcjami powodowanymi przez bakterie patogenne. Najlepiej udokumentowanym

przykładem jest zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków poprzez podaż szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG lub *Saccharomyces boulardii*, których stosowanie zmniejsza ryzyko wystąpienia biegunki poantybiotykowej o 42 do 56% [10, 11]. Ponadto w ostrej bieguncie infekcyjnej jako uzupełnienie nawadniania można rozważyć zastosowanie szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG lub *Saccharomyces boulardii* [11]. Randomizowane badanie kliniczne obejmujące pacjentów z oddziału nefrologicznego, będących nosicielami wankomycynoopornych *Enterococcus*, wykazało że 4-tygodniowa suplementacja *Lactobacillus rhamnosus* GG wypierała patogenny szczep [12].

### ROZWÓJ MIKROBIOTY JELITOWEJ

Najnowsze badania naukowe wykazały, że bakterie jelitowe kobiety ciężarnej, jej dieta i status zdrowotny mają bezpośredni wpływ na późniejszy profil bakterii jelitowych dziecka [13]. Kluczowym etapem kolonizacji układu pokarmowego człowieka przez mikrobiotę jest poród. Najbardziej korzystny dla mikrobioty jest poród naturalny, podczas którego płód, przechodząc przez drogi rodne, jest zasiedlany fizjologiczną mikrobiotą pochwy matki. Badania pokazały, że w przypadku cięcia cesarskiego noworodek jest kolonizowany przez bakterie skórne matki i personelu szpitalnego, a w skrajnych przypadkach szczepy pochodzenia szpitalnego. W badaniu Dominguez-Bello i wsp. wykazali, że mikrobiota noworodków urodzonych fizjologicznie zbliżona jest do mikrobioty pochwy z dużym udziałem bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, w przeciwieństwie do noworodków urodzonych przez cięcie cesarskie, których mikrobiota zawierała więcej skórnych bakterii, na przykład *Streptococcus*, *Staphylococcus* [14]. Obecnie notuje się niestety wzrost liczby cięć cesarskich, także bez jasnych wskazań medycznych, co ma istotne konsekwencje zdrowotne [13]. W badaniach akcentuje się korelacje między cięciami cesarskimi a dysbiozą jelitową, co

zwiększa realne ryzyko alergii, atopii, astmy oskrzelowej, cukrzycy typu 1 i otyłości w późniejszym okresie życia [15–17]. Przyjmuje się, że pierwsze 1000 dni życia dziecka wraz z życiem płodowym programuje mikrobiotę, mając kluczowy i długotrwały wpływ na rozwój oraz zdrowie człowieka [18]. W tym okresie niezwykle ważna w procesie zasiedlania jelit noworodka i niemowlęcia, poza rodzajem porodu, jest forma karmienia [19]. Pomimo niezwykle szybkiego rozwoju dedykowanych mieszanek zastępczych, naturalny pokarm matki jest w dalszym ciągu „złotym standardem” w żywieniu noworodków i niemowląt. Karmienie piersią jest niezwykle korzystne również w aspekcie kształtowania mikrobioty jelitowej dziecka. Z aktualnych badań wynika bowiem, że mleko matki poza wieloma czynnikami bioaktywnymi zawiera także prozdrowotne bakterie, które wspierają pierwotną kolonizację jelit noworodka. Z pokarmem matki do przewodu pokarmowego noworodka dostają się bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oraz przedstawiciele rodziny *Enterobacteriaceae*, a także substancje stymulujące ich wzrost (prebiotyki), w tym najważniejsze oligosacharydy mleka ludzkiego (HMO, ang. *human milk oligosaccharides*). Mieszanina bakterii ochronnych, prebiotyków z immunoaktywnymi białkami (np. laktoferyną) w mleku kobiecym odpowiada za prawidłowe trawienie, rozwój kosmków jelitowych, perystaltykę jelit i kształtowanie układu immunologicznego u noworodka [20]. Badania wykazały, że u niemowląt karmionych piersią dominują bakterie ochronne *Bifidobacterium*, z domieszką *Lactobacillus*, natomiast znacznie mniej jest bakterii z rodzajów *Clostridium* i *Escherichia*. W pierwszych dwóch latach życia dziecka wraz z kontaktem z nowymi pokarmami oraz mikrobiotą środowiska dziecka, w tym pochodzącą od rodzeństwa, zwierząt domowych i najbliższego otoczenia, różnorodność bakterii wzrasta do zespołu przypominającego mikrobiotę osoby dorosłej [21]. Ponieważ dieta wpływa na mikrobiotę jelitową, kluczowym

jest, żeby kobieta już przed ciążą oraz w trakcie całej ciąży dbała o urozmaicony, zbilansowany i bogaty w prebiotyki sposób odżywiania. Warto podkreślić, że wzrost higienizacji życia, skutkujący zmniejszeniem kontaktu dzieci z drobnoustrojami pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego oraz nadużywanie antybiotyków w ciąży i pierwszych dwóch latach życia, może zaburzać rozwój mikrobioty. W konsekwencji dochodzi do nieprawidłowego kształtowania procesów odpornościowych, co może prowadzić do wystąpienia nadmiernej reakcji immunologicznej na pyłki czy roztocze kurzu (alergii) lub tkanki własne (choroby autoimmunizacyjne) [22, 23]. Wyniki badań wykazały, że podawanie antybiotyków okołoporodowo matce lub dziecku, jak i poród przedwczesny, równie silnie wpływają na mikrobiotę i mogą mieć konsekwencje dla późniejszego zdrowia. Noworodki przedwcześnie urodzone mają obniżoną liczebność rodziny *Bacteroidaceae* w pierwszych miesiącach życia oraz wyższy początkowy odsetek *Lactobacillaceae*, w porównaniu z niemowlętami urodzonymi w terminie. Antybiotyki stosowane okołoporodowo wpływają na strukturę ilościową i jakościową mikrobioty jelit, a szczególnie podwyższoną liczebność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i *Clostridiaceae* oraz zmniejszenie liczebności ochronnych *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* u niemowląt [24].

Wu i wsp. przeprowadzili badanie kohortowe na grupie 136 098 dzieci w poszukiwaniu czynników zwiększających ryzyko zachorowania na astmę w dzieciństwie. Wykazano, że wśród czynników podwyższających ryzyko wystąpienia astmy są: leczenie antybiotykami matki w trakcie ciąży (w zakażeniach dróg moczowo-płciowych), poród przez cięcie cesarskie, antybiotykoterapia we wczesnym dzieciństwie oraz brak rodzeństwa (jedyński) [25].

#### **ROLA WYBRANYCH PRZEDSTAWICIELI MIKROBIOTY JELITOWEJ**

Stan eubiozy mikrobioty jelitowej charakteryzuje się przewagą pożądaných bakterii,

niezbędnych w prawidłowym procesie trawienia, wchłaniania, ale również metabolizmie i ochronie immunologicznej całego organizmu. Znaczenie mikrobioty jelitowej jest warunkowane przez rolę poszczególnych rodzajów bądź grup bakterii, które są zależne od prowadzonego przez nie metabolizmu. Niejednokrotnie funkcje poszczególnych grup bakterii uzupełniają się i są zależne od wspólnego występowania poszczególnych gatunków bakterii. Wiadomo, że mikrobiota jelitowa, wytwarzając enzymy, rozkłada substancje niestrawialne bądź trudnostrawialne dla człowieka, między innymi skrobię oporną, oligosacharydy, mucyny, związki azotowe i lipidy [8, 26]. Z docierających do jelita grubego „resztek” odzyskiwane są potrzebne substancje oraz są syntetyzowane witaminy K, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, kwas foliowy. Mikrobiota rozkłada złuszczone komórki nabłonkowe, składniki żółci, ksenobiotyki, niektóre leki oraz potencjalne kancerogeny [27, 28]. Prawidłowa mikrobiota jelitowa stymuluje zachowanie wydajnej bariery jelitowej oraz poprawia wchłanianie składników mineralnych: sodu, potasu, magnezu i wapnia [4].

Najbardziej licznymi bakteriami w jelicie grubym są bakterie pełniące funkcję ochronną to jest *Bifidobacterium ssp.*, *Bacterioides ssp.* i *Lactobacillus spp.* Bakterie te, posiadając szeroki zasób genów kodujących zróżnicowane enzymy, uczestniczą w rozkładzie złożonych węglowodanów endogennych i egzogennych białek, lipidów i innych. Na drodze fermentacji bakterie ochronne syntetyzują między innymi kwas mlekowy zakwaszający środowisko jelitowe i utrzymujący korzystne lekko kwaśne pH, zwalczając jednocześnie bakterie chorobotwórcze. Dodatkowo autochtoniczne bakterie konkurują z patogenami o składniki odżywcze i miejsce adhezji do nabłonka jelitowego. Do bakterii ochronnych zalicza się również *Lactobacillus spp.* syntetyzujące nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), który aktywnie hamuje rozwój bakterii chorobotwórczych [29, 30]. W procesach fermentacji

powstają również kwasy masłowy, propionowy oraz octowy, czyli krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA, ang. *short-chain fatty acids*). Najlepiej zbadanym krótkołańcuchowym kwasem tłuszczowym jest mała stabilny chemicznie kwas masłowy, szybko przekształcający się w maślan. Wykazuje on działanie przeciwzapalne, odżywia i regeneruje kolonocyty nabłonka jelitowego, przez co wspiera prawidłowe funkcjonowanie bariery jelitowej. Jednocześnie stwierdzono, że kwas masłowy hamuje rozwój i indukuje apoptozę komórek nowotworowych jelita grubego [8, 28]. Ponadto kwas masłowy poprawia wzrost kosmków jelitowych i poprawia motorykę jelit. Do najbardziej istotnych producentów maślanu należą: *Faecalibacterium prausnitzii* i przedstawiciele rodzajów *Clostridium* i *Butyrivibrio*. Bakteria *Faecalibacterium prausnitzii* stanowi od 2 do 15% całkowitej mikrobioty jelitowej [31]. Obniżoną liczebność tego gatunku i maślanu obserwuje się u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit (IBD, ang. *inflammatory bowel disease*), to jest w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [3, 32]. Ponadto stwierdzono, że w tych chorobach nadmierna aktywacja układu immunologicznego śluzówki jest potęgowana przez bakterie patogenne u pacjentów z genetyczną predyspozycją do choroby. Ponadto maślan wytwarzany przez *F. prausnitzii* poprzez indukcję interleukiny (IL-10) wycisza reakcję zapalną, łagodząc objawy stanów zapalnych jelit [32, 33]. Badania mikrobioty u osób starszych, zdrowych i hospitalizowanych wykazały obniżenie liczebności *F. prausnitzii* do 2–3% [34]. W roku 2004 Derrien wraz z zespołem opisali Gram-ujemną, bezwzględnie beztlenową bakterię *Akkermansia muciniphila*, stanowiącą 5% całkowitej mikrobioty jelitowej [35]. Stwierdzono, że *F. prausnitzii* i *A. muciniphila* współzależą od siebie, wspierając swój metabolizm i tym samym korzystnie wpływając na funkcjonowanie bariery jelitowej [34, 36]. *A. muciniphila*, bytując w śluzie, degradowuje

jego składniki do kwasu propionowego, octowego i oligosacharydów, które z kolei odżywiają *F. prausnitzii* [37]. Natomiast *F. prausnitzii* produkuje z tych substratów wspomniany już kwas masłowy. Natomiast prawidłowa liczebność *A. muciniphila* wykazuje korelację z utrzymaniem prawidłowej masy ciała u dzieci oraz osób dorosłych [38, 39]. Dodatkowo *A. muciniphila* i *F. prausnitzii* oddziałują korzystnie na ekosystem jelitowy, także u pacjentów z dysbiozą jelitową, na przykład w chorobach zapalnych jelit, celiakii, atopowym zapaleniu skóry, alergiach, otyłości, cukrzycy typu 1 i 2, zaburzeniach ze spektrum autyzmu, depresji [40]. Ponieważ nie jest jeszcze możliwa suplementacja bakteriami odżywiającymi nabłonek jelitowy, czyli *A. muciniphila* i *F. prausnitzii*, ich działalność może być jedynie pośrednio imitowana przez suplementację maślanu. Jednak najlepszą metodą wsparcia wzrostu opisywanych bakterii jest dostarczanie w diecie substancji o charakterze prebiotyków, czyli pożywki dla bakterii. Na wzrost *A. muciniphila* i *F. prausnitzii* korzystnie wpływa spożywanie skrobi „opornej”, której znaczną zawartość odnotowano w schłodzonym ryżu, makaronie, cebuli, średnio dojrzałych bananach, szparagach, cykorii i innych [3].

Kolejną niezwykle istotną funkcją mikrobioty jelitowej jest immunostymulacja komórek tkanki limfatycznej związanej z jelitem, w skrócie nazywana GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), wchodzącego w skład układu odpornościowego błon śluzowych (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*). Ponieważ obliczono, że 70% limfocytów człowieka jest związanych z jelitowym GALT, jelita są nazywane centralnym organem układu immunologicznego [41, 42]. Strukturalnie GALT są zbudowane z kępek Peyera (miejsca indukcji immunologicznej), węzłów chłonnych kręzkowych i grudek chłonnych. W nich, za pośrednictwem komórek dendrytycznych, zachodzi trening immunologiczny limfocytów śród błonkowych, plazmacytów, makrofagów, mastocytów i granulocytów. Powierzchnia



nabłonka układu pokarmowego ma kontakt z autochtoniczną mikrobiotą, ale również patogennymi wirusami, bakteriami, toksynami czy grzybami. Aktywność komórek GALT służy rozróżnieniu substancji odżywczych oraz drobnoustrojów auto- i allochtonicznych. Wśród mikrobioty jelitowej stwierdzono gatunki, które aktywują receptory i utrzymują w gotowości komórki odpornościowe. Autochtoniczne bakterie, przy prawidłowym działaniu bariery jelitowej, są rozpoznawane przez układ immunologiczny jednak nie wywołują odpowiedzi zapalnej, a wręcz utrzymują równowagę limfocytów Th1/Th2 przez aktywację sieci cytokin [21, 42, 43]. Są to głównie bakterie z rodzaju *Enterococcus*, stymulujące plazmocyty w nabłonku jelitowym do syntezy sekrecyjnej IgA (sIgA). Wydzielnicza IgA jest zasadniczym komponentem nieswoistej odporności śluzówkowej, który hamuje adhezję patogennych komórek bakterii, wirusów i grzybów do nabłonka błon śluzowych, dodatkowo ma zdolność opłaszczania i aglutynacji mikroorganizmów, działa bakteriostatycznie i przyczynia się do neutralizacji toksyn bakterialnych. W związku z powyższym używa się niepatogennych szczepów *Enterococcus faecalis* lub ich lizatów w preparatach stymulujących odporność, szczególnie w przypadku nawracających infekcji. Przeprowadzono randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą na grupie 136 pacjentów w wieku 19–70 lat z przewlekłym zapaleniem oskrzeli trwającym minimum dwa lata. Pacjenci otrzymywali 30 kropli preparatu Symbioflor 1 (komórki i autolizat *Enterococcus faecalis* pochodzenia ludzkiego) lub placebo. Wyniki badania dowodzą, że przyjmowanie doustnie probiotyku immunostymulującego (*E. faecalis*) spowodowało 43-procentową redukcję ryzyka nawrotów w fazie leczenia i około 68-procentową redukcję nawrotów w okresie 8 miesięcy po zakończeniu terapii [44]. Jeszcze silniej na komórki układu odpornościowego wpływają niepatogenne szczepy *Escherichia coli*. Poprzez obecność lipopolisachrydu (LPS) w błonie

komórkowej, *E. coli* aktywuje komórki GALT do syntezy czynników przeciwbakteryjnych i dojrzewania komórek dendrytycznych [45]. Kolejną różnorodną grupą bakterii jelitowych są bakterie proteolityczne, a należą do nich śluzowe i laktozo-ujemne szczepy *Escherichia coli*, tak zwane biovare (nieposiadające właściwości immunostymulujących), *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Hafnia alvei*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Clostridium spp.* Bakterie te metabolizują białka i niebiałkowe związki azotowe, które szczególnie w podwyższonym pH w jelicie, są przekształcane między innymi w amoniak, indol, skatol i mogą być cytotoksyczne dla komórek nabłonka i wątroby. Wiele bakterii proteolitycznych wykazuje potencjał patogenny, a podwyższona liczba tych bakterii może skutkować obciążeniem wątroby w związku z nadprodukcją gazów oraz mutacją komórek w procesie kancerogenezy [21]. Warto zwrócić uwagę na liczbę tych bakterii u pacjentów z zaburzeniami układu pokarmowego, szczególnie wzdęciami i gazami, oraz u pacjentów ze zwiększonym ryzykiem nowotworów jelita grubego, stłuszczeniem wątroby i zapaleniami jelit.

W skład naturalnej mikrobioty człowieka wchodzi niewielka liczba komórek grzybów drożdżopodobnych, głównie *Candida albicans*. Zaburzenia równowagi mikrobioty jelitowej mogą w skrajnych wypadkach przyczynić się do nadmiernego namnożenia gatunków *Candida spp.* mogących powodować kandydozę błon śluzowych i zakażenia inwazyjne, na przykład kandydozę wątrobowo-śledzionową [46].

#### **DIAGNOSTYKA UŻYTECZNA W PRAKTYCE LEKARZA RODZINNEGO**

Mikrobiota jelitowa tworzy kompleksowy i aktywny metabolicznie ekosystem. Jednak poszczególne bakterie są wrażliwe na czynniki wewnętrzne i zewnętrzne. Warto podkreślić, że do najsilniej zaburzących mikrobiotę czynników należą nieprawidłowa, uboga w błonnik

dieta, antybiotyki, inhibitory pompy protonowej, niesteroidowe leki przeciwzapalne, silny stres, alkohol, zanieczyszczenie środowiska i żywności [47]. Dysbiozę jelitową stwierdza się u pacjentów z zaburzeniami czynnościowymi przewodu pokarmowego (biegunkami, wzdęciami, zaparciami), zespole jelita drażliwego, atopowym zapaleniu skóry oraz zaburzeniach psychicznych i neurorozwojowych (depresja, schizofrenia i autyzm). Postuluje się związek zaburzeń mikrobioty jelit z chorobami cywilizacyjnymi, na przykład cukrzycą typu 2, otyłością i nadciśnieniem oraz ryzykiem zaburzeń układu sercowo-naczyniowego oraz chorobami autoimmunizacyjnymi, na przykład celiakią, cukrzycą typu 1, reumatoidalnym zapaleniem stawów, chorobami zapalnymi jelit (IBD) [23, 47, 48]. Ponadto obniżona liczba bakterii immunostymulujących (niepatogennych szczepów *Escherichia coli* oraz *Enterococcus* spp.) może skutkować nawracaniem infekcji, na przykład górnych dróg oddechowych czy moczowo-płciowych, związanych z obniżoną obroną śluzówek. W przypadku leczenia nawracających infekcji, również u dzieci, zasadne jest wykonanie oznaczenia poziomu sIgA w stolcu, której stężenie jest wskaźnikiem stopnia ochrony śluzówkowej (norma 510–2040  $\mu\text{g/g}$  kału). Badaniem, które może wspomóc praktykujących lekarzy, jest ocena mikrobioty jelitowej, obejmująca szczegółowe posiewy mikrobiologiczne oraz analizy genetyczne dla bakterii niehodowlanych. Badanie mikrobioty wskaźnikowej (KyberKompakt Pro) to szczegółowa analiza jakościowa i ilościowa drobnoustrojów autochtonicznych: ochronnych (bakterii

beztlenowych z rodzaju *Bacteroides* i *Bifidobacterium*, pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, również produkujących nadtlenek wodoru), bakterii immunostymulujących (*Enterococcus* i pałeczek z gatunku *E. coli*), odżywiających nabłonek jelita (*Faecalibacterium prausnitzii* i *Akkermansia muciniphila*) oraz bakterii proteolitycznych (*Clostridium*, rodzina *Enterobacteriaceae* w tym *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp.) i *Pseudomonas* oraz całkowitą liczbę bakterii. Ponadto składową badania, którą można wykonać też oddzielnie (KyberMyk), jest analiza ilościowa grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych.

Nieinwazyjne badanie kału umożliwia ocenę składu ilościowego mikrobioty jelitowej oraz pozwala dobrać najbardziej efektywną, celowaną i indywidualną pre- i probiotykoterapię w przypadku stwierdzenia dysbiozy jelitowej. Indywidualnie dobrana dieta oraz probiotyki zawierające przebadane klinicznie szczepy bakterii jednego gatunku (preparaty jednoszczepowe), jak i kilku gatunków bakterii najczęściej *Lactobacillus* i/lub *Bifidobacterium* (wieloszczepowe), zdecydowanie wspierają mikrobiotę jelitową [1, 21]. Oczywiście kluczowe jest dobranie bezpiecznych, przetestowanych preparatów, a bakterie powinny dotrzeć do jelita grubego i stymulować tworzenie korzystnych warunków dla rozwoju prawidłowej mikrobioty. Bardzo istotny jest jednak indywidualny dobór odpowiednich preparatów przez specjalistę, z uwzględnieniem choroby zasadniczej i podawanych leków.

## PIŚMIENNICTWO

1. Gałęcka M, Szachta P. Kyberkompakt — znaczenie nowoczesnej diagnostyki mikrobiologicznej przewodu pokarmowego. *Zakażenia*. 2013; 13(6): 84.
2. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995; 125(6): 1401–1412, doi: [10.1093/jn/125.6.1401](https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401), indexed in Pubmed: [7782892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7782892/).
3. Gałęcka M, Basińska A, Bartnicka A. KyberKompakt-Pro – nowoczesna diagnostyka mikroflory przewodu pokarmowego i jej znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. *Forum Zakażeń*. 2017; 8(2): 111–116, doi: [10.15374/fz2017007](https://doi.org/10.15374/fz2017007).
4. Mroczyńska M, Libudzisz Z, Gałęcka M, et al. Mikroorganizmy jelitowe człowieka i ich aktywność metaboliczna. *Prz Gastroenterol*. 2016; 4: 218–224.



5. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, et al. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol.* 2006; 21(9): 517–523, doi: [10.1016/j.tree.2006.06.013](https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.06.013), indexed in Pubmed: [16820245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16820245/).
6. Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006; 124(4): 837–848, doi: [10.1016/j.cell.2006.02.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017), indexed in Pubmed: [16497592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16497592/).
7. Turnbaugh P, Ley R, Hamady M, et al. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007; 449(7164): 804–810, doi: [10.1038/nature06244](https://doi.org/10.1038/nature06244).
8. Nowak A, Libudzisz Z. Mikroorganizmy jelitowe człowieka. *Standardy Medyczne–Pediatria.* 2008; 5: 372–379.
9. Olszewska J, Jagusztyn-Krynicka EK. Human Microbiome Project — Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol.* 2012; 51(4): 243–256.
10. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2012; 307(18): 1959–1969, doi: [10.1001/jama.2012.3507](https://doi.org/10.1001/jama.2012.3507), indexed in Pubmed: [22570464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22570464/).
11. Szajewska H. Praktyczne zastosowanie probiotyków. *Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy.* 2014; 6(1).
12. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, et al. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust.* 2007; 186(9): 454–457, indexed in Pubmed: [17484706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17484706/).
13. Bartnicka A, Gałęcka M, Mazela J. Wpływ czynników prenatalnych i postnatalnych na mikrobiotę jelitową noworodków. *Stand Med Pediatr.* 2016; 13: 112–116.
14. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(26): 11971–11975, doi: [10.1073/pnas.1002601107](https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107), indexed in Pubmed: [20566857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20566857/).
15. Bager P, Wohlfahrt J, Westergaard T. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(4): 634–642, doi: [10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x), indexed in Pubmed: [18266879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18266879/).
16. Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, et al. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(4): 629–633, doi: [10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x), indexed in Pubmed: [18352976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18352976/).
17. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia.* 2008; 51(5): 726–735, doi: [10.1007/s00125-008-0941-z](https://doi.org/10.1007/s00125-008-0941-z), indexed in Pubmed: [18292986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18292986/).
18. Cukrowska B. Znaczenie programowania mikrobiotycznego w rozwoju przewlekłych chorób infekcyjnych. *Stand Med Pediatr.* 2016; 13: 1019–1028.
19. Jańczewska I, Domżańska-Popadiuk I. Znaczenie kolonizacji bakteryjnej przewodu pokarmowego noworodków donoszonych urodzonych drogą cięcia cesarskiego. *Ann Acad Med Gedan.* 2014; 44: 99–104.
20. Rouge C, Darmaun D, Potel G, et al. Intestinal Microbiota in Neonates and Preterm Infants: A Review. *Current Pediatric Reviews.* 2007; 3(1): 21–34, doi: [10.2174/157339607779941697](https://doi.org/10.2174/157339607779941697).
21. Gałęcka M, Bartnicka A, Szewc M, et al. Kształtowanie się mikrobioty jelitowej u niemowląt warunkiem zachowania zdrowia. 2016; 13: 359–367.
22. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, et al. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 Suppl 1: 4615–4622, doi: [10.1073/pnas.1000082107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000082107), indexed in Pubmed: [20660719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660719/).
23. Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011; 8(2): 110–120, doi: [10.1038/cmi.2010.67](https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67), indexed in Pubmed: [21278760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278760/).
24. Arboleya S, Sánchez B, Milani C, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015; 166(3): 538–544, doi: [10.1016/j.jpeds.2014.09.041](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.041), indexed in Pubmed: [25444008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25444008/).
25. Wu P, Feldman AS, Rosas-Salazar C, et al. Relative Importance and Additive Effects of Maternal and Infant Risk Factors on Childhood Asthma. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151705, doi: [10.1371/journal.pone.0151705](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151705), indexed in Pubmed: [27002979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27002979/).
26. Egert M, de Graaf AA, Smidt H, et al. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* 2006; 14(2): 86–91, doi: [10.1016/j.tim.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.12.007), indexed in Pubmed: [16406528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16406528/).
27. Sobieszczkańska BM. The influence of intestinal dysbiosis on human's health. *Gastroenterologia Polska/Gastroenterology.* 2008; 15(5).
28. Radwan P, Skrzydło-Radomańska B. Rola mikroflory jelitowej w zdrowiu i chorobie. *Gastroenterologia Praktyczna.* 2013; 2: 1–11.
29. O'Hara AM, Shanahan F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5(3): 274–284, doi: [10.1016/j.cgh.2006.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.009), indexed in Pubmed: [17368226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17368226/).
30. Schwarz A, Bruhs A, Schwarz T. The Short-Chain Fatty Acid Sodium Butyrate Functions as a Regulator of the Skin Immune System. *J Invest Dermatol.* 2017; 137(4): 855–864, doi: [10.1016/j.jid.2016.11.014](https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.014), indexed in Pubmed: [27887954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27887954/).
31. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 294(1): 1–8, doi: [10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x), indexed in Pubmed: [19222573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19222573/).
32. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(43): 16731–16736, doi: [10.1073/pnas.0804812105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105), indexed in Pubmed: [18936492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18936492/).

33. Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract*. 2014; 2014: 872725, doi: [10.1155/2014/872725](https://doi.org/10.1155/2014/872725), indexed in Pubmed: [24799893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24799893/).
34. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(6): 3575–3581, doi: [10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004), indexed in Pubmed: [15184159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15184159/).
35. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54(Pt 5): 1469–1476, doi: [10.1099/ijs.0.02873-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0), indexed in Pubmed: [15388697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15388697/).
36. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(22): 9066–9071, doi: [10.1073/pnas.1219451110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110), indexed in Pubmed: [23671105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23671105/).
37. Derrien M, Adawi D, Ahrné S, et al. The Intestinal Mucosa as a Habitat of the Gut Microbiota and a Rational Target for Probiotic Functionality and Safety. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 2004; 16(2-3): 137–144, doi: [10.3402/mehd.v16i2-3.7934](https://doi.org/10.3402/mehd.v16i2-3.7934).
38. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, et al. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92(5): 1023–1030, doi: [10.3945/ajcn.2010.29877](https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29877), indexed in Pubmed: [20844065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844065/).
39. Karlsson CLJ, Onnerfält J, Xu J, et al. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2012; 20(11): 2257–2261, doi: [10.1038/oby.2012.110](https://doi.org/10.1038/oby.2012.110), indexed in Pubmed: [22546742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546742/).
40. Hansen AK, Hansen CH, Krych L, et al. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(47): 17727–17736, doi: [10.3748/wjg.v20.i47.17727](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17727), indexed in Pubmed: [25548471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548471/).
41. MacDonald TT. The gut is still the biggest lymphoid organ in the body. *Mucosal Immunol*. 2008; 1(4): 246–247, doi: [10.1038/mi.2008.17](https://doi.org/10.1038/mi.2008.17).
42. Rusch K, Peters U. Jelito grube — centrum układu immunologicznego. *Medycyna Biologiczna*. 2003; 2: 54–58.
43. Strzępa A, Szczepanik M. Influence of natural gut flora on immune response. *Postępy Hig Med Dośw*. 2013; 67: 908–920, doi: [10.5604/17322693.1064563](https://doi.org/10.5604/17322693.1064563).
44. Habermann W, Zimmermann K, Skarabis H, et al. [The effect of a bacterial immunostimulant (human *Enterococcus faecalis* bacteria) on the occurrence of relapse in patients with]. *Arzneimittelforschung*. 2001; 51(11): 931–937, doi: [10.1055/s-0031-1300140](https://doi.org/10.1055/s-0031-1300140), indexed in Pubmed: [11765597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11765597/).
45. Majewska M, Szczepanik M. Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Postępy Hig Med Dosw*. 2006; 60: 52–63.
46. Rogalski P. Kandydoza przewodu pokarmowego — fakty i mity. *Gastroenterol Klin*. 2010; 2(3): 87–97.
47. Kasper LH. The evolving role of the gut microbiome in human disease. *FEBS Lett*. 2014; 588(22): 4101, doi: [10.1016/j.febslet.2014.09.015](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.015), indexed in Pubmed: [25239394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25239394/).
48. Ebel B, Lemetais G, Beney L, et al. Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014; 54(2): 175–189, doi: [10.1080/10408398.2011.579361](https://doi.org/10.1080/10408398.2011.579361), indexed in Pubmed: [24188267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24188267/).
49. Quigley EMM. New perspectives on the role of the intestinal flora in health and disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2006; 15(2): 109–110, indexed in Pubmed: [16802003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16802003/).