

ROLA MIKROFLORY JELIT W INDUKCJI CHOROBY LEŚNIEWSKIEGO-CROHNA W ŚWIETLE PROGRAMU BADAŃ HUMAN MICROBIOME PROJECT

Artur Franczuk¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

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

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Podłoże genetyczne i immunologiczne CD. 2.1. Podłoże genetyczne choroby Leśniowskiego-Crohna. 2.2. Defensyny. 2.3. Nabłonkowa bariera jelitowa. 3. Rola mikroflory jelit w indukcji CD. 3.1. Zmiany dysbiotyczne. 3.2. Organizacja przestrzenna mikroorganizmów flory jelit. 4. Przyszłość metagenomiki w badaniu CD. 5. Podsumowanie

Role of microbiota in Crohn's disease induction in the light of studies of Human Microbiome Project

Abstract: Crohn's disease (CD) is an inflammatory disorder which develops as a result of dysregulated interactions between gut microbiota and immune system. Because bacterial involvement in this illness is certain and classic methods of growing microorganisms are insufficient to clarify their impact on disease induction, metagenomics, as a culture-independent technique, provides revolutionary approach. This method become pivotal tool for a large project aiming at describing whole human microbiota – Human Microbiome Project (HMP). Studies on pathologically changed gut microbiota of CD patients involving metagenomic strategy provide profound analysis of intestinal microbial structure as well microbial localization. The review article also presents various aspects of the immune system functioning – such as genetic predispositions, dysregulated defensin secretion, poor epithelial barrier integrity, which contribute to improper immunological answer and promotion of inflammation.

1. Introduction. 2. Genetic and immunological basis. 2.1. Genetic basis of CD. 2.2. Defensins. 2.3. Gut epithelial barrier. 3. Role of microbiota in CD induction. 3.1. Dysbiotic changes. 3.2. Spatial organization of gut microorganisms. 4. Future of metagenomics in studies on CD. 5. Summary.

Słowa kluczowe: metagenomika, choroba Leśniowskiego-Crohna, mikroflora, HMP, dysbioza

Key words: metagenomics, Crohn's disease, comensals, microbiota, HMP, dysbiosis, inflammation

1. Wstęp

Człowiek nie jest sam – stwierdzenie to zdaje się najlepiej potwierdzać fakt, że ciało ludzkie stanowi niezwykle bogaty i złożony układ ekologiczny, na który składa się ogromna liczba mikroorganizmów, chociaż bakterie stanowią zaledwie od 1% do 2% masy ciała człowieka. Dlatego uzasadnione jest używanie, w odniesieniu do człowieka, określenia „superorganizm”, na którego genom składają się nie tylko geny *H. sapiens*, ale również geny naszych mikroskopijnych towarzyszy (tzw. mikrobiom). Komórek ludzkich w organizmie człowieka jest dziesięć razy mniej niż komórek mikroorganizmów, a liczba genów mikroorganizmów kolonizujących organizm człowieka stokrotnie przewyższa liczbę genów genomu ludzkiego. Ogromna liczba komensali wywiera znaczący wpływ na funkcjonowanie ludzkiego organizmu, między innymi modulując działanie układu immunologicznego, wpływając na proliferację komórek nabłonkowych czy wzbogacając całkowity metabolom, co ma istotne znaczenia dla fizjologii i stanu zdrowia człowieka.

Przeszkodą, która stoi na drodze do dokładnego zbadania tych mikroorganizmów jest fakt, że większość

z nich jest niehodowalna *ex vivo*. Rozwiązanie tego problemu przynosi metagenomika, dziedzina biologii odnosząca się do metod badań struktur i funkcji mikrobiologicznych zbiorowisk i stwarzająca możliwość bezpośredniej analizy genomów. Termin metagenomika został zaproponowany przez prof. Jo Handelsman w roku 1998 dla opisanego strategii sekwencjonowania DNA izolowanego bezpośrednio ze środowisk naturalnych [16].

Jednym z projektów metagenomowych jest HMP (Human Microbiome Project), który ma na celu dokładne zbadanie pięciu najważniejszych nisz mikroflory człowieka. Jedną z nich jest populacja mikroorganizmów bytujących w jelicie, która jest najliczniejsza i najbardziej różnorodna. Wykazano wiele korelacji pomiędzy zmianami w składzie tej mikroflory a różnymi schorzeniami, głównie chorobami zapalnymi jelita, w tym CD (Crohn's disease, choroba Leśniowskiego-Crohna), nieswoistego, przewlekłego procesu zapalnego ściany przewodu pokarmowego (zwykle końcowego odcinka jelita krętego i początkowego odcinka okrężnicy) o niezwykle złożonej etiologii. Uważa się, że do rozwoju choroby mogą przyczyniać się czynniki zakaźne, autoimmunologiczne, środowiskowe, genetyczne, alergiczne i psychosomatyczne. Obserwowane

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

objawy kliniczne choroby to bóle brzucha, przewlekła biegunka, krwawienie oraz zaburzenia wchłaniania [30].

Obecna praca omawia rolę, jaką spełniają bakterie jelitowe w indukcji chorób zapalnych na przykładzie CD w oparciu, między innymi, o dane uzyskane z analiz metagenomowych realizowanych w ramach HMP.

2. Podłoże genetyczne i immunologiczne CD

W świetle niedawno opublikowanych danych wiadomym już jest, że wystąpienie CD jest głównie wynikiem nieprawidłowych oddziaływań pomiędzy mikroflorą jelitową a układem immunologicznym śluzówki jelit. Analizowane są dwie hipotezy opisujące to zjawisko. Pierwsza z nich za przyczynę wystąpienia objawów chorobowych uznaje nieprawidłowe funkcjonowanie systemu immunologicznego. Zwolennicy drugiej hipotezy uważają, że zmiany w składzie mikroorganizmów jelitowych powodują obniżenie tolerancji ze strony układu immunologicznego. Istotną rolę w rozwoju choroby odgrywa także obniżenie szczelności bariery nabłonkowej śluzówki [51]. Najprawdopodobniej wystąpienie zaburzeń ma wielorakie przyczyny.

2.1. Podłoże genetyczne choroby Leśniowskiego-Crohna

Wśród 71 loci predysponujących do zachorowania na CD, największe znaczenie wydają się mieć polimorfizmy w obrębie genu *NOD2/CARD15* (nucleotide-binding oligomerization caspase recruitment domain 15) [13]. Jego białkowy produkt to wewnątrzkomórkowy receptor należący do grupy PRR (pattern recognition receptor), zawierający na N-końcu dwie domeny CARD, centralnie położoną domeną NBD (nucleotide binding domain) oraz rejon bogaty w powtórzenia leucynowe, tzw. LRR (leucine rich region) [19]. Białko NOD2 jest zaangażowane w regulację wytwarzania czynników prozapalnych zależnych od NF- κ B (nuclear factor κ B) w odpowiedzi na stymulację przez fragmenty bakteryjnego peptydoglikanu [20]. Rozpoznanie ligandu skutkuje indukcją szlaków transdukcji sygnału czego końcowym rezultatem jest aktywacja NF- κ B [23] – kluczowego czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za uruchomienie ekspresji genów związanych z indukcją stanu zapalnego.

Zidentyfikowano trzy niezależne, jednonukleotydowe polimorfizmy *NOD2*: Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007fsinsC uznawane za czynniki ryzyka wystąpienia CD [17]. Polimorfizmy te znajdują się w obrębie fragmentu genu kodującego domenę LRR białka lub w jego pobliżu [18], skutkiem czego następuje nieprawidłowe rozpoznanie ligandów mikroorganizmów [21]. Wzrost ryzyka rozwoju CD dla homozygot niosących te warianty genu *NOD2* może być nawet czterdziestokrotny [62].

Z drugiej strony, niektóre dane eksperymentalne zaprzeczają znaczeniu polimorfizmów *NOD2* w indukcji CD. Wykazano podwyższoną aktywność NF- κ B w makrofagach blaszki właściwej jelita dotkniętego CD [59] a penetracja tego genu jest względnie niewielka, nawet u osób posiadających dwa zmutowane warianty *NOD2* [18].

Otrzymane dane eksperymentalne dowodzą, że SNPy (single-nucleotide polymorphism) genu *NOD2* nie są jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za wystąpienie objawów chorobowych a wyjaśnienie przyczyn tej choroby wymaga dalszych badań – zwłaszcza, że istnieje aż 71 loci predysponujących do zachorowania na CD [13].

2.2. Defensyny

W funkcjonowaniu wrodzonego układu odpornościowego bardzo istotną rolę odgrywają działające w świetle jelita defensyny będące przeciwdrobnoustrojowymi peptydami (AMP – antimicrobial peptides) wytwarzane przez różnorodne komórki wielu tkanek różnych organizmów. Defensyny są małymi (3–5 kDa) peptydami przeciwdrobnoustrojowymi o strukturze β -harmonijki, zawierającymi zwykle sześć reszt cysteinowych połączonych trzema mostkami dwusiarczkowymi. Obecnie znamy około 550 defensyn, należących do trzech klas: α -, β -, i θ -różniących się strukturą i liczbą mostków dwusiarczkowych [65]. Wystąpienie CD jest wyraźnie związane z deficytem tych małych peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej [64]. Zarówno w typie choroby, który dotyczy jelita krętego, jak i w typie dotyczącym okrężnicy wykazano obniżony poziom aktywności antybakteryjnej ekstraktów peptydowych z biopsji [35]. Jednakże, w zależności od rejonu, w którym rozwinął się stan zapalny, deficyt ten dotyczył defensyn różnych klas [64].

Jeden z godnych uwagi modeli patogenezy CD przyjmuje, że nadmierna liczba komórek bakterii związana z obniżeniem poziomu defensyn zaburza równowagę pomiędzy mikroflorą a nabłonkiem, i skutkuje intensywnymi procesami adhezji bakterii do powierzchni nabłonka, dokonaniu inwazji i wywołaniu stanu zapalnego [64]. Mechanizm, w jaki bakterie wpływają na obniżenie poziomu produkowanych w jelicie defensyn pozostaje nadal nie całkiem wyjaśniony. Wykazano np. że *Shigella flexnerii* moduluje poziom ekspresji genów kodujących przeciwdrobnoustrojowe peptydy wykorzystując białka układu sekrecyjnego typu III [49].

2.3. Nabłonkowa bariera jelitowa

Utrzymanie właściwej homeostazy w przewodzie pokarmowym jest zależne od prawidłowego funkcjonowania nabłonkowej bariery jelitowej, która oddziela przestrzeń układu pokarmowego od tkanek gospodarza,

jednocześnie umożliwiając oddziaływania pomiędzy nimi – np. pozwalając na interakcje pomiędzy mikroorganizmami a układem immunologicznym [32].

Nabłonek jelitowy chorych na CD cechuje zwiększona przepuszczalność [39], co koresponduje z odkryciem zjawiska redystrybucji białek AJC (apical junctional complex) – istotnego regulatora funkcji bariery nabłonkowej [15].

K o s o v a c i wsp. wykazali, że obecność zmutowanego wariantu genu *NOD2* jest związana z translokacją komórek drobnoustrojów (i/lub ich składników) przez śluzówkę jelitową, objawiającą się wzmożoną aktywnością szlaku prozapalnego zależnego od NF- κ B [24]. Natomiast z badań wykonanych z wykorzystaniem linii komórkowych wiemy, że stan zapalny prawdopodobnie wpływa niszcząco na jelitową barierę nabłonkową [43].

Dokonując syntezy powyższych informacji, należy zaznaczyć, że omawiane schorzenie jest wynikiem utraty regulacji odpowiedzi immunologicznej wobec komensalnych mikroorganizmów jelita grubego, na co składa się wiele czynników – nieprawidłowe rozpoznanie bakterii (dysfunkcja *NOD2*) i nieprawidłowa sekrecja defensyn prowadzą do naruszenia bariery nabłonkowej, a to z kolei promuje stan zapalny, ponieważ bakteryjne antygeny ze światła jelita dostarczane są komórkom immunologicznym i odpowiednim receptorem.

3. Rola mikroflory jelit w indukcji CD

Dane eksperymentalne otrzymane podczas realizacji pierwszych etapów projektu HMP wskazują, że kompozycja mikroorganizmów kolonizujących jelita danego osobnika jest powiązana jest z jego stanem fizjologicznym. Zmiany ilościowe, jakościowe i związane z lokalizacją poszczególnych grup bakterii wchodzących w skład mikroflory jelitowej przypuszczalnie powodują nieprawidłową stymulację układu immunologicznego. Dlatego tak istotna jest dokładna i kompleksowa analiza mikroflory jelitowej. Zgodnie z zamierzeniem HMP będzie ona przeprowadzona przy użyciu technik metagenomowych. Jednym z celów projektu HMP jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy dana kompozycja i proporcje drobnoustrojów kolonizujących konkretny obszar jelit determinują rozwój chorób zapalnych, takich jak CD. Wiedza zdobyta w szczegółowych badaniach składu mikroflory potencjalnie będzie mogła być wykorzystana zarówno w diagnostyce jak i terapii choroby, w projektowaniu leków w postaci pre-, pro- i synbiotyków.

3.1. Zmiany dysbiotyczne

Nieodłącznym zjawiskiem związanym z występowaniem CD oraz innych chorób zapalnych jelit są znaczące zmiany w składzie mikroflory, czyli tzw. dysbioza [22, 42, 53].

Techniki wykorzystujące sekwencje nukleotydowe genów 16S rRNA udokumentowały, że sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes* stanowią ponad 98% wszystkich analizowanych w tych badaniach [10]. Dalsze eksperymenty wykazały, że wystąpienie CD jest skorelowane ze spadkiem liczby Gram-dodatnich bakterii typu *Firmicutes* (szczególnie grupy *Clostridium leptum*) oraz wzrostem liczby drobnoustrojów typu *Bacteroidetes*, obejmującego bakterie Gram-ujemne [2, 61], jak również z występowaniem nowych, jak dotąd niesklasyfikowanych gatunków, których liczba przewyższała liczbę występującą w grupie kontrolnej nawet trzykrotnie [28].

Niewykluczone jest, że efektem zmniejszenia liczby bakterii Gram-dodatnich jest kompensacyjny wzrost liczby bakterii Gram-ujemnych, które silniej oddziałują na układ immunologiczny ze względu na obecność lipopolisacharydu [28]. Co więcej, metagenomowy „screening” mikroflory chorego jelita pacjentów dotkniętych CD wykazał, że zawiera ona wiele niepatogennych bakterii, które w sposób wzmożony wpływają na ludzki układ odpornościowy, np. *Bacteroides vulgatus* [27], jak również charakteryzuje się zmniejszoną liczbą bakterii „protektynnych”, wykazujących właściwości przeciwwapalne, np. *Faecalibacterium prausnitzii* (dawniej *Fusobacterium prausnitzii*) [22, 53].

Jednocześnie ze stwierdzonym spadkiem liczby przedstawicieli typu *Firmicutes*, zaobserwowano zredukowaną liczbę bakterii gatunków *Clostridium leptum* i *Clostridium coccooides*, które należą do wymienionego typu [2, 28]. Bakterie rodzaju *Clostridium* grupy XIVa i IV produkują duże ilości maślanu [3], który nie tylko pełni niezwykle ważną rolę źródła energii dla kolonocytów [41], ale wpływa także na zahamowanie aktywności czynnika NF- κ B – tym samym obniżając poziom cytokin prozapalnych [44]. Co więcej, indukując produkcję mucyny i antybakteryjnych peptydów oraz wzmacniając ścisłe połączenia pomiędzy komórkami nabłonka, poprawiają wydatnie stan bariery śluzówkowej [59]. Nieprawidłowe ilości maślanu rzutują również na proliferację innych gatunków drobnoustrojów u osób cierpiących na omawianą chorobę. Spadek liczby mikroorganizmów rodzaju *Clostridium* odnotowano u pacjentów z remisją CD, co sugeruje, że zmiana ta jest pierwotna i wpływa na późniejsze perturbacje mikroflory oraz na rozwój stanu zapalnego [28].

Wartym uwagi przedstawicielem grupy IV rodzaju *Clostridium* jest gatunek *Faecalibacterium prausnitzii*, którego ilościowy spadek w porównaniu do osób zdrowych, został wykryty u pacjentów z aktywną chorobą Leśniowskiego-Crohna [22, 53]. Redukcję liczby komórek tego gatunku drobnoustrojów skorelowano ze zwiększonym ryzykiem pooperacyjnego nawrotu CD obejmującego jelito kręte. Dodatkowo, bakterię tę charakteryzują dwie cechy, których brak jest koherentny

z patologią CD – *F. prausnitzii* wykazuje bowiem aktywność przeciwzapalną oraz posiada zdolność produkcji maślanu [48].

Odpowiednio wysoki poziom różnorodności mikroflory jelitowej jest niezwykle ważny, ponieważ wywołuje redundancję pełnionych przez bakterie funkcji, która gwarantuje przeprowadzanie kluczowych procesów w tym środowisku [31]. Generalnie akceptowany jest, bazujący na wynikach metagenomowych badań porównawczych, pogląd, że mikroflora osób cierpiących na choroby zapalne jelita odznacza się mniejszą różnorodnością w porównaniu do mikroflory kolonizującej jelita zdrowego człowieka. Dotyczy to zarówno mikroorganizmów fekalnych jak i tych związanych ze śluzówką, tworzących biofilm [42, 46]. W przypadku biofilmu osób cierpiących na CD, po ustaleniu jego bioróżnorodności na podstawie analiz nukleotydowych sekwencji genu 16S rRNA, wykazano, że jest on znacznie uboższy w gatunki bakterii niż biofilm pochodzący od osób zdrowych. Badacze podejrzewają, że powodem niskiego poziomu różnorodności mikroflory przylegającej do śluzówki są zakłócające równowagę mikrobiologiczną przemiany metaboliczne [36].

Porównano także stan mikrobiologiczny bioptatów pochodzących z tkanek osób zdrowych i tkanek osób chorych: tych dotkniętych stanem zapalnym oraz bez stanu zapalnego. Najwyższy poziom różnorodności mikrobiologicznej wykazuje zdrowa tkanka osoby chorej a najniższy – tkanka, w której rozwinął się stan zapalny. Sugeruje to, że wraz z rozwojem odpowiedzi immunologicznej skład mikroflory ulega zubożeniu, mimo, że pierwsze zmiany patologiczne wywoływały wzrost różnorodności mikrobiologicznej. S e p h e r i i wsp. interpretując przedzapalny etap podniesienia poziomu różnorodności, wskazują na rekrutację przejściowej populacji mikroorganizmów, które mogą mieć kluczowe znaczenie w patogenezie CD [46].

Pierwsze dane eksperymentalne wskazują na obniżenie liczby komórek także innych gatunków drobnoustrojów zaobserwowany u chorych na CD. Należą do nich: *Bacillus vulgatus*, *Bacteroides fragilis* [55], *B. uniformis* [9], *Bifidobacterium adolescentis*, *Dialister invisus* [22], *Faecalibacterium*, *Subdoligranula*, *Lachnospiraceae* [4] i niescharakteryzowane gatunki z grupy *Clostridium* XIVa [22]. Zaobserwowano także wzrost liczby bakterii przedstawicieli typów *Proteobacteria*, *Actinobacteria* [12], rodziny *Enterobacteriaceae*, oraz gatunków *Eubacterium halii*, *E. cylindroides* [53] i *Ruminococcus gnavus* [22].

Bez względu na to, analizując zmiany dysbiotyczne mikroflory chorych na CD należy uwzględnić zmiany składu drobnoustrojów w czasie. Wykazano, że mikroflora osób chorych na CD jest mniej stabilna niż osób zdrowych. Badacze koncentrują się w szczególności na analizie zmian liczby bakterii rodzajów *Clostridium* i *Bacteroides*. Porównanie kompozycji mikroflory osób z aktywną

chorobą do składu mikroflory osób z jej remisją może ułatwić identyfikację grup bakterii mających istotny udział w rozwoju stanu zapalnego [43].

Kilka grup badawczych w sposób niezależny udokumentowało ostatnio, że rozwój CD może być związany z występowaniem niektórych szczepów gatunku *E. coli* [29, 52], co znalazło potwierdzenie w analizach metagenomowych (identyfikacja 16S rDNA *E. coli*) [4]. Analiza bioptatów okrężnicy pobranych od osób dotkniętych CD wykazała obecność wielu drobnoustrojów wewnątrz warstwy śluzówkowej, z czego ponad 50% stanowiły bakterie gatunku *E. coli* [29]. U osób zdrowych ten gatunek drobnoustrojów stanowi mniej niż 1% ogólnej mikroflory jelitowej [40]. Dodatkowo, znaczenie *E. coli* w przebiegu CD potwierdza fakt znacznie podwyższonego poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko flagelinie tego mikroorganizmu u osób chorych [48]. *E. coli* wykrywana w tkankach pacjentów cierpiących na CD należy do grupy filogenetycznej B2 i D [25] i charakteryzuje się wieloma nietypowymi właściwościami fenotypowymi/genotypowymi. Biorąc pod uwagę nietypowe patogenne właściwości tej bakterii, nadano jej nazwę AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) i uznano ją za nowy patotyp gatunku *E. coli* [5]. Komórki tego wiro/patotypu *E. coli* są zdolne do adhezji i inwazji do komórek nabłonka śluzówki na drodze makropinocytozy. W procesach adhezji i inwazyjności istotną rolę odgrywiają dwa receptory komórek nabłonkowych, białko CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule) i białko opiekuńcze GP96, oraz wytwarzane pęcherzyki błony zewnętrznej OMV (outer membrane vesicles) dostarczające do komórek nabłonkowych białka bakteryjne. Nadekspresja genu kodującego CEACAM6 może być cechą predysponującą do wystąpienia CD [42]. Po indukcji lizy błony endosomu bakterie namnażają się w cytoplazmie komórek gospodarza. AIEC *E. coli* pokonuje barierę śluzówki jelit także przez komórki M kępek Peyera [40] a pierwsze uszkodzenia tkanek w CD dotyczą właśnie rejonu kępek Peyera [14]. W warstwie podśluzówkowej, komórki bakteryjne dokonują inwazji makrofagów i bez przeszkód proliferują w ich wnętrzu – zademonstrowano tę ich cechę zarówno w eksperymentach wykonanych *in vitro* [6] jak i *in vivo* [26]. Inwazja nie powoduje apoptozy wspomnianych komórek żernych, jednakże charakteryzują się one zaburzoną sekrecją cytokiny prozapalnej TNF- α (tumour necrosis factor alpha), podwyższonym poziomem wydzielania IL-23 i obniżonym IL-10. Zmiany te mogą mieć udział w wywoływaniu stanu zapalnego [7]. Szczepy AIEC prawdopodobnie odgrywają rolę w początkowych stadiach rozwoju choroby [46], można je więc uznać za pierwotny czynnik etiologiczny CD. Wielu nowych informacji dostarczyła pełna sekwencja nukleotydowa genomu AIEC, na który składa się chromosom o wielkości 4.77 Mb i plazmid

o wielkości 108 Kb. Organizacja genomu tego patotypu jest podobna do genomów innych patotypów *E. coli* – głównie do genomu szczepów APEC (avian pathogenic *E. coli*). Genom AIEC zawiera cztery wyspy patogenności (PAI I–IV), które kodują m.in. białka systemu sekrecji typu IV, białka fimbrinopodobne, adhezynę FimH, proteazy serynowe, białka wykorzystywane w procesie inwazji, czynnik specyficzny dla kępek Peyera (Peyer's patch-specific factor) oraz białka o niepoznanej funkcji [33]. Przeprowadzone ostatnio eksperymenty porównawczej genomiki dostarczyły odmiennych danych dotyczących wirotypów *E. coli* kolonizujących jelita pacjentów chorych na CD. Autorzy porównali metodami hybrydyzacji genomy trzynastu szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów ze stanami zapalnymi jelit (IBD – inflammatory bowel disease), w tym CD, z sekwencjami nukleotydowymi trzydziestu jeden komensalnych i patogennych *E. coli* o zsekwencjonowanych genomach. Wyniki eksperymentów wskazują na heterogenność populacji *E. coli* izolowanych od chorych, co może oznaczać trudności w identyfikacji markerów genetycznych przydatnych w diagnozie choroby [61].

Nie tylko adherento-inwazyjne szczepy *E. coli* znajdują się na liście potencjalnych czynników etiologicznych CD. Wśród innych wymienić można *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* [11], *Chlamydia pneumoniae* [8]. Kontrowersyjne są dane eksperymentalne dotyczące udziału fakultatywnego wewnątrzkomórkowego patogenu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* w indukcji CD. W zależności od grupy badawczej i zastosowanej techniki wykrywania patogenu stwierdzano jego obecność lub brak u osób chorych [1]. Dodać też można, że pomimo niekiedy bardzo silnych korelacji obecności *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* z występowaniem CD, terapie skierowane przeciwko tej bakterii nie przynoszą poprawy zdrowia pacjentów [58]. Z drugiej strony udokumentowano wysoki poziom przeciwciał specyficznych w stosunku do antygenów tego gatunku bakterii w surowicy chorych [34].

Pomimo wielu wnikliwych badań dotyczących dysbiozy, nadal trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy jest ona przyczyną stanu zapalnego, czy też jedynie wtórnym efektem zmian chorobowych [57]. Badania, wykazujące zmiany dysbiotyczne u osób zdrowych spokrewnionych z chorymi na CD [22] zdają się przechylać szalę wagi na korzyść teorii, mówiącej o dysbiozie jako przyczynie choroby i świadczą o wpływie czynników genetycznych bądź środowiskowych na jej rozwój [57], aczkolwiek pełne wyjaśnienie problemu wymaga dalszych badań. Jak dotąd udało się stwierdzić, że: a) skomplikowana, ale zrównoważona pod względem składu gatunkowego mikroflora, której kompozycja ulega zaburzeniu, wykazuje zakłócone relacje pomiędzy specyficznymi grupami bakteryjnymi; redukcja pewnej grupy bakterii pociąga za sobą wzrost liczby

bakterii innej grupy, co może mieć negatywny wpływ na zdrowie gospodarza, b) nieprawidłowe ilości (niedobór lub nadmiar) pewnych substancji produkowanych przez mikroorganizmy jelitowe mają wpływ na organizm gospodarza, c) anomalie w zwykle stabilnej kompozycji mikroflory utrudniają gospodarzowi rozpoznawanie mikroorganizmów jako „swoich”, d) zmiany dysbiotyczne charakterystyczne dla CD zdają się również dotyczyć wzrostu liczby bakterii o wzmożonej sile oddziaływania na układ immunologiczny. Jednocześnie, obserwuje się spadek liczby bakterii, które posiadają właściwości łagodzące w odniesieniu do stanu zapalnego.

Dalsze badania powinny także ustalić czy rzeczywiście konkretny patogen może indukować zmiany dysbiotyczne w normalnej mikroflorze. Najbardziej wiarygodną wydaje się hipoteza wskazująca na adherento-inwazyjne szczepy *E. coli* jako istotny czynnik etiologiczny rozwoju CD.

3.2. Organizacja przestrzenna mikroorganizmów flory jelit

Żeby dokładnie scharakteryzować mikroflorę jelitową, wiedzę o jej kompozycji warto dopełnić informacją o usytuowaniu poszczególnych grup mikroorganizmów w przestrzeni.

Techniki, które pozwalają na takie badania wymagają przeprowadzenia na próbce biopsyjnej FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), wizualizacji za pomocą barwnika DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fotodokumentacji i kwantyfikacji. Dzięki użyciu wielu sond specyficznie wykrywających przedstawicieli różnych grup bakteryjnych i odpowiednio przygotowanego biopłynu, można z łatwością określić miejsce bytowania danej grupy bakterii. Co więcej – równoczesne użycie dodatkowych barwników obok DAPI, daje możliwość zbadania relacji przestrzennych pomiędzy danymi grupami mikroorganizmów, jak również pozwala na porównanie ich rozmieszczenia w stosunku do makroskopowych zmian tkankowych [53, 55].

U cierpiących na CD istotne znaczenie ma analiza biofilmu, jako że bakterie tworzące biofilm bezpośrednio oddziałują z żywą tkanką. Porównanie danych eksperymentalnych otrzymanych z użyciem metody FISH ze zmianami makroskopowymi, wykazało, że integralność i grubość biofilmu wzrastały wraz ze wzrostem koncentracji bakterii śluzówkowych [52]. Ponadto, sygnały sond wykrywających przedstawicieli grupy *Bacteroides* w biofilmie stanowiły nawet do 80% wszystkich sygnałów wykrywających bakterie zaadherowane do śluzówki, z czego najczęściej pojawiającym się mikroorganizmem był gatunek *Bacteroides fragilis* [55] – mikroorganizm podejrzany o udział w wywoływaniu CD [38]. Wykazano również obecność adherentnych *E. coli*, które występowały w postaci miejscowych, niemalże

jednorodnych prążków (ang. band) – jednakże tylko u niektórych pacjentów. W obrębie biofilmu pojawiały się także w mniejszych, ale nadal znaczących ilościach takie gatunki bakterii jak *Eubacterium rectale*, *Enterococcus faecalis* i *Faecalibacterium prausnitzii* (dawniej *Fusobacterium prausnitzii*) [55].

Bazując na technice FISH, Swidsinski i wsp. odkryli wiele interesujących różnic pomiędzy dystalną a proksymalną częścią okrężnicy zdrowych myszy, co może mieć znaczenie przy badaniu chorób zapalnych jelita grubego [53]. Mikroorganizmy obu regionów różnią się między sobą przede wszystkim położeniem względem ścianki jelita. O ile w proksymalnej części okrężnicy drobnoustroje komensalne cechuje bezpośredni kontakt ze ścianką, tak w części dystalnej sytuacja jest odwrotna. Wziąwszy pod uwagę fakt, iż zapalenie jelita grubego częściej dotyka regionu dystalnego okrężnicy [21], wysunięto przypuszczenie, że owa styczność mikroorganizmów do ścianki jelita jest czynnikiem wpływającym na wytworzenie tolerancji organizmu gospodarza [53].

Skład mikroflory fekalnej i zasocjowanej ze śluzówką różni się nie tylko pod względem kompozycji jakościowej, ale również ilościowo. Technika FISH z użyciem sond uniwersalnych (wykrywających z założenia 16S rRNA wszystkich bakterii), wykazała wyższą koncentrację komórek bakteryjnych przylegających do śluzówki u pacjentów z CD w porównaniu do grupy kontrolnej [52, 55], w dodatku zwiększającą się wraz z stanem zaawansowania odczynu zapalnego [52]. Przeciwnie zjawisko, tj. zmniejszenie liczby bakterii, zaobserwowano przy szacowaniu liczby komórek bakteryjnych masy fekalnej okrężnicy [53].

4. Przyszłość metagenomiki w badaniu CD

Całościowe analizy materiału genetycznego danego środowiska, czyli metagenomika, bez wątpienia dostarczyły cennych danych dotyczących mikroflory jelit dotkniętych stanem zapalnym, a jej przyszły wkład w zrozumienie procesów indukcji choroby bez wątpienia może okazać się znaczący. Niżej podano przyszłe cele badań metagenomowych mogących przyczynić się do zrozumieniu patogenyzy CD [25, 37]. Obejmują one: a) zdefiniowanie na różnych poziomach rozdzielczości lokalizacji mikroorganizmów w jelitach; przeprowadzenie badań porównawczych zmian przestrzennego rozmieszczenia mikroorganizmów, b) opracowanie strategii badania ludzkiej mikroflory przeniesionej do jelit gnotobiotycznych myszy, c) przeprowadzenie systemowych analiz meta-proteomicznych, meta-transkryptomicznych i meta-metabolomicznych populacji mikroorganizmów jelita, e) przeprowadzenie badań mikroflory bliźniąt jednojajowych różniących się występowaniem nieswoistej choroby zapalnej jelita, f) identyfikacja

biomarkerów różnych stadiów CD i wykorzystanie ich w ocenie ryzyka zapadalności na CD, określaniu fazy choroby, przewidywaniu i indywidualizacji terapii.

5. Podsumowanie

Ogólnym celem badań dotyczących przebiegu patogenyzy CD jest zrozumienie interakcji bakterii z gospodarzem. Istotnym elementem tych badań jest charakterystyka mikroflory w stanie dysbiozy jelitowej i połączenie tych zmian z dysfunkcją nabłonka, zaburzoną usuwaniem bakterii i zmianami genotypu gospodarza skutkującymi zachwianiem procesów immunoregulacyjnych. Należy także wyjaśnić, czy pierwotnym inicjatorem choroby są bakterie czy nieprawidłowo funkcjonujący układ immunologiczny. Innowacyjność podejścia metagenomicznego w badaniach nad patogenyzą tego schorzenia polega na ucieczce od tradycyjnego zawężania uwagi do jednego gatunku bakterii (głównie patogennych), stanowiących czynnik etiologiczny danej choroby, na rzecz złożonych badań ekologicznych całej populacji mikroorganizmów. Patologiczne zmiany są bowiem wypadkową interakcji w obrębie mikroflory, obejmującej zarówno gatunki drobnoustrojów komensalnych jak i patogennych, oraz statusu immunologicznego i genetycznego gospodarza.

Poznanie sekwencji nukleotydowych materiału genetycznego jelitowych populacji mikroorganizmów nie tylko umożliwia zidentyfikowanie poszczególnych szczebli taksonomicznych prokariotów, ale również daje okazję do stworzenia katalogu genów i odpowiadającym im funkcji. Wielowymiarowość badań z pewnością poszerza możliwość skorelowania zmian dysbiotycznych z funkcjami mikroorganizmów, lokalizacją danej populacji bakterii, jak również pozwoli prowadzić badania stabilności mikroflory.

Skoro genom w całości determinuje fenotyp danego organizmu, czyż metagenomika nie stanowi idealnego klucza do niezwykle dokładnego i wszechstronnego opisu ludzkiej mikroflory? Bez cienia wątpliwości można powiedzieć, że to prawda, choć jednocześnie trzeba mieć na uwadze fakt, że dziedzina ta znajduje się dopiero na początku swej fascynującej drogi, która niewątpliwie przyczyni się do rozwoju nauki, w tym lepszego zrozumienia wpływu mikroorganizmów na stan zdrowia człowieka.

Literatura

1. Abubakar I., Myhill D., Aliyu S.H., Hunter, P. R.: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 401–410 (2008)

2. Andoh A., Imaeda H., Aomatsu T., Inatomi O., Bamba S., Sasaki M., Saito Y., Tsujikawa T., Fujiyama Y.: Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gastroenterol.* **46**, 479–486 (2011)
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. Baumgart M., K.W. Simpson i wsp.: Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J.* **1**, 403–418 (2007)
5. Boudeau J., Glasser A.L., Masseret E., Joly B., Darfeuille-Michaud A.: Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **67**, 4499–4509 (1999)
6. Bringer M.A., Glasser A.L., Tung C.H., Meresse S., Darfeuille-Michaud A.: The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol.* **8**, 471–484 (2006)
7. Campos N., Sarmiento A. i wsp.: Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor- α secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection. *Immunobiology*, **216**, 961–970 (2011)
8. Chen W., Li D., Wilson I., Chadwick V.S.: Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 987–993 (2002)
9. Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M., Järnerot G., Tysk C., Apajalahti J., Engstrand L., Jansson J.K.: Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *Isme J.* **2**, 716–727 (2008)
10. 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)
11. Fava F., Danese S.: Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J. Gastroenterol.* **17**, 557–566 (2011)
12. 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)
13. Franke A., M. Parkes i wsp.: Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–1125 (2010)
14. Fujimura Y., Kamoi R., Iida M.: Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*, **38**, 724–732 (1996)
15. Gassler N., Rohr C., Schneider A., Kartenbeck J., Bach A., Obermüller N., Otto H.F., Autschbach F.: Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, 216–228 (2001)
16. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M.: Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, 245–249 (1998)
17. Hugot J.P., Thomas G. i wsp.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 599–603 (2001)
18. Hugot J.P., Parkes M. i wsp.: Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 1259–1267 (2007)
19. Inohara N., Nunez G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382 (2003)
20. Inohara N., Ogura Y., Chen F.F., Muto A., Nunez G.: Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **276**, 2551–2554 (2001)
21. Isbister W.H.: Colonoscopy: how far is enough? *Aust. N.Z.J. Surg.* **65**, 44–47 (1995)
22. Joossens M., Huys G., Cnockaert M., De Preter V., Verbeke K., Rutgeerts P., Vandamme P., Vermeire S.: Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, **60**, 631–637 (2011)
23. Kobayashi K.S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell R.A.: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, **307**, 731–734 (2005)
24. Kosovac K., Brenmoehl J., Holler E., Falk W., Schoelmerich J., Hausmann M., Rogler G.: Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1311–1321 (2010)
25. Kotlowski R., Bernstein C.N., Sepehri S., Krause D.O.: High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 669–675 (2007)
26. Liu Y., van Kruiningen H.J., West A.B., Cartun R.W., Cortot A., Colombel J.F.: Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **108**, 1396–1404 (1995)
27. Mangin, Doré J. i wsp.: Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**, 25–36 (2004)
28. Manichanh C., Doré J. i wsp.: Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, **55**, 205–211 (2006)
29. Martin H.M., Campbell B.J., Hart C.A., Mpfu C., Nayar M., Singh R., Englyst H., Williams H.F., Rhodes J.M.: Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, **127**, 80–93 (2004)
30. Maśliński S., Ryżewski J., Patofizjologia dla studentów medycyny. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa, 1998 s. 733–739 i 777
31. McCann K. S. The diversity-stability debate. *Nature*, **405**, 228–233 (2000).
32. McGuckin M.A., Eri R., Simms L.A., Florin T.H., Radford-Smith G.: Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 100–113 (2009)
33. Miquel S., Darfeuille-Michaud A. i wsp.: Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One*, **5**, 12714 (2010)
34. Naser S.A., Hulten K., Shafran I., Graham D.Y., El-Zaatari F.A.: Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **77**, 497–504 (2000)
35. Nuding S., Fellermann K., Wehkamp J., Stange E.F.: Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*, **56**, 1240–1247 (2007)
36. Ott S.J., Musfeldt M., Wenderoth D.F., Hampe J., Brant O., Fölsch U.R., Timmis K.N., Schreiber S.: Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 685–693 (2004)

37. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I.: Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell. Host. Microbe*, **3**, 417–427 (2008)
38. Rabizadeh S., Rhee K.J., Wu S., Huso D., Gan C.M., Golub J.E., Wu X., Zhang M., Sears C.L.: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1475–1483 (2007)
39. Resnick R.H., Royal H., Marshall W., Barron R., Werth T.: Intestinal permeability in gastrointestinal disorders. Use of oral [^{99m}Tc]DTPA. *Dig. Dis. Sci.* **35**, 205–211 (1990)
40. Rhodes J.M.: The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 610–612 (2007)
41. Roediger W.E.: The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*, **2**, 712–715 (1980)
42. Rohlion N., Hofman P., Darfeuille-Michaud A.: The endoplasmic reticulum stress response chaperone: Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, **2**, 115–119 (2011)
43. Scanlan P.D., Shanahan F., O'Mahony C., Marchesi J.R.: Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3980–3988 (2006)
44. Schmitz H., Fromm M., Bentzel C.J., Scholz P., Detjen K., Mankertz J., Bode H., Epple H.J., Riecken E.O., Schulzke J.D.: Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.* **112**, 137–146 (1999)
45. Segain J.P., Raingeard de la Blétière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottière H.M., Galliche J.P.: Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, **47**, 397–403 (2000)
46. Sepeshri S., Khafipour E., Bernstein C.N., Coombes B.K., Pilar A.V., Karmali M., Ziebell K., Krause D.O.: Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1451–1463 (2011)
47. Sepeshri S., Kotlowski R., Bernstein C.N., Krause D.O.: Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 675–683 (2007)
48. Sitaraman S.V., Klapproth J.M., Moore D.A., Landers C., Targan S., Williams I.R., Gewirtz A.T.: Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, 403–406 (2005)
49. Sokol H., P. Langella i wsp.: *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16731–16736 (2008)
50. Sperandio B., Regnault B., Guo J., Zhang Z., Stanley S.L. Jr, Sansonetti P.J., Pédrón T.J.: Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *Exp. Med.* **205**, 1121–1132 (2008)
51. Strober W., Fuss I., Mannon P.: The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 514–521 (2007)
52. Swidsinski A., Lochs H. i wsp.: Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002)
53. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Lochs H., Hale L.P.: Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* **11**, 1131–1140 (2005)
54. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Vaneechoutte M., Doerffel Y.: Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 147–161 (2008)
55. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L.P., Lochs H.: Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3380–3389 (2005)
56. Takaishi H., Hibi T. i wsp.: Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 463–472 (2008)
57. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., Colombel J.F.: Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 1–4 (2004)
58. Thomas G.A., Swift G.L., Green J.T., Newcombe R.G., Braniff-Mathews C., Rhodes J., Wilkinson S., Strohmeyer G., Kreuzpainter G.: Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut*, **42**, 497–500 (1998)
59. Uehara A., Yang S., Fujimoto Y., Fukase K., Kusumoto S., Shibata K., Sugawara S., Takada H.: Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocyte cells in culture. *Cell Microbiol.* **7**, 53–61 (2005)
60. Vanhoutvin S.A., Troost F.J., Hamer H.M., Lindsey P.J., Koek G.H., Jonkers D.M., Kodde A., Venema K., Brummer R.J.: Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One*, **4**, 6759 (2009)
61. Vejborg R.M., Hancock V., Petersen A.M., Krogfelt K.A., Klemm P.: Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics*, **12**, 316 (2011)
62. Vermeire S.: NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 569–575 (2004)
63. Walker A.W., Sanderson J.D., Churcher C., Parkes G.C., Hudspeth B.N., Rayment N., Brostoff J., Parkhill J., Dougan G., Petrovska L.: High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* **11**, 7 (2011)
64. Wehkamp J., Stange E.F., Fellermann K.: Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **33** Suppl 3, 137–144 (2009)
65. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* **50**, 223–234 (2011)