



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU Z ODDZIAŁEM PIELĘGNIARSTWA  
I INSTYTUTEM MEDYCZYNY MORSKIEJ I TROPIKALNEJ

**AGATA JANCZY**

**WPŁYW DIETY REDUKCYJNEJ I SUPLEMENTACJI PROBIOTYKU  
NA MIKROBIOM I PRZEPUSZCZALNOŚĆ JELIT U OSÓB  
Z NADWAGĄ I OTYŁOŚCIĄ**

Praca na stopień doktora nauk o zdrowiu  
Promotor dr hab. Sylwia Małgorzewicz, prof. nadzw.  
Katedra Żywienia Klinicznego, Gdańsk Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2019

*Składam serdeczne podziękowania  
Pani Profesor Sylwii Małgorzewicz  
za pomoc, opiekę merytoryczną  
oraz możliwość przeprowadzenia badań*

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów .....	5
Wstęp .....	7
Nadwaga i otyłość – charakterystyka epidemiologiczna .....	7
Typy otyłości i metody klasyfikacji .....	8
Mikrobiom jelitowy .....	10
Metody oceny ekosystemu jelitowego .....	11
Rozmieszczenie mikroorganizmów w różnych odcinkach przewodu pokarmowego i ich funkcje .....	12
Stan zapalny a budowa bariery jelitowej .....	16
Nadwaga i otyłość - rola i zmiany mikrobiomu jelitowego .....	18
Udział mikrobioty jelit w fermentacji polisacharydów zawartych w diecie .....	19
Udział mikrobioty jelit w metabolizmie monosacharydów i kwasów tłuszczowych ...	19
Bariera jelitowa i endotoksemia .....	20
Zmiany w mikrobiomie jelitowym towarzyszące otyłości .....	20
Otyłość a stan zapalny .....	21
Zonulina – marker stabilności bariery jelitowej .....	23
Laktoferyna – marker stanu zapalnego .....	24
Probiotyki w terapii nadwagi i otyłości .....	25
Cel pracy .....	26
Hipoteza badawcza .....	26
Materiał i metody .....	26
Schemat badania .....	26
Kryteria włączenia do badania i podział na grupy .....	28
Charakterystyka grupy badanej .....	29
Badania dodatkowe .....	30
Charakterystyka stosowanego preparatu probiotycznego .....	31
Opis badania bakteriologicznego .....	32
Opis badania mikologicznego .....	33
Oznaczenie w próbkach kału stężenia zonuliny .....	34
Oznaczenie w próbkach kału stężenia laktoferyny .....	34
Algorytm postępowania dietetycznego .....	35
Analiza statystyczna .....	36
Wyniki .....	37
Analiza częstości spożycia żywności .....	37

Analiza zmian parametrów antropometrycznych w trakcie terapii .....	37
Stężenie markerów stanu zapalnego i przepuszczalności jelit w badanych grupach.....	42
Analiza zależności zonuliny i laktoferyny od wybranych parametrów antropometrycznych ..	43
Analiza mikrobiologiczna próbek kału .....	44
Związek pomiędzy mikrobiomem jelit a zonuliną i laktoferyną oraz parametrami antropometrycznymi .....	49
Podsumowanie uzyskanych wyników .....	68
Dyskusja.....	70
Wnioski.....	82
Streszczenie .....	83
Summary .....	85
Aneks .....	87
Piśmiennictwo .....	117
Spis tabel, schematów i wykresów.....	126

## Wykaz stosowanych skrótów

AMPK (*activated protein kinase*) - kinaza białkowa aktywowana przez AMP

BMI (*Body Mass Index*) - wskaźnik masy ciała

BMR (*Basal Metabolic Rate*) - podstawowa przemiana materii

CAMPs (*cationic antimicrobial peptides*) - kationowe peptydy o antybakteryjnej aktywności

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) - Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa

FFQ-6 (*Food Frequency Questionnaire*) - kwestionariusza częstości spożycia żywności

FIAF (*fasting-induced adipocyte factor*) - czynnik tkankowy indukowany głodem

GALT (*gut associated lymphoid tissue*) - tkanka limfatyczna związana z jelitami

GF (*germ free*)

GI (*gastrointestinal tract*) - przewód pokarmowy

HMP (*Human Microbiome Project*)

IASO (*International Association for the Study of Obesity*) - Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Otyłością

IDF (*International Diabetes Federation*) - Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna

IEC (*intestinal epithelial cell*) - komórka nabłonka jelitowego

IEL (*intraepithelial lymphocytes*) - limfocyty śród nabłonkowe

IL-6 - interleukina 6

IOTF (*International Obesity Task Force*)

JAM (*junctional adhesion molecules*) - białka adhezyjne

LBM (*Lean Body Mass*) - beztłuszczowa masa ciała

LF (*lactoferrin*) - laktoferyna

LPL (*lipoprotein lipase*) - lipaza lipoproteinowa

MALT (*mucosal-associated lymphoid tissue*) - tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi

MBF (*Mass of Body Fat*) - masa tkanki tłuszczowej

PBF (*Percent of Body Fat*) - procentowa zawartość tkanki tłuszczowej

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - łańcuchowa reakcja polimerazy

PSA - polisacharyd bakteryjny

PTD - Polskie Towarzystwo Dietetyki

SCFA (*Short Chain Fatty Acid*) - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

T2D (*Diabetes type 2*) - cukrzyca typu 2

TAG (*triacylglycerides*) - triacyloglicerole

TBW (*Total Body Water*) - zawartość wody całkowitej

TJ (*tight junction*) - połączenia ścisłe

TLR (*Toll-like receptor*) - receptory toll-podobne

TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) - czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

WHO (*World Health Organization*) - Światowa Organizacja Zdrowia

WHR (*Waist to Hip Ratio*) - stosunek obwodu talii do obwodu bioder

ZO-1 (*zonula occludens protein 1*) - białko 1 obwódki zamykającej

ZOT (*zonula occludens toxin*) - toksyna produkowana przez bakterie *Vibrio cholerae*

## Wstęp

### Nadwaga i otyłość – charakterystyka epidemiologiczna

Rosnące rozpowszechnienie problemu nadwagi i otyłości stanowi w ostatnich latach ważny problem społeczny. Nadmierny przyrost masy ciała dotyczy nie tylko mieszkańców krajów rozwiniętych, ale również krajów rozwijających się. Za główną przyczynę takiego zjawiska podaje się zmiany w stylu życia, szczególnie zmniejszenie aktywności fizycznej i złe nawyki żywieniowe, przede wszystkim nadkonsumpcję produktów wysokoenergetycznych [1]. Ponieważ otyłość dotyczy blisko 20% osób na świecie zalicza się ją do chorób cywilizacyjnych. Natomiast z danych epidemiologicznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – *World Health Organization*) wynika, że otyłość jest szóstą co do ważności przyczyną zgonów na świecie [3].

W ostatnich latach WHO wskazuje na niepokojący wzrost liczby osób z nadwagą i otyłością. Szacunkowe dane WHO wskazują, że w 2016 roku nadwaga (BMI, *Body Mass Index*  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) dotyczyła 39% społeczeństwa powyżej 18 roku życia (39% mężczyzn i 40% kobiet), natomiast otyłość (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) występowała u 11% dorosłych (11% mężczyzn i 15% kobiet). Globalnie problem nadwagi dotyczy ponad 1,9 miliarda ludzi na świecie, a ponad 650 milionów cierpi z powodu otyłości [4]. Dane pochodzące z krajów europejskich wskazują, że ponad 50% społeczeństwa ma nadwagę, natomiast u 30% rozpoznaje się otyłość. Europejski Raport Żywienia i Zdrowia z 2009 roku (*European Nutrition and Health Report*) wskazuje, że do krajów gdzie nadwaga i otyłość występują w największym stopniu należy Grecja. Tutaj 51% mężczyzn i 37% kobiet ma nadwagę, a 28% mężczyzn i 38% kobiet jest otyła. Z drugiej strony nadmierna masa ciała rzadziej dotyczy mieszkańców Francji, Szwecji, Danii czy Norwegii, nadwaga dotyka 35-41% mężczyzn i 20-24% kobiet, a otyłość dotyczy 7-9% mężczyzn i 6-8% kobiet [5].

W Polsce nadwaga i otyłość jest poważnym problemem epidemiologicznym, co pod względem liczby osób z nadmierną masą ciała plasuje Polskę w czołówce europejskiej. W badaniach Instytutu Żywności i Żywienia z 2000 roku występowanie nadwagi wykazano u 41% mężczyzn i 28,7% kobiet, a otyłość u 15,7% mężczyzn i 19,9% kobiet [6, 7].

Wśród mieszkańców Polski występowanie otyłości było przedmiotem badań programu NATPOL prowadzonego w 1997 i 2002 roku. Wykazano, że w roku 1997 otyłość dotyczyła 16% mężczyzn i 19% kobiet, natomiast już w roku 2002 nadwagę odnotowano u 34% społeczeństwa (29% kobiet i 39% mężczyzn), a otyłość u 19% (19% mężczyzn i 19% kobiet) [8]. Co szczególnie istotne, w roku 2011 przeprowadzono ponownie badania w ramach programu NATPOL i wykazano, że odsetek osób w przedziale wiekowym 18-34 lata cierpiących z powodu nadwagi wzrósł z 21,5% w 2002 roku do 25,7%. Odnotowano również wzrost liczby otyłych młodych osób, szczególnie kobiet w wieku 18-34 lata, z 4,4% w roku 2002 do 7,4% w roku 2011. Autorzy programu NATPOL prognozują, że brak

istotnych zmian w stylu życia Polaków spowoduje do roku 2035 wzrost liczby osób otyłych z 22% do 33%, czyli do ponad 9 milionów [15].

Dane pochodzące z prowadzonego w latach 2003-2005 Wieloośrodkowego Ogólnopolskiego Badania Stanu Zdrowia (WOBASZ) wśród osób w wieku 20-74 lata pokazują, że nadwaga dotyczy 40,4% mężczyzn i 27,9% kobiet, otyłość natomiast 21,% mężczyzn i 22,4% kobiet [9]. Należy zwrócić uwagę, że w Polsce, podobnie jak w krajach europejskich, rozpowszechnienie nadwagi i otyłości wśród dorosłych wykazuje tendencję wzrostową. Jak podaje Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Otyłością (IASO, *International Association for the Study of Obesity*) w latach 2003-2007 w Polsce, wśród kobiet blisko co czwarta (23,8%), wśród mężczyzn co piąty (20,8%) byli otyli [10].

Zarówno WHO jak i IOTF (*International Obesity Task Force*) prognozują, że w 2025 roku ponad połowa mieszkańców Stanów Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii czy Australii będzie otyła. Ryzyko takie dotyczy również Polaków. Powszechny rozwój ekonomiczny, mechanizacja i automatyzacja, a przede wszystkim nadmierna podaż żywności wysokoprzetworzonej przy niskiej aktywności fizycznej, sprzyjają rozwojowi nadwagi i otyłości. Ważne jest zatem promowanie zdrowego stylu życia, w celu zatrzymania niekorzystnej tendencji do gromadzenia nadmiernej masy ciała [14].

### **Typy otyłości i metody klasyfikacji**

Definicja nadwagi i otyłości mówi o nadmiernym lub nieprawidłowym nagromadzeniu tkanki tłuszczowej, konsekwencją czego jest wzrost masy ciała powyżej wartości prawidłowych, charakterystycznych dla danej płci, wieku czy rasy [2]. Zawartość tkanki tłuszczowej przekraczająca 25% masy ciała kobiet świadczy o występującej otyłości, w przypadku mężczyzn kiedy odsetek tkanki tłuszczowej jest powyżej 15% masy ciała [11,12].

Wskaźnikiem wykorzystywanym powszechnie do rozpoznawania nadwagi i otyłości jest BMI (*Body Mass Index*) definiowany jako stosunek masy ciała wyrażonej w kilogramach do kwadratu wysokości ciała wyrażonej w metrach [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] [13]. Szczegółową klasyfikację BMI zgodną z wytycznymi WHO przedstawia tabela 1.



Tabela 1. Klasyfikacja BMI według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO)

BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Interpretacja
< 18,5	Niedowaga
18,5-24,9	Prawidłowa masa ciała
25-29,9	Nadwaga
30-34,9	Otyłość I stopnia
35-39,9	Otyłość II stopnia
≥40	Otyłość III stopnia

Źródło: WHO. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2013

W diagnostyce nadwagi i otyłości równie istotne jest rozmieszczenie tkanki tłuszczowej, pozwalające wyróżnić dwa typy otyłości:

- otyłość brzuszną (trzewną) typu „jabłko”;
- otyłość gynoidalną (pośladkowo-udową) typu „gruszka”.

Wskaźnikiem pomocnym w określaniu typów otyłości jest obwód pasa do talii lub WHR (*Waist to Hip Ratio*) – stosunek obwodu talii (mierzonego dokładnie w połowie odległości między dolnym brzegiem łuków żebrowych, a górnym brzegiem grzebieni biodrowych) do obwodu bioder (mierzonego w największym obwodzie pośladków poniżej talerzy biodrowych). Otyłość brzuszną u osób dorosłych, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (IDF, *International Diabetes Federation*) diagnozuje się u mężczyzn, gdy obwód pasa przekracza 94 cm (WHR>1,0) i 80 cm u kobiet (WHR>0,85) [14].

Diagnostyka różnicowa dzieli otyłość na pierwotną (prostą) i wtórną. Przyczyną otyłości pierwotnej jest dodatni bilans energetyczny. W warunkach fizjologicznych zbilansowana dieta dostarcza energii, która zużywana jest w ok. 60% na pokrycie podstawowej przemiany materii, w 20% na aktywność fizyczną i ok. 20% na tzw. termogenezę poposiłkową. Nadmiar energii spożywanej w diecie jest magazynowany w tkance tłuszczowej, co prowadzi do rozwoju nadwagi i otyłości. Blisko 90% przypadków występowania otyłości jest związanych z otyłością prostą [16].

Po rozpoznaniu otyłości kolejnym krokiem w diagnostyce jest wykluczenie wtórnej otyłości, wynikającej m.in. z niedoczynności tarczycy, choroby i zespołu Cushinga, niedoboru hormonu wzrostu, rzekomej niedoczynności przytarczyc, zespołu policystycznych jajników, hipogonadyzmu czy uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, wad chromosomowych czy rzadkich zespołów uwarunkowanych genetycznie [17].

Układ odpornościowy organizmu oraz układ metaboliczny są ze sobą ściśle powiązane i zależne funkcjonalnie. Co za tym idzie spożywanie nadmiernej ilości energii z pożywieniem przez

osoby z nadwagą i otyłością jest dla organizmu zjawiskiem stresogennym i szkodliwym. Może to prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej w różnych tkankach związanych z metabolizmem, a w efekcie do pojawienia się stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, tzw. metazapalenia. Do czynników prawdopodobnie biorących udział w rozwoju zapalenia oprócz stresu oksydacyjnego, aktywacji inflammasomów, czyli czynników prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz interleukina 6 (IL-6) czy aktywacji receptorów TLR (*Toll-like receptor*), podaje się zaburzenia homeostazy mikrobiomu jelit [18].

### **Mikrobiom jelitowy**

Nową dziedziną wiedzy, budzącą obecnie coraz większe zainteresowanie ze strony nauk biologicznych, jak i medycyny, jest mikrobiom. Ludzki mikrobiom tworzą genomy oraz geny drobnoustrojów zarówno saprofitycznych, komensalnych jak i pasożytów zasiedlających organizm człowieka, ale także wzajemne zależności i interakcje ze środowiskiem. Mikrobiom stanowi zatem ekosystem zlokalizowany w ściśle określonych miejscach, takich jak np. przewód pokarmowy, skóra czy układ moczowo-płciowy [1].

Przypuszcza się, że organizm ludzki zasiedla około 10 razy większa liczba komórek bakterii, niż liczy on sam, z czego większość mikroorganizmów zasiedla właśnie przewód pokarmowy, stanowiąc tzw. mikroflorę endogenną – mikrobiotę [2]. Uważa się, że człowiek i jego mikrobiota tworzą superorganizm, którego wspólny genom określa się metagenomem [4].

Mikroorganizmy wykształciły mechanizmy umożliwiające im „porozumiewanie się” nie tylko pomiędzy sobą, mogą także prowadzić „dialog molekularny” z komórkami gospodarza. Taka wielokierunkowa sieć powiązań umożliwia przesyłanie sygnału i wzajemny kontakt pomiędzy bakteriami, ale także bakterii z gospodarzem oraz gospodarza z bakteriami. Wszystko to sprawia, że mikrobiota wraz z komórkami gospodarza tworzą interaktywny ekosystem wpływający na regulację wielu procesów biologicznych, w tym decydują o stanie zdrowia [4].

Zbierane na powierzchni komórek bakteryjnych sygnały środowiskowe transportowane są do cytoplazmy i przetwarzane przez system czuciowy (*quorum sensing signaling system*). Bakterie wykorzystują ten system komunikacji głównie do modyfikowania liczebności swojej populacji, ale również do odpowiedzi na czynniki pochodzące ze strony gospodarza, np. w efekcie uszkodzenia jego tkanek. Ten rodzaj współzależności (mutualizm) pomiędzy organizmem człowieka, a jego mikrobiotą stał się przyczyną rozwoju badań mających na celu ocenę różnic w składzie ludzkiego mikrobiomu zależnie od czynników takich jak: populacja, genotyp, stan zdrowia, wiek, sposób odżywiania się, środowisko życia czy stosowane leki [3].

Mikrobiota jelit jest aktualnie jednym z najszybciej rozwijających się tematów naukowych. Wiele projektów światowych, jak MetaHIT (Chiny i UE), MicrOBES (Francja) czy zainicjowany

w 2007 roku Human Microbiome Project – HMP (USA) skupia się na określeniu roli bakterii jelitowych w utrzymywaniu prawidłowego stanu zdrowia człowieka. Celem projektu HMP było poznanie genomów mikroorganizmów wchodzących w skład genomu człowieka, kształtującego jego metabolizm i wpływających na procesy fizjologiczne oraz skłonność do zapadania na różne choroby [7]. Wyniki otrzymane w ramach programu pozwoliły między innymi na scharakteryzowanie mikrobiomu człowieka w stopniu umożliwiającym badanie jego zmian w odniesieniu do populacji czy wielu innych czynników m.in. genotypu, stanu zdrowia, wieku, diety, stosowanych leków, środowiska życia [3].

Analiza mikrobiomu w odniesieniu do genotypu oraz metabolicznego fenotypu gospodarza, może umożliwić poznanie czynników, dzięki którym organizm człowieka oddziałuje na własne mikrobionty i ich reakcje, wpływając na zachowanie homeostazy w przewodzie pokarmowym. Metagenom człowieka oraz kodowany przez niego złożony proteom wpływają bowiem na predyspozycje do zapadania na choroby, odporność immunologiczną, czynniki chorobotwórczości, a także identyfikację patogenów nie poznanych dotychczas [5].

Przypuszcza się, że metagenom populacji wszystkich mikroorganizmów, które kolonizują ciało człowieka zawiera około 150 razy więcej genów niż genom człowieka [6]. Liczba komórek bakterii i archeonów zamieszkujących światło jelita szacowana jest na około  $10^{13}$ - $10^{14}$  jtk. [7]. Bakteryjny ekosystem jelit ze względu na swoją stosunkowo dużą masę (1-1,5 kg) oraz liczne funkcje nazywany jest narządem bakteryjnym [8].

### **Metody oceny ekosystemu jelitowego**

Ocena wzajemnych powiązań i oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składowymi jelitowego ekosystemu jest aktualnie narzędziem niezbędnym do poznania przyczyn występowania wielu jednostek chorobowych oraz wdrożenia leczenia celowanego.

Dotychczas do oceny składu mikrobioty jelit stosowano głównie badania oparte na izolacji i fenotypowej identyfikacji drobnoustrojów. Aktualnie obok standardowego posiewu mikrobiologicznego stosuje się analizę genetyczną. Opiera się ona głównie na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z amplifikacją 16S rRNA bakteryjnego. Dotychczas nowo rozpoznane sekwencje 16S rRNA porównywano ze zgromadzonymi w bazach danych znanymi sekwencjami i na tej podstawie identyfikowano gatunki mikroorganizmów hodowlanych. Z czasem zauważono, że aby móc przewidzieć potencjalne funkcje rozpoznanych bakterii konieczna jest znajomość ich genów [4]. Ważnym kierunkiem rozwoju mikrobiologii ekosystemu jelitowego stała się zatem metagenomika, tj. populacyjna genomika środowiskowych drobnoustrojów, która na podstawie DNA pozyskanego bezpośrednio ze środowiska pozwala na zbadanie całego zbiorczego genomu mikrobioty. Sekwencjonowanie bibliotek genomowych i komputerowa analiza uzyskanych danych umożliwia poznanie genów drobnoustrojów tworzących jelitowy ekosystem [9].

Do głównych zalet metagenomiki można zaliczyć m.in. możliwość oceny większej ilości gatunków bakterii niehodowlanych, tzn. tych które nie mogą być zidentyfikowane metodą tradycyjnego posiewu mikrobiologicznego. Wykonana przez National Institute of Health GenBank analiza PCR wykazała, że z ponad 1800 pochodzących z ludzkiego przewodu pokarmowego zidentyfikowanych sekwencji bakteryjnych, blisko 93% należy do bakterii których nie można zidentyfikować na drodze posiewu mikrobiologicznego [10].

Metody genetyczne, szczególnie PCR, są obecnie uważane za złoty standard badań mikrobiomu jelitowego. Należy jednak pamiętać, że ma ona swoje ograniczenia, np. analiza PCR uwzględnia szczepy bakterii martwych, które mogą uniemożliwić rzeczywistą ocenę liczebności żywych bakterii prozdrowotnych wpływając tym samym na zafałszowanie wyniku [11].

Łatwiej dostępną, a zarazem tańszą metodą oceny jakości mikrobiologicznej jelit, jest wykorzystanie posiewu kału. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego skolonizowane są przez różne drobnoustroje, dlatego do oceny całości ekosystemu jelitowego należałoby oceniać materiał pochodzący z różnych rejonów jelita, tj. biopłaty, kał oraz śluz. Wiązałoby się to jednak z koniecznością stosowania zabiegów endoskopowych, dlatego przyjęto zasadę, że posiew odzwierciedla ekosystem jelita grubego, czyli głównej niszy bakteryjnej ludzkiego organizmu [13].

### **Rozmieszczenie mikroorganizmów w różnych odcinkach przewodu pokarmowego i ich funkcje**

Każda część ciała człowieka zasiedlana jest przez specyficzne populacje drobnoustrojów – mikrobiom, ściśle dopasowany do poszczególnych miejsc ciała osobnika, zależny od wielu różnych czynników: wieku, płci, stanu zdrowia czy rodzaju diety. Zwykle dzięki współzawodnictwu z drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi lub patogenami, o miejsce oraz o pokarm, mikrobiom spełnia rolę ochronną.

Badania nad mikrobiomem człowieka skupiają najwięcej uwagi nad różnorodnością mikroorganizmów obecnych w przewodzie pokarmowym (GI – *gastrointestinal tract*), w szczególności w jelitach. GI to idealne środowisko do wzrostu i życia zarówno bakterii komensalnych, jak i tych pochodzących z pożywienia, które mogą wpływać na przebieg procesów zachodzących w tym środowisku.

Do głównych czynników, które mogą wpływać na skład i rozmieszczenie bakterii w kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego należą:

- zależne od gospodarza elementy: pH, immunoglobuliny, kwasy żółciowe, enzymy trawienne, perystaltyka jelit, mucyny, wydzieliny tkankowe;
- przyczyny mikrobiologiczne: adhezja, ruchliwość bakterii, zdolność do przyswajania różnych źródeł węgla, spory bakterii, związki przeciwbakteryjne, czas generacji;

- interakcje pomiędzy drobnoustrojami: współdziałania w możliwościach wykorzystania różnych źródeł węgla; krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe; zmiany potencjału elektrochemicznego Eh; wymagania pokarmowe;

- dieta: jej skład, leki, obecność niestrawialnych włókien celulozy lub błonnika [14];

W przewodzie pokarmowym człowieka występuje aż 1500 różnych gatunków drobnoustrojów, a liczba bakterii w jelicie zmienia się wraz z panującymi w poszczególnych odcinkach warunkami. Główne typy bakterii należące do mikrobioty jelit człowieka to: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) oraz *Actinobacteria* (3%). Przewód pokarmowy zdrowego człowieka jest zasiedlany przez około  $10^{14}$  różnego rodzaju bakterii należących do 40-50 rodzin. Łączną masę mikrobioty jelit szacuje się na 1,5-2kg. Forma zależności pomiędzy człowiekiem-gospodarzem, a bakteriami określana jest mianem komensalizmu [26].

Skład gatunkowy, liczebność i rozmieszczenie drobnoustrojów są różne w zależności od rozpatrywanego odcinka przewodu pokarmowego, na co wpływ mają zarówno czynniki fizyczne jak i chemiczne tam panujące, np. pH treści pokarmowej czy obecność tlenu. W tabeli 2 przedstawiono najistotniejsze właściwości fizjologiczne kolejnych odcinków przewodu pokarmowego i ich wpływ na charakterystykę mikrobiologiczną jelit [21,24,27].

Tabela 2. Skład i funkcje drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym.

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">1000 – 1150 gatunków bakterii</div> <div style="margin: 0 10px;">↑</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Tlenowce</div> <div style="margin: 0 10px;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Beztlenowce</div> </div>	Żołądek	$<10^2$ jtk/g	Trawienie i wydzielanie kwasu żołądkowego
	Dwunastnica	$10^{1-3}$ jtk/g	Trawienie i wchłanianie węglowodanów, białek i tłuszczów
	Jelito czcze	$10^{3-4}$ jtk/g	
	Jelito kręte	$10^{7-9}$ jtk/g	Wchłanianie kwasów żółciowych i witaminy B <sub>12</sub>
	Okrężnica	$10^{10-12}$ jtk/g	Wchłanianie wody, elektrolitów i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych

Źródło: opracowanie własne, na podstawie [21,24,27].

Przełyk zasiedlają bakterie pochodzące z jamy ustnej lub wprowadzane wraz z pokarmem. Natomiast mikrobiota żołądka jest nieliczna, na co wpływają występujące tam niekorzystne warunki, tj. niska wartość pH soku żołądkowego oraz stosunkowo szybkie tempo przemieszczania się masy pokarmowej. W świetle żołądka znajdują się głównie względne beztlenowce (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* oraz *Enterococcus*) [28]. Obniżenie pH soku żołądkowego stanowi obronę organizmu przed patogenami. Czynniki takie jak anemia czy podeszły wiek mogą wpływać na podwyższenie pH w żołądku i pozbawić organizm naturalnej bariery ochronnej. Zmiana składu

jakościowego i ilościowego mikrobioty przewodu pokarmowego w miarę przesuwania się masy pokarmowej ma związek ze zmianami m.in. pH oraz ograniczoną dostępnością tlenu. W dwunastnicy wartość pH wzrasta, a najczęściej spotykane tu bakterie należą do rodzaju *Bacteroides*, *Lactobacillus* oraz *Streptococcus*. W jelicie czczym w związku ze znacznym wzrostem pH tutaj panującym zwiększa się zarówno liczba, jak i różnorodność bakterii [25, 29].

Wartości pH bliskie obojętnemu (6-7) panujące w jelicie cienkim powodują, że w porównaniu ze światłem żołądka wzrasta liczba bakterii do  $10^2$ - $10^5$  w 1 ml treści. Poza bakteriami tlenowymi pojawiają się też beztlenowce. Charakterystyczne dla obecnych tu bakterii jest szybkie tempo wzrostu, wytwarzanie adhezyn, co umożliwia im przyłączanie się do receptorów umiejscowionych na błonie śluzowej jelita. Ma to na celu zapewnienie bakteriom przetrwania w trudnych warunkach panujących w jelitach, tj. wymywanie z zajmowanych pozycji na skutek szybkiego przemieszczania się pokarmu oraz ruchów perystaltycznych [30].

Ilość bakterii w ostatnim odcinku jelita cienkiego zagęszcza się do około  $10^6$  komórek w 1 ml treści, przede wszystkim dzięki spowolnionemu przepływowi zawartości oraz wyższej wartości pH. W okrężnicy znajduje się najwyższa liczba bakterii, nawet do  $10^8$ - $10^{12}$  w 1 ml treści. Światło jelita grubego charakteryzują głównie warunki beztlenowe, dlatego specyficzną mikrobiotę tego odcinka jelita stanowią bakterie takie jak *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Bacillus* czy *Fusobacterium* [31]. Spowolniony przepływ treści pokarmowych przez światło jelita grubego sprawia, że bakterie nie muszą przytwierdzać się do ścian jelita, mogą swobodnie wzrastać, co wpływa na ich zwiększoną liczbę ogólną. Bakterie stanowią nawet 30% treści okrężnicy [21].

Mikrobiotę jelit tworzą zarówno bakterie autochtoniczne, stale obecne w jelitach, a także allochtoniczne, pochodzące z otoczenia, bytujące tymczasowo, a jednocześnie konkurujące o miejsce zasiedlenia na błonach śluzowych z naturalną mikrobiotą człowieka. W grupie bakterii autochtonicznych, odpowiedzialnych za procesy gnicia i fermentacji, wyróżniamy m.in. bakterie z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium* oraz *Enterobacterium*, natomiast w grupie allochtonicznych głównie patogeny.

Mikrobiotę jelitową można podzielić na 3 grupy, pomiędzy którymi zachowana powinna być homeostaza:

- bezwzględnie patogenne bakterie (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*), które między innymi poprzez produkcję toksyn wywołują zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego;
- względnie patogenne bakterie (*Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*), których negatywne skutki działania są widoczne w czasie zaburzeń funkcji przewodu pokarmowego;
- bakterie o działaniu pozytywnym, dobroczynnym (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), stymulują wybrane funkcje przewodu pokarmowego oraz hamują rozwój patogenów [32].

Korzystne działanie mikrobioty jelit ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu i oparte jest m.in. na:

- hamowaniu namnażania i rozwoju bakterii patogennych;
- wpływie na wchłanianie i trawienie substancji odżywczych (witamin i soli mineralnych) oraz magazynowanie energii;
- zwiększeniu pasażu jelitowego, ograniczeniu występowania zaparć i wzdęć;
- pomocy w trawieniu mleka i jego przetworów, w tym kazeiny i laktozy;
- syntezie witamin;
- pobudzaniu układu immunologicznego;
- wpływie na utrzymanie prawidłowego poziomu pH w świetle przewodu pokarmowego [21].

Komensalne bakterie jelit stanowią barierę chroniącą organizm człowieka przed patogenami oraz infekcjami poprzez modulację składników odżywczych dostępnych w jelitach. Skład mikrobiomu jelitowego wpływa na zawartość oraz jakość węglowodanów, stanowiących podstawowe źródło energii. Zmiana stosunku liczby *Firmicutes* do *Bacteroidetes*, w odpowiedzi na zmiany w diecie (wysoka podaż węglowodanów), wpływa na zwiększenie podatności myszy na infekcje [38]. Istotny jest również fakt, że bakterie patogenne na drodze adaptacji do konkretnej niszy ekologicznej, w której występują, wykazują zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla, co umożliwia im współzawodniczenie z komensalnymi bakteriami gospodarza. Skład SCFA kształtowany przez mikrobiotę jest sygnałem odbieranym przez patogeny. Maślan obecny przede wszystkim w końcowym odcinku jelit umożliwia adhezję enterohemokrotoczących szczepów *E.coli* (EHEC) do kolonocytów, odwrotnie zaś, blokuje ekspresję genów inwazyjności *S. typhimurium* [39].

Mikrobiom jelitowy odpowiada również za trawienie resztek pokarmowych, nieulegających degradacji w jelicie cienkim (włókna pokarmowego i skrobi odpornej). W procesie fermentacji produkowane są gazy: wodór, dwutlenek węgla, metan oraz kwasy organiczne: masłowy, propionowy i octowy. Kwasy te obok obniżania wartości pH treści jelitowej są odpowiedzialne za stymulację rozwoju nabłonka jelitowego (kwas masłowy), hepatocytów (kwas propionowy) oraz tkanek obwodowych (kwas octowy), regulację metabolizmu glukozy i lipidów oraz wpływ na gospodarkę mineralną, poprzez pobudzanie absorpcji jonów wapnia, magnezu i żelaza ze światła jelita grubego [33].

Szacuje się, że fermentacja mikrobiologiczna dostarcza nawet 10% energii uzyskiwanej z pożywienia, głównie w postaci krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), w tym maślanu, octanu i propionianu oraz innych substancji łatwo przyswajalnych wykorzystywanych przez komórki gospodarza [34]. Maślan stanowi źródło energii dla komórek nabłonkowych jelita grubego, a jego obecność wpływa na rozrost śluzówki jelit i proliferację komórek. Stanowi on także ochronę przed chorobami, m.in. stanami zapalnymi czy nowotworami jelit [35].



Udokumentowano, że skład mikrobioty jelit wpływa na zjawisko immunologicznej homeostazy. Wyniki badania przeprowadzonego na modelu zwierzęcym opisujące zjawisko kolonizacji jelit zwierząt przez bakterie *Bacteroides fragilis*, za pomocą charakterystycznego dla tego gatunku polisacharydu bakteryjnego (PSA), wykazało że wpływa on na kierowanie dojrzewaniem rozwijającego się układu immunologicznego. Analiza porównawcza z myszami GF (*germ free*) pokazała, że PSA kształtują procesy immunologiczne organizmu gospodarza m.in. na drodze regulacji pomiędzy limfocytami Th1 oraz Th2 [37].

Mikrobiom jelit związany jest także z produkcją niezbędnych dla człowieka witamin (K, B<sub>12</sub>, kwasu foliowego, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>), a także poprzez wytwarzanie hydrolaz kwasów żółciowych wpływa na recyrkulację tych kwasów. Bakterie jelitowe biorą ponadto udział w przekształcaniu potencjalnie patogennych i karcynogennych związków (np. heterocyklicznych amin), których produkcja endogenna wzrasta wraz ze zwiększeniem spożycia czerwonego mięsa oraz w aktywacji związków bioaktywnych (np. fitoestrogenów), wykazujących zdolność interakcji z układem hormonalnym i kształtowania jego czynności w sposób charakterystyczny dla żeńskich hormonów płciowych [40].

Mikrobiom jelitowy pełni również ważne funkcje związane z utrzymywaniem homeostazy pomiędzy komórkami układu immunologicznego a mikroorganizmami oraz z utrzymaniem tzw. immunologicznej ignorancji. Przede wszystkim zapobiega bezpośredniemu kontaktowi bakterii z komórkami układu immunologicznego. Działalność bakterii komensalnych wpływa na wzmocnienie integralności nabłonka jelit, ochronę przed uszkodzeniem komórek oraz kontrolę tempa ich proliferacji. Poza tym komensale indukują wydzielanie i wytwarzanie przez komórki nabłonkowe przeciwciał sekretoryjnych (sIgA) oraz kationowych peptydów o antybakteryjnej aktywności (CAMPs, *cationic antimicrobial peptides*). Biorą także udział w procesie wytwarzania mucyny [36]. Funkcja immunologiczna mikrobiomu jelitowego dotyczy również szybkiego i sprawnego mechanizmu eliminacji szkodliwych antygenów dzięki połączeniu receptorów TLR (*toll like receptors*) oraz domen NOD (*nucleotide oligomerisation domain*) ze strukturami komórek bakteryjnych, co w ostateczności powoduje produkcję mediatorów stanu zapalnego. Wyniki badań wskazują, że zakłócenie homeostazy mikrobiomu jelit zwiększa przepuszczalności bariery jelitowej, co w obrazie klinicznym jest przyczyną zaburzeń metabolicznych, neurorozwojowych czy autoimmunologicznych. Przywróceniu równowagi ekosystemu jelitowego sprzyja natomiast stosowanie spersonalizowanej probiotykoterapii [28].

### **Stan zapalny a budowa bariery jelitowej**

Błona śluzowa przewodu pokarmowego człowieka jest to ogromna powierzchnia narażona na ciągły kontakt z różnymi antygenami, w tym bakteryjnymi, pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego, również z żywności. Bliskość organizmu z drobnoustrojami stanowiącymi naturalny mikrobiom jelit, wymusiła wykształcenie mechanizmów ograniczających ich kontakt z nabłonkiem



jelita oraz powiązaniem z nim układem immunologicznym, aby ograniczyć ryzyko zainicjowania odpowiedzi prozapalnej [21]. Układ pokarmowy wykształcił własny system odpornościowy – tkankę limfatyczną związaną z błonami śluzowymi (MALT, *mucosal – associated lymphoid tissue*), częścią której jest tkanka limfatyczna związana z jelitami (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) [22].

Układ immunologiczny przewodu pokarmowego pełni ważną rolę zarówno w odporności miejscowej, jak i ogólnej organizmu. Komórki GALT rozproszone są w obrębie nabłonka jelita (IEC, *intestinal epithelial cell*) tworząc limfocyty śród nabłonkowe (IEL, *intraepithelial lymphocytes*) lub blaszki właściwej śluzówki (LP, *lamina propria*) tworząc zorganizowane struktury, takie jak: grudki chłonne, kępki Peyera czy węzły chłonne krezkowe [23]. Należy zaznaczyć, że odporność błon śluzowych w przewodzie pokarmowym kształtują również takie czynniki jak: niskie pH soku żołądkowego, enzymy proteolityczne zawarte w soku jelitowym oraz lizozym i substancje antybakteryjne – defensyny, laktoferyna, śluz, a także naturalny mikrobiom przewodu pokarmowego. Istotnym elementem budowy tkanki GALT jest nabłonek cylindryczny z enterocytami, komórkami kubkowymi, śród nabłonkowymi leukocytami i komórkami Panetha, znajdującymi się w dnie gruczołów jelitowych, tzw. kryptach Lieberkühna. Pełnią one ważną rolę ochronną, ponieważ w kontakcie z bakteriami uwalniają przeciwbakteryjne białka o szerokim zakresie działania. Dodatkowo połączenia komórek nabłonkowych błony śluzowej typu zwierającego (*adherentes*) i zamykającego (*occludentes*) stanowią ważną barierę odpornościową układu GALT [32].

Część bakterii fizjologicznie zasiedlających przewód pokarmowy uwalnia związki o charakterze przeciwdrobnoustrojowym: bakteriocyny, kwasy organiczne czy nadtlenek wodoru. Wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz poliamin przez bakterie jelitowe dostarcza niezbędnych substratów do odżywiania komórek nabłonka jelita. Dodatkowo bakterie te pobudzają sekrecję mucyny, uszczelniającego nabłonek jelitowy elementu śluzu jelitowego. Brak właściwego składu mikrobioty prowadzi zatem do zaburzenia ciągłości bariery jelitowej, czyli tzw. filtra pomiędzy wnętrzem organizmu a środowiskiem zewnętrznym [32].

Barierę jelitową tworzą mikroorganizmy jelitowe, warstwa śluzu, nabłonek jelitowy oraz komórki układów: krwionośnego, immunologicznego, chłonnego i nerwowego. Warstwa śluzu stanowi pierwszą linię obrony przed przyleganiem i wnikaniem patogenów w głąb ściany jelita. Wyróżnia się tu dwie charakterystyczne części. Warstwa zewnętrzna jest bogata w przeciwbakteryjne peptydy, produkowane przez komórki Panetha oraz powstające w komórkach plazmatycznych immunoglobuliny A. W tej części bariery jelitowej znajdują się również liczne mikroorganizmy jelitowe, stanowiące jeden z największych i najbardziej aktywnych elementów bariery. Część wewnętrzna warstwy śluzu jest znacznie grubsza i bezpośrednio przylega do komórek nabłonkowych. Jej rola to przede wszystkim nawodnienie, regeneracja oraz ochrona nabłonka przed działaniem enzymów trawiennych. Znajduje się tu głównie glikokaliks produkowany przez komórki kubkowe, którego

zadaniem jest ograniczanie przenikania antygenów do blaszki właściwej błony śluzowej [26]. Wyniki badań na zwierzętach potwierdzają, że wraz z utratą warstwy śluzu zwiększa się przepuszczalność bariery jelitowej, co umożliwia bakteriom przenikanie w głąb światła jelita i inicjowanie reakcji zapalnej. Błona śluzowa zapewnia zatem selektywny kontakt pomiędzy światłem jelita a komórkami układu immunologicznego, co jest szczególnie istotne w wytworzeniu odporności na bakterie komensale i antygeny pochodzące z żywności [27].

Fizycznym elementem bariery jelitowej jest pojedyncza warstwa komórek nabłonka, utworzona w blisko 80% przez enterocyty, które obok wchłaniania substancji odżywczych mają także wpływ na rozwój aktywności immunologicznej poprzez pośredniczenie w uwalnianiu cytokin i ekspresji receptorów biorących udział w generowaniu odpowiedzi immunologicznej [28]. Szczytowo-boczna powierzchnia błony komórkowej jest miejscem, w którym zlokalizowane są tzw. połączenia ściste (TJ, *tight junction*) zapewniające integralność nabłonka. TJ są najważniejszym elementem odpowiedzialnym za regulację selektywnej przepuszczalności jelit, warunkującym transport bierny cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie [29]. Połączenia ściste są wielobiałkowymi kompleksami, utworzonymi z czterech białek przezbłonowych: okludyn, klaudyn, białek adhezyjnych (JAM, *junctional adhesion molecules*) i triceluliny. Zaburzenie integralności bariery jelitowej zachodzi na skutek interakcji pomiędzy wewnątrzkomórkowymi domenami białek przezbłonowych z proteinami *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2, ZO-3), tj. białkami cytozolu połączonymi z kolei z włóknami aktynowymi cytoszkieletu enterocytów. Rozluźnienie struktury TJ na skutek fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny pozwala na parakomórkowy transport substancji. Dane literaturowe wskazują, że komórki pozbawione ZO-1 nie tracą zdolności tworzenia ścisłych połączeń, co zapewnia prawidłową przepuszczalność jelit [30].

Połączenia pomiędzy komórkami nabłonka tworzone są również przez złącza mechaniczne (*adherent junctions*) i połączenia szczelinowe (*GAP junctions*). Pierwsze z nich zbudowane są z desmosomów i kadheryn połączonych z cytoszkieletem, co zapewnia dużą wytrzymałość mechaniczną wspomnianych złączy. Połączenia GAP natomiast składają się z 6 białek transbłonowych tzw. koneksyn, które uczestniczą w dojrzewaniu i różnicowaniu komórek nabłonka, co ma szczególnie duże znaczenie w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania bariery jelitowej [31].

### **Nadwaga i otyłość - rola i zmiany mikrobiomu jelitowego**

Tradycyjne spojrzenie na problem nadwagi i otyłości koncentruje się wokół wpływu czynników genetycznych, środowiskowych czy psychospołecznych. Jednak wiele badań opartych na wykorzystaniu modelu zwierzęcego, szczególnie myszy, wskazuje związek dysbiozy w obrębie mikrobiomu jelitowego z nadwagą i otyłością. Przeszczepienie mikrobioty jelit pochodzącej od myszy z otyłością (z DIO, *diet-induced obesity*) myszom z jałowym przewodem pokarmowym (GF)

doprowadziło u tych ostatnich do szybszego odkładania się tłuszczu, w przeciwieństwie do zwierząt którym przeszczepiono mikrobiom pochodzący od osobników szczupłych [33]. Prawdopodobnie metaboliczna aktywność mikrobioty jelit sprzyja łatwiejszemu pozyskiwaniu energii z pożywienia oraz magazynowaniu jej w zapasach tkanki tłuszczowej, zapewniając tym samym składniki pokarmowe niezbędne do rozmnażania, wzrostu i funkcjonowania bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym.

W analizie wpływu zmian w składzie mikrobioty jelit na powstawanie i rozwój nadwagi i otyłości rozpatruje się kilka mechanizmów opianych poniżej.

- **Udział mikrobioty jelit w fermentacji polisacharydów zawartych w diecie**

Bakterie jelitowe dzięki swojej zdolności do rozkładania niestrawialnych polisacharydów mogą wspomagać znacznie efektywniejsze pobieranie energii z pokarmu. Mikrobiom rozkładając błonnik do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, *short chain fatty acid*) dostarcza dodatkowo 80-200 kcal dziennie, co stanowi około 10% energii dostarczanej w ciągu dnia z pożywieniem. U osób z nadmiarem masy ciała obserwuje się większą zawartość SCFA w stolcu [34]. Sugeruje się, że stosunek bakterii typu *Firmicutes* do *Bacteroidetes* ma mniejsze znaczenie w powstawaniu nadwagi i otyłości niż ilość wytwarzanych z ich udziałem SCFA. Wykazano dwudziestoprocentowy wzrost liczby *Firmicutes* i odpowiednie obniżenie liczby *Bacteroidetes*, co odpowiadało zwiększonemu o 150 kcal pobraniu energii z pożywieniem [35]. Można przypuszczać, że dodatkowa podaż energii w postaci SCFA powstających w wyniku działalności metabolicznej bakterii jelitowych może przyczynić się do wystąpienia nadwagi lub otyłości.

- **Udział mikrobioty jelit w metabolizmie monosacharydów i kwasów tłuszczowych**

Kolejnym mechanizmem, który może mieć wpływ na nadmierny wzrost masy ciała jest zwiększenie wchłaniania węglowodanów prostych. Monosacharydy absorbowane lub metabolizowane do SCFA stymulują wzrost lipogenezy w wątrobie. SCFA dostarczane są do wątroby i przekształcane do triacylogliceroli (TAG), a następnie gromadzone w adipocytach. Mechanizmem dzięki któremu mikrobiom jelitowy sprzyja magazynowaniu tłuszczu jest hamowanie ekspresji genu kodującego czynnik tkankowy indukowany głodem (FIAF, *fasting-induced adipocyte factor*). Zadaniem FIAF jest hamowanie działania lipazy lipoproteinowej (LPL, *lipoprotein lipase*), enzymu który odpowiada za gromadzenie energii w postaci tłuszczu. Obniżenie ekspresji FIAF prowadzi w efekcie do większej aktywności LPL w tkance tłuszczowej i nasila proces magazynowania energii w postaci tłuszczu [36].

- **Bariera jelitowa i endotoksemia**

Na skutek zaburzeń w składzie mikrobioty jelit – dysbiozy, dochodzi do zmniejszenia integralności ściany jelita. Dysbioza może być efektem różnych czynników w tym diety bogatotłuszczowej, wysokobiałkowej oraz ubogiej w błonnik [37-38]. Zmniejszenie syntezy białek zonuliny-1 i okludyny, stanowiących istotny element strukturalny *tight junctions* (TJ) prowadzi do zaburzenia integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego. Nieszczelna bariera jelitowa sprzyja przenikaniu przez nią wielu antygenów oraz substancji szkodliwych, z których szczególnie niebezpieczny jest LPS (lipopolisacharyd). Jest to endotoksyna będąca składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii gram-ujemnych i cyjanobakterii, które bytują w przewodzie pokarmowym [39]. Jednym ze skutków toksycznego działania LPS na organizm jest indukcja przewlekłego stanu zapalnego oraz nasilenie produkcji prozapalnych cytokin. Opublikowane dane sugerują, że zapalenie nabłonka jelitowego, w konsekwencji stosowania diety wysokotłuszczowej, może powodować zaburzenia w regulacji przyjmowania pokarmu i prawdopodobnie wpływać na rozwój otyłości. Taką zależność potwierdzono w badaniu na myszach. Autorzy podawali myszom LPS przez 4 tygodnie. Po tym czasie zaobserwowali obok stanu zapalnego, wzrost masy ciała, jak również wzrost masy wątroby, wzrost stężenia glukozy i trójglicerydów oraz pojawienie się insulinooporności [40].

Uważa się, że LPS oraz SCFA uruchamiają wiele procesów, mających negatywny wpływ na metabolizm człowieka:

- Aktywują receptory sprzężone z białkiem G (GPR, *G protein coupled receptor*), co przez wydzielanie peptydu PYY (*peptide YY*) spowalnia pasaż treści jelitowej i ułatwia pobieranie energii;
- Stymulują aktywność LPL, co prowadzi do zmniejszenia ekspresji FIAF, a zatem sprzyja zwiększonemu magazynowaniu tłuszczu;
- nasilają supresję kinazy proteinowej aktywowanej przez AMPK (*activated protein kinase*), która jest odpowiedzialna za oksydację kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach. Prowadzi to do odkładania wolnych kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej;
- powodują aktywację układu endokannabinoidowego, przyczyniającego się do rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego.

Wszystkie wymienione zjawiska mają wpływ na regulację masy ciała [41-43].

- **Zmiany w mikrobiomie jelitowym towarzyszące otyłości**

Wyniki większości badań przeprowadzanych na modelach zwierzęcych, a dotyczących porównania składu mikrobioty jelit osobników szczupłych i otyłych, wskazują na prawie 50% obniżenie liczebności bakterii należących do typu *Bacteroidetes* oraz proporcjonalny wzrost liczby bakterii typu *Firmicutes* u zwierząt z nadwagą lub otyłością [44]. Ley i wsp. [45] podjęli się przeprowadzenia obserwacji mających na celu wykazanie, że doświadczenia na zwierzętach mają swoje

odzwierciedlenie w badaniach na ludziach. Przez okres 12 miesięcy monitorowali oni skład bakterii w próbkach stolca pochodzących od 12 otyłych osób. Pacjenci w sposób losowy zostali przydzieleni odpowiednio do jednej z dwóch grup: otrzymujący dietę o obniżonej zawartości tłuszczu oraz otrzymujący dietę z obniżoną podażą węglowodanów, grupę kontrolną stanowiły osoby szczupłe na diecie normokalorycznej. Przed włączeniem diety u osób otyłych zaobserwowano mniejszą liczebność bakterii *Bacteroidetes*, a większą *Firmicutes* w porównaniu z osobami szczupłymi. Zmniejszeniu masy ciała towarzyszyło zwiększenie stosunku *Bacteroidetes* do *Firmicutes* w stopniu zależnym od ilości utraconych kilogramów, niezależnie natomiast od rodzaju stosowanej diety. Bakterie typu *Bacteroidetes* stanowiły wyjściowo około 3% całego mikrobiomu jelitowego, natomiast po dietoterapii i redukcji masy ciała ich ilość wzrosła do 15%.

Wyniki innego badania mającego na celu porównanie składu mikrobiomu jelit osób szczupłych oraz z nadwagą i otyłością, również wykazały, że pacjenci z BMI poniżej 25 kg/m<sup>2</sup> mają wyższą ilość bakterii *Bacteroidetes* w przewodzie pokarmowym oraz większy stosunek *Bacteroidetes* do *Firmicutes* [34]. Poza tym zaobserwowano, że przewód pokarmowy osób otyłych jest częściej zasiedlany przez bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Faecalibacterium prausnitzii* [46].

Zwiększenie liczebności bakterii typu *Firmicutes* w przewodzie pokarmowym osób otyłych jest jak dotąd niewyjaśnione. Przypuszcza się, że może to mieć związek z dużym zróżnicowaniem gatunkowym w obrębie rodziny *Firmicutes* oraz osobniczej podatności na obecność bakterii w jelicie. Upatruje się tu zatem skuteczniejszego pozyskiwania energii z pożywienia na skutek wspomnianej różnorodności, co może stanowić ogniwo łączące nadwagę i otyłość ze zmianami w składzie mikrobiomu jelitowego [37].

### **Otyłość a stan zapalny**

Układowa reakcja zapalna stanowi jeden z elementów patogenezы chorób wchodzących w skład zespołu metabolicznego, w tym otyłości. Zwiększona objętość adipocytów wiąże się z uwalnianiem czynnika chemotaktycznego dla makrofagów, co skutkuje rozwojem stanu zapalnego w białej tkance tłuszczowej. Towarzyszy temu uwalnianie przez makrofagi i adipocyty czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz interleukiny-6 (IL-6). Wraz ze wzrostem wydzielania czynników prozapalnych w tkance tłuszczowej dochodzi do zmian w wydzielaniu adipokin – hormonów tkanki tłuszczowej, obniżeniu ulega synteza adiponektyny, zwiększa się synteza leptyny, rezystyny i wisfatyny [47,48]. W ostatnim czasie wskazuje się także na związek mikrobiomu jelitowego z obecnością stanu zapalnego towarzyszącego nadwadze i otyłości [49]. Gram-ujemne bakterie jelitowe zawierają LPS oraz peptydoglikany o właściwościach prozapalnych. Przeprowadzono badanie polegające na kolonizacji przewodu pokarmowego myszy *germ-free* bakteriami *Escherichia coli*,

co w efekcie spowodowało zwiększenie naciekania tkanki tłuszczowej makrofagami oraz wzrost wydzielania cytokin prozapalnych [50]. W badaniach doświadczalnych wskazuje się na bezpośredni wpływ LPS na rozwój insulinooporności, cukrzycy czy prozapalnych zmian w tkance tłuszczowej [51]. Nie wyjaśniono dotychczas, który ze składników komórki bakteryjnej odpowiada za inicjowanie stanu zapalnego, wskazuje się jednak na LPS jako element spełniający najważniejszą rolę. Opisuje się w publikacjach dwie możliwe hipotezy stanowiące próbę wyjaśnienia tego zjawiska. Z jednej strony autorzy twierdzą, że LPS przedostaje się do krwi z pomocą chylomikronów, natomiast druga hipoteza mówi o zwiększonej przepuszczalności jelit, która łączy się z występowaniem takich zaburzeń jak cukrzyca, zespół metaboliczny, stłuszczenie wątroby czy otyłość [52-54].

Dotychczas uważano, że zaburzenia immunologiczne związane z powstawaniem procesu zapalnego towarzyszącego otyłości są związane z zaburzeniem równowagi subpopulacji limfocytów Th1/Th2 z przewagą Th1 oraz cytokin prozapalnych. Natomiast odkrycie limfocytów T regulatorowych (Tregs) rzuca nowe światło w postrzeganiu problemu stanu zapalnego w otyłości [55].

Najnowsze badania dotyczące udziału limfocytów T w patogenezie zaburzeń immunologicznych towarzyszących otyłości u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową, wskazują na znacznie większą liczbę komórek T o fenotypie CD8+, niewielką natomiast komórek T-pomocniczych i T-regulatorowych w tkance tłuszczowej zwierząt. Zdaniem autorów limfocyty CD8+ pełnią znaczącą rolę w indukcji procesu zapalnego towarzyszącego otyłości. Prawdopodobnie komórki CD8+ oraz adipocyty uczestniczą w przyciąganiu makrofagów do tkanki tłuszczowej [56].

Przewlekły stan zapalny powodowany przez endotoksyny bakterii patogennych może przyczyniać się zatem do występowania otyłości. Modyfikacja składu mikrobiomu jelitowego poprzez dietoterapię zdaje się być obiecującą strategią wspomagającą obniżenie ryzyka zachorowania na nadwagę czy otyłość [57]. Powierzeniem tego stwierdzenie może być badanie oparte na sekwencjonowaniu próbek kału 123 pacjentów otyłych poddanych 9-cio tygodniowej diecie WTP, tj. opartej m.in. na produktach pełnoziarnistych oraz wspomaganej prebiotykami. Wykazano, że liczba oportunistycznych patogenów wytwarzających endotoksyny, jak *Enterobacteriaceae*, uległa znacznemu zmniejszeniu, podczas gdy liczebność bakterii chroniących barierę jelitową - *Bifidobacteriaceae* wzrosła. Przepuszczalność jelit, została zmniejszona w porównaniu z wartością wyjściową. Obciążenie endotoksynami w osoczu białkiem wiążącym lipopolisacharydy również było znacznie zmniejszone, z równoczesnym obniżeniem stężenia czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$ , interleukiny-6 i wzrostu adiponektyny. Wyniki te sugerują, że modulacja mikrobioty jelit poprzez interwencję dietetyczną może zwiększyć integralność bariery jelitowej i ostatecznie złagodzić stan zapalny towarzyszący nadwadze i otyłości [58].



- **Zonulina – marker stabilności bariery jelitowej**

Przestrzenie między komórkami nabłonka jelitowego kontrolowane są przez co najmniej cztery rodzaje połączeń międzykomórkowych, których zadaniem jest regulacja przepuszczalności jelit. Jednym z białek uwalnianych przez komórki nabłonka jelitowego oraz wątroby, jest odkryta w 2000 roku przez dr Alessio Fasano zonulina [68]. Strukturą przypomina ona toksynę produkowaną przez bakterie *Vibrio cholerae* (ZOT, *zonula occludens toxin*). Badania wskazują, że zonulina stanowi fizjologiczny modulator funkcji połączeń ścisłych. Odpowiada za przelnabłonkowy transport jonów czy płynów pomiędzy światłem jelita, a krwioobiegiem, przez co reguluje przepuszczalność jelit. Za czynniki w najwyższym stopniu aktywujące jej wydzielanie uważane są gładyny oraz patogenne bakterie jelitowe. Zonulina jest zatem mierzalnym białkiem obecnym nie tylko we krwi, ale również w kale. Odzwierciedla stan połączeń międzykomórkowych w barierze jelitowej, a jej zwiększone poziomy są uważane za marker stabilności bariery jelitowej [67].

W ostatnich latach intensywnie bada się strukturę, funkcje i regulacje TJ. Jednakże dokładny mechanizm za pomocną którego działają nie jest w dalszym ciągu poznany. Wykazano natomiast, że drobnoustroje wywierają cytologiczny, patologiczny wpływ na komórki nabłonka, co w sposób nieodwracalny wpływa na prawidłowe funkcje TJ. Bakterie mogą działać w sposób bezpośredni (jak *Escherichia coli*) lub poprzez produkowane toksyny (*Clostridium difficile*) [68].

Podwyższony poziom zonuliny wykazano w chorobach autoimmunologicznych, cukrzycy typu 2, a nawet otyłości. Wzrost stężenie zonuliny koreluje z poziomem glukozy, dyslipidemią, stanem zapalnym oraz insulinoopornością [69].

Pojawiają się dane wskazujące, że endotoksyna pochodząca z przewodu pokarmowego może przyczynić się do przewlekłego ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Specyficzne bakterie jelitowe wydają się służyć jako źródła lipopolisacharydów (LPS), a kilka doniesień potwierdza rolę zwiększonej przepuszczalności jelitowej w genezie zaburzeń metabolicznych. Zbadano poziom LPS i zonuliny oraz czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukiny 6 (IL-6) u pacjentów z cukrzycą typu 2 (T2D). Grupę badaną stanowiło 45 pacjentów z T2D, grupę kontrolną 45 pacjentów zdrowych. Wykazano, że stężenie LPS, zonuliny, TNF $\alpha$  i IL-6 było istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z T2D w porównaniu do pacjentów grupy kontrolnej [71].

W 2017 roku w Szwecji opublikowano interesujące wyniki badania przeprowadzonego na grupie 363 pacjentów. Głównym celem była analiza związku pomiędzy poziomem zonuliny w surowicy, a objawami żołądkowo-jelitowymi oraz pomiędzy poziomem zonuliny, a parametrami antropometrycznymi i metabolicznymi. Wyniki badań nie wykazały zależności pomiędzy poziomem zonuliny, a objawami ze strony przewodu pokarmowego, natomiast wyższe stężenia zonuliny w surowicy były związane z większym obwodem talii, ciśnieniem rozkurczowym krwi, poziomem glukozy na czczo, a także zwiększonym ryzykiem nadwagi, otyłości i hiperlipidemii. Dane mogą

sugerować, że poziomy zonuliny w surowicy są zależne od warunków metabolicznych, a nie od obecności chorób przewodu pokarmowego [70].

Dane naukowe mogą wskazywać na możliwość wykorzystania zonuliny jako markera w diagnostyce chorób związanych z występowaniem stanu zapalnego lub zwiększoną przepuszczalnością jelit.

- **Laktoferyna – marker stanu zapalnego**

Laktoferyna (LF) to glikoproteina występująca w wydzielinach i płynach ustrojowych ssaków, jej duże ilości znajdują się przede wszystkim w sianie i mleku, ale także w ślinie, żółci, krwi oraz kale. Składa się z 689 aminokwasów połączonych 17 mostkami disiarczkowymi. W organizmie laktoferyna może występować w dwóch postaciach: *holo-laktoferyny* posiadającej skoordynowane jony żelaza w miejscach wiążących oraz *apo-laktoferyny* nieposiadającej jonów żelaza [62].

Laktoferyna pełni funkcję białka odporności wrodzonej, zmagazynowana jest w specyficznych ziarnistościach neutrofilów. Bierze udział w regulacji procesów odporności nabytej oraz zapewnia prawidłowe wchłanianie żelaza. Ponadto wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne i przeciwgrzybicze. Jej ogromną zaletą jest odporność na działanie trawiennej enzymów, co pozwala na przejście tego związku w postaci niezmienionej przez przewód pokarmowy. Oznaczanie laktoferyny przyjęto zatem za wiarygodne, właśnie ze względu na jej wyjątkową trwałość i stabilność. W reakcji na przewlekły stan zapalny dochodzi do degranulacji neutrofilów, następstwem czego jest zwiększenie stężenia laktoferyny w osoczu, a następnie surowicy. Dzięki temu może ona pełnić rolę markera stanu zapalnego [63].

Zdolność laktoferyny do wychwytywania i chelatacji jonów żelaza w organizmie, powoduje zmniejszenie ilości wolnego żelaza dostępnego dla mikroorganizmów patogennych, dzięki czemu opóźnia ich wzrost. Wysokie stężenie żelaza jest niezbędne niektórym bakteriom do wytworzenia warstwy biologicznej. Laktoferyna może w sposób bezpośredni wpływać na uszkodzenia i zaburzenia metabolizmu komórek bakteryjnych. Dodatkowo ma zdolność hamowania adhezji patogenów do tkanek i rozkłada czynniki wirulencji drobnoustrojów na drodze reakcji enzymatycznych [64].

Szczególnie istotny jest fakt selektywnego działania tego białka. Omawiana glikoproteina nie wykazuje działania przeciwbakteryjnego w stosunku do bakterii probiotycznych. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nie wymagają do swego namnażania obecności żelaza, zatem laktoferyna nie wykazuje w stosunku do nich działania hamującego. Natomiast promuje namnażanie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* właśnie dzięki udostępnianiu im jonów żelaza [65]. Takie jej właściwości pozwalają na regulację mikrobiomu jelitowego.

Badania *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, że laktoferyna wykazuje zdolność do zapobiegania przyłączaniu się wybranych bakterii do komórek gospodarza. Jej działanie polega między innymi



na utrudnieniu tworzenia kolonii i biofilmu, poprzez zwiększenie ruchu drgającego komórek bakteryjnych [66].

Zaznacza się szczególną rolę swoistych receptorów LF obecnych na powierzchni komórek układu immunologicznego, a przede wszystkim ich interakcję z LPS błony komórkowej bakterii gramujemnych [65]. Zatem zwiększone stężenie laktoferyny w próbkach biologicznych może świadczyć o zaburzeniach w homeostazie mikrobiomu jelitowego i współistnieniu stanu zapalnego.

### **Probiotyki w terapii nadwagi i otyłości**

Definicja probiotyku przedstawiona przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) mówi, iż są to żywe bakterie, które w postaci produktu farmaceutycznego lub dodane do żywności, wywołują korzystny efekt zdrowotny na organizm gospodarza, poprzez poprawę homeostazy jego ekosystemu jelitowego [59]. Przyjmowanie probiotyków ma na celu modyfikację stanu mikrobiomu jelitowego poprzez zwiększenie liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. W efekcie sprzyja to poprawie działania i zwiększa szczelność bariery jelitowej, co natomiast prowadzi do obniżenia endotoksemii oraz ogranicza rozwój reakcji zapalnej w organizmie [51]. W 2010 roku opublikowano wyniki randomizowanego badania klinicznego, w którym oceniano zasadność stosowania probiotyków jako elementu wspomagającego terapię nadwagi i otyłości. Zbadano wpływ *Lactobacillus gasseri* SBT2055 na zmiany parametrów antropometrycznych 43 pacjentów z BMI w przedziale 24,2-30,7 kg/m<sup>2</sup> oraz z otyłością trzewną. Pacjenci w grupie badanej przez okres 12 tygodni spożywali kefir wzbogacony opisanym powyżej szczepem bakterii, natomiast grupę kontrolną stanowiło 44 pacjentów z otyłością, którzy nie stosowali probiotyku w diecie. Wyniki obserwacji wykazały, że podawanie probiotyku sprzyja obniżeniu masy ciała, spadkowi BMI, obwodu talii i bioder oraz obniżeniu zawartości tłuszczu trzewnego [60].

W ostatnich latach wzrasta liczba badań oceniających wpływ specyficznych szczepów probiotycznych na zmiany parametrów antropometrycznych w nadwadze i otyłości. Bardzo interesująca zdaje się być perspektywa wykorzystania probiotyków wieloszczepowych i wielogatunkowych w połączeniu ze związkami prebiotycznymi (synbiotyków). Działanie wielopoziomowe takich preparatów może przynieść spodziewane efekty terapeutyczne u pacjentów z otyłością. Warto jednak zwrócić uwagę na konieczność potwierdzania takiej hipotezy w badaniach klinicznych, pamiętając iż różne rodzaje bakterii mogą w sposób odmienny działać na zmiany wskaźników antropometrycznych [61].

## **Cel pracy**

Celem pracy była:

1. Ocena występowania stanu zapalnego, przepuszczalności jelit oraz zmian liczebności wybranych rodzajów bakterii i grzybów w kale pacjentów zakwalifikowanych do leczenia dietetycznego nadwagi i otyłości.
2. Ocena wpływu probiotyku na skład mikrobiomu jelit u osób poddawanych redukcji masy ciała.

## **Hipoteza badawcza**

U osób z podwyższonym BMI obecny jest przewlekły, subkliniczny stan zapalny w obrębie jelit, zwiększona przepuszczalność jelitowa oraz nieprawidłowy skład mikrobiomu jelitowego.

Zastosowanie diety opartej o rekomendacje Polskiego Towarzystwa Dietetyki (PTD) oraz podaż probiotyku wpływa korzystnie na skład mikrobiomu jelit oraz skuteczność redukcji masy ciała.

## **Materiał i metody**

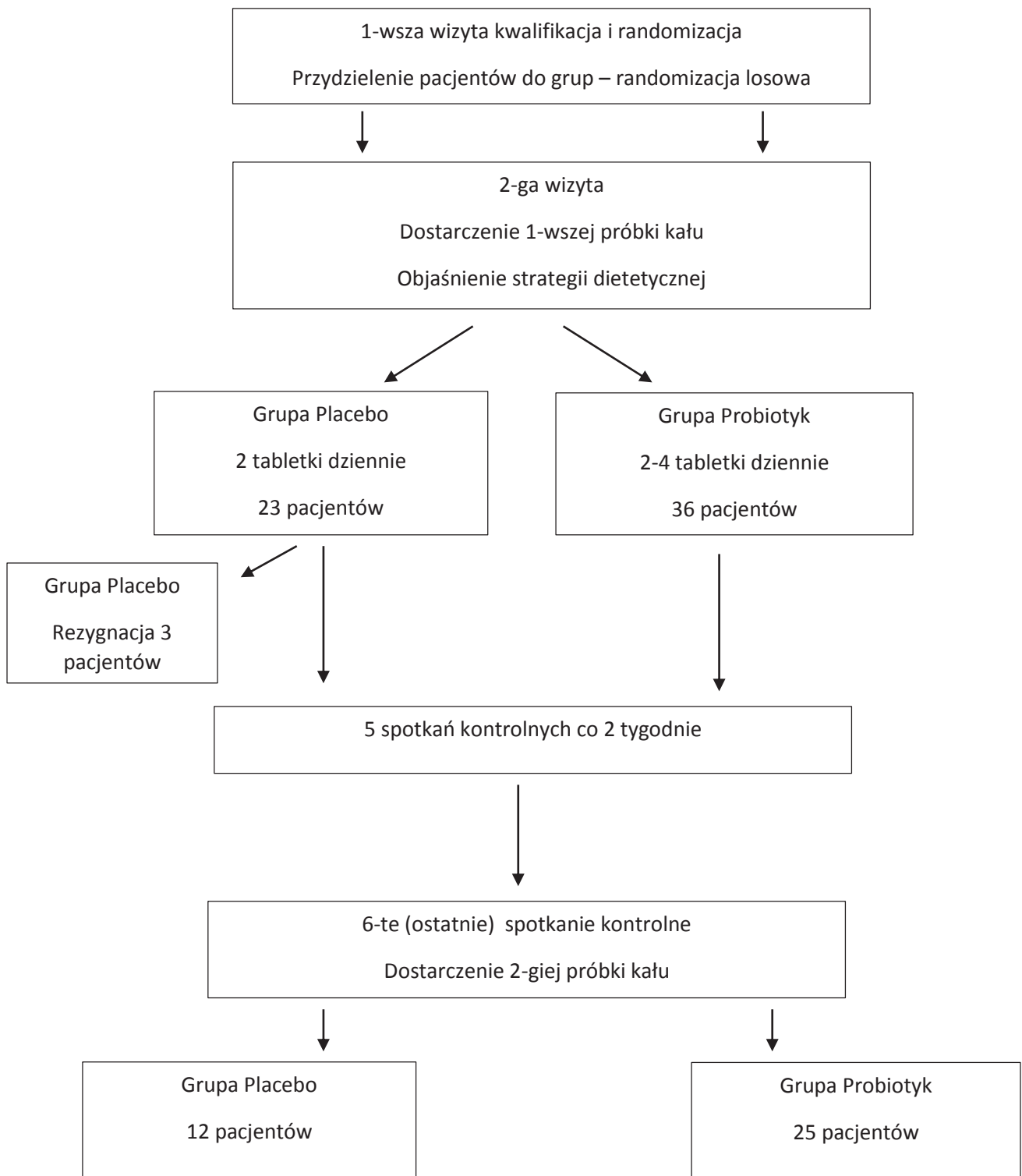
- **Schemat badania**

Do badania zakwalifikowano 56 pacjentów z nadwagą lub otyłością, zgłaszających się w celu redukcji masy ciała do Poradni Dietetycznej, Katedry Żywienia Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wśród pacjentów były 44 kobiety (78,6%) oraz 12 mężczyzn (21,4%), zakwalifikowanych na podstawie kryteriów włączenia i uzyskania zgody na udział w badaniu.

W trakcie badania, ze względów zdrowotnych, w tym konieczności włączenia antybiotykoterapii lub ze względów losowych zrezygnowały 3 osoby, natomiast 19 pacjentów nie dostarczyło 2-giej próbki kału (schemat 1).

Badanie miało charakter pojedynczej próby zaślepionej, zakwalifikowanych pacjentów randomizowano do dwóch grup badanych: Placebo oraz Probiotyk.

Schemat 1. Ramowy plan przebiegu badania.



- **Kryteria włączenia do badania i podział na grupy**

Pacjentów kwalifikowano do badania na podstawie przedstawionych poniżej kryteriów włączenia:

- BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>;
- obecność otyłości prostej;
- zgoda pacjenta na badanie;
- ukończone 18 lat;

Kryteria wyłączenia z badania:

- BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup>;
- brak zgody pacjenta
- wiek poniżej 18 lat

Osoby na podstawie randomizacji przydzielono do 2 grup:

- grupa kontrolna (Placebo): 20 pacjentów z nadwagą lub otyłością którym zalecono dietę redukcyjną oraz suplementację placebo w ilości 2 tabletki dziennie;
- grupa badana (Probiotyk): 36 pacjentów z nadwagą lub otyłością, którym zalecono dietę redukcyjną oraz suplementację preparatu probiotycznego w ilości 2 tabletki dziennie, dodatkowo w grupie 16 osób zastosowało dwukrotnie wyższą dawkę probiotyku, tj. 4 tabletki dziennie;

Ze względu na finalnie małą liczebność podgrupy stosującej podwójną dawkę probiotyku analiza statystyczna została przeprowadzona w dwóch grupach:

- grupie kontrolnej (Placebo) liczącą 20 pacjentów oraz
- grupie badanej (Probiotyk) liczącą 36 pacjentów.

Badanie obejmowało następujące etapy:

1. Wywiad żywieniowy, wykonanie pomiarów antropometrycznych, przypisanie do grupy na zasadzie randomizacji (pojedyncza ślepa próba), ustalenie schematu postępowania dietetycznego (założenia diety redukcyjnej, wypełnienie kwestionariusza FFQ;
2. Dostarczenie przez pacjenta dwóch próbek kału. Jedna próbka została zamrożona celem wykonania oznaczeń w terminie późniejszym (zonulina, laktoferyna), drugą bezpośrednio wykorzystano do oznaczeń mikrobiologicznych.
3. Włączenie suplementacji preparatu: probiotyk lub placebo;
4. Spotkania kontrolne przez okres 12 tygodni co 2 tygodnie (w sumie 6 spotkań);
5. Dostarczenie przez pacjenta ponownie dwóch próbek kału, zakończenie suplementacji oraz dietoterapii;
6. Wykonanie ponownie badania mikrobiologicznego w próbce kału oraz oznaczenie stężenia zonuliny i laktoferyny w próbkach (przed i po obserwacji).

Próbki materiału biologicznego pobierane były od pacjentów, po uprzednim wyrażeniu zgody pisemnej na udział w badaniu zgodnie z zasadami zaakceptowanymi przez Niezależną Komisję Bioetyczną do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym nr 379/2013 z dnia 17.09.2013 roku. Pacjenci dostarczali próbki kału w jałowych pojemnikach dwukrotnie: przed przystąpieniem do badania oraz po zakończeniu 12-to tygodniowej kuracji. Materiał przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , aż do chwili wykonania oznaczeń.

- **Charakterystyka grupy badanej**

W badaniu udział wzięło 56 pacjentów z nadwagą lub otyłością, których początkowo na zasadzie randomizacji losowej podzielono na dwie grupy:

- grupę kontrolną (Placebo),
- grupę badaną (Probiotyk) stosującą 2 - 4 tabletek probiotyku.

Po dokonaniu wstępnych analiz statystycznych nie wykazano żadnych istotnych różnic pomiędzy grupami stosującymi probiotyk, dlatego na potrzeby dalszych analiz wspomniane grupy połączono, tworząc 36 osobową grupę Probiotyk.

Odsetek kobiet i mężczyzn, zarówno w grupie Placebo jak i Probiotyk wynosił odpowiednio 75% i 25%. Średnie BMI pacjentów w grupach było zbliżone i wynosiło odpowiednio w grupie Probiotyk  $33,4 \pm 6,5$  (zakres 26,9-49,6), w grupie Placebo  $34,4 \pm 8,0$  (zakres 25,1-56,4).

W grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku, płci, wzrostu czy BMI.

Charakterystykę podstawową badanych grup pod względem wieku, płci, wzrostu oraz BMI przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Charakterystyka podstawowa grupy badanej (Probiotyki) i grupy porównawczej (Placebo) pod względem wieku, płci, wzrostu oraz BMI.

	<b>Grupa Probiotyk (N=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>p</b>
<b>Wiek</b>			
śr. (SD)	42,8 (13,5)	37,1 (14,3)	0,1403 <sup>1</sup>
zakres	18,0-66,0	18,0-64,0	
mediana	46,0	39,0	
<b>Płeć</b>			
kobieta	27 (75,0%)	15 (75,0%)	1,00 <sup>3</sup>
mężczyzna	9 (25,0%)	5 (25,0%)	
<b>Wzrost</b>			
śr. (SD)	168,0 (9,6)	169,4 (8,2)	0,4570 <sup>2</sup>
zakres	153,0-191,0	160,0-188,0	
mediana	164,5	168,0	
<b>BMI</b>			
śr. (SD)	33,4 (6,5)	34,4 (8,0)	0,8441 <sup>2</sup>
zakres	26,9-49,6	25,1-56,4	
mediana	32,1	33,3	

<sup>1</sup>t-Studenta test, <sup>2</sup>U Manna-Whitneya test, <sup>3</sup>Chi-kwadrat test

- Badania dodatkowe**

U pacjentów zostały wykonane pomiary antropometryczne, w tym:

- pomiar masy ciała (Jawon, Model – Contact 350F), wzrostu (wzrostomierz firmy SECA);

BMI (*Body Mass Index*) obliczono na podstawie wzoru: aktualna masa ciała/wzrost<sup>2</sup>, przyjęto następującą klasyfikację BMI:

<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Interpretacja</b>
< 18,5	Niedowaga
18,5-24,9	Prawidłowa masa ciała
25-29,9	Nadwaga
30-34,9	Otyłość I stopnia
35-39,9	Otyłość II stopnia
≥40	Otyłość III stopnia

- ocena składu ciała, w tym m.in. beztłuszczowa masa ciała (LBM – *Lean Body Mass*), masa tkanki tłuszczowej (MBF – *Mass of Body Fat*), zawartość wody całkowitej (TBW – *Total Body Water*), procentowa zawartość tkanki tłuszczowej (PBF – *Percent of Body Fat*), segmentowa analiza składu ciała dla beztłuszczowej masy ciała oraz dla tkanki tłuszczowej w rozkładzie: lewa ręka, lewa noga, prawa ręka, prawa noga, tułów, oraz podstawowa przemiana materii (BMR – *Basal Metabolic Rate*), przy pomocy bioimpedancji (aparat Jawon, Model –Contact 350F).

Wykonano również przed przystąpieniem do terapii analizę zwyczajów żywieniowych pacjentów z wykorzystaniem kwestionariusza częstości spożycia żywności FFQ-6 (*Food Frequency Questionnaire*). Kwestionariusz jest półilościowym, zwalidowanym dla populacji polskiej narzędziem pozwalającym na ocenę częstości i ilości żywności spożywanej zwyczajowo w przeciągu ostatnich 12 miesięcy.

- **Charakterystyka stosowanego preparatu probiotycznego**

W badaniu zastosowano probiotyk Sanprobi Super Formula (Sanprobi Sp. z o.o. zawierający siedem żywych szczepów bakterii probiotycznych oraz dwa prebiotyki. Tabela 2 przedstawia listę zawartych w preparacie bakterii oraz prebiotyków jak również skład ilościowy substancji aktywnych zawartych w porcji maksymalnej zalecanej do spożycia w ciągu dnia (2 - 4 tabletek).

Tabela 4. Skład stosowanego preparatu probiotycznego.

Probiotyki			
rodzaj	gatunek	szczep	Ilość
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	W51	≥2,8*10 <sup>8</sup> CFU
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	W52	
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	W22	≥1,2*10 <sup>8</sup> CFU
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	W20	≥0,9*10 <sup>8</sup> CFU
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	W21	≥1,1*10 <sup>8</sup> CFU
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	W24	≥0,9*10 <sup>8</sup> CFU
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	W19	≥1,1*10 <sup>8</sup> CFU
Prebiotyki			
Fruktooligosacharydy (FOS)			9,6mg
Inulina			110,4mg

- **Opis badania bakteriologicznego**

Badanie mikrobiologiczne wykonano z użyciem testu KyberKompakt w laboratorium Instytutu Mikroekologii w Poznaniu.

Jest to ilościowa i jakościowa analiza próbek kału w kierunku wybranych rodzajów bakterii obecnych w przewodzie pokarmowym oraz grzybów drożdżopodobnych, półilościowa diagnostyka grzybów pleśniowych i analiza parametrów takich jak: pH i konsystencja kału. Badanie ocenia obecność wymienionych drobnoustrojów wskaźnikowych oraz grzybów:

- beztlenowce z rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides*;
- bakterie z rodzaju *Enterococcus* i pałeczki z gatunku *Escherichia coli*, w tym postać potencjalnie patologiczna tzw. *Escherichia coli* *Biovare*;
- beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium*;
- pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, w tym produkujące nadtlenek wodoru, tj.  $H_2O_2$  *Lactobacillus*;
- inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Proteus* spp.) oraz z rodzaju *Pseudomonas*;
- całkowitą liczbę bakterii;
- obecność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz ilościową diagnostykę drożdżaków i grzybów pleśniowych ogółem;

Do badań bakteriologicznych pobierano 0,25g kału i umieszczano w 2,25ml jałowej soli fizjologicznej (rozcieńczenie  $10^{-1}$ ). Po wymieszaniu próby na wytrząsarce, pobierano 250  $\mu$ l zawiesiny do kolejnej probówki z 2,25ml jałowej soli fizjologicznej (rozcieńczenie  $10^{-2}$ ). Procedurę powtarzano, aż do uzyskania rozcieńczenia  $10^{-8}$ . Szereg odpowiednich rozcieńczeń posiewano w ilości 50 $\mu$ l oraz rozprowadzono jałową eżą, na podłoża wybiórczo-różnicujące oraz namnażające:

- całkowita liczba bakterii – posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-8}$  na podłoże agarowe z 5% krwią baranią (bioMerieux);
- beztlenowe bakterie z rodzaju *Bacteroides* - posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-6}$  na podłoże wybiórcze: agar Schaedlera (Heipha);
- beztlenowe pałeczki z rodzaju *Bifidobacterium* – posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-6}$  na podłoże wybiórcze: agar DIC (Heipha);
- beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium* - posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-3}$  na podłoże SPM (Heipha);
- bakterie z rodzaju *Enterococcus* oraz pałeczki z gatunku *Escherichia coli* - posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-5}$  i  $10^{-3}$  na podłoże chromogenne CPS (bioMerieux);
- potencjalnie patologiczna forma *Escherichia coli* *Biovare* - posiew 50 $\mu$ l zawiesiny z rozcieńczenia  $10^{-3}$  na podłoże Endo (Heipha);



- pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* oraz pałeczki kwasu mlekowego produkujące nadtlenek wodoru *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lactobacillus* – posiew 50μl zawiesiny z rozcieńczenia 10<sup>-3</sup> na podłoże Rogosa z peroksydazą i związkami TMB (Heipha);
- pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp.) oraz pałeczki z rodzaju *Pseudomonas* – posiew 50μl zawiesiny z rozcieńczenia 10<sup>-5</sup> i 10<sup>-3</sup> na podłoże chromogenne CPS;

Hodowle prowadzono w specyficznych warunkach:

- inkubacja prowadzona przez 48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych – w celu oznaczenia całkowitej liczby bakterii oraz bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*;
- inkubacja prowadzona przez 48 godzin w temperaturze 37°C w warunkach podwyższonego stężenia CO<sub>2</sub> – w celu oznaczenia obecności pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*;
- inkubacja przez 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych – w celu oznaczenia obecności bakterii z rodzaju *Enterococcus*, pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* i pałeczek z rodzaju *Proteus*;

Po upływie odpowiedniego czasu wszystkie hodowle poddane zostały analizie mikrobiologicznej.

Bakterie analizowane w teście KyberKompakt charakteryzuje się w oparciu o ich właściwości w obrębie trzech podgrup:

- mikrobiota ochronna (*Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus*);
- immunostymulująca (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.);
- proteolityczna (śluzowe, potencjalnie patogenne szczepy *Escherichia coli* Biovare, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp.);

Dla oceny ewentualnych korelacji pomiędzy stanem jelit pacjentów a liczebnością drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym, bakterie przedstawione w wynikach posiewów podzielono na 3 grupy w zależności od pełnionych przez nie w organizmie funkcji:

- mikroflora ochronna: *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus*;
- mikrobiota immunostymulująca: *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.;
- mikrobiota proteolityczna: śluzowe, laktozo-ujemne szczepy *Escherichia coli* Biovare, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., inne bakterie proteolityczne;

- **Opis badania mykologicznego**

Próbki kału pobierane od pacjentów analizowane były również w celu wykrycia i oznaczenia liczebności wybranych grzybów. Badanie pozwala na ilościowe określenie obecności grzybów drożdżopodobnych oraz grzybów pleśniowych, bytujących w przewodzie pokarmowym człowieka.

Materiał do analizy pobierany był z 8 różnych miejsc, z uprzednio wymieszanej próbki kału, celem ujednoczenia próby. Oznaczenie wykonano w terminie maksymalnie 3 dni od pobrania próby, wcześniej próbki przechowywane były w temperaturze 4°C. Do oznaczenia pobierano 0,25g kału i umieszczano w 2,5ml roztworu trypsyny z dodatkiem 25µg antybiotyków (Penicyliny i Streptomycyny), w celu zahamowania wzrostu bakterii. Następnie próbę umieszczano w temperaturze 37°C na 15 minut celem nadtrawienia resztek pokarmowych, które mogłyby uniemożliwić wzrost grzybów. Kolejnym krokiem było przepłukanie próby w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), a następnie posiew na 2 podłoża wzrostowe dla grzybów, Sabouraud z chloramfenikolem (bioMerieux). Inkubację prowadzono odpowiednio: dla pierwszej płytki w 37°C przez 48h; dla drugiej płytki w temperaturze pokojowej przez okres 48h. Taki zabieg miał na celu rozróżnienie grzybów pochodzących ze środowiska od grzybów potencjalnie chorobotwórczych. Ostatnim etapem było przeprowadzenie diagnostyki mikologicznej – identyfikacja wstępna do gatunku grzybów drożdżopodobnych przy użyciu podłoża chromogennego CHOMagar Candida (Becton Dickinson), natomiast grzyby pleśniowe identyfikowano w oparciu o preparat bezpośredni i klucz mikologiczny.

- **Oznaczenie w próbkach kału stężenia zonuliny**

Stężenie zonuliny w kale oznaczano przy użyciu testu ELISA (Zonulin Elisa, numer katalogowy K5600, Immundiagnostik AG, Germany).

Do studzienek reakcyjnych наносono 100µl rozcieńczonego uprzednio materiału biologicznego, standardów oraz kontroli. Studzienki płytki reakcyjnej opłaszczane były poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko zonulinie. Pierwsza inkubacja trwała 60 minut w temperaturze pokojowej, płytka reakcyjna umieszczona była na wytrząsarce. Następnie każdą studzienkę reakcyjną płukano 5 - krotnie buforem płuczającym i dodawano 100µl koniugatu. Ponownie inkubowano w wytrząsarce, w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Po drugim 5 - krotnym płukaniu buforem, do każdej studzienki dodano substrat i przeprowadzono inkubację w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Reakcję zatrzymano poprzez dodatek 100µl buforu STOP. Absorbancję próbek odczytywano przy użyciu spektrofotometru E-Liza Mat 3000 i na tej podstawie wyznaczano stężenie zonuliny w oparciu o krzywą wzorcową.

- **Oznaczenie w próbkach kału stężenia laktoferyny**

Stężenie laktoferyny w kale oznaczano przy użyciu testu ELISA (Lactoferrin Elisa, numer katalogowy K6870, Immundiagnostik AG, Germany).

W tym celu do studzienek reakcyjnych наносono 100µl rozcieńczonego uprzednio materiału biologicznego. Jednocześnie na płytkę наносono po 100 µl odpowiednio: kontroli dodatniej, ujemnej

oraz roztworów standardowych. Studzienki płytki reakcyjnej opłaszczane były króliczymi przeciwciałami przeciwko laktoferynie. Pierwszą inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie każdą studzienkę reakcyjną przepłukano 5 – krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano 100µl koniugatu, który zawierał królicze poliklonalne przeciwciała swoiste dla ludzkiej laktoferyny i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po kolejnym 5-krotnym płukaniu buforem, do każdej studzienki reakcyjnej dodano substrat i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut w ciemności. Po tym czasie reakcję zatrzymano poprzez dodanie 100µl buforu STOP. Gęstość optyczną próbek odczytano przy użyciu spektrofotometru E-Liza Mat 3000 i na tej podstawie wyznaczono stężenia laktoferyny w oparciu o krzywą wzorcową.

- **Algorytm postępowania dietetycznego**

Przed ustaleniem diety dokonano oceny sposobu żywienia pacjentów na podstawie wywiadu 24-godzinnego oraz kwestionariusza częstości spożycia FFQ-6. Przygotowując dietę niskokaloryczną dietetyk brał również pod uwagę indywidualne cechy pacjentów: wiek, stopień otyłości, obecność chorób towarzyszących i metody ich leczenia oraz dotychczas podejmowane metody walki z nadwagą i otyłością. Przy konstruowaniu diety zwracano także uwagę na kulturowe zwyczaje żywieniowe pacjentów. Dieta była ustalana zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Dietetyki [72].

Metodyka planowania diety redukcyjnej obejmowała:

1. Ustalenie zapotrzebowania energetycznego:

- ustalenie BMR w oparciu o wskazania wagi z bioimpedancją;
- obliczenie całkowitego zapotrzebowania energetycznego pacjenta (CPM), wykorzystując współczynnik aktywności fizycznej (PAL = 1,4 -dla osób o niskiej aktywności fizycznej; 1,6 – dla osób o średniej aktywności fizycznej; 2,0 – dla osób o dużej aktywności fizycznej);
- ustalenie wysokości redukcji masy ciała na jednostkę czasu – dla ujednoczenia przyjęto deficyt 500 kcal dziennie, w celu utraty 0,5-1,0 kilograma w tygodniu.

2. Ustalenie zapotrzebowania na składniki odżywcze:

- białko: 20 – 25% dobowego zapotrzebowania energetycznego;
- tłuszcz: 25 - 30% dobowego zapotrzebowania energetycznego;
- węglowodany: 45-55% dobowego zapotrzebowania energetycznego.

3. Ustalenie zapotrzebowania na składniki mineralne w oparciu o normy żywienia dla populacji Polski z 2012 roku.

4. Ustalenie dziennej racji pokarmowej oraz rozkładu energetycznego posiłków (4-5 posiłków dziennie).

Dietoterapia zaplanowana była na 12 tygodni, w trakcie których pacjenci co 2 tygodnie odbywali spotkania kontrolne (przykład diety umieszczono w aneksie). Wykonywano wówczas pomiary antropometryczne oraz ustalano ewentualne konieczne zmiany w bieżącej diecie.

Spotkania kontrolne ponadto miały na celu analizę przestrzegania zaleceń dietetycznych. Obok weryfikacji postępu zmian masy ciała, sprawdzano przebieg suplementacji probiotykiem. Pacjent zgłaszał ile od czasu ostatniej wizyty zużył kapsułek preparatu, co zapisywano w karcie.

- **Analiza statystyczna**

Wszystkie obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu statystycznego StatSoft. Inc. (2014). STATISTICA 12.0 oraz arkusza kalkulacyjnego Excel.

Zmienne ilościowe zostały scharakteryzowane za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej (zakres) oraz 95%CI (przedział ufności). Natomiast zmienne typu jakościowego zostały przedstawione za pomocą licznosci oraz wartości procentowych (odsetka).

Do sprawdzenia, czy zmienna ilościowa pochodziła z populacji o rozkładzie normalnym posłużono się testem W Shapiro-Wilka. Natomiast do sprawdzenia hipotezy o równych wariancjach wykorzystano test Levena (Browna-Forsythe'a).

Stosując test Grubbsa określano w danych wartości odstające, które następnie wykluczano w dalszych analizach statystycznych.

Istotność różnic pomiędzy dwiema grupami (model zmiennych niepowiązanych) zbadano testami istotności różnic: t-Studenta (lub w przypadku braku homogeniczności wariancji test Welcha) lub test U Manna-Whitneya (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności testu t-Studenta lub dla zmiennych zmierzonych na skali porządkowej). Istotność różnic pomiędzy więcej niż dwiema grupami sprawdzono testem F (ANOVA) lub Kruskala-Wallisa (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności ANOVA). W przypadku otrzymania istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami zastosowano testy post hoc (dla F test Tukeya. dla Kruskala-Wallisa test Dunna).

W przypadku modelu dwóch zmiennych powiązanych wykorzystano test t-Studenta lub test kolejności par Wilcoxon (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności testu t-Studenta lub dla zmiennych zmierzonych na skali porządkowej). Istotność różnic pomiędzy więcej niż dwiema zmiennymi w modelu zmiennych powiązanych sprawdzano analizą wariancji z powtarzanymi pomiarami lub testem Friedmana (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami lub dla zmiennych zmierzonych na skali porządkowej).

Testy niezależności Chi-kwadrat wykorzystano dla zmiennych jakościowych (odpowiednio z wykorzystaniem korekcji wg Yatesa dla liczebności komórek poniżej 10, sprawdzeniem warunków Cochra, dokładny test Fishera).

W celu stwierdzenia powiązania pomiędzy zmiennymi zastosowano test Pearsona i/lub Spearmana obliczając współczynniki korelacji. We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto  $p=0,05$ .

## Wyniki

- **Analiza częstości spożycia żywności**

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w częstości spożycia wybranych produktów spożywczych w obu badanych grupach. Wyniki analiz przedstawiają tabele umieszczone w aneksie.

Na uwagę zasługuje zatem fakt, iż zgodnie z wykonaną analizą zwyczaje żywieniowe pacjentów w obu badanych grupach były podobne, przed przystąpieniem do badania.

- **Analiza zmian parametrów antropometrycznych w trakcie terapii**

Wykonano analizę statystyczną dotyczącą zmian masy ciała, BMI, beztłuszczowej masy ciała, zawartości wody, masy tkanki tłuszczowej oraz podstawowej przemiany materii zarówno w grupie Probiotyk jak i grupie Placebo, przed i po 12 tygodniach obserwacji.

Tabela 14 przedstawia zmiany BMI w obu grupach badanych. Średnia wartość BMI pacjentów w grupie Probiotyk, przed włączeniem diety wynosiła  $33,4 \pm 6,5 \text{ kg/m}^2$  (zakres 26,9 – 49,6), a w grupie Placebo  $34,4 \pm 8,0 \text{ kg/m}^2$  (zakres 25,1 – 56,4). Po 12 tygodniach średnia wartość BMI po okresie dietoterapii pacjentów w grupie Probiotyk wynosiła  $32,3 \pm 6,7 \text{ kg/m}^2$  (zakres 19,3-49,7), a w grupie Placebo wynosiła  $32,4 \pm 7,1 \text{ kg/m}^2$  (zakres 23,7-49,4).

Dodatkowo wykonano analizę zmian masy ciała pacjentów włączonych do badania. W grupie Placebo jeden pacjent przytył 1,7kg w stosunku do masy ciała wyjściowej, pozostali pacjenci stracili średnio  $6,3 \pm 4,2 \text{ kg}$  (zakres 1,4-18,2). W grupie Probiotyk natomiast 4 pacjentów przytyło średnio  $0,42 \pm 0,5 \text{ kg}$  (zakres 0,1-1,2), natomiast u 29 osób zaobserwowano ubytek masy ciała wynoszący średnio  $4,6 \pm 4,4 \text{ kg}$  (zakres 0,6-20,2). Nie wykazano istotności statystycznej w opisywanych zmianach masy ciała.

Tabela 14. Porównanie badanych grup pod względem BMI.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>p</b>
<b>BMI przed</b>			0,8441 <sup>1</sup>
śr. (SD)	33,4 (6,5)	34,4 (8,0)	
zakres	25,9-49,6	25,1-56,4	
mediana	32,1	33,3	
95%CI	[31,2;35,6]	[30,7;38,1]	
<b>BMI po</b>			0,9864 <sup>1</sup>
śr. (SD)	32,3 (6,7)	32,4 (7,1)	
zakres	19,3-49,7	23,7-49,4	
mediana	30,9	30,9	
95%CI	[30,0;34,5]	[29,1;35,8]	

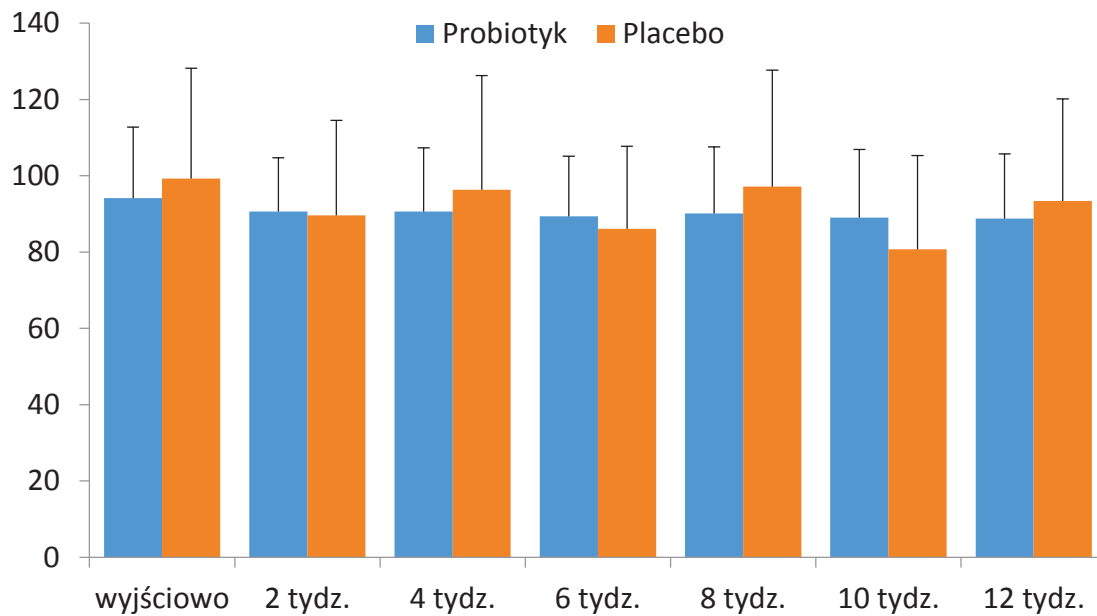
<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

Wykazano istotny statystycznie spadek BMI w obu grupach po 12 tygodniach (Wilcoxon test, p=0,0001).

Porównanie masy ciała zarówno w grupie Probiotyk jak i w grupie Placebo wykazało istotną statystycznie zmianę w rozpatrywanym okresie badania (test Friedmana, p=0,0001). Analiza *post hoc* (Dunna test) w grupie Probiotyk, jak i w grupie Placebo, wykazała istotny spadek masy ciała w 10 i 12 tygodniu diety w stosunku do wyjściowej masy ciała oraz istotny spadek masy ciała w tygodniu 12 w stosunku do 2 tygodnia terapii.

Szczegółowy przebieg zmian średniej masy ciała w obu grupach badanych przedstawia wykres 1.

Wykres 1. Porównanie zmian masy ciała w grupie Probiotyk i Placebo.



Charakterystyka porównawcza badanych grup pod względem zawartości beztłuszczowej masy ciała, wody, tkanki tłuszczowej i podstawowej przemiany materii nie wykazała istotnych statystycznie różnic w obu badanych grupach co obrazuje tabela 15.

Tabela 15. Porównanie badanych grup pod względem beztłuszczowej masy ciała, wody, tkanki tłuszczowej i podstawowej przemiany materii.

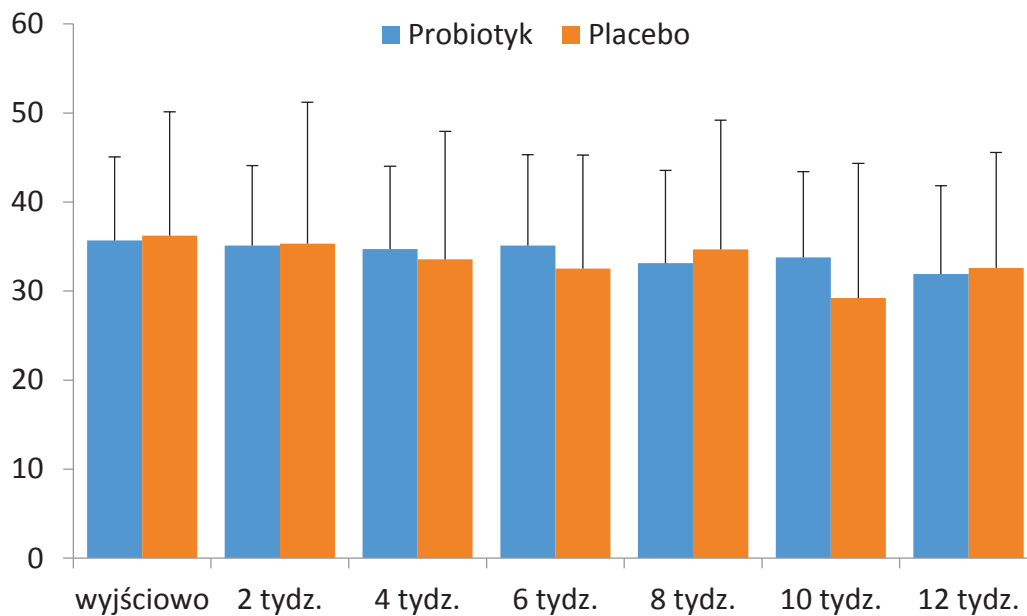
			start	2 tydz.	4 tydz.	6 tydz.	8 tydz.	10 tydz.	12 tydz.	p
<b>FFM (beztłuszczowa masa ciała) [kg]</b>	Grupa Probiotyk	średnia (SD)	57,9 (11,3)	55,4 (9,2)	56,9 (11,6)	55,9 (11,1)	56,9 (9,7)	55,1 (11,5)	56,6 (11,0)	>0,05 <sup>1,2</sup>
		zakres	41,9-87,7	43,0-80,0	40,8-80,5	42,3-79,9	42,5-79,9	42,0-82,0	37,8-82,2	
	Grupa Placebo	średnia (SD)	63,0 (19,4)	54,3 (10,8)	62,7 (19,6)	54,1 (10,4)	62,5 (20,1)	52,0 (9,7)	60,8 (18,0)	
		zakres	41,1-120,0	40,9-73,1	40,1-118,6	40,4-73,2	39,0-117,5	40,6-71,2	40,5-117,8	
<b>TBW (zawartość wody) [kg]</b>	Grupa Probiotyk	średnia (SD)	41,6 (8,2)	39,9 (6,9)	41,0 (8,1)	40,2 (8,1)	41,0 (7,2)	39,7 (8,4)	40,9 (7,8)	>0,05 <sup>1,2</sup>
		zakres	30,8-63,1	30,0-57,6	29,9-58,0	29,4-57,5	29,5-57,7	29,6-59,0	29,4-59,2	
	Grupa Placebo	średnia (SD)	45,4 (14,3)	39,0 (7,8)	43,5 (13,9)	39,2 (7,3)	43,1 (13,3)	37,3 (7,1)	42,3 (11,6)	
		zakres	29,6-87,8	29,4-52,6	28,9-86,8	29,1-52,7	28,1-86,0	29,2-51,3	29,2-84,1	
<b>FM (zawartość tkanki tłuszczowej) [kg]</b>	Grupa Probiotyk	średnia (SD)	35,7 (9,4)	35,1 (9,0)	34,7 (9,3)	35,1 (10,2)	33,1 (10,4)	33,8 (9,6)	31,9 (9,9)	>0,05 <sup>1,2</sup>
		zakres	19,9-54,3	18,3-49,1	17,4-49,7	15,4-51,6	14,5-57,9	14,3-47,9	14,0-57,9	
	Grupa Placebo	średnia (SD)	36,2 (13,9)	35,3 (15,9)	33,6 (14,3)	32,5 (12,7)	34,7 (14,5)	29,2 (15,1)	32,6 (13,0)	
		zakres	14,3-67,7	12,6-68,6	12,8-66,0	11,4-62,3	12,1-63,1	10,3-57,6	10,2-63,2	
<b>BMR (zapotrzebowanie podstawowe) [kcal]</b>	Grupa Probiotyk	średnia (SD)	1483,0 (277,7)	1488,0 (270,7)	1484,1 (289,4)	1493,9 (321,8)	1451,3 (257,5)	1491,4 (271,7)	1440,6 (270,5)	>0,05 <sup>1,2</sup>
		zakres	1109,0-2033,0	1185,0-2023,0	1109,0-2247,0	1141,0-2020,0	1163,0-2020,0	1219,0-2000,0	1133,0-2008,0	
	Grupa Placebo	średnia (SD)	1566,4 (376,4)	1436,2 (184,3)	1534,8 (399,6)	1290,5 (417,9)	1501,3 (610,5)	1320,6 (94,1)	1599,8 (597,9)	
		zakres	1245,0-2771,0	1235,0-1791,0	1229,0-2756,0	1210,0-1772,0	1072,5-2778,0	1235,0-1461,0	1229,0-3705,0	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test, <sup>2</sup>t-Studenta test



W grupie pacjentów stosujących probiotyk masa tkanki tłuszczowej istotnie zmniejszyła się w okresie obserwacji (wykres 2, test Friedmana,  $p=0,0095$ ). Analiza post hoc (test Dunna) wykazała, że masa tkanki tłuszczowej istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej wyjściowej. Dla pozostałych porównań nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian. Również w grupie Placebo masa tkanki tłuszczowej istotnie zmieniła się w rozpatrywanym okresie obserwacji (test Friedmana,  $p=0,0008$ ). Analiza post hoc (test Dunna) wykazała, że masa tkanki tłuszczowej istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej wyjściowej oraz istotnie zmniejszyła się w 12 tygodniu w stosunku do masy tkanki tłuszczowej w 2 tygodniu diety. Dla pozostałych porównań nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian.

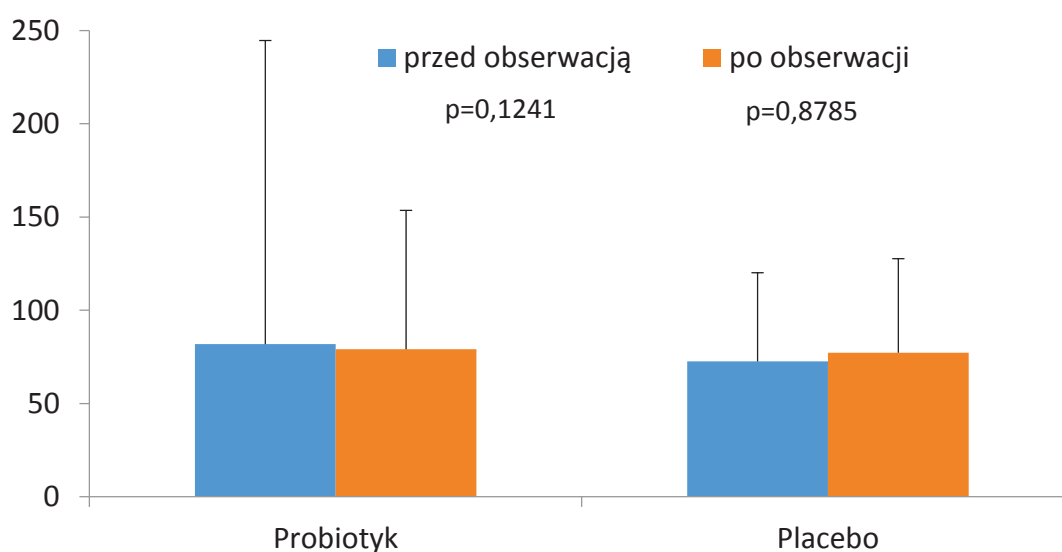
Wykres 2. Porównanie zmian zawartości tkanki tłuszczowej w grupie Probiotyk i Placebo.



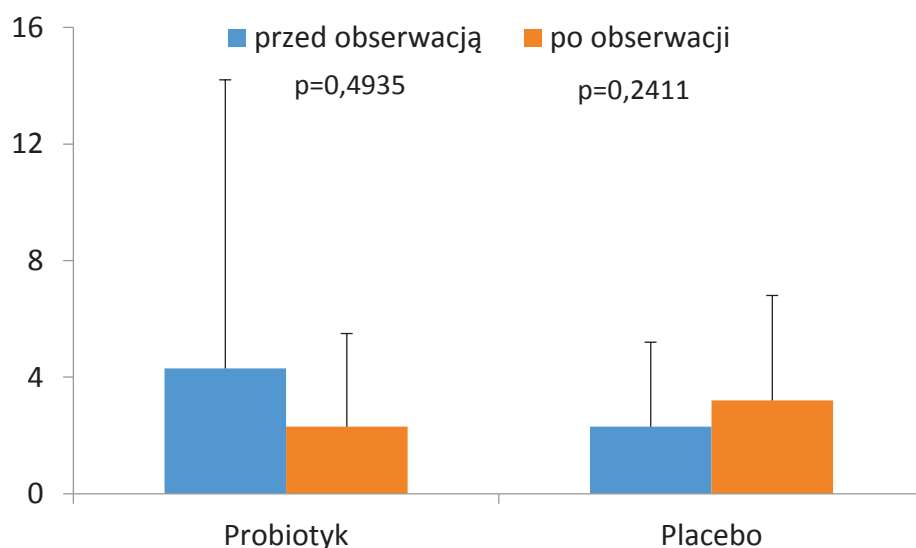
- **Stężenie markerów stanu zapalnego i przepuszczalności jelit w badanych grupach**

Wykresy 3 i 4 przedstawiają zmiany stężeń zonuliny i laktoferyny w badanych próbkach kału pacjentów w grupie Probiotyk i Placebo. W obu rozpatrywanych grupach nie wykazano istotnych statystycznie zmian w stężeniach badanych parametrów zarówno przed jak i po obserwacji (test Wilcoxon). Znotowano jednak obniżenie stężenia badanych markerów w grupie stosującej probiotyk, odwrotnie zaś – wzrost w grupie przyjmującej placebo.

Wykres 3. Zmiany stężenia zonuliny w grupach badanych.



Wykres 4. Zmiany stężenia laktoferyny w grupach badanych.



Na potrzeby wykonywanych oznaczeń przyjęto również w oparciu o dane literaturowe wartości referencyjne oznaczonych markerów, powyżej których notuje się odpowiednio – wystąpienie zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej oraz obecność stanu zapalnego:

- zonulina 61ng/ml próbki;

- laktoferyna <7,2 µg/ml próbki;

Zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 16 średnie stężenie zonuliny w grupach badanych było powyżej przyjętej normy. Natomiast po 3 miesiącach kuracji zanotowano obniżenie średniego stężenia zonuliny u pacjentów w grupie Probiotyk, natomiast w grupie Placebo – wzrost. W obu przypadkach stężenia markera przepuszczalności jelit pozostawały powyżej normy. Zaobserwowano, że w przypadku laktoferyny średnie wartości parametru zapalnego w badanych grupach pozostawały w normie zarówno przed jak i po obserwacji.

Tabela 16. Zmiany stężenia zonuliny i laktoferyny w badanych grupach.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>p</b>
<b>Zonulina (przed obserw.)</b>			0,1466 <sup>1</sup>
śr. (SD)	81,9 (162,7)	72,6 (47,6)	
zakres	7,0-935,5	24,0-151,0	
mediana	35,5	54,0	
<b>Zonulina (po obserw.)</b>			0,6080 <sup>1</sup>
śr. (SD)	79,1 (74,5)	77,2 (50,5)	
zakres	7,0-293,0	6,5-157,5	
mediana	57,0	94,5	
<b>Laktoferyna (przed obserw.)</b>			0,9126 <sup>1</sup>
śr. (SD)	4,3 (9,9)	2,3 (2,9)	
zakres	0,3-54,2	0,6-9,5	
mediana	1,1	1,2	
<b>Laktoferyna (po obserw.)</b>			0,8642 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2,3 (3,2)	3,2 (3,6)	
zakres	0,6-17,7	0,7-12,5	
mediana	1,5	1,9	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

- **Analiza zależności zonuliny i laktoferyny od wybranych parametrów antropometrycznych**

Analiza korelacji pomiędzy stężeniem zonuliny i laktoferyny w próbkach kału, z wiekiem oraz BMI wyjściowym i BMI końcowym pacjentów w grupach Probiotyk i Placebo nie wykazała istotnych statystycznie różnic (test Spearmana, p>0,05).

- **Analiza mikrobiologiczna próbek kału**

Analiza statystyczna zmian liczebności bakterii pełniących funkcje ochronne w przewodzie pokarmowym nie wykazała istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych drobnoustrojów względem badanych grup w posiewie 1. W posiewie 2 zaobserwowano natomiast, że liczebność bakterii *Bacteroides spp.* w grupie Placebo była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie Probiotyk ( $p=0,0256$ ). W przypadku pozostałych drobnoustrojów nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (tabela 17).

Tabela 17. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii pełniących funkcję ochronną (przed i po obserwacji).

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Posiew 1</b>			
<b><i>Bifidobacterium spp.</i> (<math>\times 10^7</math>)</b>			0,5048 <sup>1</sup>
śr. (SD)	67,5 (103,6)	80,0 (106,7)	
zakres	2,0-400,0	4,0-400,0	
mediana	20,0	35,0	
<b><i>Bacteroides spp.</i> (<math>\times 10^7</math>)</b>			0,6140 <sup>1</sup>
śr. (SD)	171,2 (133,1)	179,9 (122,4)	
zakres	4,0-600,0	4,0-400,0	
mediana	200,0	200,0	
<b><i>Lactobacillus spp.</i> (<math>\times 10^4</math>)</b>			0,8307 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2 965,8 (16 640,8)	139,8 (225,6)	
zakres	2,0-100 000,0	2,0-800,0	
mediana	40,0	45,0	
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i> (<math>\times 10^4</math>)</b>			0,7068 <sup>1</sup>
śr. (SD)	732,2 (3 335,2)	53,9 (132,4)	
zakres	2,0-20 000,0	2,0-600,0	
mediana	12,0	9,5	
<b>Mikroflora ochronna (<math>\times 10^4</math>)</b>			0,3693 <sup>1</sup>
śr. (SD)	60 605,1 (49 076,4)	65 023,4 (38 078,0)	
zakres	2 001,0-226 000,0	2 501,0-125 300,0	
mediana	51 002,3	66 762,5	
<b>Posiew 2</b>			
<b><i>Bifidobacterium spp.</i> (<math>\times 10^7</math>)</b>			0,9599 <sup>1</sup>
śr. (SD)	70,2 (123,0)	55,8 (84,4)	
zakres	2,0-600,0	4,0-300,0	
mediana	45,0	20,0	

<b><i>Bacteroides spp. (x10<sup>7</sup>)</i></b>			0,0256 <sup>1</sup>
śr. (SD)	147,3 (141,3)	243,3 (159,5)	
zakres	4,0-600,0	20,0-600,0	
mediana	100,0	200,0	
<b><i>Lactobacillus spp. (x10<sup>4</sup>)</i></b>			0,2402 <sup>1</sup>
śr. (SD)	25 137,8 (122 445,5)	80,0 (173,5)	
zakres	2,0-600 000,0	2,0-600,0	
mediana	35,0	9,0	
<b><i>H2O2 Lactobacillus (x10<sup>4</sup>)</i></b>			0,1637 <sup>1</sup>
śr. (SD)	732,2 (3 335,2)	53,9 (132,4)	
zakres	2,0-20 000,0	2,0-600,0	
mediana	12,0	9,5	
<b>Mikroflora ochronna (x10<sup>4</sup>)</b>			0,0753 <sup>1</sup>
śr. (SD)	61 287,2 (74 522,8)	74 829,3 (52 814,9)	
zakres	2 003,0-300 250,0	12 505,5-200 100,0	
mediana	41 274,3	55 001,0	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

Porównanie wyników badania bakteriologicznego wykonanego przed i po 12 miesiącach pod względem liczebności bakterii pełniących funkcje immunostymulujące nie wykazała żadnych istotnych statystycznie różnic w obu rozpatrywanych grupach badanych (tabela 18).

Tabela 18. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii pełniących funkcje immunostymulujące.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Posiew 1</b>			
<b><i>Escherichia coli (x10<sup>4</sup>)</i></b>			0,6566 <sup>1</sup>
śr. (SD)	3 131,2 (6 982,6)	3 161,3 (5 990,4)	
zakres	2,0-30 000,0	2,0-20 000,0	
mediana	500,0	600,0	
<b><i>Enterococcus spp. (x10<sup>4</sup>)</i></b>			0,8642 <sup>1</sup>
śr. (SD)	816,8 (1 703,5)	745,8 (2 282,6)	
zakres	0,2-8 000,0	2,0-10 000,0	
mediana	65,0	45,0	
<b>Mikroflora immunos.(x10<sup>4</sup>)</b>			0,7844 <sup>1</sup>
śr. (SD)	1 974,0 (3 903,4)	1 953,6 (3 105,0)	
zakres	3,0-17 500,0	2,0-10 040,0	
mediana	475,5	451,0	

<b>Posiew 2</b>			
<b><i>Escherichia coli</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,7120 <sup>1</sup>
śr. (SD)	3 956,5 (6 600,1)	1 586,2 (1 815,3)	
zakres	2,0-20 000,0	2,0-5 000,0	
mediana	700,0	800,0	
<b><i>Enterococcus spp.</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,4603 <sup>1</sup>
śr. (SD)	1 081,5 (1 751,0)	477,5 (826,5)	
zakres	2,0-6 000,0	2,0-3 000,0	
mediana	300,0	300,0	
<b>Mikroflora immunos.(x10<sup>4</sup>)</b>			0,4706 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2 519,0 (3 706,0)	1 031,8 (1 043,8)	
zakres	2,0-12 000,0	11,0-2 501,0	
mediana	825,0	475,0	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

W analizie porównawczej grupy Probiotyk z grupą Placebo nie wykazano istotnych statystycznie zmian liczebności bakterii należących w grupy proteolitycznych: *Escherichia coli* *Biovare*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* oraz innych bakterii proteolitycznych (tabela 19).

Tabela 19. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii proteolitycznych.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>	<b>P</b>
<b>Posiew 1</b>			
<b><i>Escherichia coli</i> <i>Biovare</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,2449 <sup>1</sup>
śr. (SD)	707,3 (3 376,7)	303,3 (781,4)	
zakres	2,0-20 000,0	2,0-3 000,0	
mediana	2,0	2,0	
<b><i>Proteus</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,9932 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2,0 (0,0)	2,0 (0,0)	
zakres	2,0-2,0	2,0-2,0	
mediana	2,0	2,0	
<b><i>Pseudomonas spp.</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,7648 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2,0 (0,0)	2,9 (4,0)	
zakres	2,0-2,0	2,0-20,0	
mediana	2,0	2,0	
<b>Inne bakterie proteolityczne (x10<sup>4</sup>)</b>			0,4467 <sup>1</sup>
śr. (SD)	629,4 (3 326,4)	153,1 (488,4)	
zakres	2,0-20 000,0	2,0-2 000,0	
mediana	2,0	2,0	

<b><i>Clostridium spp.</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,3878 <sup>1</sup>
śr. (SD)	23,7 (73,3)	29,9 (88,2)	
zakres	2,0-400,0	0,2-400,0	
mediana	2,0	2,0	
<b>Bakterie proteolityczne (x10<sup>4</sup>)</b>			0,8710 <sup>1</sup>
śr. (SD)	272,9 (928,9)	98,2 (235,1)	
zakres	2,0-4 013,2	1,6-1 006,8	
mediana	5,6	6,8	
<b>Posiew 2</b>			
<b><i>Escherichia coli</i> BioVare (x10<sup>4</sup>)</b>			0,2982 <sup>1</sup>
śr. (SD)	347,2 (1 630,6)	443,0 (1 140,0)	
zakres	2,0-8 000,0	2,0-4 000,0	
mediana	2,0	2,0	
<b><i>Proteus</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,9866 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2,0 (0,0)	2,0 (0,0)	
zakres	2,0-2,0	2,0-2,0	
mediana	2,0	2,0	
<b><i>Pseudomonas spp.</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,9866 <sup>1</sup>
śr. (SD)	2,0 (0,0)	2,0 (0,0)	
zakres	2,0-2,0	2,0-2,0	
mediana	2,0	2,0	
<b>Inne bakterie proteolityczne (x10<sup>4</sup>)</b>			0,5237 <sup>1</sup>
śr. (SD)	112,8 (407,4)	18,8 (57,1)	
zakres	2,0-2 000,0	2,0-200,0	
mediana	2,0	2,0	
<b><i>Clostridium spp.</i> (x10<sup>4</sup>)</b>			0,4502 <sup>1</sup>
śr. (SD)	23,2 (80,8)	35,0 (77,1)	
zakres	2,0-400,0	2,0-200,0	
mediana	2,0	2,0	
<b>Bakterie proteolityczne (x10<sup>4</sup>)</b>			0,6147 <sup>1</sup>
śr. (SD)	97,4 (331,4)	100,2 (225,1)	
zakres	2,0-1 605,2	2,0-801,6	
mediana	2,4	22,2	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

Dane literaturowe wskazują na istotny związek pomiędzy występowaniem nadwagi i otyłości, a obecnością bakterii należących do typu *Firmicutes*, stanowiących liczącą ponad 2150 gatunków grupę bakterii. Na potrzeby analizy statystycznej uśredniono liczebność bakterii wykazanych w badaniu posiewowym, należących do wspomnianej grupy. Są to: *Lactobacillus spp.*, *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*

Zmiana stosunku bakterii należących do typu *Firmicutes* i *Bacteroidetes* stanowi w literaturze wskaźnik skuteczności działań profilaktycznych w nadwadze i otyłości. Analiza porównawcza badanych

grup pod względem zmian stosunku bakterii typu *Firmicutes* do *Bacteroides* w posiewach 1 i 2 nie wykazała istotnych statystycznie różnic, co przedstawia tabela 20.

Tabela 20. Porównanie badanych grup pod względem stosunku liczbowego bakterii *Firmicutes/Bacteroidetes* (przed i po obserwacji).

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)	P
<b>Firmicutes/Bacteroides (posiew 1) (<math>\times 10^{-4}</math>)</b>			0,6566 <sup>1</sup>
śr. (SD)	535,5 (2 657,6)	288,7 (1 015,8)	
zakres	0,4-16 000,3	0,8-4 580,0	
mediana	24,6	16,9	
<b>Firmicutes/Bacteroides (posiew 2) (<math>\times 10^{-4}</math>)</b>			0,0753 <sup>1</sup>
śr. (SD)	805,0 (3 348,1)	31,0 (38,7)	
zakres	0,9-16 500,6	0,5-140,6	
mediana	40,8	21,2	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

Wykonane badania miały również na celu wykazanie potencjalnej obecności drożdżaków oraz grzybów drożdżopodobnych. Tabela 21 przedstawia analizę porównawczą próbek kału przed i po badaniu pod względem obecności drożdżaków, grzybów *Candida albicans* oraz grzybów pleśniowych.

Tabela 21. Analiza mykologiczna próbek kału w badaniach 1 i 2 (przed i po obserwacji).

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)	P
<b><i>Candida albicans</i> (1 posiew)</b>			0,7728 <sup>1</sup>
śr. (SD)	3 888,9 (3 333,3)	27 625,0 (69 664,4)	
zakres	1 000,0-10 000,0	1 000,0-200 000,0	
mediana	3 000,0	3 000,0	
<b><i>Candida albicans</i> (2 posiew)</b>			0,0874 <sup>1</sup>
śr. (SD)	9 714,3 (10 980,5)	1 666,7 (577,4)	
zakres	1 000,0-30 000,0	1 000,0-2 000,0	
mediana	4 000,0	2 000,0	
<b>Drożdżaki (1 posiew)</b>			0,4603 <sup>1</sup>
śr. (SD)	1 760,0 (2 350,2)	1 000,0 (0,0)	
zakres	1 000,0-10 000,0	1 000,0-1 000,0	
mediana	1 000,0	1 000,0	



<b>Drożdżaki (2 posiew)</b>			0,8325 <sup>1</sup>
śr. (SD)	1 066,7 (258,2)	1 000,0 (0,0)	
zakres	1 000,0-2 000,0	1 000,0-1 000,0	
mediana	1 000,0	1 000,0	
<b>Grzyby (1 posiew)</b>			0,0518 <sup>2</sup>
norma	28 (82,4%)	19 (100,0%)	
<b>Grzyby (2 posiew)</b>			0,0685 <sup>2</sup>
norma	18 (75,0%)	11 (100,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test, <sup>2</sup>Chi-kwadrat test

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności liczebności grzybów drożdżopodobnych *Candida albicans*, drożdżaków ogółem w posiewach 1 i 2 ze względu na rozpatrywane grupy. Podobnie nie otrzymano istotnych statystycznie różnic odsetek w odstępstwach od normy grzybów pleśniowych.

- **Związek pomiędzy mikrobiomem jelit a zonuliną i laktoferyną oraz parametrami antropometrycznymi**

W kolejnym etapie pracy podjęto próbę ustalenia ewentualnych zależności pomiędzy stężeniem **zonuliny** a liczebnością analizowanych drobnoustrojów.

Tabela 22. Korelacja stężenia zonuliny z bakteriami pełniącymi funkcję ochronną w badanych grupach.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	-0,47	-0,29
P-value	0,0055	0,3383
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	-0,09	-0,25
P-value	0,6154	0,4057
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	-0,18	-0,13
P-value	0,3117	0,6799
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	-0,27	-0,46
P-value	0,1356	0,1154
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	-0,26	-0,35
P-value	0,1370	0,2387
<b>próbka 2</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	0,02	-0,17
P-value	0,9408	0,6340

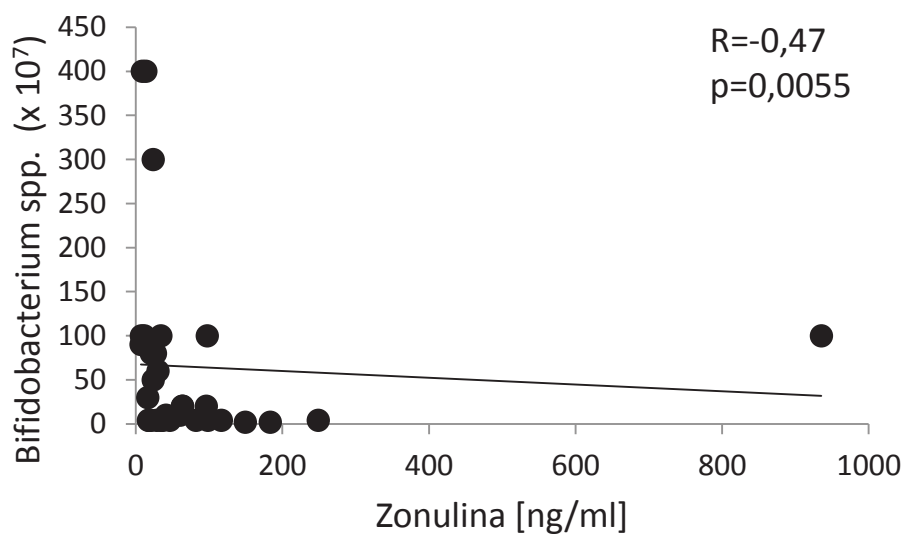
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	-0,07	-0,76
P-value	0,7454	0,0100
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	-0,21	0,14
P-value	0,3301	0,6974
<b>H2O2 <i>Lactobacillus</i></b>		
R	-0,21	0,14
P-value	0,3193	0,6962
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	0,11	-0,78
P-value	0,6231	0,0080

Spearmana test

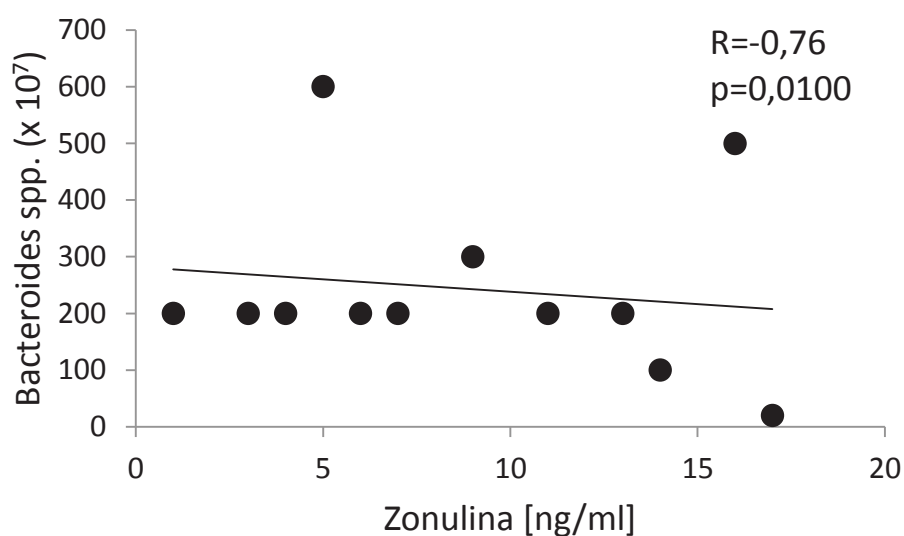
W próbce 1, w grupie Probiotyk wraz ze wzrostem stężenia zonuliny malała liczebność bakterii *Bifidobacterium spp.* (współczynnik korelacji  $R=-0,47$ ,  $p=0,0055$ ). Dla pozostałych zależności w grupie Probiotyk nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

W grupie Placebo, w próbce 2 z kolei wraz ze wzrostem wartości stężeń zonuliny malała liczebność bakterii *Bacteroides spp.* (współczynnik korelacji  $R=-0,76$ ,  $p=0,0100$ ) oraz malała średnia liczebność bakterii należących do grupy ochronnych (współczynnik korelacji  $R=-0,78$ ,  $p=0,0080$ ). Dla pozostałych zależności w grupie Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji. Korelacje zostały przedstawione na wykresach 5-7.

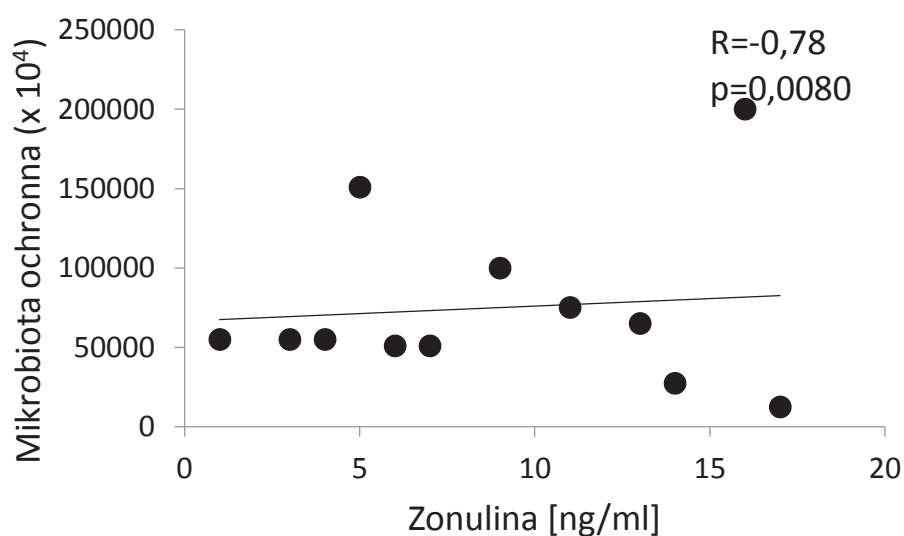
Wykres 5. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą *Bifidobacterium spp.* w grupie Probiotyk (1 próbka).



Wykres 6. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą *Bacteroides spp.* w grupie Placebo (2 próbka).



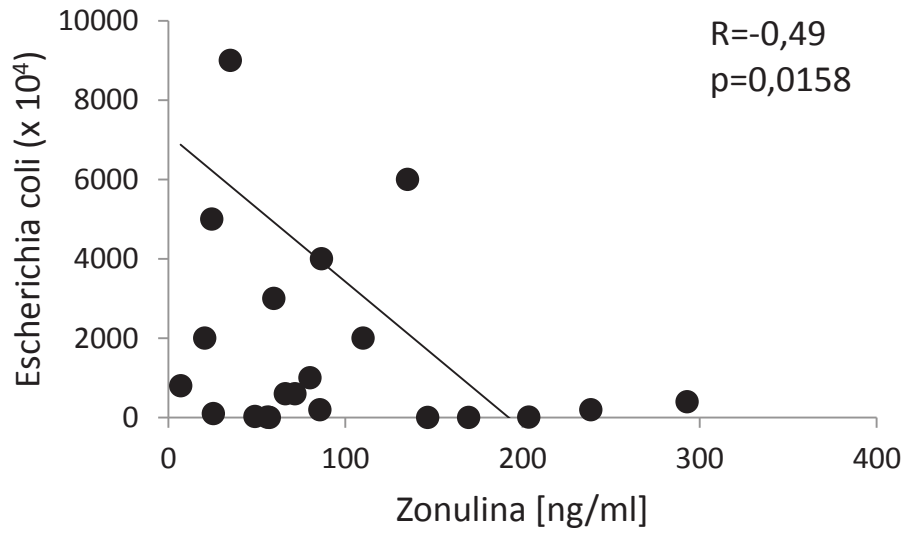
Wykres 7. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii pełniących funkcje ochronne w grupie Placebo (2 próbka).



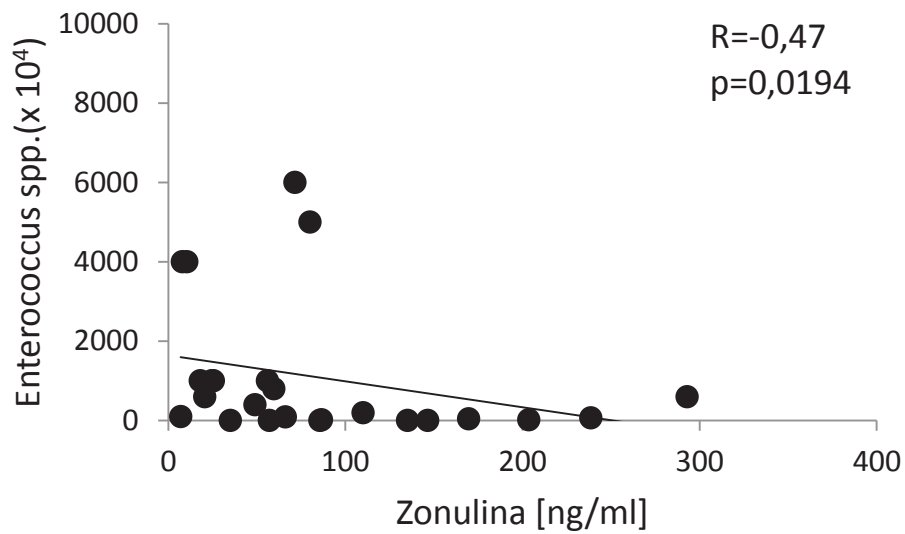
W grupie Probiotyk (tabela 23) ze wzrostem stężenia zonuliny w kale (1 próbka) malała liczebność bakterii *Enterococcus spp.* (współczynnik korelacji  $R=-0,36$ ,  $p=0,0424$ ). W grupie Probiotyk wraz ze wzrostem wartości zonuliny (2 próbka) malała liczebność bakterii *Escherichia coli* (współczynnik korelacji  $R=-0,49$ ,  $p=0,0158$ ), *Enterococcus spp.* (współczynnik korelacji  $R=-0,47$ ,  $p=0,0194$ ) oraz grupy bakterii pełniących funkcję immunostymulującą (współczynnik korelacji  $R=-0,51$ ,  $p=0,0107$ ). Dla pozostałych zależności w grupie Probiotyk nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji. W grupie Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.



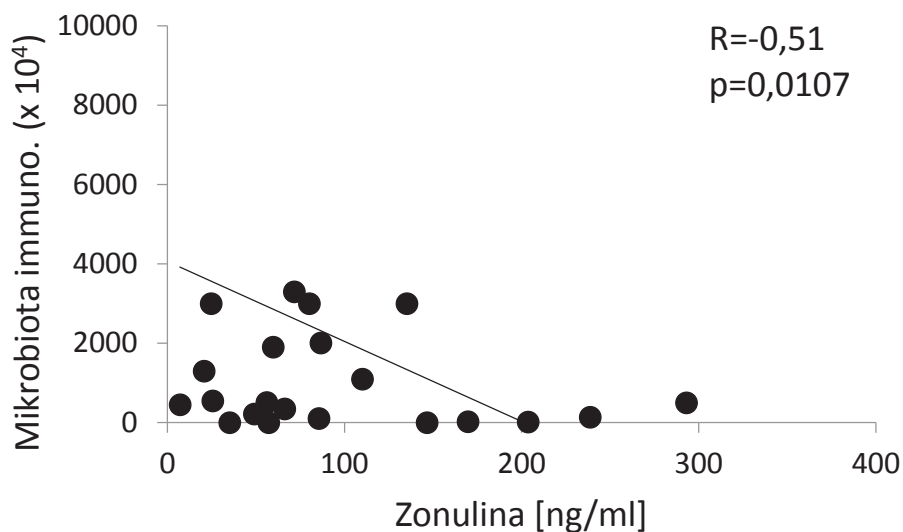
Wykres 9. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii *Escherichia coli* w grupie Probiotyk (próbka 2).



Wykres 10. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii *Enterococcus spp.* w grupie Probiotyk (próbka 2).



Wykres 11. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii pełniącymi funkcję immunostymulującą w grupie Probiotyk (próbka 2).



Analiza korelacji stężenia zonuliny w próbkach kału pacjentów w obu badanych grupach (tabela 24) z liczbą poszczególnych bakterii proteolitycznych nie wykazała żadnych istotności statystycznych.

Tabela 24. Korelacja stężenia zonuliny z liczbą bakterii w grupie proteolitycznych w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Escherichia coli Biovare</i></b>		
R	0,18	0,33
P-value	0,3234	0,2726
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,18	0,23
P-value	0,3142	0,4565
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	0,25	0,06
P-value	0,1664	0,8469
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	0,16	0,18
P-value	0,3820	0,5543

<b>próbka 2</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> Biovare</b>		
R	0,33	-0,10
P-value	0,1103	0,7899
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,32	-0,14
P-value	0,1250	0,7030
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	-0,30	0,26
P-value	0,1527	0,4662
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,14	0,12
P-value	0,5177	0,7429

Spearmana test

Analiza statystyczna nie wykazała również istotnej korelacji pomiędzy zmianą stężenia zonuliny w kale a stosunkiem bakterii *Firmicutes* do *Bacteroidetes* (tabela 25).

Tabela 25. Korelacja stężenia zonuliny z liczbą bakterii typu *Firmicutes/Bacteroidetes* w badanych grupach.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Firmicutes/Bacteroidetes</i></b>		
R	-0,25	0,17
P-value	0,1579	0,5780
<b>próbka 2</b>		
<b><i>Firmicutes/Bacteroidetes</i></b>		
R	-0,37	0,26
P-value	0,0743	0,4671

Spearmana test

Dodatkowo podjęto próbę porównania wielkości ubytku masy ciała ze zmianami w mikrobiomie jelit oraz stężeniami zonuliny i laktoferyny w badanych grupach. Biorąc pod uwagę opisany wcześniej średni spadek masy ciała pacjentów w grupach, za punkt odcięcia przyjęto wartość 5,5kg. Analiza statystyczna zmian w mikrobiomie oraz stężeniu laktoferyny nie wykazała istotnych zależności w badanych grupach ze względu na wysokość ubytku masy ciała. Zanotowano natomiast

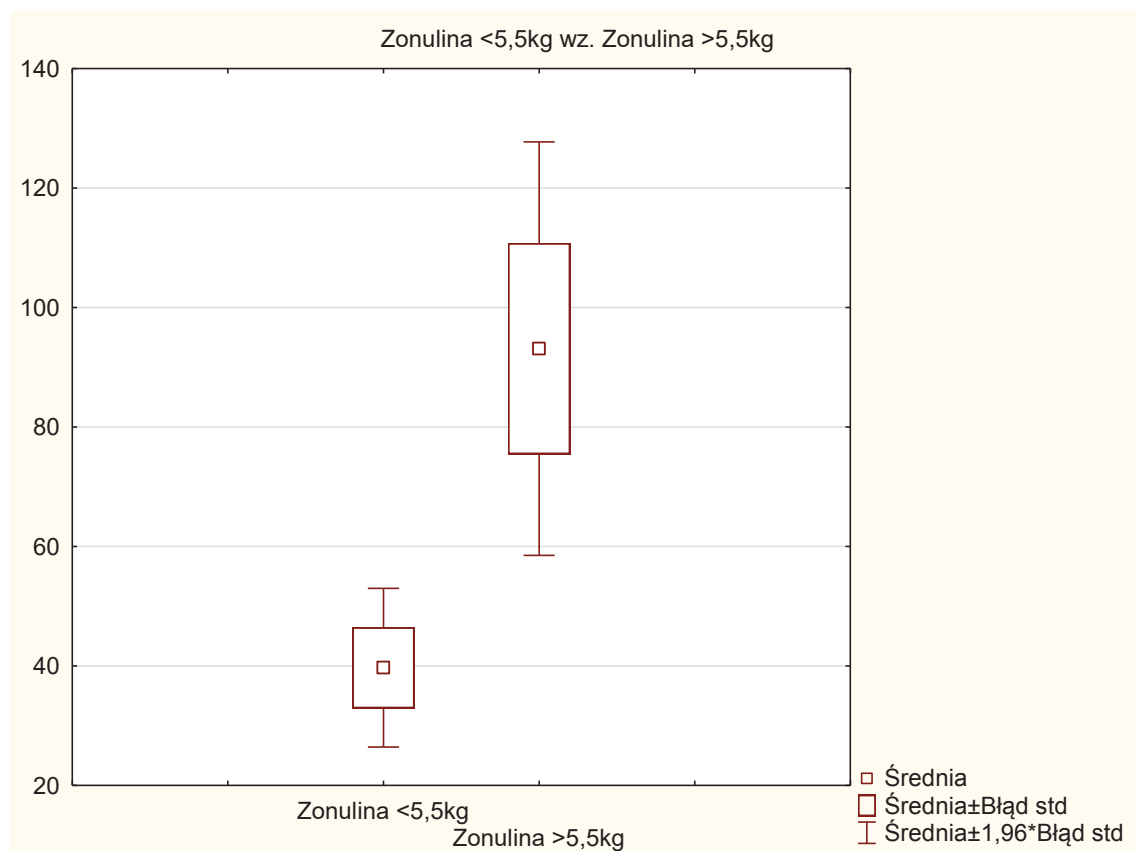
istotne statystycznie zmiany w stężeniu zonuliny w badanych grupach, w zależności od stopnia ubytku masy ciała. Wyniki przedstawia poniższa tabela 26 oraz wykresy 15 i 16.

Tabela 26. Zmiany stężenia zonuliny w zależności od utraty masy ciała.

	ubytek <5,5 kg (średnia, odchylenie standardowe)	ubytek >5,5 kg (średnia, odchylenie standardowe)	p
zonulina, próbka 1 (grupa Placebo) [ng/ml]	39,7 (15,2)	93,1 (49,9)	0,04259
zonulina, próbka 2 (grupa Placebo) [ng/ml]	101,3 (62,5)	66,8 (45,9)	0,3511
zonulina, próbka 1 (grupa Probiotyk) [ng/ml]	107,0 (205,1)	50,19 (44,7)	0,4491
zonulina, próbka 2 (grupa Probiotyk) [ng/ml]	103,3 (83,5)	37,8 (26,1)	0,0464

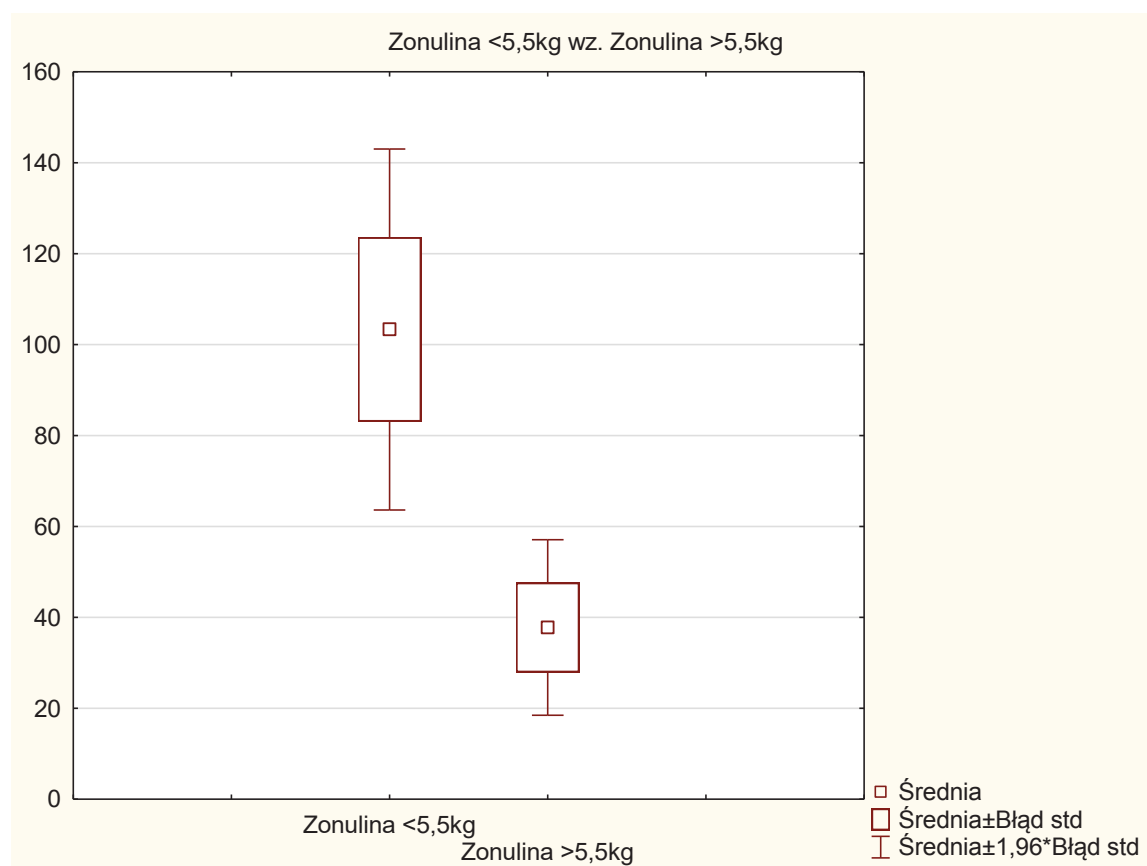
t-Studenta test

Wykres 12. Zmiany stężenia zonuliny w grupie Placebo (przed obserwacją).





Wykres 13. Zmiany stężenia zonuliny w grupie Probiotyk (po obserwacji).



Zwraca uwagę fakt, że w grupie Placebo przed przystąpieniem do badania stężenie zonuliny w próbkach kału pacjentów było istotnie statystycznie wyższe u osób które następnie traciły więcej niż 5,5kg masy ciała. W grupie Probiotyk natomiast po zakończeniu badania stężenie zonuliny było istotnie niższe u pacjentów tracących powyżej 5,5kg. Można zatem wnioskować, że większy ubytek masy ciała oraz ewentualna probiotykoterapia wpływają na poprawę szczelności bariery jelitowej.

Wykonano analizę związku pomiędzy stężeniem laktoferyny, a liczbą poszczególnych grup bakterii. W tabeli 27 przedstawiono korelację z bakteriami pełniącymi funkcję ochronną.

Tabela 27. Korelacja laktoferyny z grupą bakterii pełniących funkcję ochronne w badanych grupach.

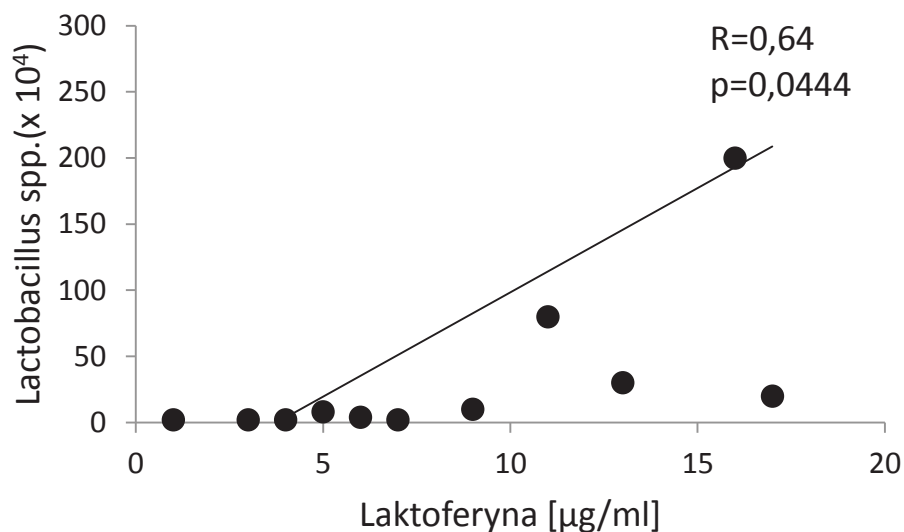
	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	0,05	0,17
P-value	0,7620	0,5756
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	-0,12	0,19
P-value	0,5148	0,5431

<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	-0,18	0,48
P-value	0,3233	0,0980
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	-0,29	0,12
P-value	0,1020	0,06887
<b>Mikroflora ochronna</b>		
R	-0,02	0,12
P-value	0,8935	0,6870
<b>próbka 2</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	-0,12	0,16
P-value	0,5652	0,6588
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	0,17	-0,23
P-value	0,4379	0,5187
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	-0,24	0,64
P-value	0,2683	0,0444
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	-0,37	0,31
P-value	0,0745	0,3903
<b>Mikroflora ochronna</b>		
R	0,11	-0,10
P-value	0,6003	0,7892

Spearmana test

W grupie Placebo ze wzrostem stężenia laktoferyny (wykres 12) w kale (2 próbka) rosła liczebność bakterii *Lactobacillus spp.* (współczynnik korelacji  $R=0,64$ ,  $p=0,0444$ ). Dla pozostałych zależności w grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

Wykres 14. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii *Lactobacillus spp.* w grupie Placebo (2 próbka).



Korelacja stężenia laktoferyny z grupą bakterii pełniących funkcje immunostymulujące nie wykazała istotności statystycznych (tabela 28).

Tabela 28. Korelacja stężenia laktoferyny z liczbą bakterii pełniących funkcje immunostymulujące w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
R	0,09	-0,04
P-value	0,6041	0,8860
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>		
R	0,01	0,20
P-value	0,9399	0,5100
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	0,14	0,09
P-value	0,4503	0,7680
<b>próbka 2</b>		
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
R	0,15	-0,18
P-value	0,4856	0,6240
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>		
R	-0,09	-0,41
P-value	0,6742	0,2379
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	0,10	-0,27
P-value	0,6549	0,4458

Spearmana test

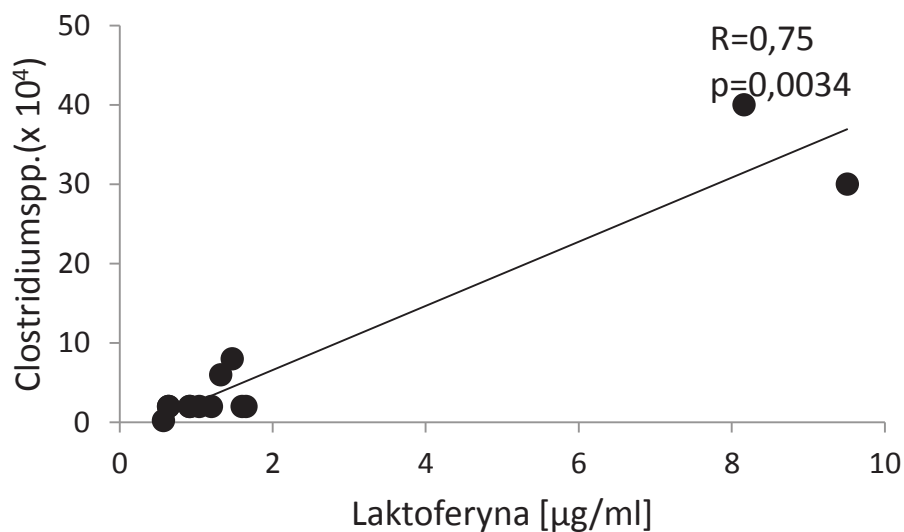
Analiza korelacji laktoferyny z bakteriami proteolitycznymi, wykazała że w grupie Placebo wraz ze wzrostem stężenia laktoferyny w kale (1 próbka) rośnie liczebność bakterii *Clostridium spp.* (współczynnik korelacji  $R=0,75$ ,  $p=0,0034$ ) i grupy bakterii proteolitycznych (współczynnik korelacji  $R=0,71$ ,  $p=0,0068$ ). Dla pozostałych zależności w grupie Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji. W grupie Probiotyk nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

Tabela 29. Korelacja stężenia laktoferyny z liczbą bakterii w grupie proteolitycznych w badanych grupach.

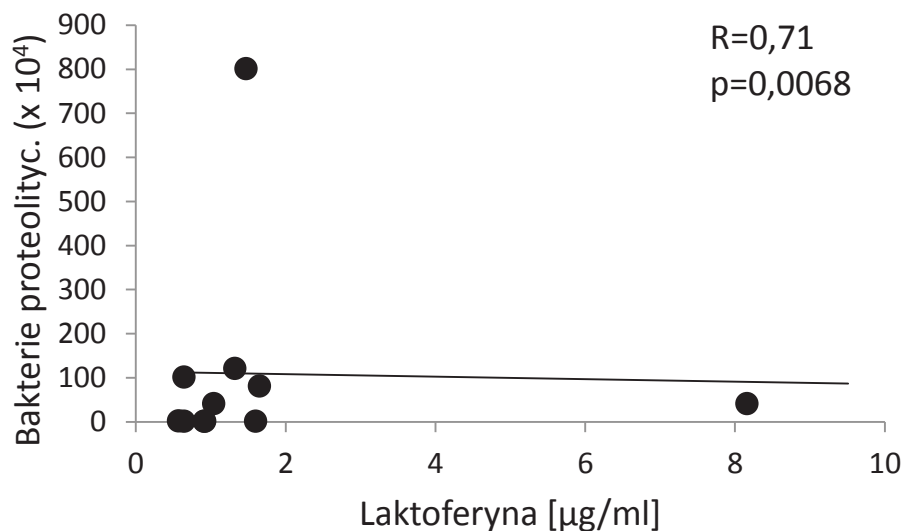
	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>próbka 1</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> Biovare</b>		
R	-0,02	0,46
P-value	0,9199	0,1105
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,11	0,43
P-value	0,5256	0,1409
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	0,21	0,75
P-value	0,2402	0,0034
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	0,11	0,71
P-value	0,5450	0,0068
<b>próbka 2</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> Biovare</b>		
R	-0,14	-0,10
P-value	0,5166	0,7899
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	0,22	0,03
P-value	0,3114	0,9433
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	-0,09	0,61
P-value	0,6866	0,0615
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,10	0,21
P-value	0,6575	0,5541

Spearmana test

Wykres 15. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii *Clostridium spp.* w grupie Placebo (1 próbka).



Wykres 16. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii w grupie bakterii proteolitycznych w grupie Placebo (1 próbka).



Jak pokazują dane zawarte w tabeli 29 w grupie Probiotyk wraz z wiekiem malała liczebność bakterii *H2O2 Lactobacillus* (1 posiew) (współczynnik korelacji  $R=-0,40$ ,  $p=0,0154$ ). W grupie Placebo natomiast z wiekiem malała liczebność bakterii *Lactobacillus spp.* (1 posiew) (współczynnik korelacji  $R=-0,46$ ,  $p=0,0413$ ). Dla pozostałych zależności w grupie Probiotyk i Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

Tabela 30. Związek pomiędzy wiekiem badanych osób a grupą bakterii pełniących funkcje ochronne w badanych grupach.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>
<b>1 posiew</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	0,20	-0,01
P-value	0,2510	0,9680
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	0,08	0,05
P-value	0,6441	0,8290
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	-0,33	-0,46
P-value	0,0507	0,0413
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	-0,40	0,01
P-value	0,0154	0,9653
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	0,05	-0,02
P-value	0,7712	0,9498
<b>2 posiew</b>		
<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>		
R	0,01	0,29
P-value	0,9942	0,3521
<b><i>Bacteroides spp.</i></b>		
R	0,09	0,33
P-value	0,6754	0,2987
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	0,11	-0,18
P-value	0,5932	0,5800
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	0,31	-0,22
P-value	0,1418	0,4915
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	0,08	0,47
P-value	0,7066	0,1215

Spearmana test

Z kolei analiza korelacji wieku z grupą bakterii o działaniu immunostymulującym nie wykazała żadnych statystycznych istotności (tabela 31).

Tabela 31. Korelacja wieku z grupą bakterii immunostymulujących w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
R	-0,01	0,14
P-value	0,9707	0,5483
<i>Enterococcus spp.</i>		
R	-0,19	-0,01
P-value	0,2777	0,9621
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	-0,09	0,01
P-value	0,6073	0,9987
<b>2 posiew</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
R	0,25	0,17
P-value	0,2341	0,5918
<i>Enterococcus spp.</i>		
R	-0,05	0,34
P-value	0,8114	0,2807
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	0,18	0,26
P-value	0,3931	0,4159

Spearmana test

Wykazano ujemną korelację pomiędzy wiekiem badanych osób a liczbą bakterii proteolitycznych pochodzących z 1 posiewu pacjentów przyjmujących placebo (współczynnik korelacji  $R=-0,56$ ,  $p=0,0109$ ). Podobnie, wskazuje się na ujemną korelację wieku oraz liczebności bakterii *Clostridium spp.* pochodzących z kolei z posiewu 2 (współczynnik korelacji  $R=-0,65$ ,  $p=0,0228$ ). Dla pozostałych zależności, zarówno w grupie Probiotyk jak i Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji (tabela 32).

Tabela 32. Korelacja wieku z grupą bakterii proteolitycznych w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> Biovare</b>		
R	-0,31	-0,44
P-value	0,0653	0,0513
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-0,14
P-value	-	0,5576
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	0,02	-0,22
P-value	0,8963	0,3507
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	0,07	-0,19
P-value	0,6988	0,4163
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,20	-0,56
P-value	0,2377	0,0109
<b>2 posiew</b>		
<b><i>Escherichia coli</i> Biovare</b>		
R	-0,10	-0,07
P-value	0,6394	0,5576
<b><i>Proteus</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,31	-0,15
P-value	0,1368	0,6527
<b><i>Clostridium spp.</i></b>		
R	-0,06	-0,65
P-value	0,7920	0,0228
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,36	-0,40
P-value	0,0867	0,1937

Spearmana test

Stosunek bakterii typu *Firmicutes* do *Bacteroidetes* (1 posiew) ujemnie korelował z wiekiem pacjentów w grupie Probiotyk (współczynnik korelacji  $R=-0,47$ ,  $p=0,0036$ ). Dla pozostałych zależności w grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji (tabela 33).



Tabela 33. Korelacja wieku z bakteriami typu *Firmicutes/Bacteroidetes* w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>		
R	-0,47	-0,28
P-value	0,0036	0,2303
<b>2 posiew</b>		
<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>		
R	0,05	-0,29
P-value	0,8146	0,3533

Spearmana test

Analiza korelacji BMI z poszczególnymi grupami drobnoustrojów przewodu pokarmowego wykazała, że w grupie Probiotyk wraz ze wzrostem BMI rośnie liczba bakterii *Bacteroides spp.* w 1 posiewie, należących do grupy drobnoustrojów ochronnych (współczynnik korelacji  $R=0,34$ ,  $p=0,0455$ ).

Tabela 34. Korelacja BMI z bakteriami pełniącymi funkcję ochronną w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<i>Bifidobacterium spp.</i>		
R	0,10	-0,32
P-value	0,5587	0,1621
<i>Bacteroides spp.</i>		
R	0,34	0,15
P-value	0,0455	0,5269
<i>Lactobacillus spp.</i>		
R	0,02	-0,21
P-value	0,8965	0,3798
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus</i>		
R	0,05	-0,08
P-value	0,7879	0,7433
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	0,33	0,04
P-value	0,0505	0,8576
<b>2 posiew</b>		
<i>Bifidobacterium spp.</i>		
R	-0,03	-0,49
P-value	0,8926	0,1078
<i>Bacteroides spp.</i>		
R	0,24	0,34
P-value	0,2621	0,2740

<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>		
R	0,04	-0,28
P-value	0,8441	0,3846
<b><i>H2O2 Lactobacillus</i></b>		
R	0,11	-0,10
P-value	0,5999	0,7653
<b>Mikrobiota ochronna</b>		
R	0,18	0,14
P-value	0,3975	0,6699

Spearmana test

Dla pozostałych zależności w grupie Probiotyk i Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji ani w przypadku grupy bakterii ochronnych ani immunostymulujących (tabela 35).

Tabela 35. Korelacja BMI z bakteriami pełniącymi funkcje immunostymulujące w badanych grupach.

	<b>Grupa Probiotyk (n=36)</b>	<b>Grupa Placebo (n=20)</b>
<b>1 posiew</b>		
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
R	-0,09	0,30
P-value	0,6162	0,2007
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>		
R	0,15	-0,33
P-value	0,3925	0,1578
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	-0,07	0,16
P-value	0,6928	0,4895
<b>2 posiew</b>		
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
R	-0,26	0,24
P-value	0,2169	0,4527
<b><i>Enterococcus spp.</i></b>		
R	0,13	-0,10
P-value	0,5333	0,7509
<b>Mikrobiota immuno.</b>		
R	-0,05	0,20
P-value	0,8046	0,5331

Spearmana test

Ujemną korelację BMI z liczebnością bakterii *Escherichia coli* Biovare wykazano w grupie pacjentów przyjmujących placebo (1 posiew) (współczynnik korelacji R=-0,48, p=0,0343).

Tabela 36. Korelacja BMI z bakteriami proteolitycznymi w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<i>Escherichia coli</i> <i>Biovare</i>		
R	0,09	-0,48
P-value	0,6072	0,0343
<i>Proteus</i>		
R	-	-
P-value	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>		
R	-	0,34
P-value	-	0,1446
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	0,31	0,11
P-value	0,0675	0,6451
<i>Clostridium spp.</i>		
R	0,01	0,27
P-value	0,9406	0,2455
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	0,29	-0,01
P-value	0,0918	0,9771
<b>2 posiew</b>		
<i>Escherichia coli</i> <i>Biovare</i>		
R	-0,01	0,04
P-value	0,9496	0,9079
<i>Proteus</i>		
R	-	-
P-value	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>		
R	-	-
P-value	-	-
<b>Inne bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,02	-0,20
P-value	0,9379	0,5404
<i>Clostridium spp.</i>		
R	0,01	0,10
P-value	0,9647	0,7635
<b>Bakterie proteolityczne</b>		
R	-0,04	0,11
P-value	0,8614	0,7228

Spearmana test

Dla pozostałych zależności w grupie Probiotyk i Placebo nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji, podobnie w przypadku zależności pomiędzy BMI, a stosunkiem bakterii typu *Firmicutes/Bacteroidetes* (tabela 37).

Tabela 37. Korelacja BMI z bakteriami typu *Firmicutes/Bacteroidetes* w badanych grupach.

	Grupa Probiotyk (n=36)	Grupa Placebo (n=20)
<b>1 posiew</b>		
<b><i>Firmicutes/Bacteroidetes</i></b>		
R	-0,25	-0,19
P-value	0,2883	0,2727
<b>2 posiew</b>		
<b><i>Firmicutes/Bacteroidetes</i></b>		
R	-0,34	0,15
P-value	0,2843	0,4853

Spearmana test

- **Podsumowanie uzyskanych wyników**

1. W obu grupach badanych wykazano istotne statystycznie obniżenie BMI po zastosowaniu terapii.
2. Analiza *post hoc* wskazała na istotny statystycznie spadek masy ciała pacjentów w obu grupach w 10 i 12 tygodniu kuracji w porównaniu do wyjściowej masy ciała.
3. Analiza zmian zawartości beztłuszczowej masy ciała, podstawowego zapotrzebowania energetycznego oraz zawartości wody w organizmie, w przebiegu badania nie wykazała istotnych statystycznie różnic.
4. W przypadku zmian zawartości tkanki tłuszczowej, analiza *post hoc* wykazała istotny statystycznie spadek zawartości tkanki tłuszczowej u pacjentów obu grup w 12 tygodniu badania.
5. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu analizowanych markerów w kale (zonulina, laktoferyna) w obu grupach, w przebiegu całego badania, ani w zależności od wieku czy BMI.
6. Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w liczebności poszczególnych grup bakterii (ochronnych, proteolitycznych i immunostymulujących) pomiędzy badanymi grupami pacjentów, przed i po kuracji.
7. W próbkach kału osób z grupy Placebo zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą liczebność bakterii z rodzaju *Bacteroides* ( $p=0,0256$ ) w porównaniu do grupy Probiotyk, po zakończeniu badania.
8. Wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny, a liczebnością bakterii *Bifidobacterium* spp. ( $R=-0,47$ ,  $p=0,0055$ ) oraz *Enterococcus* spp. ( $R=-0,36$ ,  $p=0,0424$ ) w grupie Probiotyk, przed rozpoczęciem obserwacji.

9. Analiza próbek kału dostarczonych przed rozpoczęciem badania, w grupie Placebo wskazała na istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a liczebnością bakterii *Clostridium spp.* ( $R=0,75$ ,  $p=0,0034$ ) oraz grupą bakterii proteolitycznych ( $R=0,71$ ,  $p=0,0068$ ).
10. Po zakończeniu obserwacji wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny, a liczebnością bakterii z rodzaju *Bacteroides* ( $R=-0,76$ ,  $p=0,0100$ ) oraz bakterii pełniących funkcje ochronne ( $R=-0,78$ ,  $p=0,0080$ ) w grupie Placebo.
11. Również w grupie Probiotyk odnotowano ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny, a liczbą bakterii *Escherichia coli* ( $R=-0,49$ ,  $p=0,0158$ ), *Enterococcus spp.* ( $R=-0,47$ ,  $p=0,0194$ ) oraz grupy bakterii pełniących funkcję immunostymulującą ( $R=-0,51$ ,  $p=0,0107$ ), po zakończeniu badania.
12. Analiza próbek pacjentów z grupy Placebo, po zakończeniu obserwacji wykazała, że wraz ze wzrostem stężenia laktoferyny istotnie statystycznie rosła liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* ( $R=0,64$ ,  $p=0,0444$ ).
13. Stwierdzono związek pomiędzy wiekiem badanych, a liczbą bakterii przed i po badaniu. Wykazano ujemną korelację pomiędzy wiekiem pacjentów w grupie Probiotyk a liczebnością  $H_2O_2$  *Lactobacillus* ( $R=-0,40$ ,  $p=0,0154$ ) oraz stosunkiem bakterii typu *Firmicutes* do *Bacteroidetes* ( $R=-0,47$ ,  $p=0,0036$ ) przed przystąpieniem do badania. W grupie Placebo natomiast przed rozpoczęciem obserwacji, wiek ujemnie korelował z liczbą *Lactobacillus spp.* ( $R=-0,46$ ,  $p=0,0413$ ) oraz bakterii pełniących funkcje proteolityczne ( $R=-0,56$ ,  $p=0,0109$ ). Po zakończeniu badania stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wiekiem pacjentów a liczbą bakterii *Clostridium spp.* ( $R=-0,65$ ,  $p=0,0228$ ) w grupie Placebo.
14. Zaobserwowano, że w grupie Probiotyk, przed rozpoczęciem terapii BMI korelowało dodatnio z liczbą *Bacteroides spp.* ( $R=0,34$ ,  $p=0,0455$ ), natomiast w grupie Placebo wykazano ujemną korelację BMI z liczebnością bakterii *Escherichia coli Biovare* (laktozo-ujemnych śluzowych) ( $R=-0,48$ ,  $p=0,0343$ ).
15. Wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenia zonuliny u pacjentów, którzy chudli powyżej 5,5kg w grupie Placebo przed badaniem ( $p=0,04259$ ) natomiast istotnie niższe w grupie Probiotyk po zakończeniu obserwacji ( $p=0,0464$ ).

## Dyskusja

Otyłość została przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) uznana za występującą najczęściej chorobę metaboliczną oraz epidemię XXI wieku. Nadmiar masy ciała stanowi już piąty co do istotności czynnik ryzyka zgonu na świecie [72].

W Polsce problem nadwagi i otyłości jest równie ważny. Przeprowadzone w ramach programu NATPOL badania wykazały, że w 1997 roku odsetek otyłych mężczyzn wynosił 16%, a kobiet 19%, natomiast już w roku 2002 wartość ta wzrosła do 19% bez względu na płeć [73]. Podobnie wyniki programu WOBASZ II prowadzonego na terenie Polski w latach 2013-2014 wykazały, że odsetek mężczyzn z nadwagą to blisko 43,2%, a kobiet 30,5%, natomiast otyłość dotyczy już 24,4% mężczyzn oraz 25% kobiet [74]. Niepokojący staje się zatem fakt rosnącego wciąż odsetka osób z nadmiarem masy ciała, pomimo postępu w leczeniu nadwagi i otyłości. W związku z tym wskazuje się na silną potrzebę prewencji i włączenie skutecznej terapii, której celem jest redukcja nadmiernych kilogramów, utrzymanie i zapobieganie ponownemu przyrostowi masy ciała.

W 2011 roku przeprowadzono na grupie 100 otyłych pacjentów badanie pilotażowe, którego celem było scharakteryzowanie nawyków żywieniowych z wykorzystaniem autorskiej ankiety. Uzyskane wyniki podkreśliły nieznaczne różnice w częstotliwości spożycia żywności. Kobiety istotnie częściej sięgały po mięso drobiowe i warzywa, nie spożywały alkoholu oraz stosowały przyprawy naturalne w porównaniu do ankietowanych mężczyzn [75].

Przeprowadzona w ramach pracy doktorskiej analiza częstości spożycia żywności, wykonana z użyciem kwestionariusza FFQ-6 nie wykazała różnic istotnych statystycznie w badanych grupach. Pacjenci przydzieleni zarówno do grupy Placebo jak i grupy Probiotyk odżywiali się przed przystąpieniem do badania w sposób podobny.

Nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej to efekt utrzymującego się w dłuższym czasie dodatniego bilansu energetycznego, tzn. przyjmowania zbyt kalorycznych posiłków w stosunku do wydatków energetycznych organizmu. Rozwojowi nadwagi i otyłości towarzyszą często zaburzenia gospodarki hormonalnej, regulacji metabolizmu tkanki tłuszczowej oraz wiele innych czynników wpływających na spożycie i wydatkowanie energii pochodzącej z diety. Dlatego też podkreśla się istotę zmiany nawyków żywieniowych oraz większą aktywność fizyczną w leczeniu zaburzeń masy ciała [14].

W terapii pacjentów z nadmierną masą ciała ważnym i przydatnym narzędziem jest analiza składu ciała obejmująca m.in. pomiar zawartości tkanki tłuszczowej, beztłuszczowej masy ciała, masy mięśniowej oraz zawartości wody w organizmie. W przeprowadzonym badaniu wykazano istotny statystycznie spadek masy ciała w rozpatrywanych 12 tygodniach obserwacji u pacjentów z grupy Probiotyk, podobnie w grupie Placebo istotnie obniżyła się masa ciała w 12 tygodniu terapii w porównaniu do 2 tygodnia. Okres 3 miesięcy kuracji wpłynął na istotne obniżenie zawartości tkanki tłuszczowej oraz BMI zarówno w grupie Probiotyk jak i Placebo w stosunku do wskazań wyjściowych.

Nie wykazano istotności statystycznych w zmianach pozostałych parametrów antropometrycznych, ani różnic pomiędzy badanymi grupami.

Odpowiednio zbilansowana dieta pozwala na optymalny i trwały spadek masy ciała średnio o około 0,5-1kg tygodniowo. Wyniki badań wskazują, że stosowanie diet o ograniczonej podaży białka, węglowodanów i tłuszczu nie wykazują większego efektu terapeutycznego niż prawidłowo skomponowana dieta ubogoenergetyczna [76, 77]. Podobne wyniki obserwacji ponad 800 pacjentów opublikowano w 2009 roku [78]. W badaniu stosowano cztery rodzaje diet: niskotłuszczową wysokowęglowodanową; niskotłuszczową wysokobiałkową; wysokotłuszczową normobiałkową i wysokotłuszczową wysokobiałkową. W każdej z diet uwzględniono deficyt energetyczny na poziomie 750kcal w stosunku do całkowitego zapotrzebowania energetycznego. Średnia redukcja masy ciała zanotowana po dwóch latach wynosiła około 9 kg, bez względu na rodzaj stosowanej diety. Wydaje się zatem, że utrata zbędnych kilogramów jest zależna przede wszystkim od samodyscypliny pacjenta w stosowaniu diety o obniżonej kaloryczności, mniej zaś od zawartości makroskładników – białek, tłuszczu i węglowodanów.

Ocena sposobu żywienia, badania antropometryczne i badanie składu ciała to elementy programu przeprowadzonego na grupie 60 pacjentek. Po 12 miesiącach stosowania diety redukcyjnej (1500kcal) wyodrębniono dwie grupy badane: I – kobiety, które uzyskały średnią redukcję masy ciała wynoszącą  $4,4 \pm 2,9$  kg oraz II – kobiety, u których masa ciała nie zmieniła się lub wzrosła średnio o  $1,8 \pm 1,7$  kg powyżej wyjściowej wartości. U kobiet z grupy I zaobserwowano istotne obniżenie procentowej zawartości tkanki tłuszczowej, co korelowało dodatnio ze zmniejszeniem wartości energetycznej diety [79].

Jak wskazują wyniki badań podstawą terapii nadwagi i otyłości powinna być zmiana sposobu żywienia w celu osiągnięcia ujemnego bilansu energetycznego oraz modyfikacja stylu życia, co pozwala na stabilną redukcję nadmiernej masy ciała.

Rozwojowi otyłości towarzyszy przewleły stan zapalny. W ostatnim czasie sugeruje się, że proces powstawania stanu zapalnego może być związany również ze składem mikrobiomu jelit [80].

Wyniki analizy przeprowadzonej w ramach pracy doktorskiej wykazały, że wraz ze zmniejszeniem masy ciała stężenie laktoferyny - markera stanu zapalnego jelit, malało w grupie pacjentów stosujących probiotykoterapię. W tej samej grupie badanych zaobserwowano niższe stężenie zonuliny w próbkach kału po przeprowadzonej kuracji. Sugeruje to zatem poprawę szczelności bariery jelitowej na skutek redukcji nadmiernej masy ciała i ewentualne działanie wspomagające probiotyku, ponieważ w grupie Placebo obserwowano wzrost obu wymienionych wskaźników, w porównaniu do wartości wyjściowych. Ponadto w grupie Placebo wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny a liczebnością bakterii *Clostridium spp.* i bakteriami proteolitycznymi

przed rozpoczęciem badania oraz pomiędzy stężeniem laktoferyny, a ilością *Lactobacillus spp.* po zakończeniu badania w tej samej grupie.

Laktoferyna to jedno z wielu białek wydzielanych do światła jelita, którego poziom rośnie adekwatnie do występującego stanu zapalnego błony śluzowej jelit. Oznaczanie stężenia laktoferyny jest bardzo korzystne, ponieważ LF obecne w kale odzwierciedla nasilenie lokalnych zmian zapalnych jelita, a nie procesu uogólnionego [95].

W 2003 roku FDA zaakceptowało oznaczanie stężenia laktoferyny w kale jako metodę umożliwiającą definiowanie obecności stanu zapalnego w jelitach [96].

Wyniki badań prowadzonych na modelu zwierzęcym wykazały, że nasilenie stanu zapalnego i insulinooporności w mniejszym stopniu występuje u myszy hodowanych w sterylnych warunkach, w przeciwieństwie do zwierząt którym przeszczepiono mikrobiom jelitowy pochodzący od myszy niesterylnych [81].

Rola laktoferyny w procesach zapalnych i infekcjach związana jest z wielokierunkowym działaniem na układ immunologiczny i wpływem na odpowiedź zapalną organizmu. Działanie przeciwzapalne tego białka związane jest między innymi z kontrolą produkcji cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) czy zdolnością do wiązania z lipopolisacharydami bakteryjnymi, tj. silnymi mediatorami reakcji zapalnych oraz wiązaniem i sekwestracją żelaza [90, 94].

Właściwością laktoferyny jest hamowanie rozwoju mikrobioty patogenicznej oraz stymulacja wzrostu mikrobioty fizjologicznej, której dodatkowym zadaniem jest ochrona przed nadmiernym wzrostem drobnoustrojów patogennych. Badania prowadzone na modelach mysich udowodniły, że laktoferyna jest czynnikiem hamującym nadmierny wzrost patogennych bakterii w jelicie, szczególnie enterobakterii i gronkowców, nie wpływając ujemnie na bakterie symbiotyczne [91].

Laktoferyna poza pełnieniem funkcji markera stanu zapalnego jelit pełni również funkcję ochronną. Przede wszystkim działa przeciwbakteryjnie. Nie zaburza wzrostu bakterii probiotycznych, w tym tych z rodzaju *Lactobacillus*, natomiast wpływa na zwiększenie wzrostu bifidobakterii dzięki możliwości udostępniania im jonów żelaza [93].

Badanie wpływu laktoferyny na kształtowanie się i funkcje mikrobiomu jelit przeprowadzono również na szczurach. Noworodki szczurze zakażono bakteriami *Escherichia coli*, a następnie podzielono na dwie grupy. Jedną poiono roztworem laktoferyny z dodatkiem bakterii *Lactobacillus GG* (LGG) w 3 i 4 dobie życia, drugiej podawano napój placebo. Badania wykazały, że zwierzęta otrzymujące LF i LGG lepiej rozwijały tkankę chłonną jelita, a ponadto zmiany zapalne w jelitach związane z zakażeniem *E. coli* były u nich znacznie łagodniejsze niż w grupie kontrolnej. Może to sugerować, że LF w połączeniu z bakteriami probiotycznymi LGG pełni funkcję ochronną przed działaniem patogennych bakterii jelitowych i związanym z tym stanem zapalnym w jelitach [92].



Sugeruje się, że w rozwoju stanu zapalnego może brać udział mikrobiota jelit modyfikowana z kolei przez rodzaj diety, szczególnie ilość zawartych w niej nasyconych kwasów tłuszczowych. Wyniki badania Deopurkara i wsp. [82] potwierdzają tę hipotezę. 300 zdrowym osobom podawano na czczo napój zawierający glukozę, kremowy napój z dodatkiem nasyconych tłuszczów na bazie śmietany, sok pomarańczowy lub wodę. W analizowanych próbkach krwi zaobserwowano wzrost wskaźników stanu zapalnego oraz poziomu LPS u osób przyjmujących napój z glukozą oraz kremową przekąską.

Autorzy badań przeprowadzonych w 2007 roku na modelach zwierzęcych zaproponowali mechanizm łączący rozwój otyłości z mikrobiotą jelit oraz współistniejącym stanem zapalnym. Zakłada on, że lipopolisacharyd bakteryjny (LPS), pochodzący głównie od gram-ujemnych bakterii bytujących w jelitach, może być czynnikiem wyzwalającym stan zapalny, na skutek stosowania diety wysokotłuszczowej. Seria badań prowadzonych na myszach otrzymujących dietę z wysoką zawartością tłuszczu (72%) wykazała, że ten sposób żywienia zwiększa endotoksemię między innymi poprzez regulację mikrobioty jelit. Dieta bogata w tłuszcz wpływa na zwiększenie stosunku bakterii gram-ujemnych do gram-dodatnich, co w efekcie powoduje zwiększenie ilości krążącego w organizmie LPS, a to z kolei indukuje otyłość [83].

Zaobserwowano, że stan zapalny w błonie śluzowej jelita zmniejsza integralność komórek bariery jelitowej. Zwiększona w ten sposób przepuszczalność ściany jelita sprzyja przemieszczaniu się do krwioobiegu całych bakterii, ich fragmentów lub bakteryjnej endotoksyny LPS, odpowiedzialnej prawdopodobnie za indukowanie stanu zapalnego. LPS stymuluje wydzielanie prozapalnych cytokin, takich jak TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 przez komórki odpornościowe [40].

Analiza zależności zonuliny i mikrobiomu w dyskutowanym badaniu wykazała punkty istotne zarówno w grupie Probiotyk jak i Placebo. Przed rozpoczęciem obserwacji ujemną korelację zonuliny w próbkach pacjentów z grupy Probiotyk wykazano w stosunku do liczby bakterii *Bifidobacterium spp.*, w grupie Placebo – *Enterococcus spp.* Po terapii w grupie Probiotyk notowano ujemną korelację pomiędzy stężeniem zonuliny a liczebnością *E. coli*, *Enterococcus spp* oraz grupy bakterii immunostymulujących, natomiast w grupie Placebo w stosunku do *Bacteroides spp.* oraz mikrobioty ochronnej.

Światło jelita to swoista nisza mikrobiologiczna, tworzona przez bakterie, wirusy i grzyby. Szczególnie istotna jest obecność bakterii komensalnych, których zadaniem jest powstrzymanie na drodze konkurencji nadmiernego rozwoju pozostałych mikroorganizmów. Komórki nabłonkowe jelita poza funkcjami związanymi z absorpcją wody, elektrolitów i składników odżywczych z diety, mają za zadanie zabezpieczać kontakt pomiędzy światłem jelita a komórkami układu immunologicznego. Obecność TJ chroni przed wnikaniem do krwi patogenów, toksyn czy czynników prozapalnych. Jak wskazują badania naukowe taki selektywny transport przez ściany jelita jest gwarantowany przez

obecność bariery jelitowej, a wszelkie zmiany w jej przepuszczalności mogą przyczynić się do zaburzeń zarówno o podłożu metabolicznym jak i zapalnym [26, 28, 84].

Wśród kilku potencjalnych bodźców, które mogą wyzwać uwalnianie zonuliny zidentyfikowano ekspozycję jelita cienkiego na obecność bakterii. Zakażenia jelitowe mogą być przyczyną chorób alergicznych, autoimmunologicznych i zapalnych, przez co osłabiona zostaje bariera jelitowa. Wyniki badań dowodzą, że zmiany w mikrobiomie jelitowym mogą wiązać się ze zwiększonym wydzielaniem markera przepuszczalności jelit, tj. zonuliny [85]. Ekspozycja komórek jelita cienkiego na działanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazała, że niezależnie od gatunku czy zjadliwości drobnoustrojów wzrastało wydzielanie zonuliny [86].

Sugeruje się w ostatnich latach, że zmiany w składzie mikrobioty jelit, a następnie zaburzenia integralności ściany jelita mogą być dodatkowym czynnikiem wzmagającym występowanie stanu zapalnego, szczególnie u osób otyłych. Przeprowadzono w Katowicach badania na grupie 80 pacjentów (50 osób otyłych, 30 szczupłych), których celem była między innymi ocena stężenia zonuliny w zależności od składu mikrobioty jelit. Wyższe poziomy zonuliny stwierdzono u osób otyłych. Dodatkowo zawartość zonuliny w osoczu korelowała dodatnio z wiekiem, masą ciała, BMI, masą tkanki tłuszczowej, procentową zawartością tłuszczu oraz całkowitą liczbą bakterii w jelitach. Z drugiej strony liczba *Bacteroides* i *Firmicutes* nie była istotnie skorelowana z ocenianym poziomem zonuliny [87].

W naszym badaniu analiza korelacji stężenia zonuliny i laktoferyny w próbkach kału, z wiekiem oraz BMI wyjściowym i końcowym pacjentów w grupach Probiotyk i Placebo nie wykazała istotnych statystycznie różnic.

Moreno-Navarette i in. przeprowadzili randomizowane badanie na grupie 123 mężczyzn (81 osób z nadwagą oraz 41 otyłych). Celem badania było określenie zależności między przepuszczalnością jelit a związanymi z otyłością zaburzeniami metabolicznymi. Wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenie zonuliny u osób otyłych w porównaniu z osobami z nadwagą. Dodatkowo stężenie zonuliny dodatnio korelowało z BMI [88].

Liu i in. wysnuli hipotezę, że korelacja pomiędzy całkowitą liczbą bakterii w kale i krążącą zonuliną jest oznaką zapalenia błony śluzowej jelita, a nie jak wcześniej przypuszczano trzewnej tkanki tłuszczowej. Łącznie 150 pacjentów z rakiem jelita grubego zostało losowo przydzielonych do grupy kontrolnej (n=75), otrzymującej placebo lub grupy otrzymującej probiotyki (n=75). Zarówno probiotyki, jak i placebo podano doustnie na 6 dni przed zabiegiem i 10 dni po operacji. Wyniki mierzono oceniając translokację bakteryjną, pooperacyjną przepuszczalność jelitową, stężenia zonuliny w surowicy, czas trwania pooperacyjnej gorączki i skumulowany czas trwania antybiotykoterapii. Okazało się, że podawanie probiotyków pacjentom z rozpoznanym nowotworem jelita grubego zmniejszało pooperacyjną posocznicę i wiązało się z niższym poziomem zonuliny we krwi [89].

Pomimo wciąż ograniczonej liczby dostępnych badań sugeruje się, że czynniki żywieniowe i składniki odżywcze mogą brać udział w regulacji stabilności bariery jelitowej. Badania wskazują, że glutamina, polifenole i probiotyki mogą stanowić narzędzie terapeutyczne w przypadku chorób związanych z występowaniem zaburzeń integralności bariery jelitowej, przeciwnie do alkoholu czy aldehydu octowego, działających osłabiająco na struktury TJ i będących przyczyną zaburzeń stanu zdrowia [97].

Zbadano stan bariery jelitowej odzwierciedlony przez poziom zonuliny w surowicy, sposób żywienia i zróżnicowanie mikrobiomu jelitowego w przekrojowym badaniu z udziałem kobiet o różnych poziomach aktywności i BMI. Grupę 102 pacjentek stanowiło 17 kobiet z niedoborem masy ciała, 25 z BMI prawidłowym, 21 z nadwagą, 19 otyłych oraz 20 wyczynowo uprawiających sport. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy poziomem zonuliny w surowicy, BMI, obwodem talii i bioder oraz masą tkanki tłuszczowej. Wyższe poziomy zonuliny korelowały również z większym spożyciem białka, tłuszczu oraz całkowitej energii z dietą. Nie wykazano różnic w ogólnej liczbie bakterii w zależności od poziomu zonuliny, natomiast u pacjentek z poziomem zonuliny poniżej 54ng/ml notowano większą liczebność bakterii należących do rodziny *Faecalibacterium*. Są to gram-ujemne drobnoustroje, należące do typu *Firmicutes*, wytwarzające SCFA i charakteryzujące się właściwościami przeciwzapalnymi. Notuje się ich wyjątkowo małą liczebność w chorobach przebiegających ze stanem zapalnym jelit. W związku z tym uważa się, że niska liczebność *Faecalibacterium* może być przyczyną osłabienia bariery jelitowej i w efekcie przyczyną reakcji zapalnych [98].

Przeciwnie, nie wykazano wpływu redukcji masy ciała na zmiany w stężeniu zonuliny w kale oraz na zmiany w parametrach antropometrycznych w jednym z niemieckich badań. Autorzy jednak zwracają uwagę na istotny fakt, że wzrost poziomu zonuliny koreluje z wysokim BMI jeśli badamy próbki krwi, a nie kału. Ponadto nie można wykluczyć, że osoby otyłe mają podwyższone stężenie zonuliny w kale, ponieważ nie analizowano grupy kontrolnej szczupłych pacjentów, a dodatkowo w danych literaturowych brak jest jednoznacznych informacji dotyczących referencyjnych wartości zonuliny [99].

W rozprawie opisano zmiany w mikrobiomie jelitowym związane z suplementacją probiotyku i skutecznością redukcji masy ciała. W analizowanych grupach pacjentów zbadano występowanie i liczebność mikroorganizmów bytujących w przewodzie pokarmowym. Jednym z celów badania było prześledzenie zmian jakościowych i ilościowych w poszczególnych grupach bakterii autochtonicznych w kontekście redukcji nadmiernej masy ciała oraz ewentualnej roli probiotyków w tym procesie.

Badane mikroorganizmy podzielono na grupy, biorąc pod uwagę najbardziej charakterystyczne funkcje poszczególnych bakterii. W stanie homeostazy określone drobnoustroje mogą być dla organizmu gospodarza zupełnie obojętne, natomiast na skutek działania różnych czynników mogą stać się patogenami. Na przykład niepatogenne bakterie *Escherichia coli spp.* charakteryzują

się korzystnym, immunostymulacyjnym działaniem na organizm, z drugiej jednak strony są odpowiedzialne m.in. za produkcję kancerogennych enzymów [100]. W związku z udowodnionym, korzystnym działaniem na układ odpornościowy bakterie *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* oraz sumę bakterii immunostymulujących zaliczono w niniejszej rozprawie do grupy immunostymulujących.

Jednoznaczne działanie korzystne dla zdrowia człowieka przypisuje się bakteriom z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. W pracy zostały one przydzielone do grupy drobnoustrojów o właściwościach ochronnych razem z *Bacteroides spp.*, *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus* oraz sumą bakterii ochronnych. Bakterie *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lactobacillus* wykazują zdolność do produkcji nadtlenu wodoru, co jest istotne w związku z ich silnymi antybakteryjnymi właściwościami. Do grupy bakterii proteolitycznych zaliczono drobnoustroje wywierające negatywny wpływ na zdrowie, tj. *Escherichia coli* *Biovare*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*, oraz sumę innych bakterii proteolitycznych.

Poszukiwano korelacji pomiędzy ilością i jakością drobnoustrojów jelitowych a parametrami antropometrycznymi oraz markerami stanu zapalnego i przepuszczalności jelit u pacjentów z nadwagą i otyłością. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniu nowych sposobów walki z epidemią nadmiernej masy ciała. Jednym z kierunków badań jest właśnie wpływ mikrobiomu jelit i ewentualnej probiotykoterapii jako czynników ściśle związanych z pojęciem dysbiozy, która w efekcie prowadzi do dysfunkcji układu odpornościowego, hormonalnego oraz zmian w metabolizmie lipidów, a to z kolei odgrywa istotną rolę w powstawaniu nadwagi czy otyłości [101].

Mając na uwadze powyższe doniesienia postanowiono ocenić stan mikrobiomu jelit pacjentów z nadwagą i otyłością przed i po zastosowaniu dietoterapii. Dodatkowym aspektem było sprawdzenie w grupie Probiotyk czy suplementacja probiotykiem wieloszczepowym może stanowić element wspomagający leczenie nadwagi i otyłości.

Wbrew przypuszczeniom kompozycja mikrobiomu w grupach badanych pacjentów nie zmieniła się istotnie statystycznie na skutek stosowanej terapii w stosunku do przyjętych norm [102]. Przypuszcza się, że mogło to być spowodowane niewielką grupą badanych pacjentów oraz stosunkowo krótkim czasem obserwacji. Być może również wykonanie dodatkowych oznaczeń biochemicznych pozwoliłoby lepiej scharakteryzować stan zdrowia osób biorących udział w prowadzonej analizie.

Przedmiotem badania była również ocena mykologiczna próbek kału pacjentów, jednakże analiza statystyczna otrzymanych wyników nie wykazała żadnych istotnych zależności. Grzybicza kolonizacja przewodu pokarmowego może przebiegać bezobjawowo i dotyczyć kilkadziesiąt procent społeczeństwa. Czynnikiem, który predysponuje do nadmiernego rozrostu grzybów jest między innymi dysbioza w obrębie przewodu pokarmowego oraz nadmierne, przewlekłe zażywanie antybiotyków. Istotne zwiększenie ryzyka infekcji grzybiczej wiąże się także z kolonizacją jelit drożdżakami. W związku

z tym zdaje się być istotna konieczność profilaktycznego monitorowania stanu mykologicznego jelit [103].

W przypadku zmian liczebności drobnoustrojów przewodu pokarmowego na skutek stosowanej terapii wykazano istotność statystyczną dotyczącą tylko bakterii *Bacteroides spp.* W grupie Placebo po zakończeniu obserwacji notowano wyższą ich liczbę niż u pacjentów z grupy Probiotyk. W tym miejscu warto również wspomnieć o poruszonym w licznych publikacjach naukowych stosunku bakterii *Firmicutes* do *Bacteroidetes*. W naszym badaniu zaobserwowano wzrost wspomnianego stosunku w grupie pacjentów Probiotyk oraz spadek w grupie Placebo w efekcie prowadzonej terapii, choć bez istotności statystycznej. Nie wykazano również zmian istotnych statystycznie w korelacji BMI z wspomnianym stosunkiem bakterii. Natomiast relacja wieku i wskaźnika *Firmicutes/Bacteroidetes* wykazała ujemną korelację u pacjentów w grupie Probiotyk jeszcze przed rozpoczęciem badania.

Opisanie różnic w funkcji bakterii *Firmicutes* i *Bacteroidetes* w organizmie człowieka było przedmiotem badania Koliady i wsp. Autorzy twierdzą, że *Firmicutes* są bardziej skuteczne jako źródło energii niż *Bacteroidetes*, promując w ten sposób znacznie efektywniejszą absorpcję kalorii i późniejszy przyrost masy ciała. Analiza mikrobiomu 61 osób z Ukrainy wykazała, że zawartość *Firmicutes* stopniowo zwiększa się, a *Bacteroidetes* zmniejszała wraz ze wzrostem wskaźnika masy ciała (BMI). Wskaźnik F/B również wzrósł wraz ze wzrostem BMI [113].

Stosunek *Firmicutes/Bacteroidetes* ulega zmianom na skutek działania wielu różnych czynników: wieku, rodzaju diety, poziomu aktywności fizycznej czy stanu zdrowia. Od urodzenia do wieku dorosłego zwiększa się i ulega obniżeniu wraz z zaawansowanym wiekiem. Wskaźnik ten wydaje się mieć zastosowanie przy wyróżnianiu różnic między niemowlętami, dorosłymi i starszymi. Można go powiązać z ogólnymi zmianami profilu bakteryjnego na różnych etapach życia, ale także w kontekście stanu zdrowia [114].

Badania prowadzone zarówno na modelach zwierzęcych jak i z udziałem ludzi wskazują, że występowanie otyłości jest związane z zaburzeniem stosunku *Firmicutes/Bacteroidetes*. Notuje się najczęściej wzrost liczebności tych pierwszych. Natomiast zwiększona liczba *Bacteroides* w ekosystemie przewodu pokarmowego jest widoczna w następstwie redukcji masy ciała i jest proporcjonalna do liczby zredukowanych kilogramów [44, 45, 104, 105].

Pierwszych dowodów na istnienie związku pomiędzy mikrobiotą jelit a występowaniem otyłości i zaburzeń metabolicznych, związanych przede wszystkim z efektywniejszym pobieraniem energii z pokarmów przed drobnoustroje jelitowe, dostarczyły doświadczenia z udziałem myszy *germ-free*. Przeszczepienie bakterii jelitowych myszom z jałowym przewodem pokarmowym powodowało mniejszy przyrost masy ciała jeżeli przeszczepiona mikrobiota pochodziła od osobników szczupłych [108].

Dotychczasowe wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie określić przyczyny zwiększenia udziału *Firmicutes* w mikrobiocie jelit osób otyłych. Nie we wszystkich badaniach obserwuje się zaburzenia w składzie mikrobioty jelit, a niektórzy badacze wykazali wręcz większy udział *Bacteroides* u pacjentów otyłych [106, 107]. Schwiertz i in. przebadali grupę 98 pacjentów, w tym 30 osób szczupłych, 35 z nadwagą i 33 otyłych. Celem badania było scharakteryzowanie różnic w mikrobiocie jelit osób szczupłych i otyłych oraz ocena stężenia SCFA w próbkach kału. Jak się okazało łączna ilość SCFA była wyższa w grupie otyłych pacjentów w porównaniu ze szczupłymi. Bakterie *Firmicutes* i *Bacteroidetes* były najliczniej charakteryzowanymi we wszystkich badanych grupach, natomiast stosunek *Firmicutes* do *Bacteroidetes* zmienił się na korzyść tych ostatnich u osób z nadwagą i otyłością [34]. Potwierdzono sugestię, że metabolizm SCFA ma związek z powstawaniem otyłości, natomiast wyniki analiz mikrobiologicznych były odmienne od tych publikowanych dotychczas, co wskazuje na konieczność dalszego, dogłębnego analizowania wpływu zmian mikrobioty jelit jako czynnika związanego z nadwagą i otyłością.

Modyfikacja sposobu odżywiania czy probiotykoterapia to elementy, które mogą istotnie wpływać na zmiany w ekosystemie jelit. Wyniki badań wskazują, że zmiany w diecie mogą wywoływać duże, chwilowe zmiany mikrobiologiczne już w ciągu 24 godzin [109]. De Filippis i wsp. przeprowadzili analizę sposobu żywienia i składu mikrobiomu jelitowego w grupie 153 pacjentów, w tym 51 wegetarian, 51 wegan oraz 51 osób na diecie śródziemnomorskiej. Wykazano znaczące powiązanie pomiędzy spożywaniem diet opartych na warzywach i zwiększonym poziomem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w kale, liczebnością bakterii *Prevotella* i niektórych *Firmicutes* powodujących rozkład włókien, których rola w jelitach wymaga wciąż dalszych badań. Spożycie owoców, warzyw i roślin strączkowych wiązało się ze wzrostem poziomu SCFA w kale, i to prawdopodobnie związane było z obecnością zarówno bakterii *Firmicutes*, jak i *Bacteroidetes*, zdolnych do degradacji węglowodanów niestrawialnych przez gospodarza [110].

Kilka innych badań również wykazało, że stosowanie typowej diety śródziemnomorskiej poprawia profil lipidowy, zmniejsza stan zapalny oraz wspomaga terapię otyłości. Zmiany te mogą powodować zwiększenie ilości *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Prevotella* w przewodzie pokarmowym, a także obniżenie liczby *Clostridium* [111, 112].

Zaobserwowano także, że dieta bogatobiałkowa i ubogowęglowodanowa wpływa na obniżenie liczebności bakterii *Bifidobacterium*, a zamiana diety ubogotłuszczowej na bogatotłuszczową powoduje spadek liczby *Bacteroides*, a wzrost *Firmicutes* [110].

W naszym badaniu więcej zależności udało się uzyskać w korelacji wieku i BMI z grupą bakterii pełniących funkcje ochronne. Wykazano dodatnią korelację BMI z liczbą *Bacteroides spp.* w grupie Probiotyk, jeszcze przed rozpoczęciem obserwacji. Zmiana liczebności wspomnianych bakterii



w odpowiedzi na modyfikację diety oraz redukcję masy ciała została już wcześniej dokładnie omówiona.

Przed rozpoczęciem badania zanotowano ujemne korelacje wieku z liczbą bakterii *Lactobacillus spp.* u pacjentów z grupy Placebo oraz spadek liczby  $H_2O_2$  *Lactobacillus* w grupie pacjentów stosujących probiotykoterapię.

Mikrobiota ochronna przewodu pokarmowego jest niezwykle istotna, ponieważ uniemożliwia zasiedlanie się i namnażanie drobnoustrojów patogennych. Jest to możliwe dzięki różnym czynnikom: współzawodniczeniu z patogenami o wiązaniu się z receptorami znajdującymi się na powierzchni nabłonka jelitowego, wytwarzaniu substancji bakteriobójczych dla patogenów, jak bakteriocyny czy  $H_2O_2$ , kompetycji o składniki odżywcze, witaminy i czynniki wzrostu, a także zmiany pH na skutek uwalniania produktów przemiany materii – kwasu mlekowego czy octowego [115].

Jak wspomniano w badaniu Mariat i wsp. wraz z upływem lat zmienia się liczba bakterii *Firmicutes* w przewodzie pokarmowym. Im starszy pacjent tym liczba *Firmicutes* mniejsza [114]. Jak wiadomo jest to grupa drobnoustrojów, w skład której obok *Clostridium spp.* i *Enterococcus spp.* wchodzi właśnie *Lactobacillus spp.* oraz  $H_2O_2$  *Lactobacillus*. Wydaje się zatem logiczne, że starszy wiek pacjenta będzie korelował z obniżeniem liczebności bakterii *Lactobacillus*, które wraz z bifidobakteriami pełnią nie tylko rolę w eliminacji patogenów z przewodu pokarmowego, ale także uczestniczą w produkcji ważnych dla organizmu i homeostazy jelitowej związków, np. krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Poprzez stymulowanie syntezy cytokin przeciwzapalnych oraz mucyny przyczyniają się do uszczelnienia bariery jelitowej [116]. Zatem obniżona liczebność wspomnianych drobnoustrojów jest pierwszym krokiem do nadmiernego wzrostu patogenów, uszkodzenia szczelności bariery jelitowej, a w efekcie rozwoju stanu zapalnego [117]. Przeciwwapalny wpływ wybranych szczepów *Lactobacillus*, w szczególności produkowanego przez nie peptydoglikanu bakteryjnego udowodnili w badaniu na modelu zwierzęcym Macho Fernandez i współpracownicy [118].

Warto również zwrócić uwagę na fakt, że bakterie *Lactobacillus* stanowią integralną część stosowanego w badaniach probiotyku wieloszczepowego. Wyniki badań wskazują, że modyfikacja mikrobioty jelit poprzez pre- i probiotyki może stanowić cel profilaktyczny i terapeutyczny w otyłości [80]. Randomizowane badanie z użyciem pojedynczej ślepej próby wykazało, że podaż w ciągu 12 tygodni szczepu bakterii *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LGG2055) pacjentom otyłym wpływało na istotne obniżenie masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej w porównaniu z pacjentami grupy placebo [119].

Korzystny wpływ probiotyków na redukcję masy ciała jest w ostatnich latach szeroko opisywany. W 2013 roku przebadano wpływ szczepu *Lactobacillus plantarum* TENSIA na zmiany masy ciała. Badanie pilotażowe dotyczyło wpływu niskokalorycznej diety oraz suplementacji serem

wzbogaconym o wymieniony wcześniej szczep na BMI oraz nadciśnienie tętnicze u 40 pacjentów otyłych. Wykazano obniżenie masy ciała, BMI oraz stężenia trójglicerydów pacjentów, którzy przez 3 tygodnie suplementowali probiotyk, w porównaniu do pacjentów grupy placebo [120].

Zespół badaczy sprawdził czy szczep LGG2055 suplementowany w ilości  $10^6$  lub  $10^7$  cfu/g wpłynie na poprawę parametrów antropometrycznych w grupie 210 pacjentów otyłych. Wyniki wykazały, że w grupach przyjmujących przez 12 tygodni probiotyk istotnie obniżyła się procentowa zawartość tkanki tłuszczowej, BMI, obwód talii i bioder, przy braku zmian odnotowanych w grupie placebo [121].

Z drugiej strony wyniki wpływu stosowania synbiotyków na zmiany mikrobiomu jelitowego oraz parametry antropometryczne nie są jednoznaczne. Działanie prozdrowotne jest zapewne zależne od składu danego preparatu synbiotycznego. W badaniu przeprowadzonym z udziałem 64 otyłych osób wykazano, że przyjmowanie szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 razem z oligofruktozą i inuliną przy jednoczesnym włączeniu diety niskokalorycznej na okres 12 tygodni wpłynęło istotnie na obniżenie masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej kobiet [122].

Z kolei 28-tygodniowa suplementacja synbiotyku w grupie 38 osób z zespołem metabolicznym wykazała poprawę w regulacji parametrów lipidowych, natomiast nie wykazano istotnych zmian w obniżeniu BMI, dziennego poboru energii czy obwodu talii [123].

Dyskutuje się zatem czy suplementacja synbiotyczna może poprawiać skuteczność terapii dietetycznej w leczeniu otyłości i zespołu metabolicznego.

Analiza korelacji wieku i BMI z bakteriami stanowiącymi grupę immunostymulujących nie wykazała żadnej istotności. Natomiast zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy bakteriami proteolitycznymi a wiekiem pacjentów z grupy Placebo przed rozpoczęciem badania oraz ujemną korelację wieku z liczebnością *Clostridium spp.* w tej samej grupie pacjentów, ale już po zakończeniu terapii. Obniżenie BMI korelowało również z większą liczebnością *Escherichia coli* *Biovare* przed rozpoczęciem badania u pacjentów przyjmujących placebo.

Zdaniem Demulle osoba zdrowa, stosująca dobrze zbilansowaną dietę, powinna mieć w swoim mikrobiomie nie więcej niż 44% bakterii *Bifidobacterium spp.* [124]. Taka zawartość bifidobakterii hamuje nadmierne namnażanie się patogenów m.in. z rodzaju *Clostridium*, utrzymując ich liczebność na stałym poziomie około 7%. Z kolei obniżenie liczebności bifidobakterii poniżej 20% powoduje namnożenie *Clostridium spp.* aż do 9%.

Mikroorganizmy potencjalnie chorobotwórcze: *Proteus*, *Clostridium* czy *Escherichia coli* poprzez działanie proteolityczne rozkładają białko, wytwarzając w ten sposób substancje toksyczne i wpływając na alkalizację środowiska przewodu pokarmowego. Tylko zachowanie homeostazy zapewnia ograniczenie ich działania chorobotwórczego. Wyniki badań przeprowadzonych



na modelach zwierzęcych GF potwierdziły, że bakterie jelitowe to niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania układu pokarmowego i odpornościowego elementy [125].

Bakterie proteolityczne na drodze swego metabolizmu wytwarzają szereg substancji toksycznych powodujących uszkodzenie nabłonka jelita i wątroby. Przy zwiększonej podaży białek w diecie powodują one alkalizację środowiska, prowadząc do obciążenia wątroby. Dodatkowo pozostałe drobnoustroje należące do tej grupy występując w zwiększonej liczbie mogą mieć wpływ na powstawanie zmian zapalnych w obrębie jelit. Zwiększenie liczby mikroorganizmów proteolitycznych skutkuje wytwarzaniem nadmiernej ilości gazów w procesie rozkładu białek, co często jest przyczyną problemów żołądkowo – jelitowych szczególnie u osób starszych. Mikrobiota proteolityczna w tym bakterie *Clostridium spp.* stanowią istotne obciążenie dla organizmu, działając destrukcyjnie na prawidłowe funkcjonowanie narządów, a także wykazując aktywność kancerogenną [126].

Biorąc pod uwagę wszystkie opisane wyniki badań można stwierdzić, że bakterie probiotyczne mogą stanowić element wspomagający redukcję masy ciała w dwojaki sposób. Homeostaza panująca w przewodzie pokarmowym pacjenta charakteryzuje się znacznie większą wydajnością energetyczną oraz usprawnia proces wydalania niestrawionych resztek pokarmowych. Stosowanie probiotykoterapii w celu redukcji masy ciała może mieć również związek z wpływem drobnoustrojów na regulację metabolizmu lipidów i węglowodanów w organizmie człowieka.

## Wnioski

1. W badanej grupie osób zaobserwowano niższą liczebność bakterii ochronnych i immunostymulujących przed rozpoczęciem badania, w stosunku do wartości końcowych. Po zakończeniu badania stwierdzono wzrost liczebności poszczególnych rodzajów bakterii immunostymulujących w grupie stosującej preparat probiotyczny, w stosunku do wartości wyjściowych.
2. Ponadto zastosowanie probiotyku wpłynęło na obniżenie liczby bakterii z grupy proteolitycznych, szczególnie *Escherichia coli* *Biovare*.
3. W grupie stosującej *placebo* stwierdzono po trzech miesiącach obserwacji istotny wzrost liczby bakterii *Bacteroides*, co mogło być wynikiem zastosowanej diety.
4. U wszystkich osób z nadmiarem masy ciała stwierdzono podwyższone stężenie zonuliny – markera przepuszczalności jelit, natomiast nie stwierdzono istotnego podwyższenia stężenia laktoferyny – markera stanu zapalnego. Zastosowanie probiotyku w połączeniu z dietą niskoenergetyczną wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem stężenia zonuliny w badanej grupie.
5. Średnia utrata masy ciała w całej badanej grupie wynosiła 5,5kg, co stanowiło 5,7% wyjściowej masy ciała. Nie stwierdzono związku pomiędzy wielkością redukcji masy ciała a zastosowaniem probiotyku.

## Streszczenie

Jak wskazuje WHO otyłość jest szóstą co do istotności przyczyną zgonów na świecie. W Polsce występowanie nadwagi dotyczy 41% mężczyzn i 28,7% kobiet, a otyłości 15,7% mężczyzn i 19,9% kobiet.

Nadmiar energii przyjętej z dietą jest dla organizmu zjawiskiem stresogennym, co może być przyczyną pojawienia się stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia.

Badania różnorodności mikrobioty przewodu pokarmowego (GI) uwzględniają 3 grupy drobnoustrojów, pomiędzy którymi powinna panować homeostaza:

- bakterie bezwzględnie patogenne, produkujące m.in. toksyny wywołujące zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego;
- bakterie względnie patogenne, których negatywne skutki działania są widoczne w czasie zaburzeń funkcji przewodu pokarmowego;
- bakterie działające pozytywnie, stymulujące wybrane funkcje przewodu pokarmowego oraz hamujące rozwój patogenów.

Interesująca jest perspektywa wpływu probiotyków wieloszczepowych na zmiany parametrów antropometrycznych, których działanie wielopoziomowe może przynieść pozytywne efekty terapeutyczne u pacjentów z otyłością.

Zakładając hipotezę badawczą, że u osób z nadwagą i otyłością obecny jest przewlekły stan zapalny w obrębie jelit, zmniejszona szczelność bariery jelitowej oraz dysbioza mikrobiomu jelitowego, określono następujące cele badania:

- ocena występowania stanu zapalnego, przepuszczalności jelit oraz zmian mikrobiomu jelit u pacjentów z nadwagą i otyłością;
- ocena wpływu probiotykoterapii na zmiany mikrobiomu jelit u osób poddawanych redukcji masy ciała.

Do badania trwającego 12 tygodni, zakwalifikowano 56 pacjentów z nadwagą lub otyłością, w tym 44 kobiety (78,6%) oraz 12 mężczyzn (21,4%). Byli to pacjenci Poradni Dietetycznej, Katedry Żywienia Klinicznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, którzy spełniali kryteria włączenia oraz wyrazili zgodę na udział w badaniu. Zastosowano dietę opartą o rekomendacje PTD.

Badanie miało charakter pojedynczej próby zaślepionej, po randomizacji pacjentów przydzielono do dwóch grup badanych: Placebo oraz Probiotyk.

Przed rozpoczęciem terapii wykonano analizę zwyczajów żywieniowych pacjentów za pomocą kwestionariusza FFQ-6. U pacjentów zarówno na początku, jak i na spotkaniach kontrolnych wykonywano pomiary masy ciała, wzrostu oraz BMI, a także składu ciała.

Ocena mikrobiologiczna pobranych od pacjentów próbek kału obejmowała analizę występowania i liczebności wybranych bakterii wskaźnikowych (ochronnych,

immunostymulujących oraz proteolitycznych) oraz grzybów drożdżopodobnych. Dodatkowo w próbkach kału zbadano zmiany stężenia zonuliny – markera przepuszczalności jelit oraz laktoferyny - markera stanu zapalnego jelit, przed rozpoczęciem i po zakończeniu badania.

W badaniu uzyskano m.in. następujące, istotne wyniki:

1. Obniżenie BMI oraz spadek masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej pacjentów obu grup w stosunku do wartości wyjściowych.
2. Ujemną korelację stężenia zonuliny, z liczebnością bakterii *Bifidobacterium spp.* oraz *Enterococcus spp.* w grupie Probiotyk, przed rozpoczęciem obserwacji oraz ujemną korelację stężenia zonuliny, z liczbą bakterii *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* oraz bakterii pełniących funkcje immunostymulujące, po terapii.
3. Dodatnią korelację pomiędzy stężeniem laktoferyny, a liczebnością bakterii *Clostridium spp.* oraz bakteriami proteolitycznymi przed rozpoczęciem badania w grupie pacjentów stosujących placebo oraz istotny wzrost stężenia laktoferyny w stosunku do liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.*, po terapii.

W oparciu o uzyskane wyniki badań oraz przeprowadzoną dyskusję wysunięto następujące wnioski:

1. U wszystkich badanych bez względu na rodzaj diety stosowanej przed przystąpieniem do badania, notowano podwyższone stężeniem zonuliny - markera przepuszczalności jelit w próbkach kału, natomiast stężenie laktoferyny - markera stanu zapalnego pozostawało w normie.
2. Podaż probiotyku wraz z dietą redukcyjną wiązała się z obniżeniem liczby bakterii *Escherichia coli Biovare*, z grupy proteolitycznych.
3. Zaobserwowano przed rozpoczęciem badania niższą liczebność bakterii ochronnych i immunostymulujących w stosunku do wartości końcowych. W grupie stosującej probiotyk zanotowano wzrost liczby bakterii immunostymulujących w stosunku do wartości wyjściowych.
4. W grupie Placebo, pozytywny efekt terapii dotyczył istotnego wzrostu liczby bakterii *Bacteroides*, co mogło być efektem zastosowanej diety.
5. W całej badanej grupie średni ubytek masy ciała wyniósł 5,5kg, co stanowiło 5,7% wyjściowej masy ciała. Nie zanotowano związku pomiędzy wysokością redukcji masy ciała a stosowanym probiotykiem.

## Summary

### Influence of reduction diet and probiotic supplementation on microbiom and intestinal permeability in overweight and obese individuals

According to the WHO, obesity is the sixth largest cause of death in the world. In Poland, the incidence of overweight refers to 41% of men and 28.7% of women, and obesity - 15.7% of men and 19.9% of women.

Obesity is recognized as a result of both biological and environmental factors, occurring when the energy intake exceeds energy expenditure.

Some inflammatory markers have been consistently associated with obesity. This can suggest that a persistent, low-grade, inflammatory response is a potentially modifiable risk factor.

The diversity of gastrointestinal (GI) microbiota include 3 groups of microorganisms, among which homeostasis should prevail:

- absolutely pathogenic bacteria, producing toxins that cause GI disorders;
- relatively pathogenic bacteria whose negative effects are evident during digestive function disorders;
- the bacteria acting positively, stimulating selected functions of the digestive tract and inhibiting development of pathogens.

Interested is the influence of probiotics on changes in anthropometric parameters, which may bring positive therapeutic effects in patients with obesity.

Assuming a hypothesis that overweight and obese people have chronic intestinal inflammation, leaky intestinal barrier, and microbiome dysbiosis, the following aims were determined:

- Evaluation of the occurrence of inflammation, intestinal permeability and changes in the microbiome of overweight and obese patients;
- The impact of probiotics on changes in the composition of the microbiome in people undergoing weight reduction.

For the study lasting 12 weeks, 56 overweight or obese patients were qualified, including 44 women (78.6%) and 12 men (21.4%). They were patients of the Dietetics Clinic, Department of Clinical Nutrition, Medical University of Gdańsk, who met the inclusion criteria and agreed to participate in the study. A diet based on PTD recommendations was applied.

The study was a single blinded trial, after randomization patients were assigned to two groups: Placebo and Probiotic.

At the beginning, patients dietary habits were analyzed using the FFQ-6 questionnaire. During the first and then control meetings patients body mass, height, BMI and body composition were measured.

Microbiological assessment of faecal samples included analysis of the presence and number of selected indicator bacteria (protective, immunostimulatory and proteolytic) and yeast. Changes

in concentration of zonuline - the marker of intestinal permeability and lactoferrin - a marker of intestinal inflammatory status were examined in the stool samples before and after the study.

The study obtained the following significant results:

1. Reduction of BMI, weight and body fat content of both groups in relation to baseline values.
2. Negative correlation of zonulin concentration with the number of bacteria *Bifidobacterium spp.* and *Enterococcus spp.* in the Probiotic group before the start of observation and negative correlation of zonulin concentration with the number of *Escherichia coli* bacteria, *Enterococcus spp.* and immunostimulatory bacteria, after therapy.
3. Positive correlation between lactoferrin concentration and the number of *Clostridium spp.* bacteria and proteolytic bacteria before the start of the study in the placebo group of patients and a significant increase in lactoferrin concentration in relation to the number of *Lactobacillus spp.* bacteria after the therapy.

Based on the results of the research and the discussion, the following conclusions were made:

1. In all subjects, regardless of the type of diet used before the study, were characterized by an increased concentration of zonulin - a marker of intestinal permeability in stool samples, whereas the concentration of lactoferrin - a marker of inflammation remained in the normal range.
2. The supply of probiotic along with the reduction diet was associated with a reduction in the number of bacteria, *Escherichia coli* *Biovare*, from the proteolytic group.
3. A lower number of protective and immunostimulatory bacteria against the final values was observed before the study began. In the group using the probiotic there was an increase in the number of immunostimulatory bacteria in relation to the baseline values.
4. In the Placebo group, the positive effect of therapy was related to a significant increase in the number of *Bacteroides* bacteria, which could be the result of the diet.
5. In the entire study group, the average weight loss was 5.5 kg, which was 5.7% of the initial body weight. There was no relationship between the body weight reduction and the probiotic supplementation.

## Aneks

### 1. Analiza częstości spożycia na podstawie kwestionariusza FFQ-6

#### Słodycze i przekąski

Tabela 5. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia słodyczy i przekąsek.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Cukier</b>			0,0710 <sup>1</sup>
nigdy	18 (64,3%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	0 (0,0%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
codziennie	3 (10,7%)	4 (25,0%)	
kilka razy dziennie	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
<b>Miód</b>			0,2225 <sup>1</sup>
nigdy	15 (53,6%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	8 (28,6%)	7 (43,8%)	
kilka razy w m-c	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Czekolady</b>			0,9417 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	11 (39,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	8 (28,6%)	6 (37,5%)	
codziennie	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	

<b>Cukierki</b>			0,9417 <sup>1</sup>
nigdy	7 (25,0%)	4 (25,0%)	
raz w m-c	8 (28,6%)	5 (31,3%)	
kilka razy w m-c	6 (21,4%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	4 (25,0%)	
codziennie	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
<b>Herbatniki</b>			0,2225 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	8 (50,0%)	
kilka razy w tyg.	13 (46,4%)	6 (37,5%)	
codziennie	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
<b>Lody</b>			0,1399 <sup>1</sup>
nigdy	5 (17,9%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	10 (35,7%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	5 (31,3%)	
codziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Przekąski słone</b>			0,2886 <sup>1</sup>
nigdy	12 (42,9%)	3 (18,8%)	
raz w m-c	8 (28,6%)	7 (43,8%)	
kilka razy w m-c	6 (21,4%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
codziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test



Produkty mleczne i jaja

Tabela 6. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia produktów mlecznych i jaj.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Mleko</b>			0,9223 <sup>1</sup>
nigdy	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	5 (17,9%)	1 (6,3%)	
kilka razy w tyg.	8 (28,6%)	8 (50,0%)	
codziennie	9 (32,1%)	4 (25,0%)	
kilka razy dziennie	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
<b>Napoje mleczne</b>			0,6430 <sup>1</sup>
nigdy	6 (21,4%)	3 (18,8%)	
raz w m-c	7 (25,0%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Twarogi</b>			0,4568 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	11 (39,3%)	4 (25,0%)	
codziennie	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Twarożki</b>			0,5339 <sup>1</sup>
nigdy	12 (42,9%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	10 (35,7%)	7 (43,8%)	
kilka razy w m-c	5 (17,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<b>Sery</b>			0,5999 <sup>1</sup>
nigdy	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	1 (3,6%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	10 (35,7%)	5 (31,3%)	
codziennie	5 (17,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
<b>Jaja</b>			0,2670 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	0 (0,0%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	12 (42,9%)	9 (56,3%)	
codziennie	12 (42,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

#### Produkty zbożowe

Tabela 7. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia produktów zbożowych.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Pieczywo razowe</b>			0,9126 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	1 (3,6%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	10 (35,7%)	4 (25,0%)	
codziennie	10 (35,7%)	8 (50,0%)	
kilka razy dziennie	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
<b>Pieczywo rafinowane</b>			0,8357 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	9 (32,1%)	6 (37,5%)	
codziennie	7 (25,0%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	1 (6,3%)	

<b>Kasze grubo.</b>			0,7697 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	14 (50,0%)	7 (43,8%)	
kilka razy w tyg.	7 (25,0%)	5 (31,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Kasze drobno.</b>			0,9417 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	18 (64,3%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
codziennie	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Gotowe śniad.</b>			0,7144 <sup>1</sup>
nigdy	9 (32,1%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	9 (56,3%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
codziennie	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

## Tłuszcze

Tabela 8. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia tłuszczu.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Olej</b>			0,7144 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	5 (17,9%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	15 (53,6%)	12 (75,0%)	
codziennie	5 (17,9%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
<b>Masło</b>			0,2179 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
codziennie	9 (32,1%)	9 (56,3%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
<b>Margaryna</b>			0,9805 <sup>1</sup>
nigdy	16 (57,1%)	10 (62,5%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	2 (7,1%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Śmietana</b>			0,7884 <sup>1</sup>
nigdy	8 (28,6%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	7 (25,0%)	3 (18,8%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<b>Inne tłuszcze</b>			0,7790 <sup>1</sup>
nigdy	21 (75,0%)	11 (68,8%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
kilka razy w tyg.	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Majonez</b>			0,9805 <sup>1</sup>
nigdy	5 (17,9%)	6 (37,5%)	
raz w m-c	12 (42,9%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	3 (18,8%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

### Owoce

Tabela 9. Analiza porównawcza badanych grup pod względem częstości spożycia owoców.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Owoce all</b>			0,7790 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	6 (21,4%)	1 (6,3%)	
kilka razy w tyg.	10 (35,7%)	5 (31,3%)	
codziennie	11 (39,3%)	7 (43,8%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
<b>Owoce pest.</b>			0,5999 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	12 (42,9%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	8 (28,6%)	4 (25,0%)	
codziennie	5 (17,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Kiwi</b>			0,4068 <sup>1</sup>

nigdy	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	13 (46,4%)	5 (31,3%)	
codziennie	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Owoce trop.</b>			0,9708 <sup>1</sup>
nigdy	5 (17,9%)	2 (12,5%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	8 (28,6%)	4 (25,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Owoce jago.</b>			0,5339 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	10 (62,5%)	
kilka razy w tyg.	9 (32,1%)	4 (25,0%)	
codziennie	3 (10,7%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Banany</b>			0,8453 <sup>1</sup>
nigdy	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	7 (43,8%)	
kilka razy w tyg.	11 (39,3%)	7 (43,8%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	

<b>Jabłka</b>			0,9903 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	12 (42,9%)	5 (31,3%)	
codziennie	2 (7,1%)	4 (25,0%)	
kilka razy dziennie	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
<b>Awokado</b>			0,93201
nigdy	13 (46,4%)	7 (43,8%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Oliwki</b>			0,99031
nigdy	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	5 (17,9%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Owoce suszone</b>			0,57471
nigdy	5 (17,9%)	4 (25,0%)	
raz w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w m-c	11 (39,3%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Słodkie przetw.</b>			0,19601
nigdy	6 (21,4%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	10 (35,7%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	4 (25,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

## Warzywa

Tabela 10 i 11. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia warzyw.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Warzywa all</b>			1,00 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	9 (32,1%)	5 (31,3%)	
codziennie	11 (39,3%)	4 (25,0%)	
kilka razy dziennie	4 (14,3%)	4 (25,0%)	
<b>Warzywa krzyż.</b>			0,8453 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	12 (42,9%)	7 (43,8%)	
codziennie	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Warzywa żółt</b>			0,4208 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	15 (53,6%)	10 (62,5%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Warzywa zielone</b>			0,6694 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	17 (60,7%)	7 (43,8%)	
codziennie	2 (7,1%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	



<b>Pomidory</b>			0,8548 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
raz w m-c	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	13 (46,4%)	5 (31,3%)	
codziennie	11 (39,3%)	7 (43,8%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Warzywa ogórek.</b>			0,5747 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	17 (60,7%)	7 (43,8%)	
codziennie	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Warzywa korzen.</b>			0,9514 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	3 (10,7%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	7 (43,8%)	
kilka razy w tyg.	13 (46,4%)	6 (37,5%)	
codziennie	2 (7,1%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<b>Świeże nasiona</b>			0,8836 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	8 (28,6%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	16 (57,1%)	11 (68,8%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	0 (0,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Suche nasiona</b>			0,1466 <sup>1</sup>
nigdy	3 (10,7%)	6 (37,5%)	
raz w m-c	14 (50,0%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	8 (28,6%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	2 (12,5%)	

codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Ziemniaki</b>			0,2367 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	3 (18,8%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	6 (21,4%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	12 (42,9%)	4 (25,0%)	
codziennie	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Orzechy</b>			0,5179 <sup>1</sup>
nigdy	4 (14,3%)	3 (18,8%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	10 (35,7%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	6 (21,4%)	3 (18,8%)	
codziennie	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Ziarna</b>			0,9417 <sup>1</sup>
nigdy	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	5 (31,3%)	
kilka razy w m-c	12 (42,9%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
codziennie	3 (10,7%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

Produkty mięsne i ryby

Tabela 12. Porównanie badanych grup pod względem częstości spożycia produktów mięsnych i ryb.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Kiełbasy</b>			0,9903 <sup>1</sup>
nigdy	4 (14,3%)	3 (18,8%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	5 (31,3%)	
kilka razy w tyg.	8 (28,6%)	4 (25,0%)	
codziennie	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
<b>Wędliny</b>			0,5259 <sup>1</sup>
nigdy	2 (7,1%)	4 (25,0%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	6 (21,4%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	12 (42,9%)	6 (37,5%)	
codziennie	5 (17,9%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
<b>Wyroby</b>			0,1466 <sup>1</sup>
nigdy	11 (39,3%)	9 (56,3%)	
raz w m-c	7 (25,0%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Mięso czerwone</b>			0,0691 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	2 (12,5%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	12 (42,9%)	8 (50,0%)	
kilka razy w tyg.	10 (35,7%)	3 (18,8%)	
codziennie	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<b>Mięso drobiowe</b>			0,6517 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	2 (12,5%)	
raz w m-c	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	5 (17,9%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	19 (67,9%)	8 (50,0%)	
codziennie	2 (7,1%)	2 (12,5%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Dziczyzna</b>			0,9805 <sup>1</sup>
nigdy	19 (67,9%)	11 (68,8%)	
raz w m-c	4 (14,3%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Ryby chude</b>			0,7790 <sup>1</sup>
nigdy	1 (3,6%)	4 (25,0%)	
raz w m-c	10 (35,7%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	16 (57,1%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	4 (25,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Ryby tłuste</b>			0,7327 <sup>1</sup>
nigdy	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	0 (0,0%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	14 (50,0%)	7 (43,8%)	
codziennie	5 (17,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	1 (6,3%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

## Napoje

Tabela 13. Analiza porównawcza badanych grup pod względem częstości spożycia napojów.

	<b>Grupa Probiotyk (n=28)</b>	<b>Grupa Placebo (n=16)</b>	<b>p</b>
<b>Soki owocowe</b>			0,5500 <sup>1</sup>
nigdy	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
raz w m-c	6 (21,4%)	3 (18,8%)	
kilka razy w m-c	8 (28,6%)	6 (37,5%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Soki warzywne</b>			0,9708 <sup>1</sup>
nigdy	11 (39,3%)	7 (43,8%)	
raz w m-c	11 (39,3%)	5 (31,3%)	
kilka razy w m-c	5 (17,9%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Napoje energ.</b>			0,9223 <sup>1</sup>
nigdy	24 (85,7%)	14 (87,5%)	
raz w m-c	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
kilka razy w m-c	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Napoje słodzone</b>			0,5999 <sup>1</sup>
nigdy	10 (35,7%)	7 (43,8%)	
raz w m-c	7 (25,0%)	4 (25,0%)	
kilka razy w m-c	7 (25,0%)	3 (18,8%)	
kilka razy w tyg.	2 (7,1%)	1 (6,3%)	
codziennie	1 (3,6%)	1 (6,3%)	
kilka razy dziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	

<b>Piwo</b>			0,8453 <sup>1</sup>
nigdy	15 (53,6%)	9 (56,3%)	
raz w m-c	8 (28,6%)	2 (12,5%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	4 (25,0%)	
kilka razy w tyg.	0 (0,0%)	1 (6,3%)	
codziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Wino</b>			0,4208 <sup>1</sup>
nigdy	9 (32,1%)	8 (50,0%)	
raz w m-c	13 (46,4%)	5 (31,3%)	
kilka razy w m-c	4 (14,3%)	1 (6,3%)	
kilka razy w tyg.	1 (3,6%)	2 (12,5%)	
codziennie	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Wódka</b>			0,2886 <sup>1</sup>
nigdy	20 (71,4%)	8 (50,0%)	
raz w m-c	5 (17,9%)	6 (37,5%)	
kilka razy w m-c	3 (10,7%)	2 (12,5%)	
kilka razy w tyg.	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
codziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
kilka razy dziennie	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

<sup>1</sup>U Manna-Whitneya test

## 2. Przykład jadłospisu 14-dniowego w diecie 1400kcal

### Dzień 1

Śniadanie: Serek wiejski ze słonecznikiem i ogórkiem, pieczywo

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
150	g	Serek wiejski lekki
100	g	Ogórek
10	g	Słonecznik, nasiona Szczypiorek

Drugie śniadanie: Kanapki z serem i pomidorem

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
30	g	Ser żółty
150	g	Pomidor Sałata

Obiad: Zupa paprykowa z kurczakiem

Uwaga! Przygotować drugą porcję na jutro!

150	g	Papryka czerwona
150	g	Ziemniaki
100	g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
50	g	Marchew
10	g	Cebula
30	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
500	g	Bulion warzywny ekologiczny z kostki
5	g	Oliwa z oliwek
35	g	Chleb żytni pełnoziarnisty Natka pietruszki

Ziemniaki pokroić w kostkę, marchew w talarki. Warzywa zalać bulionem i gotować. Na oliwie podsmażyć pokrojone w kostkę: paprykę, cebulę i kurczaka, dusić aż zmiękną i dodać do gotujących się warzyw. Całość gotować jeszcze 20 minut. Na koniec zupę zabielić serkiem i posypać natką. Podawać z pieczywem.

Podwieczorek: Jogurt i śliwki

200	g	Jogurt naturalny
200	g	Śliwki

Kolacja: Sałatka z kuskusem i kukurydzą

30	g	Kasza kuskus
15	g	Cebula
10	g	Rodzynki
10	g	Oliwa z oliwek
70	g	Kukurydza konserwowa
100	g	Ogórek

## Dzień 2

Śniadanie: Kanapki z serem i pomidor z cebulą

100 g	Chleb żytni pełnoziarnisty
20 g	Ser żółty
50 g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
150 g	Pomidor
10 g	Cebula

Drugie śniadanie: Bułka z orzechowym serem, śliwki

50 g	Bułki grahamki
50 g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
10 g	Orzechy włoskie
150 g	Śliwki

Obiad: Zupa paprykowa z kurczakiem

150 g	Papryka czerwona
150 g	Ziemniaki
100 g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
50 g	Marchew
10 g	Cebula
30 g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
500 g	Bulion warzywny ekologiczny z kostki
5 g	Oliwa z oliwek
35 g	Chleb żytni pełnoziarnisty
	Natka pietruszki

Podwieczorek: Jogurt i otręby

200 g	Jogurt naturalny
30 g	Otręby

Kolacja: Sałata z fetą i rzodkiewką

100 g	Kukurydza konserwowa
100 g	Rzodkiewka
60 g	Ser Feta 12% tłuszczu
35 g	Chleb żytni pełnoziarnisty
	Sałata do woli



### Dzień 3

Śniadanie: Kanapki z rybą i ogórkiem

70	g	Bułki grahamki
80	g	Makrela wędzona
50	g	Ogórek kwaszony

Drugie śniadanie: Gruszkowy jogurt z orzechami

150	g	Gruszka
250	g	Jogurt naturalny
10	g	Orzechy włoskie

Obiad: Spaghetti a la Bologne

Uwaga! Przygotować drugą porcję na jutro!

70	g	Makaron pełnoziarnisty
100	g	Mięso z podudzia indyka bez skóry
70	g	Marchew
100	g	Seler naciowy
200	g	Pomidor
20	g	Cebula
5	g	Oliwa z oliwek

Duży ząbek czosnku, oregano świeże

Pokroić cebulę, czosnek i seler naciowy, marchew zetrzeć. Na patelni rozgrzać oliwę, wrzucić czosnek, chwilę podsmażyć, tak by oliwa nabrała smaku czosnku, a następnie wyjąć go z oliwy. Na oliwę wrzucić warzywa i mięso. Przyprawić solą i pieprzem podsmażyć cały czas dobrze mieszając. Do mięsa z warzywami dodać pomidory (sparzone, obrane ze skórki), wymieszać i dusić przez 15 minut. Pod koniec, dodać liście świeżego oregano. Do wrzątku wrzucić makaron. Ugotować i odcedzić. Wymieszać w garnku makaron z sosem. Wyłożyć kopczyk na talerz, posypać świeżymi listkami oregano.

Podwieczorek: Bułka z serkiem i rodzynekami

50	g	Bułki grahamki
50	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
10	g	Rodzyнки

Kolacja: Pomidor z mozzarellą i bazylią

200	g	Pomidor
50	g	Mozzarella
70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
		Bazylia

#### Dzień 4

Śniadanie: Owsianka z migdałami

50	g	Płatki owsiane
250	g	Mleko spożywcze 1,5% tłuszczu
10	g	Płatki migdałowe

Drugie śniadanie: Kanapki z rybą i ogórkiem kwaszonym

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
60	g	Makrela wędzona
50	g	Ogórek kwaszony

Obiad: Spaghetti a la Bologne

70	g	Makaron pełnoziarnisty
100	g	Mięso z podudzia indyka bez skóry
70	g	Marchew
100	g	Seler naciowy
200	g	Pomidor
20	g	Cebula
5	g	Oliwa z oliwek
		Duży ząbek czosnku, oregano świeże

Podwieczorek: Wafle ryżowe z serkiem i nektarynką

100	g	Nektarynka
50	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
30	g	Wafle ryżowe

Nektarynkę pokroić w kostkę i wymieszać z serkiem. Masą posmarować wafle.

Kolacja: Sałatka z zielonej fasolki i fety z sezamem

200	g	Fasola szparagowa
100	g	Pomidor
40	g	Ser Feta 12% tłuszczu
10	g	Cebula
10	g	Sezam
70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
		Ocet winny biały, musztarda

Gotować fasolkę w osolonej wodzie 6-8 min. Odsączyć, przepłukać zimną wodą. Wymieszać ocet z musztardą, dodać pieprz. Połączyć fasolkę, ćwiartki pomidorków, cebulkę i wymieszać z sosem. Całość posypać pokruszoną fetą i sezamem. Podawać z pieczywem.

## Dzień 5

Śniadanie: Kanapki z jajkiem i papryką

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
120	g	Jaja kurze całe (2 sztuki)
50	g	Papryka czerwona

Drugie śniadanie: Kanapki z polędwicą i śliwki

50	g	Bułki grahamki
30	g	Polędwica sopočka
100	g	Pomidor
200	g	Śliwki

Obiad: Łosoś z pomidorami w sosie czosnkowym

100	g	Łosoś świeży
60	g	Ryż brązowy
150	g	Pomidor
50	g	Jogurt naturalny

Sok cytrynowy, ząbek czosnku, szczypiorek, folia aluminiowa

Ryż ugotować. Łososa skropić sokiem z cytryny posolić i zapiec w folii w piekarniku. Pomidora pokroić w ósemki, posypać szczypiorkiem polać sosem przygotowanym z jogurtu, czosnku, odrobiny soli i pieprzu. Łososa podać na ryżu z pomidorami.

Podwieczorek: Jogurt i otręby

200	g	Jogurt naturalny
30	g	Otręby

Kolacja: Sałatka z tuńczykiem

100	g	Pomidor
50	g	Tuńczyk w sosie własnym
100	g	Kukurydza konserwowa
50	g	Jogurt naturalny
50	g	Bułki grahamki
		Kapusta pekińska, koperek

Z jogurtu i koperku przygotować sos.

## Dzień 6

Śniadanie: Kanapki z tuńczykiem i papryką

100	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
60	g	Tuńczyk w sosie własnym
30	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
150	g	Papryka czerwona Szcypiorek

Drugie śniadanie: Jogurt i kanapka z dżemem

200	g	Jogurt naturalny
50	g	Bułka grahamka
20	g	Dżem niskosłodzony

Obiad: Placuszki z cukinii z sosem czosnkowym

Uwaga! Przygotować drugą porcję na jutro!

60	g	Jaja kurze całe (1 sztuka)
300	g	Cukinia
40	g	Mąka pszenna pełnoziarnista
45	g	Połudwica z indyka
10	g	Oliwa z oliwek
100	g	Jogurt naturalny Koperek, ząbek czosnku

Cukinię zetrzeć na drobnej tarce. Odcisnąć nadmiar wody. Cukinię przełożyć do miski, wbić jajka, dodać mąkę, posiekany koperek i pokrojoną w drobną kosteczkę szynkę. Przyprawić do smaku odrobiną soli i pieprzem. Ciasto dokładnie wymieszać. Na patelni rozgrzać olej, formować placuszki (każdy z jednej łyżki masy), smażyć z obu stron na złoty kolor. Przygotować sos: wyciśnięty ząbek czosnku wymieszać z jogurtem, solą i pieprzem. Gotowe placuszki osączyć z nadmiaru tłuszczu na papierowym ręczniku.

Podwieczorek: Kanapka z serkiem i borówkami

35	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
50	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
150	g	Borówki

Kolacja: Serek wiejski z warzywami

150	g	Serek wiejski lekki
100	g	Rzodkiewka
100	g	Ogórek
50	g	Bułki grahamki

## Dzień 7

Śniadanie: Kanapki z serem, polędwicą i ogórkiem

100	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
20	g	Ser żółty
45	g	Polędwica z indyka
100	g	Ogórek

Drugie śniadanie: Kanapka z polędwicą i pomidorem, ciasteczko

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
40	g	Polędwica sopocka
100	g	Pomidor
15	g	Ciasteczko pełnoziarniste

Obiad: Placuszki z cukinii z sosem czosnkowym

60	g	Jaja kurze całe (1 sztuka)
300	g	Cukinia
40	g	Mąka pszenna pełnoziarnista
45	g	Polędwica z indyka
10	g	Oliwa z oliwek
100	g	Jogurt naturalny
		Koperek, ząbek czosnku

Podwieczorek: Jogurt z jabłkiem i orzechami

150	g	Jogurt naturalny
150	g	Jabłko
10	g	Orzechy włoskie

Kolacja: Bułka z serkiem i ogórek

70	g	Bułki grahamki
100	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
100	g	Ogórek

## Dzień 8

Śniadanie: Owsianka z gruszką

40	g	Płatki owsiane
250	g	Mleko spożywcze 1,5% tłuszczu
150	g	Gruszka

Płatki zalać niewielką ilością wody i podgrzewać, aż się lekko rozkleją i zmiękną. Następnie dolać mleko, gotować aż płatki będą miękkie. Podawać z gruszką pokrojoną w kostkę.

Drugie śniadanie: Kanapki z polędwicą i papryką, orzechy

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
45	g	Polędwica z indyka
100	g	Papryka czerwona
		Sałata do woli
10	g	Orzechy włoskie

Obiad: Kurczak w sezamie z pieczonymi ziemniaczkami i kalafiorem

Uwaga! Przygotować drugą porcję na jutro!

200	g	Ziemniaki
130	g	Mięso z ud kurczaka bez skóry (filet bez kości)
5	g	Miód pszczeli
15	g	Sezam, nasiona
150	g	Kalafior

Sok z cytryny, papryka słodka i ostra w proszku, sól, pieprz do smaku, koperk

Ziemniaki obrać, pokroić w grubsze talarki i ugotować na półmiękkko. Udka natrzeć papryką w proszku i pieprzem. Miód wymieszać z sokiem i sezamem. Taką mieszaniną natrzeć udka. Piec w piekarniku w 180°C przez 50 min wraz z ziemniakami ułożonymi na blaszce i posypanymi papryką. Kalafior ugotować na parze lub w wodzie. Danie posypać koperkiem.

Podwieczorek: Owoce w sosie cyjamonowym

150	g	Jogurt naturalny
100	g	Borówki
200	g	Jabłko
		Cynamon

Jabłko pokroić i wymieszać z borówkami. Owoce połączyć sosem przyrządzonym z jogurtu i cynamonu.

Kolacja: Sałatka z mozzarellą i ananasem

50	g	Ananas
40	g	Mozzarella
100	g	Kukurydza konserwowa
5	g	Oliwa z oliwek
25	g	Bułki grahamki

Kapusta pekińska, mały ząbek czosnku, natka pietruszki, sól, pieprz

## Dzień 9

Śniadanie: Grzanki z mozzarellą i pomidorem

70 g	Chleb żytni pełnoziarnisty
60 g	Mozzarella
100g	Pomidor
	Bazylia

Drugie śniadanie: Kanapki z migdałowym serkiem

70 g	Bułki grahamki
10 g	Płatki migdałowe
50 g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
100	g Ogórek

Obiad: Kurczak w sezamie z pieczonymi ziemniaczkami i kalafiorem

200g	Ziemniaki
130g	Mięso z ud kurczaka bez skóry (filet bez kości)
5	g Miód pszczeli
15 g	Sezam, nasiona
150g	Kalafior

Sok z cytryny, papryka słodka i ostra w proszku, sól, pieprz do smaku, koperek

Podwieczorek: Jogurt egzotyczny

150g	Jogurt naturalny
100g	Banan
50	g Ananas świeży

Kolacja: Sałatka z ananasem

Przygotować drugą porcję mięsa na jutro!

100g	Ananas świeży
40 g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
5	g Oliwa z oliwek
50 g	Por
50 g	Jogurt naturalny
50 g	Bułki grahamki

Kapusta pekińska, pieprz, słodka papryka mielona

Kurczaka pokroić w kostkę, przyprawić papryką i obsmażyć na oliwie. Ananasa pokroić w kostkę, pora w pierścionki, kapustę posiekać. Wszystkie składniki wymieszać i połączyć jogurtem. Przyprawić do smaku. Podawać z pieczywem.

## Dzień 10

Śniadanie: Serek wiejski ze słonecznikiem i papryką, pieczywo

70	g	Bułki grahamki
150	g	Serek wiejski lekki
100	g	Papryka czerwona Szczypiorek

Drugie śniadanie: Jogurt ze słonecznikiem, wafle

200	g	Jogurt naturalny
20	g	Słonecznik
20	g	Wafle ryżowe

Do jogurtu można dodać cynamonu lub soku z cytryny.

Obiad: Dorsz w pomidorach z tymiankiem

150	g	Dorsz świeży
250	g	Pomidor
50	g	Cebula
5	g	Cukier
10	g	Oliwa z oliwek
250	g	Ziemniaki

Łyżeczka sosu sojowego (lub szczypta soli i pieprz), tymianek, szczypiorek  
Ziemniaki ugotować. Na patelni rozgrzać oliwę, dodać pokrojoną cebulkę i lekko podduśić przez 5 minut. Dodać pomidory, obrane ze skóry i drobno pokrojone, cukier, sos sojowy i oberwane listki tymianku, zagotować. Gotować na małym ogniu przez 5 minut, dodać filety dorsza, lekko oprószone solą i pieprzem, przykryć i gotować przez 8 - 10 minut. Gotowe danie podać posypane szczypiorkiem.

Podwieczorek: Ananas z orzechami

200	g	Ananas
15	g	Orzechy włoskie

Kolacja: Sałatka z winogronami

40	g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
100	g	Winogrona
150	g	Ogórek
50	g	Jogurt naturalny
50	g	Por
50	g	Bułki grahamki



## Dzień 11

Śniadanie: Bakaliowe musli z jabłkiem

40	g	Musli z rodzynkami i orzechami
250	g	Mleko spożywcze 1,5% tłuszczu
200	g	Jabłko

Drugie śniadanie: Bułka z polędwicą i awokado, sok marchwiowy

50	g	Bułki grahamki
30	g	Polędwica sopocka
20	g	Awokado
50	g	Ogórek
250	g	Sok marchwiowy jednodniowy

Obiad: Mielone z wołowiny z fetą i kolorową kaszą

Uwaga! Przygotować drugą porcję na jutro!

100	g	Wołowina mielona (najlepiej mięso na tatar)
60	g	Jaja kurze całe ( sztuka)
20	g	Ser Feta 12% tłuszczu
40	g	Kasza kuskus
100	g	Ogórek
50	g	Papryka
5	g	Olej rzepakowy

Ząbek czosnku, szalwia, natka pietruszki

Kaszę przygotować zgodnie z opisem na opakowaniu. Posiekać szalwię i ząbek czosnku. Fetę pokroić w kostkę. Przyprawić mięso ziołami, odrobiną soli i pieprzem, dodać jajko i dokładnie wyrobić. Formować małe okrągłe kotleciki i nadziewać je kostkami fety. Wstawić do piekarnika nagrzanego do 200 °C na ok. 15 minut (długość pieczenia dostosować do wielkości kotlecików). Podać z kaszą wymieszaną z pokrojonymi w drobną kostkę: ogórkiem i papryką oraz natką pietruszki i olejem.

Podwieczorek: Jogurt z gruszką i rodzynkami

150	g	Jogurt naturalny
150	g	Gruszka
10	g	Rodzynki

Kolacja: Sałatka z kurczakiem i awokado

Przygotować drugą porcję mięsa na jutro!

40	g	Awokado
50	g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
100	g	Pomidor
50	g	Bułki grahamki
5	g	Oliwa z oliwek

Sałata do woli, estragon, ocet winny biały

Mięso z piersi kurczaka ugotować w lekko osolonej wodzie. Gdy wystygnie, pokroić na cząstki wraz z awokado i pomidorem. Sałatę porwać i wymieszać z przygotowanymi składnikami. Z oliwy, estragonu i octu przygotować dressing do polania sałatki. Podawać z pieczywem.

## Dzień 12

Śniadanie: Kanapki z pastą z makreli i ogórkiem kwaszonym

70 g	Bułki grahamki
50 g	Makrela wędzona
50 g	Jogurt naturalny
10 g	Koncentrat pomidorowy 30%
100g	Ogórek kwaszony
	Szczypiorek

Makrelę dokładnie wymieszać z jogurtem, koncentratem i szczypiorkiem. Przyprawić do smaku. Pastą smarować pieczywo. Jeść z ogórkiem.

Drugie śniadanie: Kanapki z serem i pomidorem

70 g	Chleb żytni pełnoziarnisty
30 g	Ser żółty
150g	Pomidor
	Sałata do woli

Obiad: Mielone z wołowiny z fetą i kolorowa kaszą

100g	Wołowina mielona (najlepiej mięso na tatar)
60 g	Jaja kurze całe (1 sztuka)
20 g	Ser Feta 12% tłuszczu
40 g	Kasza kuskus
100g	Ogórek
50 g	Papryka
5 g	Olej rzepakowy
	Ząbek czosnku, szalwia, natka pietruszki

Podwieczorek: Sałatka owocowa

100g	Winogrona
100g	Jabłko
100g	Banan
	Sok z cytryny

Kolacja: Sałatka z kurczakiem i awokado

40 g	Awokado
50 g	Mięso z piersi kurczaka bez skóry
100g	Pomidor
50 g	Bułki grahamki
5 g	Oliwa z oliwek
	Sałata do woli, estragon, ocet winny biały

## Dzień 13

Śniadanie: Kanapki z wędzoną makrelą

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
70	g	Makrela wędzona
50	g	Jogurt naturalny
50	g	Ogórek kwaszony Szcypiorek

Jogurt wymieszać z rybą i szczypiorkiem. Pastę nałożyć na pieczywo. Podawać z ogórkiem.

Drugie śniadanie: Kanapki z serem, sałatą i papryką

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
30	g	Ser żółty
100	g	Papryka czerwona Sałata do woli

Obiad: Makaron z borowikami i surówką

Uwaga! Przygotować drugą porcję na kolejny dzień!

100	g	Borowiki (ewentualnie pieczarki)
50	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
150	g	Marchew
100	g	Jabłko
10	g	Oliwa z oliwek
60	g	Makaron pełnoziarnisty

Natka pietruszki, ząbek czosnku, sok cytrynowy

Makaron ugotować. Grzyby umyć, osuszyć, pokroić na kawałki. Rozgrzać patelnię i jeśli są to grzyby mrożone, chwilę trzymać je na suchej patelni, aby odparować płyn. Na patelnię wlać oliwę, jeśli mamy grzyby świeże to należy dodać je teraz. Grzyby doprawić solą oraz pieprzem i smażyć przez kilka minut. W połowie smażenia dodać pokrojony na plasterki czosnek. Grzyby delikatnie zrumienić, zmniejszyć ogień, dodać natkę pietruszki oraz serek, wymieszać z makaronem. Marchewkę i jabłko zetrzeć na tarce, doprawić sokiem z cytryny.

Podwieczorek: Kefir i jabłko

200	g	Kefir naturalny
200	g	Jabłko

Kolacja: Kanapki z wędliną i sałatka z pomidora z sezamem

70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
45	g	Polędwica z piersi kurczaka
100	g	Pomidor
5	g	Sezam
5	g	Oliwa z oliwek Sałata do woli, szczypiorek

## Dzień 14

### Śniadanie: Omlet z cukinią

120	g	Jaja kurze całe (2 sztuka)
5	g	Oliwa z oliwek
20	g	Mąka pszenna pełnoziarnista
50	g	Mleko spożywcze 1,5 % tłuszczu
30	g	Polędwica z piersi kurczaka
100	g	Cukinia

Jaja zmiksować blenderem razem z mąką, mlekiem, dodać szczyptę soli. Patelnię posmarować pędzelkiem oliwą, rozgrzać, wyłączyć na nią jajka, dodać przesmażone wcześniej szynkę z cukinią, zmniejszyć ogień i smażyć omlet pod przykryciem aż wierzch się zetnie.

### Drugie śniadanie: Kanapki z polędwicą i pomidorem

100	g	Chleb żytni pełnoziarnisty
60	g	Polędwica z piersi kurczaka
100	g	Pomidor

### Obiad: Makaron z borowikami i surówką

100	g	Borowiki (ewentualnie pieczarki)
50	g	Serek śmietankowy 5% tłuszczu
150	g	Marchew
100	g	Jabłko
10	g	Oliwa z oliwek
60	g	Makaron pełnoziarnisty
Natka pietruszki, ząbek czosnku, sok cytrynowy		

### Podwieczorek: Jogurt, jabłko i otręby

150	g	Jogurt naturalny
20	g	Otręby
150	g	Jabłko

### Kolacja: Orzeźwiająca sałatka z orzechami

10	g	Orzechy włoskie
150	g	Ogórek
50	g	Jogurt naturalny
70	g	Chleb żytni pełnoziarnisty

Sałata do woli, mały ząbek czosnku, natka pietruszki, sok z cytryny

Ogórkę pokroić w plasterki, natkę pietruszki posiekać, sałatę porwać. Składniki wymieszać. Sos przygotować z: jogurtu, kilku kropel soku z cytryny, przeciśniętego czosnku, soli i pieprzu.

## Piśmiennictwo

1. Kłosiewicz-Latoszek L. *Otyłość jako problem społeczny, zdrowotny i leczniczy*. Probl Hig Epidemiol, 2010, 91(3):339-343.
2. Szymocha M., Bryła M., Maniecka-Bryła I. *Epidemia otyłości w XXI wieku*. Zdr Publ 2009;119(2):207-212.
3. Jasiel-Wojculewicz H, Chrostowska M, Narkiewicz K. *Otyłość – niektóre aspekty epidemiologiczne i rokownicze*. Kardiologia na co Dzień. 2007;3(2):79-83.
4. Światowa Organizacja Zdrowia. *Obesity and overweight. Fact sheets*. Dostępne na: [www.who.int](http://www.who.int). WHO.2016.
5. *Health and lifestyle indicators in the European Union*. European Nutrition and Health Report 2009. Forum Nutr. Krager, Basel 2009, 62: 157-201.
6. *Otyłość, żywienie, aktywność fizyczna, zdrowie Polaków. Diagnoza stanu odżywienia, aktywności fizycznej i żywieniowych czynników ryzyka otyłości oraz przewlekłych chorób niezakaźnych w Polsce (1960-2005)*. Jarosz M (red.) IŻŻ, Warszawa 2006.
7. Szponar L., Sekuła W., Rychlik E i wsp. *Badania indywidualnego spożycia żywności i stanu odżywienia w gospodarstwach domowych*. IŻŻ, Warszawa 2003.
8. Jarosz M., Rychlik E. *Otyłość wyzwaniem zdrowotnym i cywilizacyjnym*. Postępy Nauk Medycznych 2011; 9: 712-717.
9. *Wieloośrodkowe Ogólnopolskie Badania Stanu Zdrowia Ludności*. Program WOBASZ. Wydawnictwo Instytut Kardiologii, Warszawa 2005; 90: 1-128.
10. *Word maps of obesity*. IASO Online. [www.iaso.org](http://www.iaso.org).
11. Bray G., Bouchard C. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology*. CRC Press, 2003.
12. Lee S., Gallagher D. *Assessment methods in human body composition*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2008; 11(5): 566-72.
13. Huxley R., Mendis S., Zheleznyakov E., i in. *Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk - a review of the literature*. Eur J Clin Nutr. 2010; 64: 16–22.
14. Polskie Towarzystwo Dietetyki, *Standardy Leczenia Dietetycznego Otyłości Prostej u Osób Dorosłych*. Journal of Dietetics, 2015, vol.8.
15. Zdrojewski T., Rutkowski M., Bandosz P. i in. *Prevalence and control of cardiovascular risk factors in Poland*. Assumptions and objectives of the NATPOL 2011 Survey. Kardiologia Polska. 2013; 71(4): 381-392.
16. Czerwińska E., Walicka M., Marcinowska-Suchowierska E. *Otyłość – czy zawsze prosta?* Postępy Nauk Medycznych, t. XXVI, nr 4, 2013.

17. Cypryk K., Lewandowski K., Szosland K. i in. *Zaburzenia stanu odżywienia u dorosłych*. [W:] Lewiński A., Zygmunt A. (red.): *Diagnostyka czynnościowa zaburzeń hormonalnych z elementami diagnostyki różnicowej*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2011; 143-152.
18. Górska M., Majewska-Szczepanik M., Szczepanik M. *Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu*. *Postępy Hig. Med. Dośw.* (online), 2015; 69: 1384-1404.
19. Garcia-Montoya I., Siqueiros-Cendon T., Arevalo-Gallegos S. i in. *Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview*. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820:226-236.
20. Ward P., Paz E., Conneely O. *Multifunctional role of lactoferrin: a critical overview*. *Cell Mol Life Sci* 2005;62: 2540-2548.
21. Tokarz-Deptuła B., Śliwa-Dominiak J., Adamiak M. i in. *Bakterie komensalne a odporność układu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego*. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2016;70: 599-609.
22. Van der Sluis M., De Koning B.A., De Bruijn A.C. i in. *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. *Gastroenterology*, 2006; 131:117 - 129.
23. Mowat A. *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3: 331-341.
24. Kelly S., Talley N., Hansbro P. *Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease*. *Mucosal Immunol.*, 2012; 5: 7-18.
25. Pham T., Lawley T. *Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014; 17: 67-74.
26. Caricilli A., Castoldi A., Câmara N. *Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity*. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5(1):18-32.
27. Kawashima H. *Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer*. *Biol Pharm Bull* 2012;35(10):1637-1641.
28. Węgrzyn D., Adamek K., Łoniewska B. *Structure of the intestinal barrier*. *Pomeranian J Life Sci* 2017;63(3):6-9.
29. Lee SH. *Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases*. *Intest Res* 2015;13(1):11-8.
30. Umeda K., Matsui T., Nakayama M. i in. *Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1*. *J Biol Chem* 2004;279(43):44785-94.
31. Kojima T., Murata M., Go M. i in. *Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells*. *J Membr Biol* 2007;217(1-3):13-9.

32. Działo J., Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A. i in. *Charakterystyka tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego*. *Alergia Astma Immunologia*, 2010, 15(4): 197 – 202.
33. Turnbaugh P.J., Bäckhed F., Fulton L, i in. *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. *Cell. Host. Microbe* 2008; 3, 213–223.
34. Schwartz A. *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. *Obesity* 2010; 18: 190–195.
35. Jumpertz R., Le D.S., Turnbaugh P.J. *Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans*. *American Journal of Clinical Nutrition* 2011; 94: 58–65.
36. Bäckhed F., Ding H., Wang T. i in. *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004; 101: 15718-15723.
37. Tilg H., Moschen A.R., Kaser B. i in. *Obesity and the microbiota*. *Gastroenterology* 2009; 136: 1476.
38. Turnbaugh P.J., Bäckhed F., Fulton L. i in. *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. *Cell. Host Microbe* 2008; 3: 213.
39. Pendyala S., Walker J.M., Holt P.R. *A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut*. *Gastroenterology* 2012; 142: 110.
40. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F. i in. *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. *Diabetologia* 2007; 50: 2374–2383.
41. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F. i in. *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. *Diabetologia* 2007; 50: 2374–2383.
42. Fleissner C.K., Huebel N., Abd El-Bary M.M. i in. *Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet induced obesity*. *Br. J. Nutr.* 2010; 104: 919–929.
43. Bäckhed F., Manchester J.K. Semenkovich C.F. i in. *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2007; 104: 979–984.
44. Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P. i in. *Obesity alters gut microbial ecology*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005; 102: 11070-11075.
45. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S. i in. *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*. 2006;444(7122):1022-1023.
46. Balamurugan R., George G., Kabeerdoss J. i in. *Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children*. *Br. J. Nutr.* 2010; 103: 335–338.

47. Hajer G.R., van Haeften T.W., Visseren F.L.: *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*. Eur. Heart J., 2008; 29: 2959-2971.
48. Weisberg S.P., McCann D., Desai M. i in. *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J. Clin. Invest., 2003;112: 1796-1808.
49. Cani P.D., Delzenne N.M. *Involvement of the gut microbiota in the development of low grade inflammation associated with obesity: focus on this neglected partner*. Acta Gastroenterol. Belg., 2010; 73: 267-269.
50. Caesar R., Reigstad C., Bäckhed H. i in. *Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice*. Gut. 2012; 61: 1701–1707.
51. Marlicz W., Ostrowska L., Łoniewski I. *Flora bakteryjna jelit i jej potencjalny związek z otyłością*. Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2013, tom 9, nr 1, 20–28.
52. Ghoshal S., Witta J., Zhong J. i in. *Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides*. J. Lipid. Res. 2009; 50: 90–97.
53. Vijay-Kumar M., Aitken J., Carvalho F. i in. *Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5*. Science 2010; 328: 228–231.
54. Gummesson A., Carlsson L., Storlien L. i in. *Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women*. Obesity 2011; 19: 2280–2282.
55. Łuczyński W., Bossowki A., Głowińska-Olszewska B. i in. *Rola limfocytów T-regulatorowych w patogenezie zaburzeń immunologicznych towarzyszących otyłości i miażdżycy*. Postepy Hig Med Dosw, 2010; 64: 156-160.
56. Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M. i in. *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat. Med., 2009; 15: 914–920.
57. Tokarz-Deptuła B., Śliwka-Dominiak J., Adamiak M. i in. *Bakterie komensalne a odporność układu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego*. Postepy Hig Med Dosw. 2016; 70: 599-609.
58. Xiao S., Fei N., Pang X. i in. *A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome*. FEMS Microbiol. Ecol., 2014; 87: 357-367.
59. Raport a Joint FAO/WHO Working Group. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
60. Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K. i in. *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial*. Eur. J. Clin. Nutr. 2010; 64: 636–643.



61. Dror T., Dickstein Y., Dubourg G. i in. *Microbiota manipulation for weight change*. Microb. Pathog., 2017; 106: 146-161.
62. Moradian F., Sharbafi R., Rafiei A. *Lactoferrin, isolation, purification and antimicrobial effects*. Journal of Medical and Bioengineering 2014; 3: 203-206.
63. Ayling RM. *New faecal tests in gastroenterology*. Ann Clin Biochem 2012,49(1):44-54.
64. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S. i in. *Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview*. Biochim. Biophys. Acta, 2012; 1820: 226-236.
65. Lauterbach R., Kamińska E., Michalski P. i in. *Laktoferyna – glikoproteina o dużym potencjale terapeutycznym*. Developmental Period Medicine, 2016; XX, 2: 118-125.
66. Wołonciej M., Roszkowska-Jakimiec W. *Laktoferyna – białko o multiwłaściwościach*. GF, 2017, 28-30.
67. Węgrzyn D., Adamek K., Łoniewski B. *Metody diagnostyki funkcji bariery jelitowej*. Przegląd Lekarski 2017, 74, 8; 393-398.
68. Fasano, A. *Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000, 915, 214–222.
69. Fasano A. *Intestinal zonulin: open sesame!* Gut 2001;49:159–162.
70. Ohlsson B., Orho-Melander M., Nilsson P. *Higher levels of serum zonulin may rather be associated with increased risk of obesity and hyperlipidemia, than with gastrointestinal symptoms or disease manifestations*. Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 582.
71. Jayashree B., Bibin Y., Prabhu D. i in. *Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 388; 1–2, 203–210.
72. Brończyk-Puzoń A., Koszowska A., Nowak J. i in. *Epidemiologia otyłości na świecie i w Polsce*. Forum Zaburzeń Metabolicznych 2014, 5; 1, 1-5.
73. Jarosz M., Rychlik E. *Otyłość wyzwaniem zdrowotnym i cywilizacyjnym*. Postępy Nauk Medycznych 2011; 9: 712–717.
74. Stępaniak U., Misek A., Waśkiewicz A. i in. *Prevalence of general and abdominal obesity and overweight among adults in Poland*. Pol Arch Med Wewn. 2016; 126 (9): 662-671.
75. Szczepańska E, Brończyk-Puzoń A. *Ocena nawyków żywieniowych pacjentów z otyłością, zakwalifikowanych do zabiegu bariatrycznego*. Med. Og Nauk Zdr. 2014; 20(3): 330–334.
76. Olszanecka-Glinianowicz M. *Rola diety bardzo niskokalorycznej (VLCD) w leczeniu otyłości*. Endokrynologia Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2012; 8 (4): 109–113.
77. Brończyk-Puzoń A., Nowak J., Koszowska A. i in. *Algorytm leczenia otyłości*. Forum Medycyny Rodzinnej 2014, tom 8, nr 5, 211–216.

78. Sacks F., Bray G., Carey V. i in. *Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates*. N Engl J Med 2009; 360: 859-887.
79. Ostrowska L., Stefańska E., Adamska E. i in. *Wpływ leczenia dietą redukcyjną na skład ciała i modyfikację składników odżywczych w codziennej racji pokarmowej u otyłych kobiet*. Endokrynologia Otyłości i Zaburzenia Przemiany Materii 2010,6(4),179-188.
80. Żak-Gołąb A., Olszanecka-Glinianowicz M., Kocelak P. i in. *Rola mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości*. Postępy Hig Med. Dośw., 2014; 68:84-90.
81. Ding S., Chi M., Scull B. i in. *High-fat diet. Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. PLoS One, 2010; 5: e12191.
82. Deopurkar R., Ghanim H., Friedman J. i in. *Differential effects of cream, glucose and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3*. Diabetes Care, 2010; 33: 991-997.
83. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A. i in. *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes. 2007;56(7):1761-1772.
84. Rescigno M. *Dendritic cells in oral tolerance in the gut*. Cell Microbiol 2011;13(9), 1303-1308.
85. Fasano A. *Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity and cancer*. Physiol Rev 2011, 91: 151–175.
86. El Asmar R., Panigrahi P., Bamford P. i in. *Host-dependent activation of the zonulin system is involved in the impairment of the gut barrier function following bacterial colonization*. Gastroenterology 2002, 123: 1607–1615.
87. Żak-Gołąb A., Kocelak P., Aptekorz M. i in. *Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile and zonulin concentration in obese and normal weight subjects*. International Journal of Endocrinology 2013.
88. Moreno-Navarrete J., Sabater M., Ortega F. i in. *Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance*. PLoS One 2012;7, 5, e37160.
89. Liu Z., Huang M., Zhang X. i in. *The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and doubleblind randomized clinical trial*. American Journal of Clinical Nutrition, 2013; 97, 1, 117–126.
90. Małaczewska J., Rotkiewicz Z. *Laktoferyna – białko multipotencjalne*. Medycyna Wet. 2007; 63,2, 136-139.
91. Artym J., Zimecki M. *Rola laktoferyny w prawidłowym rozwoju noworodka*. Postępy Hig Med Dosw. 2005; 59: 421-432.

92. Sherman M., Bennett S., Hwang F. i in. *Neonatal small bowel epithelia: enhancing antibacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG*. Biometals, 2004; 17: 285–289.
93. Petschow B., Talbott R., Batema R. *Ability of lactoferrin to promote the growth of Bifidobacterium spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level*. J Med Microbiol. 2001;48:541-549.
94. Siqueiros-Cendon T., Arevalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B i in. *Immunomodulatory effects of lactoferrin*. Acta Pharm Sin. 2014;35:557-566.
95. Walker T., Land M., Kartashov A. i in. *Fecal Lactoferrin Is a Sensitive and Specific Marker of Disease Activity in Children and Young Adults With Inflammatory Bowel Disease*. J Ped Gastroenterol Nutr 2007; 44: 414-422.
96. Kane S., Sandborn W., Rufo P. i in. *Fecal Lactoferrin Is a Sensitive and Specific Marker in Identifying Intestinal Inflammation*. Am J Gastroenterol 2003; 98: 1310-1314.
97. Suzuki T. *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junction*. Cell. Mol. Life Sci. 2013, 70:631–659.
98. Mörkl S., Lackner S., Meinitzer A. i in. *Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women*. European Journal of Nutrition, 2018.
99. Damms-Machado A., Louis S., Schnitzer A. *Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction*. Am J Clin Nutr 2017;105:127–135.
100. Roberfroid M., Bornet Bouley C., Cummings J. *Colonic Microflora: Nutrition and Health. Summary and Conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] Workshop held in Barcelona, Spain*. Nutr Rev 1995,53, 127–130.
101. Ostrowska L., Smarkusz J. *Modyfikacja mikroflory jelitowej sposobem zapobiegania lub leczenia otyłości i schorzeń metabolicznych?* Forum Zaburzeń Metabolicznych 2016; 7, 2, 53-61.
102. Gibson G., Roberfroid M. *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. J Nutr. 1995,125(6):1401-1412.
103. Staniszewska M., Bondaryk M., Kowalska M. i in. *Patogeneza i leczenie zakażeń Candida spp*. Post. Mikrobiol. 2014, 53, 3, 229–240.
104. Furet J., Kong L., Tap J. i in. *Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low grade inflammation markers*. Diabetes 2010; 59: 3049-3057.
105. Qin J., Li R., Raes J. i in. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature 2010; 464: 59-65.

106. Duncan S., Lobley G., Holtrop G. i in. *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. Int. J. Obes. 2008; 32: 1720-1724.
107. Kocetak P., Żak-Gołąb A., Zahorska-Markiewicz B. i in. *Resting energy expenditure and intestinal microbiota in obese and normal weight subjects*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013; 17, 20, 2816-2821.
108. Nawrocka M., Szulińska M., Bogdański P. *Rola mikroflory jelitowej w patogenezie i leczeniu otyłości oraz zespołu metabolicznego*. Forum Zaburzeń Metabolicznych 2015; 6, 3, 95–102.
109. Liszt K., Zwielehner J., Handschur M. i in. *Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting*. Ann. Nutr. Metab. 2009; 54: 253–257.
110. De Filippis F., Pellegrini N., Vannini L. i in. *High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome*. Gut 2016; 65: 1812–1821.
111. Fava F., Gitau R., Grifn B. i in. *The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population*. Int J Obes 2013; 37, 216–223/
112. Koloverou E., Panagiotakos D., Pitsavos C. i in. *Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence (2002–2012) of diabetes: correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study*. Diabetes Metab Res Rev. 2016; 32, 73–81.
113. Koliada A., Syzenko G., Moseiko V i in. *Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population*. BMC Microbiology 2017, 17, 120.
114. Mariat D., Firmesse O., Levenez F. i in. *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. BMC Microbiology 2009, 9, 123.
115. Hooper L., Gordon J. *Commensal host-bacterial relationships in the gut*. Science 2001; 292, 1115-1118.
116. Cani P., Possemiers S., Van de Wiele T. i in. *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut 2009; 58, 1091-1103.
117. Ewaschuk J., Dieleman L. *Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol 2006, 7: 5941-5950.
118. Macho Fernandez E., Valenti V., Rockel C., i in. *Anti-inflammatory capacity of selected Lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide*. Gut. 2011,60, 8, 1050-1059.

119. Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K. *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial.* Eur. J. Clin. Nutr., 2010; 64, 636-643.
120. Sharafedinov K., Plotnikova O., Alexeeva R. i in. *Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients — a randomized double-blind placebo-controlled pilot study.* Nutr. J. 2013; 12, 138.
121. Kadooka Y., Sato M., Ogawa A. i in. *Effect of Lactobacillus gasseri SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial.* Br. J. Nutr., 2013; 110, 1696-1703.
122. Sanchez M., Darimont C., Drapeau V. i in. *Effect of Lactobacillus rhamnosus CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women.* Br. J. Nutr., 2014; 111, 1507-1519.
123. Eslamparast T., Zamani F., Hekmatdoost A. i in. *Effects of synbiotic supplementation on insulin resistance in subjects with the metabolic syndrome: a randomised, double-blind, placebo controlled pilot study.* Br. J. Nutr., 2014; 112, 438-445.
124. Delmulle L. *Lactobacilli, Bifidobacteria and fibres. Compilation of available literature on Lactobacillus and Oligosaccharides.* Beneflora. 2002.
125. Berg R. *The indigenous gastrointestinal microflora.* Trends Microbiol. 1996; 4, 430-435.
126. Weichselbaum E. *Probiotics and health: a review of the evidence.* Nutr. Bull. 2009, 34, 4, 340–344.

## Spis tabel, schematów i wykresów

### Tabele

Tabela 1. Klasyfikacja BMI według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).....	9
Tabela 2. Skład i funkcje drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym.....	13
Tabela 3. Charakterystyka podstawowa grupy badanej (Probiotyk) i grupy porównawczej (Placebo) pod względem wieku, płci, wzrostu oraz BMI.....	30
Tabela 4. Skład stosowanego preparatu probiotycznego.....	31
Tabela 5-13. Analiza częstości spożycia na podstawie kwestionariusza FFQ-6.....	87-101
Tabela 14. Porównanie badanych grup pod względem BMI.....	38
Tabela 15. Porównanie badanych grup pod względem beztłuszczowej masy ciała, wody, tkanki tłuszczowej i podstawowej przemiany materii.....	40
Tabela 16. Zmiany stężenia zonuliny i laktoferyny w badanych grupach.....	43
Tabela 17. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii pełniących funkcję ochronną (przed i po obserwacji).....	44
Tabela 18. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii pełniących funkcje immunostymulujące.....	45
Tabela 19. Porównanie badanych grup pod względem liczebności bakterii proteolitycznych.....	46
Tabela 20. Porównanie badanych grup pod względem stosunku liczbowego bakterii <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> (przed i po obserwacji).....	48
Tabela 21. Analiza mykologiczna próbek kału w badaniach 1 i 2 (przed i po obserwacji).....	48
Tabela 22. Korelacja stężenia zonuliny z bakteriami pełniącymi funkcję ochronną w badanych grupach.....	49
Tabela 23. Korelacja stężenia zonuliny z liczbą bakterii pełniących funkcje immunostymulujące w badanych grupach.....	52
Tabela 24. Korelacja stężenia zonuliny z liczbą bakterii w grupie proteolitycznych w badanych grupach.....	54
Tabela 25. Korelacja stężenia zonuliny z liczbą bakterii typu <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> w badanych grupach.....	55
Tabela 26. Zmiany stężenia zonuliny w zależności od utraty masy ciała.....	56
Tabela 27. Korelacja laktoferyny z grupą bakterii pełniących funkcje ochronne w badanych grupach.....	57
Tabela 28. Korelacja stężenia laktoferyny z liczbą bakterii pełniących funkcje immunostymulujące w badanych grupach.....	59

Tabela 29. Korelacja stężenia laktoferyny z liczbą bakterii w grupie proteolitycznych w badanych grupach.....	60
Tabela 30. Związek pomiędzy wiekiem badanych osób a grupą bakterii pełniących funkcje ochronne w badanych grupach.....	62
Tabela 31. Korelacja wieku z grupą bakterii immunostymulujących w badanych grupach.....	63
Tabela 32. Korelacja wieku z grupą bakterii proteolitycznych w badanych grupach.....	64
Tabela 33. Korelacja wieku z bakteriami typu <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> w badanych grupach.....	65
Tabela 34. Korelacja BMI z bakteriami pełniącymi funkcję ochronną w badanych grupach.....	65
Tabela 35. Korelacja BMI z bakteriami pełniącymi funkcje immunostymulujące w badanych grupach.....	66
Tabela 36. Korelacja BMI z bakteriami proteolitycznymi w badanych grupach.....	67
Tabela 37. Korelacja BMI z bakteriami typu <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> w badanych grupach.....	68

#### Schemat

Schemat 1. Ramowy plan przebiegu badania.....	27
---	----

#### Wykresy

Wykres 1. Porównanie zmian masy ciała w grupie Probiotyk i Placebo.....	39
Wykres 2. Porównanie zmian zawartości tkanki tłuszczowej w grupie Probiotyk i Placebo.....	41
Wykres 3. Zmiany stężenia zonuliny w grupach badanych.....	42
Wykres 4. Zmiany stężenia laktoferyny w grupach badanych.....	42
Wykres 5. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą <i>Bifidobacterium spp.</i> w grupie Probiotyk (1 próbka).....	50
Wykres 6. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą <i>Bacteroides spp.</i> w grupie Placebo (2 próbka).....	51
Wykres 7. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii pełniących funkcje ochronne w grupie Placebo (2 próbka).....	51
Wykres 8. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii <i>Enterococcus spp.</i> w grupie Probiotyk (1 próbka).....	52
Wykres 9. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii <i>Escherichia coli</i> w grupie Probiotyk (próbka 2).....	53
Wykres 10. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii <i>Enterococcus spp.</i> w grupie Probiotyk (próbka 2).....	53
Wykres 11. Wykres korelacji stężenia zonuliny z liczbą bakterii pełniącymi funkcję immunostymulującą w grupie Probiotyk (próbka 2).....	54
Wykres 12. Zmiany stężenia zonuliny w grupie Placebo (przed obserwacją).....	56

Wykres 13. Zmiany stężenia zonuliny w grupie Probiotyk (po obserwacji).....	57
Wykres 14. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii <i>Lactobacillus spp.</i> w grupie Placebo (2 próbka).....	59
Wykres 15. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii <i>Clostridium spp.</i> w grupie Placebo (1 próbka).....	61
Wykres 16. Wykres korelacji stężenia laktoferyny z liczbą bakterii w grupie bakterii proteolitycznych w grupie Placebo (1 próbka).....	61