

Rola mikroflory jelitowej w nieswoistych zapaleniach jelit

The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease

Piotr Radwan, Karolina Radwan-Kwiatek, Barbara Skrzydło-Radomańska

Katedra i Klinika Gastroenterologii z Pracownią Endoskopową Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Przegląd Gastroenterologiczny 2009; 4 (1): 1–6

Słowa kluczowe: nieswoiste zapalenia jelit, mikroflora jelit, patogeniza nieswoistych zapaleń jelit.

Key words: inflammatory bowel disease, enteric microflora, pathogenesis of inflammatory bowel disease.

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Piotr Radwan, prof. UM, Katedra i Klinika Gastroenterologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin, tel. 603 79 49 44, faks +48 81 724 45 35, e-mail: piotr_radwan@wp.pl

Streszczenie

Mikroflora jelitowa odgrywa ważną rolę w powstawaniu i przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (WZJG) i choroby Leśniowskiego-Crohna (ChLC), określanych mianem nieswoistych zapaleń jelit (NZJ). Nie ma obecnie dowodu na istnienie specyficznego patogenu wywołującego te schorzenia, chociaż w wielu doniesieniach sugeruje się udział *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* w etiopatogenezie ChLC. Saprofityczna flora jelitowa mająca istotne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu gospodarza pozostaje w stanie homeostazy z jelitowym systemem immunologicznym. Zaburzenia ochronnych mechanizmów odpornościowych i regulacyjnych mogą powodować wzbudzenie nieprawidłowych reakcji immunologicznych i rozwój reakcji zapalnych prowadzących do uszkodzenia tkanki jelitowej. W przebiegu NZJ stwierdza się znaczne odmienności w składzie i funkcji bakterii jelitowych w porównaniu z osobami zdrowymi. Modyfikacje terapeutyczne dotyczące mikroflory bakteryjnej mogą stanowić istotny postęp w zakresie leczenia aktywnych postaci i podtrzymywania remisji NZJ.

Wprowadzenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) obejmujące wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) i chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChLC) są schorzeniami o niezna-nej etiologii i wybitnie przewlekłym, nawrotowym przebiegu. Wśród czynników odgrywających rolę w ich powstawaniu pod uwagę bierze się uwarunkowania genetyczne oraz wpływ czynników środowiskowych. Za bezpośrednie uszkodzenia tkanki jelita, zmiany morfologiczne i w konsekwencji objawy kliniczne odpowiedzialne są zaburzone mechanizmy immunologiczne i związane z nimi liczne mediatory reakcji zapalnych [1].

Abstract

Enteric microflora play an important role in the development and course of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), the two major forms of inflammatory bowel disease (IBD). No infectious agent has been proved as a causative factor of IBD, although in numerous studies *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* has been proposed to be an inciting agent of CD. Indigenous intestinal microorganisms have a significant impact on normal host physiology. In normal conditions commensal bacteria remain in a state of homeostasis with the gastrointestinal immunological system. Disturbances of protective functions or regulatory mechanisms can lead to inappropriate activation of the mucosal immune system and inflammation resulting in tissue injury. The composition and function of enteric microflora in patients with IBD reveal substantial changes as compared to healthy persons. Therapeutic manipulation of intestinal microorganisms offers great potential for the treatment of active disease and maintenance of remission in IBD.

Udział bakteryjnej flory jelitowej w etiopatogenezie NZJ wydaje się obecnie nie budzić wątpliwości. Przema-wia za tym wiele obserwacji, takich jak:

- lokalizacja zmian zapalnych obejmująca najczęściej koń-cowy odcinek jelita cienkiego i okrężnicę, gdzie stwierdza się największą koncentrację bakterii jelitowych [2];
- zmniejszenie nasilenia, a nawet ustępowanie zapale-nia w odcinku jelita chirurgicznie wyłączonego z pa-sażu treści jelitowej oraz nawrót zmian zapalnych po ponownej ekspozycji tego fragmentu jelita na za-wartość jelitową [3];
- zwiększenie liczby oraz odmienności udziału poszczegół-nych rodzajów drobnoustrojów, a także występowanie

szczepów o zwiększonej adhezyjności i wirulencji u chorych na NZJ, szczególnie osób z ChLC w porównaniu z osobami zdrowymi [4];

- skuteczność antybiotykoterapii (metronidazol, ciprofloksacyna, rifaksymina) w niektórych postaciach aktywnego NZJ, zapalenia zbiornika jelitowego (*pouchitis*) po kolektomii czy zmniejszenie nawrotowości ChLC po zabiegach resekcyjnych [5, 6];
- niewystępowanie zapalenia jelit w modelach doświadczalnych NZJ, u zwierząt hodowanych w warunkach sterylnych (*germ-free*) [7];
- nieprawidłowości genetyczne (mutacje) w zakresie genów kodujących białka odpowiedzialne za rozpoznawanie i obróbkę antygenów bakteryjnych, takich jak NOD2, powodującą zwiększoną podatność na rozwój ChLC [8].

Rolę drobnoustrojów w etiopatogenezie NZJ można rozpatrywać w kilku aspektach:

- jako specyficznego, inwazyjnego patogenu (patogenów?) powodującego zmiany zapalne, podobnie jak w innych zakażeniach jelitowych (teoria infekcyjna),
- jako źródła antygenów, które wskutek zaburzeń mechanizmów regulacyjnych układu immunologicznego jelit wzbudzają nieprawidłową, nadmierną reakcję odpornościową z uwolnieniem mediatorów zapalnych prowadzącą do uszkodzenia tkanki.

Nieswoiste zapalenia jelit a specyficzne czynniki infekcyjne

Mimo trwających już od blisko 100 lat poszukiwań nie udało się dotąd znaleźć specyficznego czynnika infekcyjnego odpowiedzialnego za powstawanie NZJ. Wśród wielu patogenów postulowanych w etiologii tych chorób najwięcej uwagi poświęcono w ostatnich latach prątkom z gatunku *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) [9, 10]. Prątek ten powoduje u przeżuwaczy ziarniniakowe zapalenie jelit, który pod względem histologicznym bardzo przypomina ChLC u ludzi [11]. Chociaż nie udowodniono zakażenia człowieka MAP od zwierząt, to jednak w tkance jelita zmienionego zapalnie pobranej od chorych na ChLC stwierdzono występowanie swoistego dla MAP materiału genetycznego dużo częściej niż u ludzi zdrowych, a także chorych na WZJG [12]. W badaniach serologicznych wykazano obecność przeciwciał swoistych dla antygenów MAP u większości osób z ChLC [10]. Udało się także w tej grupie chorych wyhodować żywe prątki z krwi, tkanki jelita, a nawet mleka chorych, karmiących matek [10, 13]. Mimo tych bardzo sugestyjnych obserwacji rola MAP w etiopatogenezie ChLC nie jest nadal udowodniona. Bakterie MAP stwierdza się również, chociaż znacznie rzadziej, u ludzi zdrowych, a próby leczenia tuberkuloostatycznego nie dostarczyły jednoznacznych rezultatów [14]. Dużo

bardziej skuteczne okazały się tutaj antybiotyki makrolidowe (m.in. klarytromycyna), które w połączeniu z rifabutyną i klofazyminą pozwoliły w jednym z badań osiągnąć remisję ChLC u ponad połowy leczonych chorych, nawet z gojeniem zmian śluzówkowych [15]. W przeciwieństwie do tego ostatnio opublikowane wyniki 2-letniego, dobrze zaprojektowanego badania klinicznego z użyciem klarytromycyny, rifabutyny i klofazyminy nie wykazały różnicy w częstości nawrotów ChLC między grupą leczoną i nieleczoną tym zestawem antybiotyków [16]. Rozważając MAP jako potencjalny czynnik etiologiczny w ChLC, należy uwzględnić jego rolę jako wewnątrzkomórkowego patogenu. Eliminacja takiego patogenu u osób z zaburzeniami odporności wrodzonej (*innate immunity*), uwarunkowanymi np. polimorfizmem genu *NOD2*, może być znacznie upośledzona i powodować zwiększoną podatność na rozwój choroby. Dotychczas nie potwierdzono jednak zwiększonej odpowiedzi serologicznej na MAP u pacjentów z niekorzystnymi mutacjami *NOD2* [17]. Rola MAP w rozwoju ChLC pozostaje nadal nieustalona i wymaga dalszych badań.

Wśród innych patogenów branych pod uwagę jako możliwe czynniki etiologiczne NZJ wymieniano m.in. wirusa odry, drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes* czy inwazyjne, przylegające szczepy *Escherichia coli* (*E. coli*) [18]. Stwierdzenie jednak obecności lub zwiększonego miana przeciwciał przeciwko poszczególnym rodzajom wirusów czy bakterii w surowicy chorych na NZJ nie dowodzi ich roli jako czynnika wywołującego chorobę.

Reasumując, na obecnym etapie wiedzy nie ma bezspornych dowodów na udział swoistego czynnika infekcyjnego odpowiedzialnego za rozwój NZJ, chociaż bez wątplenia mikroflora bakteryjna odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i podtrzymywaniu procesu zapalnego jelit.

Fizjologiczna mikroflora jelitowa

Fizjologiczna mikroflora przewodu pokarmowego, obejmująca tysiące różnych szczepów bakteryjnych, licząca ok. 10^{13} – 10^{14} organizmów, o łącznej masie ok. 1,5–2 kg, stanowi źródło niezliczonych antygenów stale stymulujących jelitowy system immunologiczny (*gut associated lymphoid tissue* – GALT) [2, 19]. Zadaniem GALT jest rozpoznawanie i odróżnianie inwazyjnych patogenów od nieszkodliwych, a nawet niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza saprofitów. Prawidłowa mikroflora jelit odgrywa bowiem kluczową rolę w metabolizmie nieprzyswajalnych innym sposobem węglowodanów, takich jak celuloza, hemiceluloza, pektyny czy arabinoza. Głównym produktem przemiany bakteryjnej tych związków są

krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*short-chain fatty acids* – SCFA), będące podstawowym źródłem energii dla nabłonka jelita grubego – kolonocytów. Udział drobnoustrojów jelitowych stanowi ok. 10% w całym bilansie energetycznym człowieka. Trawieniu podlegają w tym miejscu również złuszczone komórki nabłonka, śluz, metabolizowane są składniki żółci, ksenobiotyki, niektóre leki oraz potencjalne kancerogeny [2, 20].

Największe nagromadzenie flory bakteryjnej stwierdza się w końcowym odcinku jelita krętego i okrężnicy, a więc miejscach o szczególnie częstej lokalizacji zmian zapalnych w przebiegu NZJ [21].

Metody biologii molekularnej, takie jak łańcuchowa reakcja polimerazowa (*polymerase chain reaction* – PCR) oraz analiza sekwencji rybosomalnego DNA (16S rDNA), pozwoliły na określenie udziału poszczególnych typów, rodzajów i gatunków bakterii fizjologicznej mikroflory jelitowej w powyższej części przewodu pokarmowego. W warunkach prawidłowych większość stanowią tu Gram-dodatnie bakterie typu *Firmicutes* (64%), głównie z klasy *Clostridium* grupy IV i XIV oraz *Bacteroides* (23%). Większość bakterii Gram-ujemnych należy do typu proteobakterii (*Proteobacteria*) z rodziny *Enterobacteriaceae*, na czele z pałeczką okrężnicy (*E. coli*) [18, 19, 21]. Udział poszczególnych typów i rodzajów bakterii wykazuje istotne różnice w różnych populacjach, regionach geograficznych, zależy także od diety, wieku, stosowania antybiotyków, a nawet może zmieniać się pod wpływem stresu [20, 22].

Mikroflora jelitowa a jelitowy układ immunologiczny

W warunkach prawidłowych mikroflora jelitowa i GALT pozostają w stanie wzajemnej równowagi. Zachowanie tzw. homeostazy jelitowej polega na braku wzbudzania lub hamowania odpowiedzi immunologicznej w stosunku do drobnoustrojów saprofitycznych przy jednoczesnej identyfikacji inwazyjnych patogenów i ich likwidacji poprzez stymulowanie odpowiedniej reakcji odpornościowej. Odpowiedzialnych jest za to wiele mechanizmów, wśród których szczególnie istotne są:

- prawidłowa struktura i funkcja nabłonka jelitowego,
- właściwe rozpoznanie poszczególnych antygenów bakteryjnych,
- mechanizmy regulacyjne odpowiedzi immunologicznej.

Warstwa nabłonka wraz z pokrywającym go śluzem stanowi barierę oddzielającą mikroflorę światła jelitowego od aparatu immunologicznego blaszki właściwej. Do prawidłowego funkcjonowania tej bariery niezbędne jest zachowanie jej nieprzepuszczalności, głównie dzięki tzw. ściśłemu połączeniu międzykomórkowemu (*tight junctions*). Zwiększona przepuszczalność nabłonka stwierdzana u chorych na ChLC może powodować

wnikanie antygenów bakteryjnych do blaszki właściwej, ze wzbudzaniem nieprawidłowej reakcji odpornościowej z udziałem limfocytów T nawet przeciwko saprofitom, a w konsekwencji reakcji zapalnej wskutek uwolnienia mediatorów zapalnych [2, 18]. Wyrazem tego jest obserwowana w tej grupie pacjentów śluzówkowa nadprodukcja immunoglobuliny G (IgG), wskazująca na nadreaktywność GALT w stosunku do mikroflory jelitowej. Mechanizm ten może także być odpowiedzialny za występowanie w surowicy osób z ChLC przeciwciał przeciwko różnym antygenom drobnoustrojów światła jelita, takim jak *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* czy *Saccharomyces cerevisiae* [18, 23]. Co ciekawe, zwiększoną przepuszczalność błony śluzowej jelita stwierdza się także u zdrowych krewnych osób z ChLC, wskazując na możliwe podłoże genetyczne, zwiększające podatność na rozwój choroby. Z drugiej strony bariera śluzówkowa może ulegać uszkodzeniu pod wpływem czynników egzogennych, takich jak palenie tytoniu czy niesteroidowe leki przeciwzapalne [18].

Zwiększona ekspozycja komórek immunologicznie kompetentnych śluzówki na bakterie jelitowe może także wynikać z upośledzonych funkcji obronnych nabłonka wskutek zmniejszonego wydzielania peptydów o charakterze antybakteryjnym, zwanych defensynami, produkowanymi w komórkach Panetha, w szczególności α -defensyny 5, co obserwuje się u osób z ChLC ze zmutowaną postacią genu *NOD2* [24]. Umożliwia to kolonizację i proliferację bakterii inwazyjnych lub infekcji oportunistycznych przez bakterie, które w warunkach prawidłowych nie powodują procesu zapalnego.

Właściwe rozpoznanie drobnoustrojów światła jelitowego i ich zróżnicowanie jest niezbędne do wzbudzenia adekwatnej odpowiedzi immunologicznej w przypadku patogenów lub hamowania niepożądanego, a nawet szkodliwej reaktywności na komensale. Zasadniczą rolę w tym procesie odgrywają tzw. receptory Toll-podobne (*Toll-like receptors* – TLR) identyfikujące elementy struktur bakteryjnych, takie jak lipopolisacharydy, peptydoglikany, flageliny rozpoznawane odpowiednio przez TLR-4, TLR-2 i TLR-5 oraz bakteryjne i wirusowe kwasy nukleinowe, przy udziale TLR-3, TLR-7, TLR-8 i TLR-9 [25]. Receptory Toll-podobne lokalizują się w dużej liczbie na komórkach prezentujących antygen, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne (*dendritic cells* – DC). Najczęstszą drogą pozyskiwania antygenów jelitowych jest ich przekazywanie do DC przez wyspecjalizowane komórki M, umiejscowione w nabłonku pokrywającym kępki Peyera. Komórki dendrytyczne wykazują również unikalną właściwość przenikania swoimi wypustkami cytoplazmatycznymi do światła jelita między komórkami nabłonka i w ten sposób uzyskania bezpośredniego kontaktu z drobnoustrojami. Dzięki

obecności TLR na powierzchni DC zdolne są do precyzyjnego odróżniania patogenów i saprofitów. Kontakt DC z antygenami drobnoustrojów komensalnych stymuluje powstanie tych pierwszych o właściwościach regulatorowych. W konsekwencji dochodzi do pobudzenia i podtrzymania stanu pokarmowej tolerancji i braku efektorowej reakcji odpornościowej. Jest to dominująca aktywność DC w warunkach fizjologicznych, bowiem – jak wiadomo – większość antygenów światła jelitowego stanowią saprofity i antygeny pokarmowe, nieszkodliwe, a nawet niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza. Potencjalnie szkodliwe antygeny patogenne powodują natomiast wiele przemian morfologiczno-strukturalnych w DC, określanych mianem dojrzewania. Podczas kontaktu dojrzałych DC z limfocytami, obok prezentacji antygeny, następuje także interakcja tzw. cząsteczek kostymulatorowych, obecnych na powierzchni dojrzałych DC, z ich receptorami na komórkach T, w wyniku czego dochodzi do aktywacji i generowania efektorowych limfocytów T. Rozwijają się wtedy odpowiedzi immunologiczne typu Th1 lub Th2. O ile taka reakcja pojawi się w stosunku do saprofitów, mamy do czynienia z załamaniem stanu tolerancji immunologicznej, a w konsekwencji procesem zapalnym, jaki obserwuje się w przebiegu NZJ [26].

Obecnie wiadomo, że TLR są również obecne na komórkach nabłonka jelitowego, będących w stałym kontakcie z zawartością jelita, w tym z komensalami, których struktura jest bardzo podobna do patogenów. W celu uniknięcia stałego pobudzania GALT i wywoływania reakcji zapalnej przez florę saprofityczną TLR na powierzchni nabłonka zwróconej do światła jelita (TLR2) po kontakcie z komensalami nie stymuluje ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję białek prozapalnych, natomiast następuje wówczas wzmocnienie bariery śluzówkowej [25]. Stwierdzane także na komórkach nabłonkowych TLR4 są w warunkach prawidłowych nieaktywne. Zapalenie błony śluzowej w przebiegu NZJ, z uwolnieniem interferonu γ (IFN- γ) powoduje aktywację TLR4 i prawdopodobnie innych TLR, co wzbudza i podtrzymuje reakcję immunologiczną [25].

Generalnie w celu zachowania homeostazy jelitowej flora saprofityczna w warunkach zdrowia stymuluje tolerogenną odpowiedź ze strony GALT, objawiającą się zmniejszoną reaktywnością TLR makrofagów i DC blaszki właściwej na ligandy bakteryjne, aktywację limfocytów regulatorowych, a także zwiększoną produkcję wydzielniczej immunoglobuliny A (IgA) w porównaniu z IgG. Komórki dendrytyczne produkują więcej przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10) w stosunku do prozapalnej IL-12 i IL-23 [1, 2].

Mikroflora jelitowa w nieswoistych zapaleniach jelit

W przebiegu NZJ stwierdza się bardzo znaczne różnice ilościowe i jakościowe w składzie mikroflory jelitowej. Zwiększoną koncentrację bakterii, tworzącą grubą warstwę przylegającą do nabłonka, obserwuje się zarówno w ChLC, jak i – chociaż w nieco mniejszym stopniu – WZJG [27]. Dotyczy to bakterii i innych drobnoustrojów, takich jak drożdży *Candida albicans*, stymulujących produkcję przeciwciał przeciwko *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), co dowodzi, że również grzyby mogą być źródłem antygenów odpowiedzialnych za nieprawidłowe reakcje immunologiczne w NZJ [28]. Większość badań wskazuje na znaczne odmienności flory bakteryjnej jelit chorych na NZJ w porównaniu z osobami zdrowymi [2, 19, 21]. Znacznie zwiększona jest liczba bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*, w tym *E. coli*, natomiast obniżony udział *Clostridium* grupy IV i XIV. Ma to bardzo istotne znaczenie, bowiem to właśnie bakterie *Clostridium* dostarczają SCFA, będących głównym źródłem energii dla kolonocytów. Zmniejszone stężenie SCFA w kale chorych na NZJ, szczególnie WZJG, wraz z upośledzoną utylizacją SCFA wskutek wzmożonej produkcji siarkowodoru, przez zwiększoną liczbę szczepów redukujących siarczany ma prawdopodobnie kluczowe znaczenie w rozwoju choroby [2, 21].

Odmienności flory jelitowej w NZJ obejmują także powstawanie inwazyjnych, mocno przylegających szczepów *E. coli* (*adherent/invasive E. coli* – AIEC), stwierdzanych w końcowym odcinku jelita krętego (*ileum terminale*) u osób z ChLC z tą lokalizacją choroby. Inwazyjne szczepy *E. coli* pozostają i namnażają się w nabłonku i makrofagach, powodując zwiększone wydzielanie prozapalnego czynnika martwicy nowotworów α (*tumour necrosis factor α* – TNF- α) [29]. *Escherichia coli* stwierdza się także w ChLC w obrębie ziarninaków, w okolicy owrzodzeń i przetok jelitowych, co może być jednak wynikiem wtórnej infekcji [2, 21]. W niektórych doniesieniach obserwowano podobieństwa w składzie mikroflory w WZJG i ChLC, inne natomiast wykazują różnice w zależności od rodzaju NZJ [30]. Podobnie istnieją rozbieżności co do odmienności rodzajów drobnoustrojów jelitowych w aktywnych i nieaktywnych postaciach obu tych chorób [27, 30].

Mikroflora jelitowa w powikłaniach nieswoistych zapaleń jelit

Mikroflora jelitowa ma bardzo istotne znaczenie również w powstawaniu powikłań jelitowych i pozajelitowych NZJ. W ropniach i przetokach w ChLC stwierdza się bardzo liczne drobnoustroje powodujące wtórne infekcje, często w wyniku translokacji, czyli przemieszczenia tych mikroorganizmów ze światła jelita, gdzie stanowią florę komensalną, do miejsc, w których odgry-

wają rolę patogenów. Najczęściej dotyczy to szczepów *E. coli*, ale także innych z rodzaju *Bacteroides* czy *Enterococcus*. Ryzyko infekcji oportunistycznych jest szczególnie zwiększone u chorych na NZJ ze względu na stosowane powszechnie leki immunosupresyjne, glikokortykosteroidy oraz terapie biologiczne.

Zaostrzenia NZJ są wielokrotnie wywoływane przez nakładające się zakażenia jelit, podobnie jak to się dzieje w przypadku *Clostridium difficile* czy cytomegalowirusa [2, 31].

Reasumując, udział mikroflory jelitowej w powstawaniu, rozwoju i podtrzymywaniu procesu zapalnego w przebiegu NZJ nie budzi obecnie wątpliwości. Nadal nie do końca i nie w każdym przypadku można określić, czy odmienności w składzie i funkcji drobnoustrojów stwierdzone w tej grupie chorych są pierwotnymi czynnikami odpowiedzialnymi za powstawanie NZJ, czy też stanowią wtórne następstwa reakcji zapalnych. Niemniej jednak modyfikacje dokonywane np. przy zastosowaniu probiotyków, prebiotyków czy niektórych antybiotyków, a w przyszłości być może wytworzonych w pracowniach biologii molekularnej peptydów przeciwbakteryjnych czy cząsteczek immunostymulujących stanowią obiecującą perspektywę terapeutyczną. Może to pozwolić nie tylko na skuteczniejsze opanowanie zaostrzeń choroby, ale także na osiągnięcie trwałych remisji [2, 5].

Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego No. N402 035 31/1140.

Piśmiennictwo

1. Strobel W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-21.
2. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-94.
3. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M i wsp. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114: 262-7.
4. Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S i wsp. Differences between tissue-associated intestinal microflora in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4136-41.
5. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-33.
6. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K i wsp. Controlled trial of metronidazole treatment for the prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995; 108: 1617-21.
7. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M i wsp. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5224-31.
8. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N i wsp. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
9. Sartor R. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 2005; 54: 896-8.
10. Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's Disease. On the etiology of Crohn's Disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA27-33.
11. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 489-512.
12. Autschbach F, Eisold S, Hinz U i wsp. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 944-9.
13. Naser SA, Schwartz D, Shafran I. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1094-5.
14. Borgaonkar MR, MacIntosh DG, Fardy JM. A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 725-9.
15. Borody TJ, Bilkey S, Wettstein AR i wsp. Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 438-44.
16. Selby W, Pavli P, Crotty B i wsp. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 2313-9.
17. Bernstein CN, Wang MH, Sargent M i wsp. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 968-71.
18. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 256-62.
19. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN i wsp. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.
20. Sobieszkańska BM. The influence of intestinal dysbiosis on human health. *Gastroenterol Pol* 2008; 15: 287-90.
21. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA i wsp. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13780-5.
22. Lay C, Rigottier-Gois L, Holmström K i wsp. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 4153-5.
23. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO i wsp. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1296-306.
24. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E i wsp. Reduced Paneth cell defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18129-34.
25. Vilay-Kumar M, Gewirtz AT. Guardians of the gut: newly appreciated role of epithelial Toll-like receptors in protecting the intestine. *Gastroenterology* 2008; 135: 351-4.
26. Radwan P, Radwan-Kwiatkiewicz K, Tabarkiewicz J i wsp. Rola komórek dendrytycznych w nieswoistych zapaleniach jelit. *Gastroenterol Pol* 2007; 14: 123-6.
27. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A i wsp. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 44-54.
28. Standaert-Vitse A, Jouault T, Vandewalle P i wsp. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae*

- antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 1764-75.
29. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N i wsp. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immunol* 2001; 69: 5529-37.
30. Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL i wsp. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1141-9.
31. Rodemann JF, Dubberke ER, Reske KA i wsp. Incidence of *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 339-44.