

**Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Anna Bartnicka

**Wpływ wybranych czynników na mikrobiotę jelit  
noworodków.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Dr hab. med. Jan Mazela, prof. UM

Praca wykonana w Klinice Zakażeń Noworodka, GPSK UM Poznań

Poznań, 2018

Składam najserdeczniejsze podziękowania:

Panu Prof. UM dr hab. med. Janowi Mazela,  
niezwykłemu człowiekowi i lekarzowi, wspaniałemu promotorowi,  
za nieocenioną pomoc i wsparcie na każdym etapie tworzenia tej pracy.

Pani dr n. med. Mirosławie Gałęckiej,  
wspaniałej szefowej,  
za sfinansowanie badań do niniejszej pracy oraz  
wrozumiałość podczas moich nieobecności w pracy.

Mojemu najukochańszemu mężowi Tomaszowi,  
za mobilizację w trudnych chwilach,  
ogromne wsparcie i cierpliwość oraz  
za bycie lepszą 'matką' przez ten cały czas niż ja.

Moim ukochanym Rodzicom,  
za to, że zawsze we mnie wierzyli.

Mojemu synowi Kubusiowi,  
za to, że nadaje temu wszystkiemu sens...

## Spis treści

1. Wstęp .....	7
1.1. Nomenklatura i techniki analizy mikrobioty .....	8
1.2. Mikrobiota jelitowa – skład i rozmieszczenie .....	16
1.3. Funkcje mikrobioty jelitowej .....	20
1.4. Układ immunologiczny jelita .....	23
1.4.1. Budowa bariery przewodu pokarmowego .....	23
1.4.2. Budowa i działanie GALT .....	24
1.4.3. Mechanizm stymulowania odpowiedzi immunologicznej przez mikrobiotę .....	26
1.5. Kształtowanie się mikrobioty i rozwój tolerancji immunologicznej .....	29
1.5.1. Czynniki prenatalne .....	30
1.5.1.1. Masa ciała ciężarnej .....	34
1.5.1.2. Stres .....	37
1.5.1.3. Status zdrowotny ciężarnej .....	38
1.5.1.4. Antybiotyki w trakcie ciąży .....	38
1.5.2. Czynniki perinatalne .....	40
1.5.2.1. Sposób porodu .....	40
1.5.2.2. Wiek ciążowy .....	43
1.5.3. Czynniki postnatalne .....	45
1.5.3.1. Forma karmienia .....	45
1.5.3.2. Ekspozycja na antybiotyki .....	48
1.5.3.3. Środowisko i styl życia .....	50
1.6. Zaburzenia mikrobioty a NEC .....	52

1.7. Probiotyki .....	55
1.8. Prebiotyki .....	61
2. Cel .....	64
3. Materiały i metody .....	65
4. Wyniki .....	74
4.1. Charakterystyka populacji .....	74
4.2. Analiza grup badanych .....	76
4.3. Analiza profilu mikrobioty .....	80
4.3.1. Analiza profilu mikrobioty w smółce .....	80
4.3.2. Analiza profilu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala ...	86
4.4. Analiza modyfikacji mikrobioty w zależności od czasu .....	94
4.4.1. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych siłami natury .....	95
4.4.2. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych poprzez CC .....	97
4.4.3. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych siłami natury .....	100
4.4.4. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych poprzez CC .....	104
4.5. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie między badanymi grupami .....	107
4.5.1. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych z podziałem na rodzaj porodu .....	107
4.5.2. Analiza porównawcza różnicy w liczbie mikroorganizmów w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na rodzaj porodu ...	109

4.6. Analiza porównawcza dla noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu oraz w domu .....	117
4.6.1. Charakterystyka populacji .....	117
4.7. Analiza profilu mikrobioty .....	120
4.7.1. Porównanie profilu mikrobioty w smółce w zależności od miejsca urodzenia .....	120
4.8. Porównanie profilu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po porodzie w zależności od miejsca urodzenia .....	122
4.9. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu oraz noworodków urodzonych w domu ...	126
5. Dyskusja .....	130
6. Wnioski .....	147
7. Streszczenie w j. polskim .....	148
8. Abstract .....	151
9. Literatura .....	153
10. Załączniki .....	177
10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	177
10.1.1. Aneks nr 1 .....	178
10.1.2. Aneks nr 2 .....	179
10.1.3. Aneks nr 3 .....	180
10.2. Wykaz stosowanych ankiet .....	181
10.2.1. Protokół informacji medycznej .....	181
10.2.2. Ankieta dla matki .....	184
10.2.3. Ankieta po 6 tygodniach .....	186

## Wykaz stosowanych skrótów

**ATCC** – amerykańska kolekcja kultur (ang. American Type Culture Collection)

**CC** – cięcie cesarskie

**cfu** – jednostka tworząca kolonię (ang. colony forming unit)

**DSM** – niemiecka kolekcja mikroorganizmów i hodowli komórkowych (niem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

**ESPGHAN** – Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii Dziecięcej, Hepatologii i Żywienia (ang. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)

**FAO** – Organizacja Narodów Zjednoczonych Do Spraw Żywności i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations)

**FISH** – hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (ang. fluorescent *in situ* hybridization)

**GALT** – tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi jelita (ang. gut-associated lymphoid tissue)

**GBS** – paciorkowce grupy B (ang. Group B *Streptococcus*)

**GF** – zwierzęta gnotobiotyczne (ang. germ-free)

**GPSK** – Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny

**HGP** – projekt poznania ludzkiego genomu (ang. Human Genome Project)

**HMO** – oligosacharydy mleka ludzkiego (ang. human milk oligosacharydes)

**HMP** – projekt poznania ludzkiego mikrobiomu (ang. Human Microbiome Project)

**IFN- $\gamma$**  – interferon gamma

**I $\kappa$ B** – białko hamujące  $\kappa$ B

**IL** – interleukina

**IPP** – inhibitory pompy protonowej (grupa leków)

**IRAK-1** – kinaza 1 związana z receptorem interleukiny 1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase 1)

**ISAPP** – Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe ds. Probiotyków i Prebiotyków (ang. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics)

**LPS** – lipopolisacharyd

**MALT** – tkanka limfatyczna związaną z błonami śluzowymi (ang. mucosa-associated lymphoid tissue)

**NEC** – martwicze zapalenie jelit noworodków (ang. necrotizing enterocolitis)

**NF-κB** – transkrypcyjny czynnik jądrowy κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

**NGS** – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. next generation sequencing)

**NICU** – oddział intensywnej terapii noworodka (ang. neonatal intensive care unit)

**OTU** – operacyjna jednostka taksonomiczna (ang. operational taxonomic unit)

**PAMP** – wzorce patogenności mikroorganizmów (ang. pathogen associated molecular pattern)

**PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

**Pfu** – polimeraza DNA wyizolowana z bakterii *Pyrococcus furiosus*

**PRR** – receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors)

**PSN** – poród siłami natury

**RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów

**SCFA** – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short-chain fatty acids)

**SIBO** – rozrost bakteryjny jelita cienkiego (ang. small intestinal bacterial overgrowth)

**sIgA** – wydzielnicza immunoglobulina A, (ang. secretory IgA)

**Taq** – polimeraza DNA wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus*

**TBC** – całkowita liczba bakterii (ang. total bacterial count)

**Tc** – limfocyty T cytotoksyczny

**TGF- $\beta$**  – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (ang. transforming growth factor  $\beta$ )

**Th** – limfocyt T pomocniczy

**TLR** – receptor Toll-podobny (ang. Toll-like receptor)

**TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor)

**Treg** – limfocyt T regulatorowy

**UPEC** – uropatogenne *E. coli* (ang. uropathogenic *E. coli*)

**WAO** – Światowa Organizacja ds. Alergii (ang. World Allergy Organization)

**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)



## 1. Wstęp

Człowiek w odniesieniu do aktualnych badań jest sumą własnych komórek i genów, jak również komórek kolonizujących go mikroorganizmów. Drobnoustroje, to dodatkowy materiał genetyczny naszego ustroju tzw. mikrobiom, który istotnie wpływa na fizjologię, w tym także na ekspresję białek gospodarza. Mikrobiom zawiera geny, nie stwierdzone w komórkach ssaków, pomimo to niezbędne do zachowania zdrowia. Ponadto, metabolizm człowieka to wypadkowa metabolizmu ludzkiego oraz procesów metabolicznych zasiedlających go drobnoustrojów (1,2). Mikrobiota człowieka pełni zatem znamienne rolę w utrzymywaniu homeostazy całego organizmu. Co więcej wywiera szereg właściwości, wymaganych do sprawnego i poprawnie działającego organizmu, których człowiek sam w sobie nie posiada, w tym np. produkcja witamin (K, B9, B12) czy pozyskiwanie energii ze składników pożywienia niepodlegających trawieniu przez nasze enzymy. Rozwój najnowocześniejszych metod genetycznych zrewolucjonizował wiedzę o mikrobach, ujawniając ich bogactwo i zdumiewającą różnorodność. Aktualnie wiadomym jest, że mikroorganizmy zajmują praktycznie każdą część naszego ciała w tym skórę, jamę ustną, nos, pochwę, przewód pokarmowy, a nawet takie miejsca jak płuca, pęcherz moczowy, łożysko, płyn owodniowy które pierwotnie uznawane były za jałowe (3). Co więcej każda część ciała ma swój unikalny zestaw mikroorganizmów, które zajmują najlepszą dla siebie niszę. Człowiek skolonizowany jest głównie przez bakterie, aczkolwiek zasiedlają nas także archeony, wirusy oraz eukarionty, w tym pierwotniaki i grzyby. Ciało ludzkie zamieszkują zatem przedstawiciele wszystkich trzech domen życia występujących na Ziemi. Zespół mikroorganizmów człowieka jest bardzo zróżnicowany. Szacuje się, że cała mikrobiota zasiedlając ciało człowieka składa się z ok. 40000 gatunków bakterii, należących do blisko 1800 rodzajów, co przekłada się na ok. 10 milionów genów nie pochodzących bezpośrednio od człowieka (4). W naszym organizmie zachodzi swoisty mechanizm, polegający na nieustannym komunikowaniu się między sobą komórek bakterii oraz komórek gospodarza (ang. cross-talk process). To skomplikowana sieć zależności cytokinowych, endokrynych, neurohormonalnych i właśnie ten mechanizm warunkuje równowagę organizmu i określa jego zdrowie lub chorobę. Dysbioza jelitowa, czyli zaburzenia w ilości i składzie poszczególnych bakterii, może być podłożem szeregu jednostek chorobowych, w tym chorób cywilizacyjnych. Liczne badania wykazały, iż zmieniony profil mikrobioty jelitowej może być związany z rozwojem m.in. celiakii (5), martwiczego zapalenia jelit noworodków

(ang. necrotizing enterocolitis, NEC) (6), otyłości, nieswoistych chorób zapalnych jelit, w tym choroby Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (7), zespołu jelita nadwrażliwego (8), kolki niemowlęcej (9), alergii, atopowego zapalenia skóry (10,11), chorób neurorozwojowych jak autyzm (12) czy psychiatrycznych jak depresja (13). Ponadto zaburzenia mikrobioty jelitowej mogą być związane z chorobą Parkinsona (14), chorobami metabolicznymi jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2 (15), otyłość (16), czy chorobami autoimmunizacyjnymi (cukrzyca typu 1, reumatoidalne zapalenie stawów - RZS) (17,18,19), nowotworowymi (20) i innymi chorobami cywilizacyjnymi (21).

### **1.1. Nomenklatura i techniki analizy mikrobioty**

Na przestrzeni lat zmieniały się metody i możliwości identyfikacji mikroorganizmów, a tym samym możliwość zbadania ich funkcji oraz oddziaływania na organizm ludzki. Początkowo, kiedy choroby infekcyjne były olbrzymim wyzwaniem dla medycyny, i często kończyły się zgonem, w analizach, co wydaje się być logiczne, skupiano się przede wszystkim na ich aspekcie chorobotwórczym. Dopiero z czasem, wraz z rozwojem zaawansowanych metod genetycznych zaczęto dostrzegać i skupiać się na korzystnych funkcjach mikroorganizmów, których ogromna ilość jest zaskakująca. Obecnie zainteresowania badaczy skupiają się na wpływie mikrobioty na choroby nieinfekcyjne, w tym cywilizacyjne oraz na strategiach opartych na przywracaniu prawidłowej mikrobioty w celu złagodzenia tych zaburzeń.

Ewoluowała także nomenklatura opisująca zespół rodzimych mikroorganizmów człowieka. Rozpatrując etymologię słowa 'mikroflora', termin ten odnosi się do świata roślin, którymi drobnoustroje nie są. Zatem dla określenia społeczności bakterii, grzybów, pierwotniaków oraz wirusów, które zasiedlają nasz organizm, należy posługiwać się szerszym pojęciem 'mikrobiota', opisującym wszystkie mikroorganizmy w danym środowisku. W tym komensalne, symbiotyczne jak i patogenne, które determinują zdrowie lub chorobę. Najbardziej kompleksową koncepcję charakteryzacji drobnoustrojów kolonizujących ciało człowieka przedstawił laureat Nagrody Nobla, Joshua Lederberg. Zaproponował on w 2001 r. termin 'mikrobiom', dla opisania ekosystemu mikroorganizmów wraz z ich materiałem genetycznym, czyli całym zespołem genów bakteryjnych (22). Określenia 'mikrobiota' oraz 'mikrobiom' aktualnie często używane są

wymiennie, choć z definicji nie są to pojęcia tożsame. Genom człowieka wraz z jego mikrobiomem tworzy zbiorczo 'metagenom'.

Do niedawna możliwości oceny kolonizacji jelit były ograniczone, ponieważ konwencjonalne metody mikrobiologii umożliwiają identyfikację tylko określonej liczby drobnoustrojów, przede wszystkim zdolnych do hodowli w warunkach laboratoryjnych. Szacuje się, że bakterie bytujące w przewodzie pokarmowym zdolne do wyhodowania *in vitro* to ok. 10% całej populacji, a liczba wszystkich mikrobów zdolna do wzrostu na pożywkach mikrobiologicznych to zaledwie 1%. Tradycyjny posiew mikrobiologiczny (metody konwencjonalne) oparty jest na izolacji konkretnego drobnoustroju z próbki (krew, kał, mocz, płwocina, inne) oraz jego pełnej identyfikacji na podstawie cech fenotypowych, mikroskopowych i biochemicznych. Nie mniej jednak, metoda ta jest pracochłonna i obarczona wieloma ograniczeniami. Z uwagi na fakt, iż bakterie bytujące w jelicie to w większości ściśle beztlenowce, przy każdym kontakcie próbki kału z powietrzem, część z nich niestety ginie. W tym przypadku, problemem diagnostycznym jest niemożność zapewnienia optymalnych warunków w trakcie pobierania, transportu i dalszej analizy materiału. Zaburza to znacząco ocenę ilościową badanych mikroorganizmów, często ze znacznym niedoszacowaniem ich liczby. Ponadto, nieodpowiednio dobrane podłoże mikrobiologiczne, temperatura lub czas hodowli może skutkować niewyhodowaniem części drobnoustrojów, w tym trudno hodowlanych (np. o wysokich wymaganiach odżywczych lub wrażliwych na zmienne warunki środowiska). Przy ocenie wyników klasycznej mikrobiologii, należy wziąć pod uwagę czas od momentu pobrania próbki do wykonania oznaczenia, oraz warunki przechowywania materiału. Aby jak najbardziej odzwierciedlić profil drobnoustrojów bytujących w jelicie, próbka kału powinna zostać przebadana jak najszybciej po wypróżnieniu. Im dłuższy czas upłynie od momentu pobrania próbki do wykonania badania, tym wzrost bakterii beztlenowych w warunkach *in vitro* będzie niewspółmierny do warunków panujących *in vivo*. Dodatkowo uważa się, iż posiew mikrobiologiczny kału, odzwierciedla głównie profil mikrobioty okrężnicy zstępującej oraz odbytu. Nie stanowi jednak pełnego odzwierciedlenia mikrobioty wyższych odcinków przewodu pokarmowego. Jest jednak materiałem nieinwazyjnym i często używany jest w badaniach określających mikrobiom jelitowy. Konwencjonalna mikrobiologia zatem, lepiej sprawdza się w przypadku poszukiwania i identyfikacji patogenów w próbkach klinicznych, jak również do oceny lekowrażliwości i mechanizmów oporności drobnoustrojów, gdyż tradycyjne techniki

mikrobiologiczne opierają się na analizie mikroorganizmów, które znamy i potrafimy wyhodować. Z kolei, w celu identyfikacji nowych drobnoustrojów, oznaczeniach bioróżnorodności danej niszy ekologicznej, jak i w badaniach populacyjnych mikrobiomu, zasadniczą rolę spełnia biologia molekularna (metody niekonwencjonalne).

Rozwój technik genetycznych i ich szersze zastosowanie w mikrobiologii dostarczyło nowych i ważnych informacji na temat składu, bioróżnorodności, a co najważniejsze dokładnych funkcji mikrobioty jelitowej. Przełomem w rozwoju nowoczesnych, molekularnych technik detekcji mikroorganizmów było wprowadzenie identyfikacji mikrobów w oparciu o rRNA, czyli rybosomalną cząsteczkę kwasu rybonukleinowego. DNA bakterii, które koduje rRNA, składa się z trzech genów kodujących następujące cząsteczki rRNA: 16S (mała podjednostka rybosomu), 23S i 5S rRNA (duża podjednostka rybosomu). Metody genetyczne diagnostyki bakterii, bazują na analizie genu kodującego cząsteczkę 16S rRNA, który obecny jest u wszystkich organizmów prokariotycznych, czyli bakterii i archeonów. Nieobecny jest on z kolei, u eukariontów oraz wirusów. Z uwagi na fakt, iż sekwencja nukleotydowa 16S rRNA jest dobrze zakonserwowana, zmienność genów ją kodujących jest mała, analiza tych sekwencji umożliwia identyfikację składu gatunkowego bakterii w określonym środowisku. Jednocześnie 16S rRNA, zawiera wystarczająco dużo (hiper)zmiennych regionów, które mogą służyć identyfikacji i różnicowaniu między sobą poszczególnych gatunków. Poziom zróżnicowania sekwencji rośnie wraz ze zwiększeniem dystansu filogenetycznego pomiędzy drobnoustrojami, w związku z czym analiza 16S rRNA umożliwia dokładne określenie przynależności danego drobnoustroju do gatunku, rodzaju, a nawet szczepu.

Kamieniem milowym w procesie rozwoju i popularyzacji metod molekularnych było pojawienie się w 1983 r. metody PCR, czyli reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction). Za jej opracowanie, Kary Mullis otrzymał nagrodę Nobla (1993 r.). Metoda PCR polega na powielaniu łańcuchów DNA i oparta jest na wielokrotnym podgrzewaniu i oziębianiu badanej próbki w odstępach czasowych. Jest to metoda enzymatyczna wymagająca zmian temperatury dla poszczególnych etapów reakcji tj. denaturacji, annealingu (przyłączania) i elongacji. W procesie denaturacji, w wysokiej temperaturze (ok. 95°C) następuje rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA. W następnym etapie, w odpowiedniej dla danej sekwencji temperaturze, do matrycy przyłączają się startery (primery), czyli krótkie oligonukleotydy DNA komplementarne

do fragmentów matrycy znajdujących się na obu końcach szukanego genu. W przypadku analizy składu mikrobiologicznego danej próbki primery przyłączają się do zidentyfikowanych uniwersalnych regionów sekwencji 16S rRNA drobnoustrojów. W procesie elongacji, następuje amplifikacja, czyli kopiowanie wybranej sekwencji nukleotydowej. Ten etap procesu zachodzi w temperaturze 72°C, w której to termostabilna polimeraza DNA (Taq, Pfu) przepisuje sekwencję nukleotydową amplifikowanego genu na cząsteczkę. Następnie cykl powtarza się wielokrotnie, co powoduje sukcesywne zwiększenie kopii powielanego fragmentu DNA. Metoda ta jest czuła, wydajna i stosunkowo prosta, co daje jej status jednego z najbardziej użytecznych narzędzi diagnostycznych w biologii molekularnej. Jej zaletą jest otrzymanie wyniku w krótkim czasie, podczas gdy w przypadku mikrobiologii konwencjonalnej, hodowla oraz pełna identyfikacja może zająć nawet kilka dni. Ponadto, otrzymujemy informację na wielu poziomach – rodzaj, gatunek, szczep. Wyróżnia się liczne odmiany i modyfikacje techniki PCR, jak: multiplex PCR, gdzie używając w tej samej reakcji kilku par starterów, namnaża się jednocześnie kilka fragmentów DNA; nested PCR (tzw. gniazdowy PCR) gdzie po pierwotnej reakcji PCR następuje kolejna, z zastosowaniem starterów zlokalizowanych bliżej środka powielanego fragmentu DNA; oraz real-time PCR, która jest techniką ilościową (ang. quantitative, qPCR). W przypadku qPCR następuje amplifikacja DNA wraz z jednoczesnym monitorowaniem przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym. Dzięki użyciu standardów o znanym stężeniu otrzymujemy dokładny pomiar ilości DNA w badanej próbce. Do często używanych technik molekularnych można zaliczyć także metodę FISH, czyli hybrydyzację fluorescencyjną *in situ* (ang. fluorescent *in situ* hybridization), która umożliwia wykrywanie określonych fragmentów DNA za pomocą specyficznych komplementarnych sond oligonukleotydowych, znakowanych fluorescencyjnie. Sondy, te to krótkie jednoniciowe fragmenty DNA, zawierające sekwencje unikalne dla danego organizmu. W celu dalszej analizy badanego materiału konieczne jest użycie mikroskopu fluorescencyjnego. Istotną zaletą tej techniki jest możliwość szybkiej detekcji nawet pojedynczych komórek mikroorganizmów w badanym materiale. W celu identyfikacji drobnoustrojów stosuje się również mikromacierze DNA, których zasada działania oparta jest również na metodzie hybrydyzacji. W mikromacierzach, odwrotnie niż w przypadku powyższej techniki FISH, sondy DNA unieruchomione są na podłożu stałym, ułożonym w macierz, na które nakłada się badaną próbkę, wyznakowaną fluorescencyjnie. Każda sonda (pozycja na mikromacierzy) wiąże

komplementarny fragment, charakterystyczny dla danej cechy mikroorganizmu bądź taksonu. Warto wspomnieć także o klonowaniu DNA, które polega na użyciu wektora czyli nośnika genu, w tym bakteriofagów (wirusów bakteryjnych) bądź plazmidów (kolistych fragmentów DNA występujących u bakterii), które mają zdolność do samoreplikacji. Jest to ich ważna cecha, która umożliwia powielenie badanego genu po ich wprowadzeniu do komórki bakteryjnej, w której namnażamy badany gen. Najczęściej wektory wprowadza się do komórek *Escherichia coli*, które są zdolne do transformacji, czyli takich, u których może dojść do powielenia wektora z wbudowanym DNA.

Istotną cegiełkę w wykorzystaniu 16S rRNA do oceny różnorodności próbki pobranej bezpośrednio ze środowiska, dołożyli Pace i wsp. W roku 1985, przeprowadzili oni analizę, polegającą na ocenie sekwencji cząsteczek 5S i 16S rRNA. Ukazali w ten sposób ogromną bioróżnorodność występujących w niej mikroorganizmów (23,24). Był to swoisty przełom, który umożliwił identyfikację mikroorganizmów środowiskowych, których nie można hodować tradycyjnymi metodami. Niekonwencjonalne metody identyfikacji osiągalne dzięki sekwencjonowaniu cząsteczki 16S rRNA umożliwiają charakterystykę i ocenę ilościową wcześniej niemożliwych do wyhodowania drobnoustrojów, jednakże nie dostarczają informacji o funkcjonowaniu ich jako społeczności oraz konkretnym wpływie poszczególnej bakterii na gospodarza. Pozwalają, jednakże pominąć etap tradycyjnej hodowli badanych mikroorganizmów.

W zależności od specyfiki analizy i postawionego pytania klinicznego, wykorzystuje się wymienione powyżej techniki analityczne bądź inne, które także bazują na oznaczaniu sekwencji 16S rRNA. Wykorzystywane metody często się uzupełniają. W zależności od rodzaju zastosowanej techniki molekularnej uzyskuje się wyniki o różnym stopniu użyteczności. Niektóre metody służą do szybkiej identyfikacji drobnoustrojów najczęściej do celów klinicznych, bądź detekcji genów oporności, a inne, bardziej zaawansowane, wykorzystywane są do szczegółowej analizy powiązań filogenetycznych. Zawsze ważna jest znajomość zalet, ale także ograniczeń każdej metody, tak aby można było wykorzystać najlepsze podejście do konkretnego celu badawczego oraz pytania klinicznego. Pomimo faktu, iż analizy 16S rRNA, uzupełniły lukę w diagnostyce o drobnoustroje niehodowlane i trudnodowlane, to jednak w dalszym ciągu brakowało metod umożliwiających określenie funkcji oraz wpływu konkretnej bakterii na gospodarza. Sposobność ustalenia taksonomii oraz co ważne, potencjału metabolicznego mikroorganizmów bez konieczności

ich izolacji zapewnia 'metagenomika', czyli genomika populacji drobnoustrojów. Za jej pomocą można sekwencjonować cały zbiorczy materiał genetyczny w próbce, pobranej bezpośrednio ze środowiska. Sekwencjonowanie to technika odczytywania kolejności nukleotydów w genomie. Pozwala na określenie różnorodności genetycznej, składu populacyjnego oraz wpływu ekologicznego mikroorganizmów, poszukiwanie mutacji oraz zrozumienie molekularnych mechanizmów ewolucji. Termin 'metagenomika' został zaproponowany przez Handelsmana w 1998 r. (25). Stanowi ona dopełnienie metod opartych o analizę sekwencji 16S rRNA i umożliwia sekwencjonowanie olbrzymich bibliotek genowych. Z uwagi na fakt, iż blisko 80% bakteryjnego genomu to regiony kodujące białka, za pośrednictwem metagenomiki możemy zidentyfikować geny związane z określoną funkcją białek bakteryjnych. W obrębie metagenomiki, jako najbardziej zaawansowane narzędzie genetyczne, należy wymienić techniki określane jako sekwencjonowanie następnej generacji, NGS (ang. Next Generation Sequencing), które zrewolucjonizowały badania molekularne. Metody NGS opierają się na równoległym, masowym sekwencjonowaniu od kilku tysięcy do kilkuset milionów różnych sekwencji, tzw. bibliotek. Obecnie NGS jest szeroko stosowaną metodą, w tym do sekwencjonowania całego bakteryjnego genomu. Sekwencjonowanie metagenomiczne zostało pierwszy raz zastosowane do określenia mikrobioty jelit w 2006 r. i od tego czasu jego użyteczność nieustannie rośnie (26). Sama metagenomika dostarcza bardzo dużo danych, ale nie zapewnia bezpośrednich informacji o tym, które geny są w danych warunkach funkcjonalne (2). Ponieważ fizjologia człowieka nie jest określana tylko przez obecność danych genów, ale głównie przez ich ekspresję i białka produkowane na podstawie informacji zawartej w naszym DNA, to tak samo ważna będzie nie tylko obecność konkretnych bakterii, ale także ich oddziaływanie na gospodarza, jak i pozostałe mikroorganizmy w danym ekosystemie. Zatem, aby w jak najdokładniejszy sposób ukazać wszystkie funkcje jakie wywiera mikrobiota jelitowa na człowieka, najbardziej wartościowym byłoby dopełnienie danych uzyskanych dzięki metagenomice o badania białek (metaproteomika), sieci metabolicznych (metainteraktomika) oraz mRNA (metatranskryptomika) (27).

W celu poznania genomu człowieka, zarówno jego własnego, jak i ściśle związanego z nim mikrobiomu zostały opracowane dwa olbrzymie, ogólnosiwiatowe badania naukowe. Pierwsze z nich *Human Genome Project* (HGP), zaprojektowano w celu zsekwencjonowania i identyfikacji genomu człowieka. Projekt zakończono w 2003 r.

i wykazano, że genom człowieka składa się z ok. 20 000 genów kodujących białka (2). Jednakże zsekwencjonowanie całego genomu ludzkiego nigdy nie byłoby kompletne, bez znajomości genomu bakteryjnego, równie silnie wpływającego na niego samego, jak jego własne geny. W tym celu w 2007 r. opracowano pięcioletnie, wielośrodkowe badanie *Human Microbiome Project* (HMP). Powszechnie mówiono nawet, iż HMP to dopełnienie projektu HGP i stanowi poznanie „drugiego ludzkiego genomu” jakim jest mikrobiom. Projekt HMP miał na celu charakterystykę mikrobiomu człowieka znajdującego się w czterech najważniejszych miejscach bytowania mikroorganizmów tj. przewodzie pokarmowym, jamie ustnej, układzie moczowo-płciowym (pochwie) oraz na skórze człowieka. Ponadto badanie, służyło ocenie funkcji kształtujących metabolizm jak i wpływających na stan zdrowia lub chorobę gospodarza (28). Dodatkowym celem projektu, była ocena mikrobiomu w odniesieniu do populacji, genotypu, wieku, stanu zdrowia, diety, przyjmowanych leków i środowiska oraz wystandaryzowanie metod i źródeł pobrania próbek do analiz. Do tej pory, HMP było badaniem oceniającym ludzką mikrobiotę na największą skalę. Dowiedziono, że genom mikrobioty składa się z ok. 3 000 000 genów i 150 razy przekracza liczbę genów człowieka (29). W projekcie tym, najnowocześniejszymi metodami genetycznymi, przebadano kohortę 242 osób (129 mężczyzn oraz 113 kobiet) i przeanalizowano 4788 próbek. Dla przewodu pokarmowego (dolnych odcinków) materiałem reprezentatywnym był kał; dla jamy ustnej i gardła próbki zbierano z 9 różnych miejsc tj. ślina, wymazy z wewnętrznej części policzka, dziąseł, podniebienia, migdałków, tkanek miękkich gardła i języka, poddziąsłowej i naddziąsłowej płytki nazębnej (biofilm przylegający do powierzchni zęba nad i pod dziąsłami); w przypadku skóry próbki pobierano z 4 miejsc jak przestrzenie zauszne (za każdym uchem) oraz z każdego dołu łokciowego; materiałem reprezentatywnym dla jamy nosowej był wymaz z nozdrzy. W przypadku kobiet pobierano dodatkowo jeszcze trzy próbki odzwierciedlające mikrobiotę pochwy tj. z ujścia pochwy, części środkowej oraz sklepienia pochwy. W badaniu wykazano bogatą różnorodność mikroorganizmów zasiedlających całe ciało człowieka, jak również obecność charakterystycznych mikrobów dla poszczególnych części ciała. Ponadto, mikrobiota między osobnikami, nawet zdrowymi różniła się między sobą, i to w obrębie wszystkich przebadanych miejsc bytowania. Co ciekawe, pomimo różnic w składzie mikrobioty szlaki metaboliczne u poszczególnych osób były, zbliżone co oznacza, że różne bakterie wywierają podobne funkcje w organizmie człowieka. Pochodzenie etniczne i rasowe



okazały się najsilniejszymi czynnikami determinującymi zarówno mikrobiotę, jak i ścieżki metaboliczne. W badaniu określono profile mikroorganizmów w obrębie próbki tzw. różnorodność *alpha* (ang. *alpha diversity*), jak również pomiędzy różnymi osobnikami w obrębie tego samego miejsca pobrania tzw. różnorodność *beta* (ang. *beta diversity*). Dla przykładu, ślina miała najwyższą średnią różnorodność *alpha* na poziomie OTUs, czyli operacyjnych jednostek taksonomicznych, ale jednocześnie jedną z najniższych różnorodności *beta*. Świadczy to o tym, że u każdego człowieka ślina zawiera bogatą różnorodność mikroorganizmów, ale między poszczególnymi osobnikami występują bardzo małe różnice w składzie gatunkowym obecnych tam mikrobów. Z kolei skóra, w zgięciu łokciowym wykazuje najwyższą różnorodność typu *beta*, przy umiarkowanej różnorodności *alpha*. Ciekawym pod względem mikrobioty środowiskiem jest pochwą, która ma najniższą różnorodność *alpha*, z bardzo małą różnorodnością *beta* na poziomie rodzaju, jednocześnie z bardzo wysoką na poziomie OTUs, ze względu na obecność odmiennych gatunków *Lactobacillus* spp. Projekt *Human Microbiome Project* dał podwaliny do kolejnych badań i spowodował olbrzymi rozkwit prac badawczych nad strukturą i funkcją mikrobioty jelitowej (30). W dalszym ciągu pozostaje jednak wiele niewiadomych, przede wszystkim na etapie wczesnej kolonizacji człowieka i jej długofalowym wpływie na zdrowie.

W tym miejscu należy wspomnieć także o zwierzętach gnotobiotycznych, czyli sterylnych (ang. germ-free, GF), które są wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów i pasożytów. Stanowią one, bardzo cenny model do badań naukowych nad mikrobiomem. Po raz pierwszy zwierzęta te wyhodowano w warunkach laboratoryjnych, w 1959 roku (31). Stanowią one doskonały model badawczy do oceny wpływu zmian jakościowych oraz ilościowych w obrębie mikrobioty jelitowej i powiązanie tych zmian ze stanem zdrowia i zachowaniem się. Ten specjalistyczny model zwierzęcy, głównie myszy, wnosi wiele informacji o funkcji mikrobioty jako ekosystemu na zdrowie człowieka (32).

Olbrzymi rozwój metod biologii molekularnej w ostatnich latach, umożliwił uzyskanie nowych, wartościowych informacji na temat fizjologii człowieka, przede wszystkim w połączeniu z zasiedlającą go mikrobiotą. Jest to nowa era dla mikrobiologii, która umożliwi analizę zarówno pojedynczego drobnoustroju, jak również całych społeczności i ich oddziaływania na organizm gospodarza. Posiadając tę wiedzę, stajemy

przed możliwością monitorowania oraz modyfikowania naszej mikrobioty, w celu promowania zdrowia człowieka. Znajomość czynników wpływających na mikrobiotę jest niezbędna dla podjęcia czynności, które mogą wspierać działanie prewencyjne w przypadku chorób przebiegających z dysbiozą jelitową. Ponadto uzyskana wiedza daje nowy pogląd na etiopatogenezę licznych schorzeń, z uwzględnieniem czynnika mikrobiologicznego oraz może przyczynić się do opracowania innowacyjnych terapii i schematów leczenia, w tym tworzenia testów diagnostycznych czy produkcji nowatorskich leków, enzymów oraz bioproduktów.

## **1.2. Mikrobiota jelitowa – skład i rozmieszczenie**

Mikrobiota przewodu pokarmowego jest aktualnie jednym z najczęściej podejmowanych tematów badawczych zarówno w dziedzinach medycznych jak i biomedycznych. W przeciągu zaledwie ostatnich kilku lat liczba publikacji naukowych z zakresu mikrobioty znacznie wzrosła i w 2015 r. wynosiła blisko 5000 (33). Trend ten wydaje się być w dalszym ciągu zwykły, co wskazuje na ważność tego tematu naukowego.

Przewód pokarmowy to największe skupisko mikroorganizmów w ciele człowieka. Natura nie jest rozrzutna, a mnogość mikrobów zasiedlających jelito człowieka nie jest kwestią przypadku. Mikroorganizmy te bowiem są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania ustroju. Podczas całego rozwoju osobniczego, jest to dynamiczny i złożony ekosystem zależny od licznych czynników endo- i egzogennych. Istotny wpływ na mikrobiotę przewodu pokarmowego wywiera: sposób porodu i forma karmienia, tryb życia, dieta, przede wszystkim zawartość błonnika w spożywanych posiłkach, miejsce zamieszkania (położenie geograficzne), higiena, przyjmowane antybiotyki i inne leki, stres, wiek, infekcje jak również genotyp gospodarza (33). Niektóre badania podkreślają, że geny gospodarza mogą wywierać nadrzędny wpływ na skład mikrobioty, w stosunku do pozostałych czynników, w tym diety. W analizie przeprowadzonej na dorosłych bliźniakach monozygotycznych i ich partnerach wykazano, że poszczególne pary bliźniąt, między sobą mają istotnie podobny skład mikrobioty. Z kolei, porównując pary bliźniak-partner (osobnik niespokrewniony genetycznie) nie wykazano takowych korelacji (34). Ponadto, badania polegające na analizie całego genomu 11262 par bliźniąt z Wielkiej Brytanii potwierdzają tezę, iż niektóre sekwencje mikrobiomu mogą być dziedziczne i kształtowane dzięki naszemu genom, a nie tylko poprzez czynniki środowiskowe czy

bezpośrednie przenoszenie się drobnoustrojów z rodzica na dziecko. Ponadto, wykazano zależność między dziedzicznymi taksonami, a genami związanymi z dietą, metabolizmem i węchem (35). Pomimo tych dowodów większość naukowców jest jednak zdania, że to czynniki środowiskowe determinują ostateczny profil mikrobioty u człowieka (33).

Zależności jakościowe i ilościowe mikrobioty jelit zmieniają się podczas życia. Największą dynamikę obserwuje się w trakcie pierwszych lat życia, jak również w okresie starzenia się organizmu. Nie mniej jednak, to okres wczesnego dzieciństwa jest czasem najbardziej aktywnych zmian i kluczowy dla kolonizacji i stabilizacji składu mikroorganizmów.

Łączna liczba mikrobów zasiedlających błonę śluzową przewodu pokarmowego u dorosłego człowieka wynosi  $10^{14}$  cfu/g kału. Jest to bogaty ekosystem, liczący około 17 rodzin, 50 rodzajów oraz ponad 1000 gatunków bakterii (33,36). Wśród nich wyróżniamy bakterie symbiotyczne, gdzie obie strony czerpią korzyści ze współżycia oraz komensalne, gdzie jedna ze stron czerpie profity bez wyrządzania szkody gospodarzowi. Bardzo ważne jest zachowanie odpowiednich proporcji między poszczególnymi grupami mikroorganizmów. Wyróżnić można także mikroorganizmy patogenne (np. *Salmonella*, *Shigella*) ściśle związane z wystąpieniem infekcji.

Początkowo szacowano, iż w organizmie człowieka występuje 10 razy więcej mikroorganizmów niż jego własnych komórek. Najnowsze dane mówią jednak, że ten stosunek jest porównywalny i wynosi ok. 1,3:1 na korzyść komórek bakterii. Wykazano, że „modelowy organizm człowieka” (70 kg masy ciała, 20-30 lat, 170 cm wzrostu) składa się z ok. 30 bilionów własnych komórek oraz 39 bilionów bakterii (37). Mikroorganizmy występujące w jelicie można sklasyfikować do 4 głównych typów: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%), *Actinobacteria* (3%), z czego dwa pierwsze są zdecydowanie najbardziej dominujące (38). Mikroorganizmy obecne są na całej długości przewodu pokarmowego, aczkolwiek ich ilość i skład jest zróżnicowany na poszczególnych jego odcinkach, z uwagi na panujące tam różne warunki fizykochemiczne.

- *Jama ustna*

W obrębie jamie ustnej i przełyku występuje ok.  $10^8$  komórek mikroorganizmów na 1 ml. Różnorodność bakterii jest dość duża (ok. 700 gatunków), z uwagi na stosunkowo stałą temperaturę, powierzchnię o zróżnicowanych właściwościach, obojętne pH. Są to przede wszystkim bakterie tlenowe, wśród których wyróżnia się mikrobiotę stałą, kolonizującą jamę ustną, jak i mikrobiotę przejściową, czyli

mikroorganizmy pochodzące przede wszystkim z żywności i dostarczanych płynów. Wśród nich stwierdza się przede wszystkim *Streptococcus* spp., który dominuje liczebnie, jak również *Peptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp. oraz grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*, głównie *Candida albicans* (36,39).

- **Żołądek**

Z uwagi na obecność kwasu solnego o pH ok. 1-2, jak również enzymów proteolitycznych liczba bakterii na tym odcinku maleje do ok.  $10^3$  cfu na 1 ml soku żołądkowego. Takie środowisko to pierwsza linia obrony organizmu przed patogennymi bakteriami ze środowiska zewnętrznego. Wśród mikroorganizmów zasiedlających tą niekorzystną niszę wyróżnić można *Helicobacter pylori* (bakterie przystosowana do życia w niskim pH), bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Streptococcus*, nieliczne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, jak również grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*.

Co ciekawe pH soku żołądkowego u noworodków jest wyższe, aniżeli u osoby dorosłej. Jest to fizjologiczne zjawisko, które w początkowym etapie życia może mieć pozytywny efekt w ułatwianiu kolonizacji prozdrowotnymi bakteriami. Oczywiście w takiej sytuacji bariera ta jest także łatwiejsza do sforsowania przez patogeny. Niepokojący jest jednak fakt stosowania inhibitorów pompy protonowej (IPP) w profilaktyce refluksu w grupie noworodków przedwcześnie urodzonych. Dowiedziono, iż stosowanie ranitydyny może zwiększać ryzyko infekcji oraz czterokrotnie ryzyko śmiertelności (40), jak i NEC (41) wśród wcześniaków. Pośrednio ma to związek z zaburzeniami mikrobioty jelitowej, gdyż podczas stosowania tej grupy leków obserwowane są zmiany w proporcji poszczególnych mikroorganizmów. Zjawisko to obserwowane jest także u dorosłych. Nadmierne i nadmierne stosowanie inhibitorów pompy protonowej może skutkować nadmiernym rozrostem mikrobioty jelita cienkiego, czyli SIBO (ang. small intestinal bacterial overgrowth) (42). Niesie to za sobą szereg objawów chorobowych u pacjenta jak, wzdęcia, uczucie przelewania w brzuchu, biegunki i inne. Poza zaburzeniami w mikrobiocie jelita cienkiego, podczas stosowania IPP stwierdza się także zmiany w obrębie mikrobioty jelita grubego. Obserwuje się wzrost udziału bakterii typu *Proteobacteria*, w tym z rodziny *Enterobacteriaceae* i jednoczesny spadek liczby *Firmicutes* (43).

- *Dwunastnica*

Z uwagi na obecność soli kwasów żółciowych, które są toksyczne dla większości mikroorganizmów, liczba drobnoustrojów na tym odcinku przewodu pokarmowego, oscyluje w tych samych granicach co w żołądku, nie przekraczając  $10^4$  cfu. Środowisko staje się jednak bardziej przyjazne dla mikrobów z uwagi na wyższe wartości pH 5,7-6,4, zmienia się zatem skład jakościowy mikrobioty. Do bakterii tu bytujących zaliczyć można rodzaj *Lactobacillus*, *Streptococcus*, jak również beztlenowce, w tym z rodzaju *Bacteroides*.

- *Jelito czcze*

Wartość pH w jelicie czczym to 5,9-6,8. Liczba mikroorganizmów w tym odcinku przewodu pokarmowego zwiększa się do ok.  $10^7$  cfu/ml treści jelitowej, bez zmiany składu jakościowego.

- *Jelito kręte*

W tym fragmencie jelita liczba bakterii wynosi  $10^9$  cfu na 1 ml treści jelitowej, a z uwagi na niższą zawartość tlenu i wyższe pH (7,3-7,7) skład gatunkowy zmienia się. W profilu bakterii wyróżnia się *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Veillonella* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*.

- *Jelito grube*

Jelito grube wraz z odbytnicą z uwagi na słabe ruchy perystaltyczne, małą aktywność wydalniczą, niską dostępność tlenu oraz pH w granicach 5,7-6,8 to najlepsza nisza dla rozwoju bakterii. Liczba komórek mikroorganizmów wynosi tu ok.  $10^{12}$  cfu na 1 gram kału, a społeczność drobnoustrojów jelita grubego nazywana jest najbardziej zróżnicowanym ekosystemem na Ziemi (ok. 800 różnych gatunków). Dominują tutaj bakterie bezwzględnie beztlenowe (99%), a względnie beztlenowe stanowią tylko ok. 1%. W składzie mikroorganizmów jelita grubego wyróżnić można *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp. Fizjologicznie występuje także pewna ilość grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* (36,44). Warto zaznaczyć, iż między światłem jelita, a treścią jelitową obserwuje się różnice w składzie jakościowym mikroorganizmów. Z uwagi na obecność tlenu pochodzącego bezpośrednio z tkanek, w śluzie jelitowym występuje

więcej bakterii względnie beztlenowych (mikroaerofilnych). W treści jelita z kolei, dodatkowo występują także mikroorganizm dostarczane z pożywieniem (36).

### 1.3. Funkcje mikrobioty jelitowej

Na pulę mikroorganizmów jelitowych u człowieka składa się tzw. rdzeń (ang. core), czyli pewien odsetek drobnoustrojów wspólny dla całej populacji ludzkiej, a pozostałą część stanowią drobnoustroje unikatowe dla każdego z nas, które przyrównuje się często do odcisku palca. Zależne są one od wspomnianych już wcześniej czynników, w tym m.in. genotypu gospodarza, diety, stosowanych leków, stylu życia i pozostałych czynników środowiskowych (2,33,45).

Układ mikrobioty osoby dorosłej jest stabilny i osobniczy, co potwierdzają analizy genów kodujących podjednostkę 16S rRNA (46). Pomimo tego, iż każdy ma swoją osobniczą, unikalną mikrobiotę, to moduluje ona naszą fizjologię w podobny sposób. Drobnoustroje bytujące w jelitach pełnią szereg funkcji, które możemy podzielić na cztery grupy (47):

- immunologiczną,
- ochronną,
- troficzną,
- metaboliczną.

Do najważniejszych należy przede wszystkim, rozwój i koordynowanie pracy układu immunologicznego gospodarza przez całe życie. Proces ten zachodzi w obrębie tkanki limfatycznej związanej z przewodem pokarmowym - GALT (ang. *gut associated lymphoid tissue*). W obrębie GALT zlokalizowanych jest 70% komórek immunokompetentnych organizmu i jest to najistotniejsze miejsce indukcji immunologicznej, przez co przewód pokarmowy powszechnie nazywany jest „organem odpornościowym” (48). Istotny jest także udział mikrobioty jelitowej w dojrzewaniu nabłonka jelitowego oraz angiogenezie w obrębie przewodu pokarmowego (49). Bardzo ważną funkcją mikrobioty jelit jest budowanie oporności w jelicie poprzez tworzenie naturalnej bariery na powierzchni nabłonka. Prozdrowotne bakterie zajmują miejsca wiązania na śluzówkach, uniemożliwiając tym samym skutecznie adhezję bakteriom patogennym. Dodatkowo, na zasadzie kompetycji, konkurują z nimi o składniki odżywcze i niszę ekologiczną. Bakterie jelitowe poprzez produkcję bakteriocyn, w tym nadtlenu wodoru są zdolne do bezpośredniego działania bakteriostatycznego oraz bakteriobójczego. Dodatkowo

syntetyzując kwasy organiczne, w tym kwas mlekowy, obniżają pH w obrębie jelit, przez co skutecznie zmieniają środowisko na nieprzyjazne dla bakterii chorobotwórczych. Biorą również udział w regulacji magazynowania tłuszczu i metabolizmu. Mikrobiota jelitowa jest również odpowiedzialna za syntezę witamin K, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> i kwasu foliowego.

Mikrobiota jelitowa syntezuje także krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short-chain fatty acids, SCFA), w tym masłowy, octowy, propionowy, stanowiące produkt fermentacji polisacharydów, niestrawialnych dla człowieka. Do polisacharydów tych, zaliczmy błonnik pokarmowy, inulinę, skrobię oporną, celulozę, hemicelulozę, pektyny, oligosacharydy dostarczane wraz z pożywieniem. Z kolei SCFA, głównie maślan, odżywiają kolonocyty, stymulują ich rozwój, chronią przed translokacją bakterii z jelita grubego do krwioobiegu oraz wykazują działanie przeciwzapalne. Głównym producentem maślanu w przewodzie pokarmowym jest *Faecalibacterium prausnitzii*. Niedobór maślanu oraz zmniejszenie liczby *F. prausnitzii* raportowany jest u osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna czy *colitis ulcerosa* (50). Oddziaływanie mikrobioty jelit nie ogranicza się wyłącznie do przewodu pokarmowego, ale obejmuje swym działaniem cały organizm. Co więcej, aktualne dane naukowe wskazują, iż mikrobiota jelitowa oddziałuje także na mechanizmy neurologiczne, poznawcze czy nawet zachowanie człowieka. Jelita, określa się mianem naszego „drugiego mózgu”. Modulacja połączenia jelito-mózg (ang. gut-brain axis) jest ściśle zależna od mikrobioty jelitowej. Warto nadmienić, iż relacja mikrobiota-mózg jest dwukierunkowa, tzn. zarówno mikroorganizmy mogą wpływać na samopoczucie, jak i samopoczucie może wywierać wpływ na mikrobiotę. Trzewny układ nerwowy to ok. 100 milionów neuronów działających samodzielnie. Połączenie jelito-mózg przebiega drogą nerwu błędnego (łac. *nervus vagus*), który łączy jelito z mózgiem. Jest to najdłuższy nerw czaszkowy, prowadzący zarówno włókna czuciowe, ruchowe i przywspółczulne od jelit do mózgu. Złożona sieć neuronów unerwiająca układ pokarmowy przekazuje impulsy nerwowe do wyspy, hipokampu, kory przedczołowej, ciała migdałowatego i zakrętu kory obręczy. Ze względu na funkcje tych obszarów mózgu, procesy zachodzące w jelitach, które są zależne od profilu mikrobioty, mogą wpływać na samopoczucie, przetwarzanie emocji, motywację, odczuwanie lęku i pamięć (51). Niezwykle istotne jest, że w jelitach powstaje 90% serotoniny, jak również prekursorzy wielu hormonów i neurotransmiterów. Coraz częściej dyskutuje się o roli mikrobioty jelitowej w autyzmie czy innych zaburzeniach neurorozwojowych u dzieci, a także depresji

czy schizofrenii (52). Bardzo ważne jest zrozumienie istoty działania mikrobioty jelitowej, oraz zależności, która mówi o tym, że to co dzieje się lokalnie w przewodzie pokarmowym ma swoje odzwierciedlenie w całym organizmie.

Dowiedziano, iż sterylne zwierzęta laboratoryjne, mają dużo słabiej rozwinięty układ odpornościowy, a w konsekwencji podwyższoną wrażliwość na patogeny. Ponadto, u zwierząt gnotobiotycznych stwierdza się: niedobór enzymów trawiennych, zmniejszone wchłanianie składników odżywczych, mniej rozwinięty nabłonek jelitowy, jak również zmniejszoną ilość limfocytów w obrębie nabłonka oraz niedobór witamin (53,54). Ponadto u myszy GF, u których sterylne przewody pokarmowe zasiedlono tylko jednym szczepem bakterii tj. *Bacteroides thetaiotaomicron*, zaobserwowano pozytywny wpływ na rozwój układu nerwowego, angiogenezę, metabolizm oraz uszczelnienie bariery jelitowej (55). Główne funkcje mikrobioty jelitowej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ mikrobioty na zdrowie człowieka (56)

<b>Układ pokarmowy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rozwój błony śluzowej (uszczelnianie nabłonka, tworzenie połączeń międzynabłonkowych)</li> <li>• Aktywacja enzymów trawiennych</li> <li>• Wpływ na perystaltykę i przyswajanie składników odżywczych</li> </ul>
<b>Metabolizm ogólnoustrojowy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolizm kwasów żółciowych, bilirubiny i cholesterolu</li> <li>• Metabolizm kwasów tłuszczowych (produkcja SCFA*)</li> <li>• Produkcja witamin (K, B<sub>12</sub>, kwas foliowy)</li> <li>• Metabolizm enzymów karcinogennych (m.in. ureazy, beta-glukuronidazy)</li> </ul>
<b>Układ immunologiczny</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tworzenie „pierwszej linii obrony” organizmu (produkcja bakteriocyn, nadtlenku wodoru, kwasów, w tym mlekowego obniżających pH, aktywacja produkcji śluzu i defensyn przez nabłonek jelitowy, aktywacja produkcji sekrecyjnej IgA)</li> <li>• Rozwój i dojrzewanie układu immunologicznego związanego z błonami śluzowymi (GALT** i MALT***)</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indukcja tolerancji immunologicznej</li> <li>• Regulacja profilu cytokinowego Th1/Th2/Th17</li> </ul>
<b>Układ nerwowy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktywacja układu neuroendokrynnego</li> <li>• Produkcja serotoniny</li> <li>• Modulacja osi jelita – mózg</li> </ul>

\*SCFA – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short-chain fatty acids)

\*\*GALT – tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi jelita (ang. gut-associated lymphoid tissue)

\*\*\*MALT – tkanka limfatyczna związaną z błonami śluzowymi (ang. mucosa-associated lymphoid tissue)

#### **1.4. Układ immunologiczny jelita**

Błona śluzowa przewodu pokarmowego, to obok skóry i śluzówek układu oddechowego miejsce największego kontaktu organizmu z antygenami ze środowiska zewnętrznego. Codziennie drogą pokarmową dostarczane są liczne czynniki potencjalnie zakaźne, czy immunomodulujące. Aby chronić wrażliwe środowisko wewnętrzne przed patogenami i antygenami z zewnątrz, organizm wytworzył szereg nieswoistych i swoistych mechanizmów obronnych w obrębie błon śluzowych. Mechanizmy te, kontrolują i utrzymują również relacje mikrobiota-gospodarz w stanie tolerancji, ponieważ także bezpośredni kontakt prozdrowotnej mikrobioty i jej metabolitów z gospodarzem (powierzchnia komórek nabłonka) musi być ograniczony i nieustannie regulowany. Mnogość mikroorganizmów, które stanowią fizjologiczną mikrobiotę jelitową i pozostają w ciągłym kontakcie z organizmem, wymusza potrzebę ograniczenia ich styczności z tkanką limfatyczną błon śluzowych jelita, a w związku z tym uniknięcia rozwoju niekontrolowanej odpowiedzi zapalnej.

##### **1.4.1. Budowa bariery przewodu pokarmowego**

Powierzchnia błony śluzowej przewodu wynosi ok. 32 m<sup>2</sup> (57) i jest znacznie większa od powierzchni skóry (1,6–1,9 m<sup>2</sup>). Tym samym narażenie przewodu pokarmowego na substancje środowiskowe jest znacznie większe niż naszej zewnętrznej bariery mechanicznej. Mechanizmy obronne błon śluzowych przewodu pokarmowego

mają na celu zapobieganie adhezji i kolonizacji śluzówek przez mikroorganizmy patogenne, jak również niedopuszczenie do wchłaniania antygenów i w konsekwencji rozwojowi nadmiernej odpowiedzi immunologicznej (58). W tym procesie biorą udział następujące elementy bariery przewodu pokarmowego: niskie pH soku żołądkowego, enzymy proteolityczne, lizozym, laktoferyna, warstwa śluzu na powierzchni nabłonka, peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe (mp. histatyny, defensyny), wydzielnicza IgA (ang. secretory IgA, sIgA), fizjologiczna mikrobiota, jak i własne metabolity gospodarza (33,59). Bardzo ważne są także struktury anatomiczne jak, nabłonek cylindryczny, ścisłość połączeń międzykomórkowych (zonula occludens; tight junctions), które skutecznie ograniczają penetrację szkodliwych substancji i czynników w głąb błony śluzowej. Istotne są także komórki Panetha, które zawierają przeciwbakteryjne białka jak, lizozym, wydzielniczą fosfolipazę A<sub>2</sub> oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -defensyny (kryptydyny). Peptydy antybakteryjne są uwalniane z ziaren, w odpowiedzi na kontakt komórek Panetha z bakteriami lub składnikami ich ściany, np. lipopolisacharydem (LPS). Bariera przewodu pokarmowego nie jest strukturą przypominającą mur, a raczej selektywny filtr, który decyduje o tym co wnika do krążenia, a co zostaje zatrzymane w świetle przewodu pokarmowego. W przypadku uszkodzeń bariery przewodu pokarmowego dochodzi do utraty owej selektywności, co w konsekwencji może prowadzić do utraty tolerancji immunologicznej i poważnych konsekwencji zdrowotnych, w tym chorób autoimmunizacyjnych, alergii i innych.

#### **1.4.2. Budowa i działanie GALT**

Bardzo ważną rolę w mechanizmach obronnych pełni tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego, tzw. GALT (ang. gut-associated lymphoid tissue). Jest ona częścią ogólnego układu odpornościowego związanego ze śluzówkami całego organizmu, czyli MALT (ang. mucosa-associated lymphoid tissue). Przewód pokarmowy jest miejscem, w którym znajduje się znaczna część limfocytów naszego organizmu. Komórki układu immunologicznego w jelicie są rozproszone w obrębie nabłonka jelita i są to tzw. limfocyty śród nabłonkowe lub limfocyty blaszki właściwej (lamina propria), albo tworzą zorganizowane struktury, jakimi są samodzielne grudki chłonne, kępki Peyera oraz węzły chłonne krezkowe (60). Głównym miejscem indukcji immunologicznej są przede wszystkim kępki Peyera. Układ immunologiczny jelita jest aktywowany przez antygeny, transportowane ze światła jelita, albo za pomocą komórek M,

obecnych w kępkach Peyera, albo bezpośrednio poprzez nabłonek jelita. Komórki M, na swej powierzchni posiadają mikropofałdowania, które ułatwiają transport antygenów do kępki Peyera. W komórkach tych, oprócz mikropofałdowań wyróżnia się także wgłębienia cytoplazmy tworzące tzw. kieszenie, zawierające limfocyty T i B. Limfocyty z kępek Peyera naczyniami limfatycznymi mogą wędrować do węzłów chłonnych krezkowych i dostawać się do krwiobiegu, a stamtąd ponownie osiedlać się w błonach śluzowych. Prawidłowo działający układ immunologiczny posiada zdolność odróżniania patogenów zarówno od fizjologicznej mikrobioty jelitowej, jak i antygenów pokarmowych. Wybrane komórki układu immunologicznego za pośrednictwem grupy receptorów PRR (ang. pattern recognition receptors), rozpoznają wzorce patogenności mikroorganizmów, czyli PAMP (ang. pathogen associated molecular pattern), takie jak lipopolisacharyd (LPS), flagelinę, kwasy nukleinowe bakterii Gram (-) lub peptydoglikany, kwas lipotejchojowy bakterii Gram (+), jak również mannan i zymosan grzybów. Wymienione substancje jak LPS, peptydoglikany, kwasy lipotejchojowe mogą być produkowane, zarówno przez bakterie komensalne, jak i patogenne, ale receptory rozróżniają ich źródło pochodzenia. Rodzajem receptorów PRR, są receptory błonowe Toll-podobne (ang. Toll-like, TLR), które inicjują stan zapalny lub w przypadku rozpoznania komensali prowadzą do tolerancji danego antygenów (61). Enterocyty płodu, już między 18-21 tygodniem ciąży wykazują obecność receptorów TLR-2 oraz TLR-4 (62). Drugą klasą PRR są nukleotydy wiążące domeny oligomeryzacji (ang. NOD-like receptors, NLRs). Są one białkami cytoplazmatycznymi, rozpoznającymi cząsteczki pochodzenia endogenne lub bakteryjne i w odpowiedzi tworzącymi oligomery, które aktywują kaspazy. To prowadzi do aktywacji ważnych cytokin zapalnych i/lub aktywacji szlaku sygnałowego NF- $\kappa$ B w celu indukowania wytwarzania cytokin prozapalnych (63).

Bardzo ważną rolę w wytworzeniu odpowiedzi immunologicznej odgrywają komórki prezentujące antygen, głównie komórki dendrytyczne. Komórki dendrytyczne oraz makrofagi jelitowe, pobierają antygen z kępek Peyera i kontaktują się z limfocytami warstwy podśluzowej jelita, bądź transportują go do węzłów chłonnych krezkowych, gdzie następuje prezentacja antygenów naiwnym limfocytom T, prowadząc do ich różnicowania. Po prezentacji pobudzone limfocyty Th aktywują inne komórki układu immunologicznego (w tym limfocyty B i Tc), a także nasilają migrację pozostałych komórek GALT za pośrednictwem substancji chemotaktycznych, jak histamina, prostoglandyny, leukotrieny, cytokiny, które wydzielają. Komórki dendrytyczne posiadają również

zdolność pobierania antygenów bezpośrednio z jelita, bez naruszania połączeń ścisłych (ang. tight-junctions), dzięki wypustkom, przechodzącym bezpośrednio między enterocytami (60).

### **1.4.3. Mechanizm stymulowania odpowiedzi immunologicznej przez mikrobiotę**

Mikrobiota jelitowa jest ściśle związana z modulacją odpowiedzi immunologicznej. Kolonizacja przewodu pokarmowego i kontakt pierwszych bakterii z GALT jest czynnikiem indukującym rozwój tolerancji immunologicznej. Mikrobiota jelitowa wpływa zarówno na aktywację sieci cytokinowej, jak również indukcję odporności nieswoistej. Prezentacja bakterii komensalnych w układzie GALT generuje ochronną odpowiedź immunologiczną, związaną z wytwarzaniem sekrecyjnych przeciwciał klasy IgA (sIgA) oraz indukcją limfocytów, które wytwarzają przeciwzapalne cytokiny jak, TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* ) oraz IL-10 (60). Autochtoniczne bakterie modulują bilans cytokinowy poprzez wpływ na limfocyty T regulatorowe (Treg). Nieaktywowane limfocyty Treg nie wydzielają cytokin. Dopiero po stymulacji zaczynają wytwarzać transformujący czynnik wzrostu beta - TGF- $\beta$  oraz IL-10, a dzięki temu hamują proliferację komórek efektorowych (bazofilów, eozynofilów, komórek tucznych), jak i wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych (64). Limfocyty Treg biorą udział m.in. w: wytwarzaniu tolerancji na antygeny, w odpowiedzi przeciwnowotworowej, przeciwnowotworowej, immunologicznej po szczepieniach ochronnych, przebiegu ciąży, powstawaniu tolerancji wobec przeszczepianych narządów, hamują limfocyty autoreaktywne (65). Wydzielana przez Treg IL-10 bierze istotny udział w immunoregulacji i procesie rozwoju tolerancji immunologicznej. Cytokina ta hamuje wytwarzanie IFN- $\gamma$  przez limfocyty Th1 oraz IL-4 i IL-5 przez Th2, dodatkowo wspomaga proliferację komórek tucznych. Niedobór bądź zablokowanie receptora dla IL-10 u myszy powoduje ostre odrzucanie przeszczepu, co wiąże tą cytokinę z tolerancją transplantacyjną (66). Z kolei TGF- $\beta$  kontroluje proliferację, różnicowanie, adhezję oraz migrację większości typów komórek, ma działanie przeciwzapalne oraz znaczenie w rozwoju tolerancji pokarmowej. Mechanizm działania tej cytokiny wiąże się z hamowaniem odpowiedzi Th2, syntezy IgE, aktywacji komórek tucznych, jak i reguluje syntezę sIgA (67).

Mikrobiota poprzez indukcję wydzielania TGF- $\beta$  oraz IL-10 wpływa na różnicowanie się limfocytów T pomocniczych (Th): Th1, Th2, Th17. Każda z wymienionych populacji

limfocytów charakteryzuje się innym profilem produkowanych cytokin. Limfocyty Th1 są odpowiedzialne za wydzielanie przede wszystkim IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ . Są one w głównej mierze zaangażowane w komórkową odpowiedź immunologiczną. W przypadku nadmiernego pobudzenia limfocytów Th1 mamy do czynienia z chorobami zapalnymi, w tym chorobami autoimmunizacyjnymi. Limfocyty Th2 wydzielają IL-4, IL-5, IL-13 i biorą udział w odpowiedzi typu humoralnego. W przypadku nadmiernej aktywności limfocytów Th2 mamy do czynienia ze zwiększoną ilością procesów alergicznych. Ten typ limfocytów dominuje w życiu płodowym oraz u noworodka. Limfocyty Th-17 wydzielają głównie IL-17, która odgrywa znaczącą rolę w obronie przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Th17 mogą także odgrywać rolę w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych. Poza schorzeniami z autoagresji, IL-17 uczestniczy także w reakcjach alergicznych i astmie, jak i w odporności przeciwnowotworowej. Rolą prozdrowotnej mikrobioty jest takie działanie, aby równowaga cytokinowa Th1/Th2/Th17, a przez to tolerancja immunologiczna została zachowana. Dowiedziono, iż brak stymulacji bakteryjnej uniemożliwia przekazywanie sygnałów z komórek dendrytycznych do limfocytów Treg i obniża zdolność produkcji IL-10 oraz TGF- $\beta$  (68).

Dodatkowo mikrobiota jelitowa wpływa na indukcję odporności nieswoistej poprzez wpływ na syntezę sekrecyjnej IgA (sIgA). Produkcja tej immunoglobuliny jest jedną z zasadniczych funkcji GALT, ściśle związaną z obecnością prawidłowej mikrobioty jelitowej. Jest to przeciwciało wydzielane na śluzówkach organizmu i stanowi pierwszą linię obrony naszego organizmu. Mechanizm wytwarzania sIgA związany jest z pobudzeniem limfocytów B, które migrują do blaszki właściwej i poprzez przełączenie izotypu IgM na IgA, proliferują i ostatecznie różnicują się w plazmocyty produkujące duże ilości IgA. Przełączenie klas zachodzi w kępkach Peyera. Proces ten uzależniony jest od pobudzenia limfocytów T przez mikrobiotę oraz innych komórek układu immunologicznego, jak również od wydzielanych przez nie cytokin. Sekrecyjna immunoglobulina A transportowana jest następnie do światła jelita i wychwytywana przez swoiste dla niej receptory. Dodatkowo plazmocyty drogą krwi i chłonki transportowane są również do odległych śluzówek organizmu, gdzie także wydzielają sIgA. Wydzielnicza IgA wywiera przede wszystkim rolę obronną, ma zdolność opłaszczania i aglutynacji mikroorganizmów, wywiera działanie bakteriostatyczne, zapobiega adhezji mikroorganizmów do nabłonka, a tym samym wnikaniu ich w głąb błon śluzowych oraz neutralizuje toksyny bakteryjne (59). Sekrecyjna IgA wytwarzana jest w organizmie

miejscowo, stanowi ona 2/3 wytwarzanych w organizmie IgA. Reszta przypada na jej obecność w surowicy i ta forma syntetyzowana jest w szpiku kostnym. Obie formy immunoglobuliny A różnią się między sobą. Ta w surowicy jest w postaci monomeru, z kolei forma sekrecyjna w postaci dimeru, rzadziej tetrameru. Sekrecyjna IgA zawiera połączone fragmentem J dwie (lub cztery) cząsteczki IgA oraz komponent wydzielniczy (ang. secretory component, SC). Wydzielone przez plazmocyty w błonach śluzowych IgA są transportowane za pomocą SC przez nabłonek do światła poszczególnych narządów (np. jelit, oskrzeli). Dzielne wytwarzanie sIgA u dorosłego człowieka wynosi ok. 4,5 g i przewyższa łączne wytwarzanie przez organizm wszystkich innych przeciwciał. Komórki plazmatyczne wytwarzające sIgA w obrębie przewodu pokarmowego, przewyższają liczebnie te wydzielające przeciwciała klasy IgM oraz IgG. Dla przykładu w żołądku stanowią 74%, w dwunastnicy oraz jelicie czczym 79%, w jelicie krętym 80%, a w okrężnicy aż 90% wszystkich komórek wytwarzających przeciwciała (59).

Z perspektywy okresu noworodkowego szczególną uwagę należy zwrócić na rozwój układu immunologicznego gospodarza. Mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, w odpowiedzi na pierwotną kolonizację aktywują dziewiczy układ immunologiczny noworodka i wpływają na rozwój adaptacyjnej odpowiedzi na dostarczane ze środowiska antygeny. Układ immunologiczny noworodka jest względnie niedojrzały, brak jest wystarczających mechanizmów regulujących odpowiedź odpornościową, dominują limfocyty Th2. Utrzymywanie takiego stanu może być czynnikiem spustowym do rozwoju alergii i atopii w wieku późniejszym (62). Pierwszymi antygenami, z którymi noworodek ma kontakt to bakterie i to one będą miały zasadniczy wpływ na proces kształtowania tolerancji immunologicznej. Dominująca w okresie ciąży przeciwzapalna odpowiedź Th2, musi zostać przekierowana na odpowiedź prozapalną Th1 oraz Th17, która ma zasadnicze znaczenie w walce z patogenami (69). Jednocześnie odpowiedź ta musi pozostać w równowadze i nie ulec nadmiernemu pobudzeniu, aby nie promować autoagresji bądź reakcji nadwrażliwości. Zarówno przełączenie odpowiedzi Th2-zależnej w stronę odpowiedzi Th1/Th17-zależnej, jak i utrzymywanie bilansu cytokinowego odbywa się z udziałem mikroorganizmów, które już podczas porodu zaczynają zasiedlać błony śluzowe oraz skórę dziecka (60). Prawidłowa kolonizacja jelit noworodka jest w związku z tym kluczowa, dla odpowiedniej adaptacji immunologicznej w środowisku zewnętrznym.

Jak już wspomniano wcześniej, myszy gnotobiotyczne, cechuje szereg nieprawidłowości związanych z brakiem działalności prozdrowotnej mikrobioty. W aspekcie funkcjonowania GALT dowiedziono, iż myszy GF cechują się mniejszą liczbą kępek Peyera, zmniejszoną liczbą komórek w lamina propria, jak również mniejszą liczbą komórek T CD4+ i komórek produkujących sIgA. U zwierząt tych stwierdza się także ograniczoną sieć kapilarną, zaburzenia w budowie oraz rozwoju śledziony i węzłów chłonnych, zaburzone, bądź słabo wykształcone strefy komórek T i B, brak odpowiedzi Th1, z silniejszą odpowiedzią Th2, na skutek zwiększonej produkcji Il-4 (61).

### 1.5. Kształtowanie się mikrobioty jelitowej i rozwój tolerancji immunologicznej

Okres noworodkowy jest decydujący dla prawidłowego zasiedlania się mikroorganizmów w jelicie. Mikrobiota noworodka jest mniej różnorodna, aniżeli dzieci starszych czy dorosłych i głównie zdominowana jest przez typy *Actinobacteria* i *Proteobacteria* (33). Względnie dojrzały układ mikroorganizmów, podobny do osoby dorosłej z dominacją *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, ustala się około 2-3 roku życia, a około 7 roku jest już charakterystyczny osobniczo (56).

Na kształtowanie mikrobioty jelitowej dziecka wpływ ma wiele czynników, przede wszystkim sposób porodu, żywienie początkowe (pokarm matki vs. mieszanki mlekozastępcze), genotyp oraz czynniki środowiskowe jak: rodzeństwo, kontakt ze zwierzętami, dieta, przebyte infekcje, antybiotyki, położenie geograficzne (33). Najważniejsze czynniki i ich wpływ na poszczególne mikroorganizmy przedstawiono w tabeli 2.

Tab 2. Czynniki modulujące mikrobiotę jelitową noworodka i ich wpływ na poszczególne mikroorganizmy (70)

CZYNNIKI PRENATALNE	
<b>Przyjmowanie antybiotyków w ciąży</b>	↓ <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Atopobium spp.</i> ↓ <i>Bifidobacterium spp.</i> w przypadku profilaktyki okołoporodowej
<b>Nadwaga matki</b>	↓ <i>Bacteroides spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> u kobiet z BMI >25
<b>Styl życia - stres</b>	↑ <i>Proteobacteria</i> , ↓ <i>Actinobacteria</i> , <i>Lactobacteriaceae</i>

<b>Mikrobiota matki</b>	Transfer mikrobioty matki do jelit płodu, wpływ mikrobioty jamy ustnej matki przez transfer z krwią np. przy zapaleniu dziąseł
<b>Cukrzyca ciążowa</b>	Stwierdzono zmiany w profilu mikrobioty łożyska u kobiet z cukrzycą ciążową ↑ <i>Firmicutes</i> , ↓ <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroides spp.</i>
<b>CZYNNIKI PERINATALNE</b>	
<b>Rodzaj porodu</b>	Cięcie cesarskie - ↑ <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i> , częściej kolonizowane przez <i>Clostridium difficile</i> , ↓ <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Bacteroides spp.</i>
<b>Wiek ciążowy</b>	Wcześniaki – opóźniona kolonizacja, mniejsza różnorodność gatunkowa ↑ <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , ↓ <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Bacteroides spp.</i>
<b>CZYNNIKI POSTNATALNE</b>	
<b>Rodzaj karmienia</b>	Mieszanki modyfikowane - ↑ <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Firmicutes</i> Karmienie piersią - ↑ <i>Bifidobacterium spp.</i>
<b>Przyjmowanie pre- i probiotyków</b>	Prebiotyki - ↑ <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> Probiotyki - ↑ <i>Lactobacillus spp.</i> ↓ <i>Enterobacteriaceae</i> (potencjalnie patogennych)
<b>Antybiotyki</b>	Antybiotyki w zależności od spektrum działania, dawki i długości terapii zmieniają mikrobiotę, a jej odbudowa może trwać kilka miesięcy. ↓ <i>Bifidobacterium spp.</i> , ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> (potencjalnie patogennych)

### 1.5.1. Czynniki prenatalne

Powszechnie przyjmuje się, że zdrowy noworodek jest jałowy, a aktywna kolonizacja dziecka rozpoczyna się w momencie porodu. Nie mniej jednak, najnowsze dane naukowe potwierdzają, iż środowisko wewnątrzmaciczne w stanie fizjologicznym nie jest sterylne. Co więcej, już wewnątrzmacicznie układ immunologiczny płodu stymulowany jest poprzez DNA bakteryjne pochodzenia matczynego, głównie mikrobioty jelitowej. Coraz częściej podkreśla się zatem udział matki, jeszcze na długo przed porodem, w prawidłowym kształtowaniu się profilu mikroorganizmów przewodu pokarmowego noworodka. Wynika z tego, że mikrobiota ciężarnej może oddziaływać na dziecko jeszcze przed narodzinami i determinować w pewien sposób jego zdrowie bądź chorobę. Materiał genetyczny bakterii niezwiązanych ze stanem patologicznym wykryto



zarówno w płynie owodniowym (71), błonach płodowych (72), krwi pępowinowej (73) i łożysku (74) oraz smółce zdrowych donoszonych noworodków (75). Do tej pory obecność mikroorganizmów w łożysku wiązano z występowaniem ścisłych patogenów i zwiększonym ryzykiem infekcji wewnątrzmacicznych, a w konsekwencji przedwczesnym porodem i poronieniem (76,77). Istnieją jednak doniesienia o obecności bakterii w łożysku także w sytuacjach niepatologicznych. Pettker i wsp. (78) wykazali dodatnie posiewy mikrobiologiczne próbek łożyska u kobiet, u których nie stwierdzono zakażeń płynu owodniowego lub stanów zapalnych. Ponadto, Aagaard i wsp. (74) wykazali, iż łożysko fizjologicznie zawiera swój unikalny mikrobiom, niepowiązany z infekcją wewnątrzmaciczną, a co za tym idzie porodem przedwczesnym. W analizie tej, materiał genetyczny bakterii znajdujący się w łożysku był najbardziej zbliżony do mikrobioty jamy ustnej matki. Co istotne, profil ten różni się u kobiet rodzących w terminie, od tych rodzących przedwcześnie, co wskazuje także na rolę mikrobioty jamy ustnej w zachowaniu homeostazy. Dodatkowo, Satokari i wsp. (79) wykazali obecność prozdrowotnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, oraz *Lactobacillus* w próbkach zarówno naczyń jak i tkanek łożyska. Oba rodzaje wspomnianych bakterii, to bakterie kwasu mlekowego, o pozytywnym oddziaływaniu na zdrowie gospodarza, które fizjologicznie bytują w przewodzie pokarmowym. Zatem badacze wysnuli hipotezę o możliwej ekspozycji płodu na ich DNA. W badaniu przeanalizowano 34 próbki materiału z łożysk, w tym 25 z porodów fizjologicznych oraz 9 z cięć cesarskich (CC). Uważa się, że materiał pobrany z łożyska w przypadku porodu poprzez cięcie cesarskie jest mniej narażony na zanieczyszczenie mikrobiotą bezpośrednio z przewodu pokarmowego lub pochwy matki. Wszystkie próbki pozyskano od noworodków urodzonych o czasie. Materiał biologiczny analizowano za pomocą tradycyjnego posiewu mikrobiologicznego jak i metody molekularnej (PCR). Materiał genetyczny *Bifidobacterium* wykryto aż w 33 próbkach (25 – porody fizjologiczne, 8 – CC), a DNA *Lactobacillus rhamnosus* wykryto w 31 próbkach (23 – porody fizjologiczne, 8 – CC). Nie stwierdzono różnic między ilością DNA poszczególnych bakterii między próbkami pobranymi z tkanek łożyska, a próbkami z naczyń. Co jednak istotne, za pomocą tradycyjnego powiewu mikrobiologicznego w żadnej z próbek nie wyhodowano bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Potwierdza to fakt, iż rozwój technik molekularnych umożliwia poszerzanie wiedzy na temat mikrobiomu ludzkiego. W prezentowanej analizie badacze potwierdzili swoją hipotezę, iż bakterie bądź ich DNA

mogą być obecne w łożysku także w stanach niepatologicznych i wywoływać odpowiedź immunologiczną u płodu.

Fragmentami bakteryjnego DNA, o silnych właściwościach immunomodulujących, zdolnymi do uruchamiania immunologicznych mechanizmów Th1-zależnych, czyli procesów zapalnych są tzw. motywy CpG (CpG DNA), składające się niemetylowanego oligonukleotydu cytozyno-guaninowego. Motywy CpG DNA są cechą swoistą organizmów prokariotycznych. Na ich podstawie układ immunologiczny odróżnia DNA bakteryjne od swych własnych komórek. W związku z tym, że CpG DNA stymulują procesy typu Th1, przy jednoczesnym hamowaniu odpowiedzi typu Th2, mają zdolność do przesuwania równowagi cytokinowej Th1/Th2 w kierunku Th1, co przekłada się na zmniejszanie procesów alergicznych (80). Satokari i wsp. postulują, iż to właśnie motywy CpG matczyne DNA bakteryjne, aktywują TLR-9, a następnie wywołują odpowiedź immunologiczną typu Th1. Powszechnie uznaje się, iż noworodek jest niedojrzały immunologicznie, jednakże ekspozycja na działanie bakteryjnego DNA może zaprogramować rozwój odporności niemowląt już w życiu płodowym, czyli wcześniej niż uprzednio rozważono (79). Ma to szczególne znaczenie w okresie noworodkowym, w którym przeważają procesy typu Th2. Od chwili przyjścia dziecka na świat, ekspozycja jego układu immunologicznego na alergen może prowadzić do dwóch przeciwstawnych zjawisk. Polegają one albo na nasilaniu i/lub przedłużaniu odpowiedzi Th2 utrwalonej jeszcze z okresu życia wewnątrzmacicznego, albo na rozwoju odpowiedzi Th1, czyli tzw. dewiacji immunologicznej (80). Nasilona stymulacja mechanizmu Th2 może prowadzić do wystąpienia atopii u dziecka w wieku późniejszym (80). Zatem wewnątrzmaciczna stymulacja procesów Th1 poprzez fizjologiczną mikrobiotę matki wpływać będzie na indukcję równowagi cytokinowej. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, iż podaż probiotyków ciężarnej, może zmniejszać objawy choroby atopowej u dziecka, pomimo jego predyspozycji genetycznej ze strony któregoś z rodziców (81).

Z kolei, wykrycie bakterii, jak *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum* w smółce zdrowych noworodków może wynikać z ich translokacji drogą krwiopochodną od matki (75). Hipotezę o translokacji potwierdza fakt, iż bakterie z rodzaju *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* oraz gatunki *Propionibacterium* wyizolowano także z krwi pępowinowej (73). Ponadto, Ardisonne i wsp. (82), porównując skład mikroorganizmów w smółkach, stwierdzili podobieństwo do

składu bakterii występujących w płynie owodniowym. W badaniu przeprowadzonym przez Jimenez i wsp. (75) przeanalizowano smółki 21 zdrowych noworodków, urodzonych zarówno fizjologicznie jak i poprzez CC. Smółka oddana była w ciągu 2 pierwszych godzin życia, jeszcze przed rozpoczęciem karmienia. U wszystkich matek noworodków włączonych do badania, ciąża przebiegała bez komplikacji, a same ciężarne nie przyjmowały żadnych probiotyków przez cały okres ciąży. W analizie bez względu na sposób porodu wykazano obecność bakterii we wszystkich próbkach smółek. Dominującymi bakteriami był rodzaj *Enterococcus* w 17/21 próbek (80%) oraz *Staphylococcus* obecny w 11/21 próbek (52%). Przy czym najliczniejsze w tych grupach były gatunki *Enterococcus faecalis* wyizolowany w 17 próbkach oraz *Staphylococcus epidermidis* obecny w 10 próbkach. Kolejno wykrytymi były bakterie *Escherichia coli* (6 próbek) oraz *Enterobacter* spp. (5 próbek). Dodatkowo wykazano także obecność *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Rothia mucilaginosa*, *Klebsiella* spp. W pojedynczych próbkach liczba poszczególnych gatunków bakterii wahała się od 5 do 1. W powyższym badaniu przeprowadzonym przez zespół Jimeneza, poza badaniem smółek wykonano jeszcze dodatkową bardzo ciekawą analizę. Grupa ciężarnych myszy otrzymywała doustnie zawieszony w mleku, znakowany genetycznie szczep bakterii *Enterococcus faecium* JLM3. Natywny szczep wyizolowany był uprzednio z mleka zdrowej kobiety. Druga grupa myszy otrzymywała placebo. Ciążę rozwiązano przez cięcie cesarskie na jeden dzień przed planowanym terminem porodu. Poród odbył się poprzez CC, aby w jak największy sposób, zminimalizować ewentualne przeniesienie badanego szczepu bezpośrednio w trakcie porodu z przewodu pokarmowego matki na noworodka. Badany szczep wykryto w smółkach noworodków mysich, jedynie w grupie u których matki otrzymywały *Enterococcus faecium* JLM3. Co ciekawe, opisanej bakterii nie wyizolowano ze smółki żadnego z noworodków grupy kontrolnej. Potwierdza to możliwość translokacji bakteryjnej z przewodu pokarmowego matki na płód i może być obiecującą strategią postępowania terapeutycznego.

Jak już wspomniano kobieta ciężarna ma swój duży udział w kształtowaniu mikrobioty jelitowej swego dziecka. Podczas ciąży zachodzi u ciężarnej wiele istotnych modyfikacji w profilu bakterii zarówno pochwy jak i przewodu pokarmowego. Istnieją także doniesienia o zmianach w obrębie mikrobioty jamy ustnej ciężarnej (83). Ma to miejsce na skutek szeregu zmian, w tym hormonalnych, wzrostu masy ciała oraz adaptacji

immunologicznych i metabolicznych, które są niezbędne dla zachowania zdrowia płodu i matki. Trzeba uzmysłowić sobie, że zmiany mikrobioty na tym etapie są w pełni fizjologiczne i niezbędne. Właściwa mikrobiota w okresie ciąży jest kluczowa dla programowania zdrowia płodu i dziecka. Mikrobiota jelitowa przyszłej matki podlega następującym zmianom, zmniejsza się ogólna bioróżnorodność bakterii jelitowych, w tym spadek liczby *Faecalibacterium prausnitzii* przy jednoczesnym zwiększeniu udziału *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Zmiany obserwowane są przez cały okres ciąży, ale największe przesunięcia występują w trzecim trymestrze (84). Z kolei zmiany w mikrobiocie pochwy ciężarnej obejmują zmniejszenie bioróżnorodności bakterii, przy jednoczesnym zwiększeniu udziału pałeczek kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*) jak i względną stabilizację całej mikrobioty pochwy (85,86). W przypadku mikrobioty pochwy, w przeciwieństwie do mikrobioty jelitowej, największe przesunięcia składu obserwuje się w pierwszym trymestrze (85). Jak już wspomniano powyżej, w środowisku wewnątrzmacicznym stwierdza się także bakterie mikrobioty jamy ustnej matki i również w jej obrębie zachodzą istotne zmiany podczas ciąży. Przede wszystkim zwiększa się ogólna liczebność mikrobioty jamy ustnej, a dane sugerują, iż ciąża, zwłaszcza we wczesnym okresie, sprzyja namnażaniu się i kolonizacji patogenów przyzębia. Częstość występowania peripatogenów, *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* we wczesnym i środkowym okresie ciąży była znacząco wyższa, niż w grupie kobiet niebędących w ciąży, podczas gdy liczba bakterii *Prevotella intermedia* i *Fusobacterium nucleatum* nie uległa zmianie. Stwierdzono także wyższy odsetek występowania grzybów drożdżopodobnych w jamie ustnej kobiet w ciąży. Gatunki *Candida* spp. były częściej izolowane w połowie i późnej ciąży. Istnieją doniesienia o związku infekcji jamy ustnej a komplikacjami ciąży (87). Wykazano, że choroba przyzębia u ciężarnej zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego (88). Zatem prawidłowy profil mikrobioty tej części ciała wydaje się być także ważnym czynnikiem determinującym zdrowie dziecka. Na tą chwilę zidentyfikowano już szereg czynników mogących w trakcie ciąży wpływać na mikrobiom nie tylko matki, ale także jej dziecka.

#### **1.5.1.1. Masa ciała ciężarnej**

Zależność między składem mikrobioty jelitowej a masą ciała, została udokumentowana zarówno na modelu zwierzęcym, jak i u ludzi. Dysproporcja profilu

mikrobioty dotyczy dwóch głównych typów bakterii. U osób szczupłych stwierdza się więcej *Bacteroidetes* aniżeli *Firmicutes*, natomiast u osób otyłych jest dokładnie na odwrót (89,90). Różnice w profilu mikrobioty widoczne są także u kobiet w ciąży, które przybierają prawidłowo na masie ciała, oraz u tych z nadmiernym przyrostem masy ciała w trakcie ciąży. Wiadomym jest, iż otyłość matki wiąże się z powikłaniami w czasie ciąży i zwiększonym zagrożeniem dla zdrowia noworodków. W analizie porównującej skład mikrobioty jelitowej ciężarnych, przebadano 18 kobiet z nadwagą oraz 36 kobiet z prawidłową masą ciała. Nadmierny przyrost masy ciała podczas ciąży został sklasyfikowany jako >16,0 kg dla kobiet z początkowo prawidłową masą ciała oraz >11,5 kg dla kobiet z początkową nadwagą. Wyższa masa ciała matki oraz BMI przed zajściem w ciążę wiązały się z większą liczbą bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Clostridium* i *Staphylococcus*. Nadmierny przyrost masy ciała w ciąży był skorelowany z wyższą liczbą *Bacteroides* (91). Ponadto, zmiany w mikrobiocie jelitowej ciężarnej związane są bezpośrednio z parametrami biochemicznymi. W analizie przeprowadzonej przez Santacruz i wsp. (92) porównano zależności między mikrobiotą jelitową, masą ciała, przyrostem masy ciała i parametrami biochemicznymi u kobiet w ciąży. Do badania, zgodnie z BMI, zakwalifikowano kobiety z prawidłową masą ciała (n=34) oraz nadwagą (n=16). Skład mikrobioty jelitowej oraz wskaźniki biochemiczne w surowicy oznaczano w 24 tygodniu ciąży. Wykazano zredukowaną liczbę bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides* i jednocześnie zwiększoną liczbę bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz *Enterobacteriaceae* i *Escherichia coli* u ciężarnych z nadwagą w porównaniu ciężarnymi z prawidłową masą ciała. Liczebność *E. coli* była wyższa u kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała, aniżeli u kobiet przybierających na masie podczas ciąży prawidłowo. Liczebności *Bifidobacterium* i *Akkermansia muciniphila* wykazywały przeciwną tendencję. Wśród wszystkich badanych kobiet, zwiększenie całkowitej liczby bakterii oraz bakterii z rodzaju *Staphylococcus* było związane ze zwiększonym poziomem cholesterolu we krwi. Zwiększona liczba *Bacteroides* związana była ze zwiększonym poziomem cholesterolu HDL i kwasu foliowego oraz zredukowanym poziomem triglicerydów. Zwiększona liczba *Bifidobacterium* skorelowana była ze zwiększonym stężeniem kwasu foliowego. Z kolei, wyższa liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *E. coli* była związana ze zwiększonym stężeniem ferrytyny i jednocześnie zmniejszonym poziomem transferyny, podczas gdy wyższa liczba *Bifidobacterium* wykazywała przeciwną tendencję.

Czy wszystkie te zmiany mają znaczenie także dla rozwijającego się płodu i wpływają na mikrobiotę dziecka? W badaniu przeprowadzonym przez Collado i wsp. (93) porównano 42 pary matka–dziecko, aby ocenić wpływ masy ciała ciężarnej na mikrobiotę jelitową dziecka. Do analizy włączono 16 kobiet z nadwagą BMI  $\geq 25$  oraz 26 kobiet z normalną masą ciała BMI  $< 25$  oraz ich noworodki. Oceniano także przyrost masy ciała kobiety podczas całej ciąży. Próbki kału noworodków pobierano w 1 i 6 miesiącu życia. Wykazano, iż skład mikroflory jelit noworodków był zależny od BMI matki, jak również przyrostu masy ciała matki w trakcie okresu ciąży. U noworodków urodzonych od matek z prawidłową masą ciała i z prawidłowym przyrostem masy ciała w czasie ciąży odnotowany znacząco niższy odsetek występowania bakterii z rodzaju *Clostridium*, *Staphylococcus* czy *Bacteroides* oraz *Akkermansia muciniphila*, aniżeli w grupie matek z nadwagą. Dzieci od matek bez nadwagi, jednocześnie charakteryzowały się wyższą liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*.

Ten sam zespół badawczy w innej pracy, porównał powyższe parametry, czyli masę ciała ciężarnej i przyrost wagi podczas ciąży, na kompozycję mleka matki. Próbki mleka pobierane były po porodzie (siara) oraz w 1 i 6 miesiącu laktacji. Analizowano w nich poziomy TGF- $\beta 2$ , rozpuszczalnej formy CD14 (sCD14), cytokin (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2) oraz profil mikrobioty. W mleku matek z nadwagą wykazano wyższą liczbę bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz niższą liczbę *Bifidobacterium*, aniżeli u kobiet z prawidłową masą ciała. Ponadto, mleko matek z nadwagą, charakteryzowało się niższą zawartością TGF- $\beta 2$  oraz sCD14. Liczba bakterii *Akkermansia muciniphila* była wyższa u matek z nadwagą i skorelowana ze stężeniem IL-6 w sianie, co z kolei było związane z mniejszą liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w mleku późniejszym (94).

Masa ciała ciężarnej może zatem w bezpośredni sposób, poprzez mikrobiotę wpływać na masę ciała dziecka w przyszłości i ewentualne ryzyko otyłości, która jak wiemy pociąga za sobą szereg powikłań metabolicznych. Galley i wsp. (95) zrekrutowali 77 dzieci w wieku ok. 2 lat, w celu oceny czy otyłość u matki jest związana z różnicami w składzie mikrobiomu jelit u dzieci we wczesnym dzieciństwie. Próbki stolca analizowano w przedziale wiekowym: 18-27 miesiąca życia dziecka. Istotny wpływ otyłości na skład mikrobioty dzieci zaobserwowano szczególnie wśród grupy o wysokim statusie socjoekonomicznym. W grupie tej, dzieci matek z otyłością (BMI  $> 30$ ) w porównaniu z dziećmi od nieotyłych matek, wykazywały różnice w liczebności bakterii

*Faecalibacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Oscillibacter* spp. oraz *Blautia* spp., które w piśmiennictwie są skorelowane z różnicami w masie ciała oraz zmianami w diecie. Co więcej w grupie dzieci otyłych oraz z nadwagą, w wieku 7 lat, wyodrębnionych z prospektywnego badania follow-up, również wykazano, iż zmiany w profilu mikrobioty w okresie wczesnego dzieciństwa mogą być długofalowo skorelowane z wystąpieniem otyłości. Dzieci z normalną masą ciała charakteryzowały się wyższą liczebnością *Bifidobacterium* oraz niższą liczbą *Staphylococcus aureus* w próbkach stolca w okresie niemowlęctwa (96).

### 1.5.1.2. Stres

Czynnik stresu w okresie ciąży predysponuje zarówno do przedwczesnego porodu jak i małej urodzeniowej masy ciała, egzemy, astmy, chorób układu oddechowego oraz schorzeń skórnych (97,98,99,100,101). Stres jest czynnikiem silnie modyfikującym mikrobiotę jelitową. W badaniach na modelu zwierzęcym, Bailey i wsp. (102) wykazali, iż noworodki małe, urodzone przez samice poddawane stresowi w okresie ciąży, charakteryzowały się mniejszą liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, w porównaniu z noworodkami od matek nieeksponowanych w tym czasie na stres. Także w badaniu na modelu mysim, wykazano, iż narażenie dorosłych zwierząt na stresory powoduje redukcję liczby *Bacteroides*, przy jednoczesnym zwiększeniu liczby *Clostridium*. Powyższe wyniki są zgodne z tymi uzyskanymi na populacji ludzkiej.

Zijlmans i wsp. (103) na podstawie ankiet (ogólny niepokój, niepokój związany z ciążą, codzienne zmartwienia, codzienne zmartwienia związane z ciążą) oraz dobowego poziomu kortyzolu w ślinie, analizowali wpływ stresu matki w trakcie ciąży na mikrobiotę jelitową noworodka. Do badania zakwalifikowano 56 noworodków donoszonych, urodzonych z niepowikłanych ciąż. W grupie tej, 28 matek w czasie ciąży doświadczało niewielkiego stresu, natomiast pozostałe (n=28) narażone były na silne stresory. Próbkę kału niemowląt zbierano do 110 dni po porodzie, w 9 punktach czasowych. Wykazano, iż w grupie dzieci urodzonych przez matki doświadczające dużego stresu w okresie ciąży odnotowano spadek liczebności *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz wzrost *Proteobacteria* w porównaniu z noworodkami urodzonymi przez kobiety niezestresowane. Co więcej, powyższe zaburzenia korelowały również ze stanem zdrowia niemowląt. Obserwowano więcej objawów związanych z przewodem pokarmowym, jak i reakcji alergicznych u dzieci

z grupy matek narażonych na silny stres w ciąży. Follow-up tego badania, określał wpływ stresu i niepokoju u matki w późnej ciąży, na zdrowie dzieci w wieku od 18 miesiąca życia do 6 lat. Badanie wykazało, że niepokój matki oraz wyższe wartości kortyzolu w ciąży były związane z chorobami dróg oddechowych i układu pokarmowego u dzieci do wieku 3-3,5 roku życia. Dodatkowo dzieci matek, które miały dużo codziennych trosk, częściej otrzymywały antybiotyki w wieku 1 do 6 roku życia. Wyniki te wskazują, iż możliwe skutki niepokoju i stresu matki w trakcie późnej ciąży, wpływają na status zdrowotny dziecka w okresie niemowlęctwa i wczesnego dzieciństwa, ale zanikają w wieku starszym (104).

### 1.5.1.3. Status zdrowotny ciężarnej

Status zdrowotny matki w okresie ciąży jest generalnie jednym z istotniejszych elementów wpływających na stan i przebieg ciąży oraz zdrowie płodu i noworodka, jak również, na co wskazują nowe prace naukowe, na skład mikrobioty dziecka. Hu i wsp. (105) porównali skład mikrobioty jelitowej noworodków urodzonych przez matki z cukrzycą (typu 2 oraz ciążową), ze składem mikrobioty noworodków matek bez cukrzycy. Badacze wykazali, że profil mikrobioty jelitowej między grupami różnił się istotnie. Co więcej, skład mikroorganizmów u noworodków urodzonych przez matki z cukrzycą typu 2 był zbliżony do składu bakterii jelitowych raportowanych w kale osób dorosłych z tą samą jednostką chorobową. Oczywiście mikrobiota dzieci była mniej różnorodna, aniżeli osób dorosłych. Analiza wykazała, że najsilniejszym czynnikiem predykcyjnym składu mikrobioty smółki był stan matczynej cukrzycy poprzedzający ciążę. Liczebności *Bacteroidetes* oraz bakterii z rodzaju *Parabacteriodes* były wyższe w smółce, w grupie z cukrzycą, w porównaniu z grupą bez cukrzycy. Co ciekawe, badacze nie wykazali aby na te różnice, wpływał jakkolwiek sposób porodu. Zatem status chorobowy matki może także wpływać na stan mikroflory jelitowej jej dziecka.

Dodatkowo, związek między składem mikrobioty jelitowej noworodków, a statusem zdrowotnym matki oraz niemowląt został wykazany przez Gosalbes i wsp. (106). Badacze donieśli, że próbki smółki, które były mniej zróżnicowane i zdominowane przez bakterie rodziny *Enterobacteriaceae*, związane były z historią wyprysku atopowego u matki. Co ciekawe i dość zaskakujące, te próbki, w których dominowały bakterie kwasu mlekowego, związane były z problemami oddechowymi u niemowląt.



#### 1.5.1.4. Antybiotyki w trakcie ciąży

Wiadomym jest, iż antybiotykoterapia w istotny sposób zaburza mikrobiotę jelitową. Nowe dane wskazują jednakże, że podaż leków przeciwbakteryjnych ciężarnej może wywierać długofalowe skutki zdrowotne u dziecka, co bezpośrednio łączy się również ze zmianami jego mikrobiomu. Mueller i wsp. (107) wykazali, iż przyjmowanie przez matkę antybiotyków w drugim i trzecim trymestrze ciąży zwiększa o 84% ryzyko otyłości u dzieci w późniejszym wieku. Jednocześnie oceniając ten sam punkt końcowy, badacze wykazali, że cięcie cesarskie zwiększa ryzyko otyłości o 46%.

W badaniu przeprowadzonym przez Arboleya i wsp. (108) porównano wpływ podaży antybiotyków w okresie perinatalnym oraz wcześniactwa na rozwój mikrobioty jelitowej dziecka w 4 punktach czasowych (2, 10, 30 i 90 dni po porodzie). Oceniano 14 matek, które okołoporodowo otrzymały antybiotyk oraz 17 noworodków, którym podano antybiotyk po urodzeniu, w tym było 9 par gdzie antybiotyk otrzymała zarówno matka jak i dziecko oraz porównywano także 5 par gdzie żadne z pary (matka ani dziecko) nie otrzymało antybiotyku. Zarówno w 2. jak i 10. dobie życia nie stwierdzono istotnie statystycznych zmian między badanymi grupami. Różnice obserwowano po pierwszym miesiącu życia dziecka, ale już ok. 90. doby życia różnice praktycznie zniknęły. Liczebność *Actinobacteria* oraz *Firmicutes* była znacznie wyższa u wcześniaków nieprzyjmujących antybiotyków, aniżeli w grupach, w których matka lub matka i dziecko przyjmowało antybiotyki. Co więcej, typ *Firmicutes* był liczniejszy w grupie wcześniaków przyjmujących antybiotyki, ale których matki nie otrzymywały śródporodowej antybiotykoterapii, aniżeli u wcześniaków bez podanych antybiotyków, ale których matkom podawano antybiotyk. Z kolei, poziom *Proteobacteria* był niższy u noworodków bez antybiotyków, aniżeli w przypadkach, w których albo matka, albo cała para otrzymała antybiotyki. Co więcej, wyższe poziomy *Proteobacteria* stwierdzono u niemowląt, których matki otrzymały okołoporodową antybiotykoterapię, niż w grupie wcześniaków przyjmujących antybiotyki, ale których matki nie stosowały antybiotykoterapii. Warto zauważyć, że obserwowany efekt antybiotyków na mikrobiotę jelitową dziecka był bardziej wyraźny, gdy antybiotyki podawano matce podczas porodu, niż samemu noworodkowi. Wyniki te potwierdzają dane wskazujące na wpływ okołoporodowej ekspozycji na mikrobiotę jelitową dziecka. Inne dostępne badania, także potwierdzają negatywny wpływ, nawet jednorazowej, okołoporodowej antybiotykoterapii u matki

z uwagi na obecność paciorkowców grupy B (GBS), przedwczesnego pęknięcia błon płodowych lub cięcia cesarskiego na mikrobiotę jelitową noworodków, zarówno donoszonych, jak i przedwcześnie urodzonych (109,110,111,112).

### **1.5.2. Czynniki perinatalne**

Jak już wspomniano, sposób porodu i forma karmienia są jednymi z najistotniejszych czynników kształtujących profil mikroorganizmów jelitowych noworodka. Mikrobiota dziecka urodzonego fizjologicznie i karmionego mlekiem matki uznawana jest za najbardziej optymalną.

#### **1.5.2.1. Sposób porodu**

Pomimo wewnątrzmacicznej ekspozycji na materiał genetyczny bakterii, właściwa i masywna kolonizacja rozpoczyna się bezpośrednio w trakcie porodu. Badania porównujące skład mikrobioty jelitowej dzieci urodzonych fizjologicznie i poprzez cięcie cesarskie (CC), wskazują na duże różnice między tymi grupami i podkreślają fakt, iż sposób porodu ma bardzo istotny wpływ na kolonizację przewodu pokarmowego noworodka. Podczas porodu fizjologicznego bardzo istotnym źródłem bakterii dla noworodka przechodzącego przez kanał rodny jest pochwa matki, ale nie mniej ważnym także jej przewód pokarmowy. Wykazano, iż 72% bakterii początkowo kolonizujących przewód pokarmowy dziecka jest zgodna z mikrobiotą jelitową matki, podczas gdy dla dzieci urodzonych poprzez CC tożsamość gatunków kolonizujących jelito matki i dziecka było na poziomie 41% (113). Noworodek podczas porodu fizjologicznego w pierwszej kolejności zasiedlany jest przez względne beztlenowce, jak *E. coli*, bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus*, które mogą zajmować i kolonizować jelito w obecności tlenu. Mikroorganizmy te przygotowują środowisko jelit dziecka, które w momencie porodu nie jest jeszcze beztlenowe, i stwarzają warunki do późniejszego zasiedlenia jelit przez ściśle beztlenowce jak *Bifidobacterium*, *Bacteroides* czy *Clostridium* (114,115). Bakterie, z którymi styka się dziecko podczas przechodzenia przez kanał rodny to także rodzaje *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*, podczas gdy dzieci rodzone przez CC kontaktują się przede wszystkim z mikrobiotą skóry, głównie *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* spp. (116). Długofalowo u dzieci urodzonych przez CC stwierdza się zmniejszoną różnorodność i bogactwo mikrobów oraz opóźnioną

kolonizację *Bacteroidetes* (117). Raportuje się, iż mikrobiota jelitowa dziecka urodzonego przez cięcie cesarskie może być zaburzona przez okres 6 miesięcy, bądź jak mówią inne dane nawet do 7 lat (118). Co istotne, cięcie cesarskie populacyjnie związane jest ze zwiększonym ryzykiem występowania alergii, w tym pokarmowej (119), astmy (120), cukrzycy typu 1 (121), celiakii (122), nadwagi i otyłości (123). W ostatnich latach znacząco wzrosła liczba porodów odbywających się przez cięcie cesarskie, bez wyraźnych wskazań medycznych. Trend ten obserwowany jest na całym świecie, szczególnie w krajach rozwiniętych. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. WHO) rekomenduje, aby cięcie cesarskie nie przekraczało 5-15% wszystkich porodów. Jednakże, zarówno polskie, jak i światowe dane wskazują, iż odsetek ten jest znacznie wyższy (124). W naszym kraju, w 2011 r. wykonano prawie 300 cięć cesarskich na 1000 żywych urodzeń (125). W Stanach Zjednoczonych odsetek cięć cesarskich wzrósł między 1996 a 2007 r. aż o 48% i osiągnął wartość 31,8% w 2007 r. Także w innych częściach świata obserwuje się to zjawisko, w Chinach odsetek cięć cesarskich wynosi blisko 50%, a niektóre prywatne kliniki w Brazylii osiągają wartość nawet 80% (63). W związku z tą niepokojącą tendencją oraz jednoznacznym związkiem między zaburzeniami mikrobioty jelitowej w przebiegu CC, a zwiększonym ryzykiem chorób cywilizacyjnych w tej grupie dzieci w przyszłości, powstaje pytanie, czy istnieje metoda przywracająca równowagę mikrobioty jelitowej noworodków rodzących się w ten sposób? Wiadomym jest, iż jak najszybsze wprowadzenie karmienia piersią u dzieci rodzonych przez CC wpływa korzystnie na proces kształtowania się mikrobioty jelitowej i moduluje na pewnym poziomie suboptymalną kolonizację tej grupy noworodków. Jednakże nadal poszukuje się rozwiązania, które pozwoli na odtworzenie warunków naturalnego porodu w aspekcie mikrobiomu. Takim rozwiązaniem może okazać się w przyszłości procedura ‘vaginal seeding’, czyli tłumacząc dosłownie ‘wysiewanie’ noworodka urodzonego cięciem cesarskim mikrobiotą pochodzącą z pochwy matki (transfer mikrobioty pochwy). Metoda ta polega na umieszczeniu w pochwie matki sterylnej gazy na godzinę przed planowanym cięciem cesarskim, i w ciągu kilku pierwszych minut po wydobyciu dziecka, przetarcia go dokładnie ową gazą skolonizowaną przez znajdujące się w pochwie mikroorganizmy. Pierwsze tego typu pilotażowe badanie, typu ‘proof of concept’ przeprowadziła wraz z zespołem Maria Dominguez-Bello (126). Analiza przeprowadzona została na 18 noworodkach i ich matkach, z czego 7 porodów odbyło się fizjologicznie, a 11 poprzez cięcie cesarskie. Z grupy niemowląt urodzonych poprzez CC, 4 zostało poddanych

procedurze transferu mikrobioty pochwy matki. Ciężarne zrekrutowane do badania nie mogły być nosicielkami bakterii *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* gr. B; ang. GBS, Group B *Streptococcus*) oraz nie mogły prezentować cech stanu zapalnego pochwy (pH pochwy <4,5). Wszystkie kobiety otrzymały okołoporodową profilaktykę antybiotykową zgodnie z obowiązującymi wytycznymi (127). Po porodzie, który odbył się poprzez CC, w ciągu pierwszych 1-3 minutach życia całe ciało dziecka było przecierane gazą – wcześniej inkubowaną w pochwie matki – począwszy od ust, w następnej kolejności twarz i reszta ciała. Jednocześnie, w przeciągu pierwszego miesiąca w celu oceny kolonizacji noworodka, zarówno od matki i dziecka pobierano wymazy z różnych części ciała tj. skóra, odbył, jama ustna, kolejno w 1, 3, 7, 14, 21 i 30 dniu po porodzie. Analiza pobranych próbek wykonana metodami molekularnymi (sekwencjonowanie regionu V4 16S rRNA) wykazała, że mikrobiota noworodków, u których zastosowano powyższą metodę bardziej przypominała swym składem mikrobiotę wydzieliny pochwowej znajdującej się na gazie oraz mikrobiom dzieci urodzonych fizjologicznie, w porównaniu z dziećmi urodzonymi poprzez CC bez tej interwencji. Co więcej, przeniesiona za w ten sposób mikrobiota utrzymywała się na skórze, w odbycie i jamie ustnej przez pierwszy miesiąc życia dziecka, czyli okres, w którym prowadzono analizę. Najlepiej widoczne było to w przypadku rodzaju *Bacteroides* spp. oraz *Lactobacillus* spp., gdzie kolonizacja tymi bakteriami u dzieci eksponowanych przebiegała podobnie jak u tych urodzonych drogą pochwową. Jednakże, pomimo powyższych pozytywnych danych transmisja bakteryjna nie była w pełni kompletna. Dodatkowo, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nie utrzymały się na skórze noworodków poddanych procedurze w takim samym stopniu jak u dzieci urodzonych fizjologicznie, a liczba mikroorganizmów kolonizujących układ pokarmowy była znacznie niższa w porównaniu z dziećmi urodzonych siłami natury. Nie zmienia to jednak faktu, że otrzymane rezultaty są bardzo obiecujące pomimo, że grupa badana była mało liczna, a okres obserwacji krótki. Wyniki analizy wskazują, że ekspozycja noworodka urodzonego przez cięcie cesarskie na mikrobiotę dróg rodnych matki poprzez przetarcie gazą może częściowo przywrócić prawidłowy profil kolonizacji jelit, zaburzony poprzez poród operacyjny. Dla oceny skuteczności proponowanej metody jako próby odbudowy zaburzonego procesu kształtowania się mikrobioty jelitowej konieczne są dalsze, dłużej trwające badania populacyjne. Sceptycy, którzy opowiadają się negatywnie za ową procedurą, podnoszą fakt, iż poprzez zastosowanie gazy możemy zakazić noworodka patogenami z dróg

rodnych matki jak: *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Herpes simplex*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*. Teoretycznie potencjalne zagrożenie istnieje zawsze, ale nie większe niż podczas porodu fizjologicznego, kiedy to noworodek przechodząc przez kanał rodny matki zawleka większość mikroorganizmów z jej pochwy. Co więcej, standardowo w Polsce każda ciężarna przed porodem badana jest rutynowo jedynie na obecność GBS, nie wykonuje się oznaczenia w kierunku pozostałych patogenów. Zatem można zaryzykować stwierdzenie, iż podczas wykonywania procedury ‘vaginal seeding’ kobieta będzie miała wykonany szerszy screening, co może przynieść wymierne korzyści zdrowotne. Oczywiście dalsze badania określające poza skutecznością także bezpieczeństwo wspomnianej procedury są wymagane i konieczne. Warto zaznaczyć, iż na tą chwilę procedura ta, nie jest rutynowo wykonywana w naszym kraju.

W najnowszych doniesieniach podkreśla się także fakt, iż nie tyle sama procedura cięcia cesarskiego wywiera tak katastrofalny skutek na mikrobiotę jelitową dziecka, jak antybiotyki stosowane u matki okołoperacyjnie podczas tej formy porodu. Wiadomym jest, iż cięcie cesarskie jako operacyjna metoda porodu, związana jest z podaniem antybiotyku każdej matce rodzącej w ten sposób.

#### **1.5.2.2. Wiek ciążowy**

Dane na temat kształtowania się fizjologicznej mikrobioty u wcześniaków są ograniczone. Noworodki przedwcześnie urodzone, z bardzo małą masą ciała mają zwiększone ryzyko dysbiozy jelit z uwagi na szereg parametrów, w tym fizjologiczną niedojrzałość oraz poporodowe czynniki które diametralnie zakłócają właściwą kolonizację jak: prenatalne interwencje (steroidoterapia, antybiotykoterapia), zazwyczaj poród CC, brak lub opóźnione karmienie piersią, środowisko oddziału intensywnej terapii (ang. NICU), podaż antybiotyków już u ciężarnej zagrożonej przedwczesnym porodem. Wszystkie wymienione mają udokumentowany negatywny wpływ na stan mikrobioty. Podczas gdy powyższe czynniki łącznie wpływają przede wszystkim na obniżenie poziomu *Bifidobacterium*, sugeruje się, że wcześniactwo może wywierać taki efekt niezależnie. W badaniu przeprowadzonym przez Butel i wsp. (128) liczebność tego rodzaju bakterii oceniono u noworodków urodzonych w 30-35 tygodniu wieku ciążowego i podzielono je na te karmione piersią bądź mieszankami, jak również pod względem porodu i urodzeniowej masy ciała czy ekspozycji na antybiotyki. Na kolonizację przez

bifidobakterie nie wpłynęła ani masa urodzeniowa, ani sposób porodu, ani też antybiotyki podawane matce lub noworodkowi. Natomiast wiek ciążowy istotnie wpływał na poziom *Bifidobacterium* ( $p < 0,05$ ) i bakterie te zawsze występowały u dzieci urodzonych w wieku ciążowym powyżej 32,9 tygodni.

Z kolei, Arboleya i wsp. (129) przeanalizowali mikrobiotę jelitową wcześniaków ( $n=27$ ) i noworodków donoszonych ( $n=13$ ), w 4 punktach czasowych (2, 10, 30 i 90 dni po porodzie). Autorzy stwierdzili, iż niedojrzałość noworodka wpływa na jego mikrobiotę jelitową istotnie, powodując zmniejszony udział bakterii *Bacteroidaceae* w pierwszych miesiącach życia i wyższy początkowy odsetek *Lactobacillaceae* u wcześniaków w porównaniu z dziećmi donoszonymi. Wcześniaki miały znacznie niższą liczebność *Bacteroidetes* po 10, 30 i 90 dniach, a wyższy odsetek *Proteobacteria*, przy niższym *Actinobacteria* w 10 i 30 dniach. W kontynuacji badania, opublikowanego rok później, ci sami badacze przedstawili zmiany mikrobioty u wcześniaków, na wyższym poziomie taksonomicznym drobnoustrojów. Wykazano, iż wcześniaki w drugiej dobie życia charakteryzowały się wyższym odsetkiem *Firmicutes*, a w 10 i 30 dobie życia stwierdzano u nich więcej *Proteobacteria* w porównaniu z noworodkami donoszonymi. Ponadto, noworodki przedwcześnie urodzone wykazały zredukowaną liczbę *Bacteroidetes* począwszy od 2 dnia życia do 3 miesiąca życia, oraz mniejszą liczbę *Actinobacteria* przez okres pierwszego miesiąca. Co więcej, w analizie tej dodatkowo określano poziom SCFA w tych samych punktach czasowych co profil mikrobioty. Stwierdzono istotnie niższe stężenie całkowitego jak i poszczególnych SCFA (maślanu, octanu, propionianu) w kale u wcześniaków, w porównaniu z noworodkami donoszonymi. Różnice te były widoczne w początkowych próbkach, ale w 90 dobie życia zaniknęły. Zmiana wzorca SCFA u wcześniaków wskazuje na zmianę funkcjonalności odmiennego profilu mikrobioty u tej grupy dzieci (108).

U noworodków urodzonych o czasie dominują bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, natomiast u wcześniaków te z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* oraz z rodzaju *Klebsiella*, *Clostridium*, *Weissella* (130,131). Dodatkowo mikrobiota jelitowa wcześniaków, szczególnie tych z małą i bardzo małą urodzeniową masą ciała, jest mniej różnorodna i bardziej niestabilna aniżeli noworodków donoszonych (132). Zmieniona kolonizacja bakteryjna u wcześniaków postulowana jest jako jeden z czynników martwiczego zapalenia jelit noworodków

(ang. NEC, necrotizing enterocolitis) (133). Wiek ciążowy to ważny czynnik, który zasadniczo wpływa na długofalowe ustanowienie mikrobioty jelitowej dziecka.

### 1.5.3. Czynniki postnatalne

#### 1.5.3.1. Forma karmienia

Po porodzie to sposób karmienia dziecka jest jednym z najistotniejszych czynników wpływających na skład kolonizujących go bakterii. Co istotne, także w życiu dorosłym jednym z najważniejszych czynników wpływających na mikrobiotę jest właśnie dieta. Nie ulega wątpliwości, iż nie ma lepszego pokarmu dla noworodka jak mleko matki, na wszystkich płaszczyznach rozwoju dziecka: troficznym, immunologicznym czy metabolicznym. Nie mniej jednak, mleko matki wspiera także zasiedlanie i dojrzewanie mikrobioty jelitowej noworodka. Wiadomym jest aktualnie, że mleko kobiece nie jest jałowe. Pokarm matki jest swoistym synbiotykiem, czyli połączeniem prebiotyku jak i korzystnych, prozdrowotnych bakterii. Mikrobiota mleka ludzkiego zdominowana jest głównie przez kilka rodzajów bakterii, w tym *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, a rozwój technik molekularnych dostarczył informacji o obecności w mleku także takich rodzajów jak *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, co sugeruje istotny udział pokarmu kobiecego w procesie ustalania składu mikrobioty jelit noworodka (134,135).

Zarówno u dzieci karmionych naturalnie jak i sztucznie bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* stanowią bardzo liczną grupę, nie mniej jednak u dzieci karmionych mlekiem matki stają się one dominujące. U niemowląt karmionych piersią skład mikrobioty jelit bardziej stabilny i jednolity w porównaniu z dziećmi karmionymi mieszankami (136).

Z kolei dzieci karmione sztucznie wykazują większe zróżnicowanie mikrobioty jelit oraz częstsze występowanie bakterii z rodzaju *Clostridium difficile*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis* przy jednoczasowym zmniejszeniu liczby *Bifidobacterium* (114). Co ciekawe karmienie mieszane, i to nawet podaż niewielkich ilości mleka modyfikowanego w trakcie jednoczesnego karmienia piersią, wpływa na zmianę zarówno profilu mikrobioty jelit jak i liczebności poszczególnych bakterii w porównaniu z wyłącznym karmieniem naturalnym (136,137). Badania z zastosowaniem metod genetycznych wykazały obecność zarówno

w mleku matki, jak i przewodzie pokarmowych noworodków karmionych piersią obecność tych samych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* (138,139). Przeprowadzono do tej pory szereg analiz, których celem było określenie, które bakterie mogą skolonizować jelita noworodka, w transmisji wertykalnej z mleka kobiecego bezpośrednio do jelit dziecka. W badaniach tych porównywano mikrobiotę mleka z próbkami kału noworodków i wykazano, że ograniczona liczba gatunków jak *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *Lactobacillus fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. vaginalis* oraz *Escherichia/Shigella* spp. pokrywa się między próbkami (140). Bardzo istotne jest także ustalenie źródła pochodzenia i sposobu przenoszenia bakterii do mleka matki. Skąd biorą się mikroorganizmy w gruczołach piersiowych, czy jest to przewód pokarmowy, pochwa, a może jama ustna dziecka? Dane te, pozostają w dalszym ciągu do zweryfikowania. Na tą chwilę istnieją pewne hipotezy określające transmisję mikroorganizmów do mleka kobiecego. Na pewno zmiany fizjologiczne w czasie ciąży i po porodzie ułatwiają migrację bakterii do gruczołu sutkowego, w tym zmiany hormonalne, które mogą mieć wpływ na zwiększoną przepuszczalność jelit, co z kolei ułatwia wychwytywanie i przechodzenie bakterii. Dodatkowo, bakterie z przewodu pokarmowego matki mogą być przechwytywane przez różne komórki układu odpornościowego. Wzmoczona migracja komórek immunologicznych do gruczołów sutkowych może stanowić kolejny szlak prowadzący do budowania swoistej mikrobioty pokarmu kobiecego. Inna hipoteza mówi o działaniu dwukierunkowym, kiedy mikrobiota na skórze kobiety oraz mikrobiota jamy ustnej niemowlęcia przyczyniają się do tworzenia mikrobiomu mleka, tzw. strumień wsteczny (ang. retrograde flux) (141). Na pewno ten szlak jest istotny w ustalaniu specyficznego profilu mikrobioty mleka nie mniej jednak, nie jedyny. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* to ściśle beztlenowce, a więc mało prawdopodobne jest, że są one transportowane z ust dziecka na skórę piersi. Jednakże, tej możliwości nie można całkowicie wykluczyć, ponieważ może to być zależne od konkretnego szczepu. Po drugie, w próbkach siary pobranych jeszcze przed narodzeniem dziecka, stwierdza się już obecność bakterii (141). Co więcej, podczas doustnej podaży probiotyków kobietom w okresie laktacji, z ich mleka można wyizolować te same szczepy probiotyczne co podawane doustnie (142).

Prebiotykiem w pokarmie matki są liczne oligosacharydy mleka ludzkiego (HMOs, ang. human milk oligosacharydes), promujące rozwój prozdrowotnej mikrobioty jelitowej



niemowlęcia, w szczególności rodzaju *Bifidobacterium*. Dodatkowo, poszczególne oligosacharydy wchodzi w bezpośrednią interakcję z powierzchnią chorobotwórczych bakterii i uważa się, że hamują wiązanie patogenów i toksyn z receptorami komórek gospodarza. Wykazano, iż mleko ludzkie zawiera ok. 200 unikatowych HMOs (115). Ich proporcje oraz stężenie ulegają zmianom podczas laktacji oraz czasu zakończenia ciąży. Poziom HMO w początkowym pokarmie kobiet, które urodziły wcześniaki jest znacznie wyższy w porównaniu z matkami, które urodziły o czasie (2,6 g/dl vs. 0,5-1 g/dl) (143). Duża koncentracja i różnorodność strukturalna oligosacharydów w mleku jest unikalną właściwością ludzi. Stanowią one trzecią, co do ilości grupę cząsteczek obecnych w mleku. Pod względem budowy HMO to oligomery węglowodanowe, glikany, które odporne są na enzymy trawienne w przewodzie pokarmowym człowieka. Są pierwszymi prebiotykami w jelicie grubym niemowlęcia, stanowiąc idealną pożywkę dla prozdrowotnych bakterii sacharolitycznych (144). Co ciekawe, produkcja oligosacharydów to bardzo duży wydatek energetyczny dla organizmu matki, zważywszy na fakt, że nie stanowią one bezpośrednio żadnej wartości odżywczej dla noworodka. Są natomiast głównym pożywieniem dla bakterii jelitowych, a w konsekwencji pośrednio wywierają długofalowy wpływ na zdrowie dziecka. Główną grupą bakterii rozkładających HMOs są gatunki *Bifidobacterium*, w tym np. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*, które początkowo stanowią dominującą mikrobiotę u dzieci karmionych piersią i mogą odgrywać zasadniczą rolę w kształtowaniu i zachowaniu zdrowia u noworodków. Warto tu zaznaczyć, iż w mleku matki występują także glikoproteiny, które mogą być również dodatkowym źródłem selektywnych substratów dla promocji wzrostu wspomnianych bakterii (145). *Bifidobacterium longum* zawiera szereg genów kodujących glikozydazy, czyli enzymy rozcinające wiązania pomiędzy cząsteczkami cukrów prostych w węglowodanach złożonych, jak i błonowych cząsteczek transportujących, które nie są stwierdzane w innych gatunkach bakterii jak i samego człowieka. W badaniu przeprowadzonym przez Schell i wsp. (146) wykazano, że genom *B. longum* NCC27 w ponad 8% stanowią geny związane z metabolizmem oligosacharydów, a sekwencji nukleotydowych dla samych tylko hydrolaz glikozydowych jest ponad 40. W warunkach *in vitro* wspomniany *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* wzrasta lepiej w obecności HMOs niż inne szczepy bakterii, prezentując działanie przeciwzapalne jak i zmniejszające przepuszczalność jelitową (147). Co istotne, prebiotyki dodawane do mieszanek mlekozastępczych dla niemowląt, różnią się strukturalnie od oligosacharydów

występujących naturalnie w mleku ludzkim, przez co nie są w stanie naśladować szeregu specyficznych właściwości HMOs, które są swoiste ze względu na ich unikatową strukturę (115).

Skład mikrobioty mleka zmienia się wraz z dojrzałością pokarmu podczas okresu laktacji (148). Jest również zależny od wieku ciążowego oraz sposobu porodu (148,149). W badaniu przeprowadzonym przez Khodayar-Pardo i wsp. (148) wykazano, iż najliczniejszymi bakteriami w analizowanych próbkach mleka były bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Streptococcus* oraz *Enterococcus*. Porównano 96 próbek mleka, zbieranych cyklicznie od 32 zdrowych kobiet, w tym od 19 kobiet, które urodziły przedwcześnie, 13 które urodziły o czasie, 15 które urodziły fizjologicznie oraz 17 poprzez cięcie cesarskie. Całkowita liczba bakterii jak i liczba rodzajów *Bifidobacterium* i *Enterococcus* spp. zwiększała się w trakcie laktacji. Przez wszystkie analizowane fazy laktacji w próbkach pobranych od kobiet, które urodziły o czasie oraz tych które rodziły fizjologicznie bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazywały wyższą liczebność, aniżeli w próbkach mleka od matek, które urodziły przedwcześnie bądź u których poród odbył się poprzez CC. Ponadto, wyższą liczebność bakterii odnotowano w sianie oraz mleku przejściowym w przypadku porodów poprzez cięcie cesarskie.

Wczesny mikrobiom dziecka po okresie wyłącznego karmienia mlekiem i wprowadzeniu pokarmów uzupełniających ulega zmianie, z mikroorganizmów utylizujących mleczany na mikroby wykorzystujące także składniki pożywienia stałego (150).

### **1.5.3.2. Ekspozycja na antybiotyki**

Jak już wspomniano powyżej, podaż antybiotyku ciężarnej wiąże się, z zaburzeniami profilu mikrobioty jej dziecka. Nie mniej, negatywne konsekwencje wywiera także podaż antybiotyku samemu noworodkowi, szczególnie w początkowym okresie życia, kiedy rozpoczyna się dopiero dynamiczny proces kolonizacji, co ma znaczenie w aspekcie kształtowania układu immunologicznego. Wczesne stosowanie antybiotyków może mieć zatem swoje konsekwencje w przyszłości, w zakresie rozwoju chorób cywilizacyjnych.

W badaniu przeprowadzonym przez Tanaka i wsp. (151) oceniano wpływ wczesnej ekspozycji na antybiotyki u noworodków, na skład mikrobioty jelitowej. Analizą objęto 26 niemowląt, w tym osiemnaścioro urodzonych fizjologicznie, bez podanych

antybiotyków, pięcioro leczonych antybiotykami o szerokim spektrum działania w ciągu pierwszych 4 dni życia oraz troje bez antybiotyków, urodzonych poprzez CC, którym matkom podano dożylnie ten sam typ antybiotyków. Skład mikrobioty jelitowej analizowano codziennie przez pierwszych 5 dni życia, a później co miesiąc przez 2 miesiące. Wykazano mniejszą różnorodność bakterii, w tym zredukowaną liczbę *Bifidobacterium* oraz większą liczbę *Enterococcus* w pierwszym tygodniu życia u dzieci, u których podano antybiotyk w porównaniu do kontroli bez antybiotyku. Co więcej, po 1 miesiącu życia, odsetek bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, był znacząco wyższy w grupie leczonej antybiotykami, aniżeli w grupie kontrolnej. Dzieci z grupy urodzonej przez CC, których matki otrzymały antybiotyk utrzymywały podobne zmiany w profilu mikrobioty do dzieci leczonych antybiotykami, choć były one stosunkowo słabsze. Wskazuje to na fakt, iż wczesna podaż antybiotyków istotnie wpływa na kształtowanie się mikrobioty jelitowej noworodków.

W innym badaniu oceniano wpływ podaży ampicyliny i gentamycyny w ciągu pierwszych 48 godz. życia noworodka. Próbkę stolca pod kątem składu mikrobioty analizowano w 4 i 8 tygodniu po zakończeniu leczenia. Do badania włączono 9 noworodków z wdrożoną antybiotykoterapią oraz 9 w grupie kontrolnej, bez antybiotyku. Badanie wykazało, że dzieci leczone antybiotykami 4 tygodnie po zaprzestaniu leczenia wykazywały znacząco wyższy odsetek *Proteobacteria* i znacznie mniejsze proporcje *Actinobacteria*, a na poziomie rodzaju mniej *Bifidobacterium*, jak również *Lactobacillus*, aniżeli nieleczone kontrole. Po 8 tygodniach od ostatniej dawki antybiotyku, u dzieci leczonych w dalszym ciągu stwierdzono wyższy poziom *Proteobacteria*, z kolei odsetki *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* były już zbliżone do próbek kontrolnych (152). Zatem stosowanie ampicyliny i gentamycyny, jak i innych antybiotyków, we wczesnym okresie życia może mieć znaczący wpływ na rozwój mikrobioty niemowląt, a przez to długoterminowe konsekwencje dla zdrowia. Wpływ wczesnej antybiotykoterapii na ryzyko otyłości oceniali Saari i wsp. (153). W swym badaniu przebadali kohortę 6114 zdrowych chłopców i 5948 zdrowych dziewczynek. Dokonano podstawowych pomiarów masy ciała oraz wzrostu w 24 miesiącu życia. Dzieci podzielono na te, które otrzymywały w swym życiu antybiotyki, oraz na takie, które w ciągu dwóch lat nie miały ekspozycji na leki przeciwbakteryjne. Wykazano, iż dzieci przyjmujące antybiotykoterapię w pierwszym okresie swego życia, czyli wtedy, kiedy kształtuje się mikrobiota jelitowa, miały wyższą masę ciała niż dzieci nie

przyjmujące antybiotyków. Zależność ta była widoczna zarówno u dziewczynek jak i chłopców. Korelacja była największa, kiedy dziecko przyjmowało makrolidy przed 6. miesiącem życia oraz kiedy kursów antybiotykowych było więcej niż jeden. Nie stwierdzono takich zależności dla wzrostu w badanych grupach. Badacze wnioskuje więc, iż antybiotykoterapia przed 6. miesiącem życia, jak również jej powtarzalność w pierwszych dwóch latach życia dziecka może być czynnikiem rozwoju otyłości u dzieci. Podobne wyniki uzyskał zespół Azad i wsp. (154), którzy oceniali wpływ antybiotykoterapii w pierwszym roku życia na nadwagę oraz otyłość brzuszną u dzieci w wieku 7 i 9 lat. Badacze wykazali, iż niemowlęta, które otrzymywały antybiotykoterapię w przeciągu pierwszego roku życia były bardziej narażone na nadwagę w wieku 9 lat oraz otyłość brzuszną w wieku 12 lat. Zależność ta dotyczyła wyłącznie chłopców, nie wykazano istotności statystycznej dla grupy dziewczynek. Co ciekawe w innym badaniu, oceniającym kohortę 979 dzieci, określano wpływ wczesnej podaży antybiotyków na nadmierną masę ciała w wieku 10 lat. Uzyskano ciekawe wyniki, które mówiły o tym, iż dzieci, które otrzymały jednorazowo antybiotyk przed 6 miesiącem życia, w porównaniu z dziećmi, które nie dostały w tym czasie leczenia, były narażone na wyższą masę ciała oraz wyższy wzrost. Ekspozycja na dwa lub więcej antybiotyków w przeciągu drugiego roku życia także wykazywały większą masę ciała i wyższy wzrost. Co istotne, nie wykazano takich korelacji, kiedy antybiotyki były podawane w późniejszym okresie życia dziecka. Dane te wskazują, na istotny udział pierwszych lat życia dziecka w długofalowym programowaniu zdrowia człowieka (155). Z kolei Korpela i wsp. (156) porównywali BMI dzieci w wieku 5-6 lat, z profilem mikrobioty jelitowej oraz historią ekspozycji na antybiotyki w dwóch populacjach, holenderskiej i fińskiej. Liczba bakterii z rodzaju *Streptococcus* pozytywnie korelowała z BMI, a z kolei liczba *Bifidobacterium* korelowała negatywnie. Zależność ta była szczególnie widoczna u dzieci, które otrzymywały w przeszłości antybiotyki. Badacze postulują, iż mikrobiota jelitowa niemowląt może być parametrem predykcyjnym dla późniejszego BMI i może służyć jako wczesny wskaźnik ryzyka otyłości.

### 1.5.3.3. Środowisko i styl życia

W różnych częściach świata odmienna jest dieta, jak i styl życia. Środowisko w jakim żyjemy, pożywienie które jemy oraz otoczenie będą miały olbrzymie znaczenie dla składu naszych mikroorganizmów jelitowych, także w początkowym okresie życia.

Fallani i wsp. (157) postanowili ocenić wpływ położenia geograficznego na mikrobiotę jelitową u 6. tygodniowych niemowląt, w 5 różnych, europejskich krajach: Szwecji, Szkocji, Niemczech, Włoszech i Hiszpanii. Przebadano 606 dzieci. U wszystkich badanych niemowląt dominującym rodzajem bakterii był *Bifidobacterium* (40%), następnie *Bacteroides* (11,4%) oraz rodzina *Enterobacteriaceae* (7,5%). Niemowlęta urodzone w krajach Europy Północnej charakteryzowały się wyższym odsetkiem *Bifidobacterium*, podczas gdy mikrobiota dzieci z krajów Europy Południowej, była bardziej zróżnicowana. Co więcej, oceniano także inne czynniki i wykazano, że dzieci karmione piersią miały wyższy odsetek *Bifidobacterium*, a te karmione mieszankami charakteryzowały się wyższą liczbą *Bacteroides*, *Clostridium* oraz *Lactobacillus*. Noworodki urodzone poprzez CC, lubte, których matki otrzymywały antybiotyki, wykazywały niższy udział *Bacteroides* oraz *Atopobium*.

Nie tylko miejsce zamieszkania, ale także najbliższe otoczenie determinuje skład mikrobioty jelitowej. Dzieci, które mają starsze rodzeństwo mają bardziej zróżnicowaną mikrobiotę, niż te które są jedynakami. Wykazano, że mikrobiota jelitowa jedynaków jest uboższa pod względem liczebności *Bifidobacterium* w pierwszym miesiącu życia, aniżeli dzieci posiadających rodzeństwo (158). Pokuszono się także o analizę wpływu zwierząt domowych i rodzeństwa na mikrobiotę jelitową niemowląt. W badaniu przeprowadzonym przez Azad i wsp. (159) przeanalizowano 24 niemowlęta, w wieku 3-4 miesięcy, w tym 15 miało zarówno rodzeństwo, jak również przynajmniej jednego psa lub kota. Wykazano większą bioróżnorodność mikrobioty jelitowej u dzieci wychowujących się ze zwierzętami. Inne, bardzo duże badanie przeprowadzone na ponad milionie dzieci, w wieku przedszkolnym i szkolnym, urodzonych w Szwecji w latach 2001-2010, oceniało wpływ zwierząt domowych i hodowlanych na ryzyko wystąpienia astmy. Badacze wykazali, iż dzieci w wieku szkolnym, które wychowywały się z psem miały o 13% mniejsze ryzyko wystąpienia astmy, aniżeli ich rówieśnicy nie posiadający psów. Kontakt dzieci ze zwierzętami hodowlanymi, zarówno w wieku przedszkolnym, jak i szkolnym także obniżał ryzyko wystąpienia astmy (160). Z kolei, Thorsteinsdottir i wsp. (161) wykazali, iż obecność psa w domu zmniejsza ryzyko wystąpienia atopowego zapalenia skóry u dzieci w wieku 3 lat. Natomiast Wernroth i wsp. (162) nie wykazali korelacji wczesnej ekspozycji na obecność psa, a ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 1 u dzieci.

Warto w tym miejscu przytoczyć także pracę Wu i wsp. (163). Badacze na dużej kohorcie dzieci (n=136 098) przeanalizowali matczyne i noworodkowe czynniki ryzyka

wystąpienia astmy, jak zakażenia układu moczowego u matki w czasie ciąży i przebyte w związku z tym antybiotykoterapie, kolonizację *Streptococcus agalactiae*, sposób porodu, podaż antybiotyków noworodkowi, oraz starsze rodzeństwo w domu. Wykazano, iż ryzyko astmy zwiększa się ośmiokrotnie u dzieci, w wieku 4,5-6 lat, kiedy dziecko urodziło się przez cięcie cesarskie, kiedy była stosowana antybiotykoterapia u dziecka, oraz u matki oraz kiedy dziecko było jedynakiem.

Potwierdza to zależności wynikające z tzw. teorii higieniczności Strachana, gdzie model rodziny z jednym dzieckiem jest czynnikiem zakłócającym mikrobiotę jelitową z uwagi na mniejszą ekspozycję antygenową w najbliższym otoczeniu. W 1989 r. David Strachan w populacji brytyjskiej zaobserwował, odwrotną korelację między liczebnością rodziny, a epizodami kataru siennego. Strachan, który zapoczątkował hipotezę higieniczną, zaproponował, że wzrost odsetka chorób alergicznych, wynika z coraz lepszych warunków sanitarnych i zmniejszonego narażenia na czynniki infekcyjne (164). Niewątpliwie w rodzinach wielodzietnych, występuje większa ekspozycja na czynniki mikrobiologiczne, które stymulując układ immunologiczny.

### **1.6. Zaburzenia mikrobioty a NEC**

Jednym z najpoważniejszych powikłań wcześniactwa jest martwicze zapalenie jelit noworodków (ang. necrotizing enterocolitis, NEC). Jest to jedna z najpoważniejszych chorób układu pokarmowego, głównie w grupie wcześniaków, obarczona wysokim odsetkiem śmiertelności. Ryzyko wystąpienia NEC jest odwrotnie proporcjonalne do wieku ciążowego i urodzeniowej masy ciała. Występuje u 4-6% noworodków przedwcześnie urodzonych z bardzo małą masą ciała (<1500 g) i u 9-14% wcześniaków z ekstremalnie małą masą ciała (<1000 g) (133,165,166,167,168). Bardzo poważne są także powikłania NEC jak: późna sepsa, przedłużone żywienie parenteralne, interwencje chirurgiczne, zaburzenia neurorozwojowe, zaburzenia wzrostu oraz zespół krótkiego jelita (133,165,166,169,170). Patogeneza choroby jest wieloczynnikowa, do tej pory nie udało się zidentyfikować jednego głównego czynnika ryzyka wystąpienia NEC. Z tego względu NEC w dalszym ciągu, jest bardzo istotnym problemem epidemiologicznym i stanowi olbrzymie wyzwanie dla neonatologów. Wystąpieniu choroby sprzyjają: wcześniactwo, mała urodzeniowa masa ciała, niedojrzałość układu pokarmowego, niedotlenienie i niedokrwienie płodu, transfuzja wymienna krwi, stosowanie inhibitorów pompy protonowej, karmienie mieszankami mlekozastępczymi, oraz coraz częściej raportowane

zaburzenia fizjologicznej mikroflory jelitowej (171,172,173). Nadal brakuje jednak, jednoznacznych markerów laboratoryjnych, które poprzedzałyby wystąpienie choroby. Dysbioza jelitowa, czyli zaburzenia w mikrobiocie jelitowej, stanowi istotny element patogenezy NEC. W takim przypadku mamy do czynienia ze zmianami w funkcjonowaniu bariery jelitowej, czyli rozszczelnienie tight junctions, zaburzenia mikrokrążenia, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej przepuszczalności jelit (172). Jednakże i w tym przypadku nie udało się stwierdzić jednego rodzaju bakterii bądź grup bakterii, które byłyby czynnikiem predykcyjnym choroby (174). Badacze aktualnie przyjmują stanowisko, iż są to całościowe zmiany w profilu mikroflory jelitowej w tej grupie dzieci. Co istotne NEC nigdy nie występuje w sterylnym środowisku (175,176), co potwierdza udział czynnika mikrobiologicznego w patogenezie choroby.

W badaniu przeprowadzonym przez Warner i wsp. (177) porównywano mikroflorę wcześniaków, z bardzo małą masą ciała ( $\leq 1500$  g), u noworodków które rozwinęły stopień II i III NEC, a dopasowanymi do nich kontrolami, bez choroby. Wykazano, iż mikroflora jelitowa między badanymi grupami różni się znacząco. Rozwinięcie NEC było pozytywnie skorelowane z *Gammaproteobacteria*, i odwrotnie skorelowane z obecnością bezwzględnie beztlenowych bakterii, szczególnie *Negativicutes*. Z kolei, Ward i wsp. (178) skorelowali obecność uropatogennej *E. coli* (ang. uropathogenic *E. coli*, UPEC) z ryzykiem wystąpienia NEC i późniejszą śmiertelnością. Zespół badawczy Heida i wsp. (179) poszukiwał z kolei, markera prognostycznego wystąpienia NEC u noworodków z grupy wysokiego ryzyka. Z włączonych do badań dzieci, 11 przypadków rozwinęło chorobę, a 22 pacjentów nie. Próbkę stolca pobierano począwszy od smółki, a następnie dwa razy w tygodniu aż do rozwinięcia NEC. Do końcowej analizy wzięto pod uwagę próbki smółki oraz dwie ostatnie próbki stolca przed rozwinięciem choroby. Obecność i liczebność *Clostridium perfringens* (8,4%) i *Bacteroides dorei* (0,9%) w smółce była większa u noworodków, u których rozwinął się NEC w porównaniu z grupą kontrolną. W późniejszych próbkach stolca obecność gronkowców negatywnie wiązała się z rozwojem NEC, a *Clostridium perfringens* nadal dominował liczebnie w przypadkach, w których wystąpiło NEC. W badaniu przeprowadzonym przez Cassir i wsp. (180), badacze porównali mikroflorę jelitową 15 dzieci, które rozwinęły NEC, oraz 15 kontroli, z 4 niezależnych geograficznie oddziałów intensywnej terapii noworodków. Dowiedziono, iż gatunek *Clostridium butyricum* był istotnie związany z wystąpieniem NEC. Co więcej, supernatanty uzyskane ze szczepów *C. butyricum*, pacjentów z NEC wykazywały znaczącą

aktywność cytotoksyczną i we wszystkich analizowanych próbkach stwierdzono obecność genu toksyny  $\beta$ -hemolizyny. Badacze wskazują na prawdopodobny mechanizm toksynotwórczy, związany z konkretnymi szczepami bakteryjnymi, zaangażowanymi w patogenezę NEC. W analizie przeprowadzonej przez Mai i wsp. (181) porównano różnorodność mikrobioty jelitowej u wcześniaków ( $\leq 32$  tydzień ciąży lub masa ciała  $\leq 1250$ g), w tym 9 przypadków które rozwinęły NEC i 9 zdrowych kontroli. Próbkę pobierano począwszy od smółki, a następnie co tydzień, aż do wypisu ze szpitala. Profil mikrobioty różnił się między badanymi grupami, w próbkach zebranych tydzień przed wystąpieniem choroby, ale już nie  $< 72$  godziny przed diagnozą NEC. Wykazano wzrost *Proteobacteria* i zmniejszenie liczby *Firmicutes* w przypadkach, w których wystąpiło NEC. Z poczynionych obserwacji wynika, iż nieprawidłowe wzorce mikrobioty mogą przyczyniać się do wystąpienia NEC. Inni badacze także raportują korelację między dysbiozą jelitową, a ryzykiem wystąpienia NEC (182,183,184,185,186,187).

Prawidłowa mikrobiota jelitowa jest zatem bardzo ważna dla zachowania homeostazy środowiska jelit. Bakterie jelitowe mają zdolność do hamowania odpowiedzi zapalnej poprzez zwiększenie produkcji I $\kappa$ B, inhibitora prozapalnego białka NF- $\kappa$ B. Dzięki temu nie dochodzi do odpowiedzi zapalnej ze strony jelit, a co za tym idzie ich uszkodzenia. U noworodków zaobserwowano też zmniejszoną ekspresję białka IRAK1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase 1), które pełni ważną rolę w indukcji syntezy NF- $\kappa$ B, wywołanego aktywacją receptora TLR-4. Postuluje się, że mechanizm ten, we wczesnym etapie kolonizacji chroni organizm noworodka przed nadmierną odpowiedzią zapalną, która może prowadzić do groźnych następstw, jakim jest np. NEC (62).

U wcześniaków rekomenduje się, w miarę możliwości, jak najwcześniejsze wprowadzenie żywienia enteralnego pokarmem matki oraz tzw. 'priming' kolonizacji przewodu pokarmowego, czyli pędzlowanie jamy ustnej noworodka mlekiem matki, w celu promowania wzrostu prozdrowotnej mikrobioty jelitowej. Poza korzystnymi bakteriami oraz prebiotykami, które kształtują optymalną kolonizację bakteryjną jelit noworodka, mleko matki zawiera także przeciwzapalną IL-10 oraz rozpuszczalną formę receptora TLR-2, który hamuje odpowiedź zapalną wyzwalaną poprzez stymulację receptorów TLR-2 (62). Z uwagi na fakt, iż karmienie wcześniaków mieszankami mlekozastępczymi jest jednym z czynników ryzyka wystąpienia NEC, wprowadzenie pokarmu kobiecego jest kluczowe. W przypadku niemożności dostarczenia pokarmu przez matkę, pokarmem



z wyboru powinno być pasteryzowane mleko kobyce dostarczane z banków mleka, co korzystnie wpływa na zdrowie wcześniaka (188).

### 1.7. Probiotyki

Definicja ‘probiotyków’ ustalona w 2001 r. przez międzynarodowych ekspertów Organizacji Narodów Zjednoczonych Do Spraw Żywności i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) i Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) opisuje probiotyk jako: *żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza* (189). Do probiotyków zalicza się bakterie kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*, jak i niepatogenne grzyby drożdżopodobne *Saccharomyces boulardii*. W 2002 r. grupa robocza FAO/WHO opracowała dodatkowo wytyczne dla naukowców, organów regulacyjnych oraz przemysłu mające pomóc w interpretacji i egzekwowaniu tej definicji (189). Po ponad dekadzie, w celu zaktualizowania wiedzy, przepisów i unormowań dotyczących dziedziny probiotyków, Międzynarodowe Stowarzyszenie Naukowe ds. Probiotyków i Prebiotyków (ang. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP), 23 października 2013 r. powołało panel ekspertów składający się z klinicystów i naukowców specjalizujących się w tym obszarze (gastroenterologów, pediatrów, lekarzy medycyny rodzinnej, mikrobiologów, immunologów, specjalistów genetyki drobnoustrojów oraz specjalistów ds. żywienia) (190). Obowiązująca od 2001 r. definicja została podtrzymana i uznana w dalszym ciągu za właściwą, z małą tylko modyfikacją gramatyczną nie wpływającą na znaczenie treści. Biorąc pod uwagę najnowszą wiedzę i aktualne zastosowanie probiotyków, na panelu tym, doprecyzowano istotne niespójności w wytycznych opracowanych wcześniej przez grupę roboczą FAO/WHO, dla poszczególnych grup zainteresowanych dziedziną probiotyków tj. naukowców, konsumentów, jednostek związanych z przemysłem oraz organów regulujących. Wszystkie te regulacje są szczególnie istotne w aspekcie nieustannie rosnącego zainteresowania nad zastosowaniem szczepów probiotycznych. Zasadne są takie wytyczne, aby ich respektowanie było jednoznaczne i nie wprowadzało konsumenta w błąd. Problemатyczne jest bowiem częste nadużywanie terminu probiotyk przez producentów, a wiele produktów wykorzystujących ten termin nie spełnia wymaganych kryteriów. Bardzo istotne są odpowiednie regulacje, szczególnie w obrębie najbardziej wrażliwych grup, w tym

oddziałów neonatologicznych i zastosowania probiotyków u noworodków przedwcześnie urodzonych.

Nie ma jednego wspólnego mechanizmu oddziaływania na człowieka dla wszystkich szczepów probiotycznych. Panel dyskusyjny ISAPP zgodził się, że niektóre funkcje mogą być przypisywane probiotykom jako populacji ogólnej, ale właściwości te odnoszą się wtedy do szczepów bardzo dobrze przebadanych, dostarczanych w dawce funkcjonalnej jako żywność bądź suplementy, natomiast nie do szczepów stosowanych jako leki. Na podstawie dostępnej, aktualnej literatury podsumowano, że mechanizm działania probiotyków można podzielić na 3 zasadnicze grupy: powszechne, częste i rzadkie.

Powszechne mechanizmy działania, wspólne dla wielu rodzajów probiotyków (np. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) obejmują:

- Ochronę przed kolonizacją,
- Wytwarzanie SCFA,
- Wpływ na pasaż jelitowy,
- Stabilizację/normalizację mikrobioty jelitowej,
- Wpływ na zwiększoną wymianę enterocytów,
- Konkurencję z patogenami.

Częste mechanizmy działania, wspólne dla poszczególnych gatunków bakterii to:

- Wytwarzanie witamin,
- Stabilizacja bariery jelitowej,
- Bezpośredni antagonizm,
- Metabolizm soli kwasów żółciowych,
- Aktywność enzymatyczna,
- Neutralizacja karcinogenów.

Rzadkie mechanizmy działania, swoiste dla konkretnych szczepów bakterii to:

- Modulacja odpowiedzi immunologicznej,
- Wytwarzanie specyficznych substancji bioaktywnych,
- Działanie endokryne i neurogenne.

Określono, że minimalna dzienna dawka probiotyku jako dodatku do żywności czy suplementu wynosi nie mniej niż  $1 \times 10^9$  cfu (190). W celach terapeutycznych nie można jednak podać ogólnych zasad dawkowania probiotyków. Uzasadnione wydaje się

być stosowanie takiej dawki, która w badaniu klinicznym przeprowadzonym u ludzi, z określonym szczepem probiotycznym, wykazała korzystny efekt zdrowotny.

Bardzo istotnym aspektem jest szczepozależność probiotyków, która oznacza, że dane funkcje są swoiste dla konkretnego szczepu bakterii i nie można ich ekstrapolować na inne szczepy należące do tego samego gatunku, czy nawet blisko spokrewnione. Dotyczy to zarówno cech pozytywnych jak i negatywnych. Każdy szczep wymaga oddzielnych badań w celu określenia jego właściwości i mechanizmów działania, a przede wszystkim skuteczności w ściśle określonej sytuacji klinicznej. Uzyskane wyniki badań przeprowadzone z danym szczepem bądź szczepami probiotycznymi nie mogą służyć jako dowód skuteczności innych, nie poddanych analizom szczepów. To samo dotyczy także stosowanej dawki. Zatem istotną kwestią jest odpowiednia identyfikacja taksonomiczna drobnoustrojów, do rodzaju, gatunku i szczepu oraz nazwy i numeru zbioru, w którym szczep jest przechowywany, np. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (191).

W dziedzinie neonatologii i pediatrii szczególne zainteresowanie probiotykami występuje w aspekcie zastosowania ich w celu prewencji NEC, zakażeń, w tym sepsy oraz zmniejszenia odsetka śmiertelności. Ponadto, drugorzędowymi korzyściami może być skrócenie czasu żywienia pozajelitowego, szybszy przyrost masy ciała oraz skrócenie ogólnego czasu hospitalizacji. Dodatkowo, inne problemy pediatryczne, których można by uniknąć stosując wcześniej probiotyki to redukcja ryzyka wystąpienia alergii, kolki niemowlęcej, bądź aspekty długofalowe jak autyzm, cukrzyca, i choroby cywilizacyjne.

W aspekcie NEC przeprowadzono szereg badań z zastosowaniem probiotyków, celem zapobieżenia wystąpieniu choroby. Pomimo licznych analiz nie udało się nadal zdefiniować jednego konkretnego szczepu probiotycznego, będącego skutecznym w redukcji ryzyka NEC. Nie mniej jednak wiele pojedynczych badań, z zastosowaniem różnych szczepów wskazuje na możliwość zastosowania probiotyków jako grupy w obniżeniu ryzyka wystąpienia choroby (188). Probiotyki zawierające *Bifidobacterium infantis* zmniejszają ryzyko martwiczego zapalenia jelit u wcześniaków. Spośród randomizowanych, kontrolowanych badań probiotyków u wcześniaków, sześć obejmowało podawanie samego *B. infantis* w monoterapii lub w skojarzeniu; pięć z tych badań wykazało zmniejszoną częstość występowania NEC w grupie probiotycznej (192,193,194,195,196,197). Z kolei, metaanaliza badań dotyczących podawania innego szczepu *Bifidobacterium* tj. *B. lactis* wcześniakom, nie wykazała zmniejszenia częstości występowania NEC (198). Celem przeglądu systematycznego oraz metaanalizy,

przeprowadzonej przez Aceti i wsp. (199) była ocena wpływu probiotyków na profilaktykę NEC u wcześniaków, ze szczególnym uwzględnieniem konkretnych szczepów, ich siły działania oraz oceny populacji wysokiego ryzyka. W pracy wykazano, że probiotyki jako grupa zapobiegały wystąpieniu NEC u wcześniaków. Sub-metaanalizy dla specyficznych szczepów, wykazały, że najlepszy efekt terapeutyczny w przypadku NEC, otrzymuje się z zastosowaniem bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium*, bądź preparatów wieloszczepowych (zawierających kilka różnych szczepów probiotyków). W ocenianych w analizie pracach, wykazano, iż probiotyki zapobiegały NEC u niemowląt o bardzo małej masie urodzeniowej, natomiast nie było wystarczających danych dla niemowląt o ekstremalnie małej masie urodzeniowej. Konkluzją wynikającą z pracy było, iż probiotyki wywierają ogólny wpływ prewencyjny na wystąpienie NEC u wcześniaków. Jednak wciąż nie ma wystarczających danych na temat konkretnego szczepu probiotycznego, który powinien być stosowany, oraz wpływu probiotyków na populację wysokiego ryzyka, w tym noworodki o skrajnie małej masie urodzeniowej.

W przeglądzie Cochrane z 2014 r. porównywano skuteczność i bezpieczeństwo profilaktycznego podawania probiotyków, w porównaniu z placebo lub brakiem leczenia w profilaktyce ciężkiej postaci NEC lub sepsy, lub obu jednostek chorobowych, u wcześniaków <37 tygodnia ciąży i/lub masie urodzeniowej <2500 g. Włączone do metaanalizy prace, wykazały, że doustna suplementacja probiotykami znacząco zmniejszyła częstość występowania ciężkiego NEC (stopień II lub III) i śmiertelność. Nie wykazano zmniejszenia posocznicy szpitalnej. Oceniając bezpieczeństwo, dowiedziono, iż w żadnym z badań nie wykazano ogólnoustrojowej infekcji wywołanej podawanymi szczepami probiotycznymi. Stwierdzono, że skuteczne w ocenianych punktach końcowych były preparaty probiotyczne zawierające albo pojedyncze szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, albo w połączeniu z *Bifidobacterium* (200). Inne badania porównawcze, także potwierdzają, że probiotyki jako grupa wykazują działanie prewencyjne w stosunku do NEC i/lub śmiertelności wcześniaków (201,202), bądź wcześniej wymienionych oraz sepsy (203,204) lub samej sepsy (205), oraz potwierdzają bezpieczeństwo stosowania.

Ponieważ, w prezentowanych analizach, różne szczepy wykazywały zróżnicowane działanie sugeruje się, że zastosowanie kilku szczepów może być najbardziej efektywne. Pomimo raportowanego pozytywnego wpływu probiotyków na mikrobiotę wcześniaków, a co za tym idzie prewencję NEC, nie opracowano jednak do tej pory jednolitego schematu

postępowania terapeutycznego odnośnie preparatów probiotycznych. Postuluje się zatem, przeprowadzenie dalszych badań porównawczych mających na celu określenie procedur przygotowania, czasu wprowadzenia oraz długości terapii probiotycznej (206). Opracowane przez Parker i wsp. zalecenia, mówią o tym jak ogólnie wprowadzać probiotyki u wcześniaków (207). Przy stabilnym stanie klinicznym noworodka i wprowadzeniu żywienia enteralnego proponuje się podawać *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *L. casei* w dawce  $0.056-6 \times 10^7-10^9$  cfu/dzień przez 4-6 tygodni, do osiągnięcia wieku 36. tygodnia skorygowanego życia postkonceptyjnego lub wypisu ze szpitala. Podobne zalecenia opracował Deshpande, wraz ze swoją grupą badawczą (206). Bazując na doniesieniach naukowych na przestrzeni lat 1966-2010, badacze proponują poniższy schemat: wprowadzając żywienie enteralne (najlepiej w pierwszym tygodniu życia) rozpocząć suplementację probiotycznym szczepami *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w dziennej dawce  $3 \times 10^9$  cfu, a w przypadku noworodków ze skrajnie małą masą urodzeniową  $1,5 \times 10^9$  cfu. Suplementacja ta powinna trwać do osiągnięcia 35. tygodnia skorygowanego życia postkonceptyjnego lub wypisu dziecka ze szpitala.

Z uwagi na coraz liczniejsze w dzisiejszych czasach przypadki alergii, w tej kwestii również rozważa się podaż probiotyków celem prewencji wystąpienia objawów choroby. W randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu, przeprowadzonym przez Kalliomaki i wsp. (208) oceniano wpływ prenatalnej i postnatalnej suplementacji probiotykiem, na ryzyko wystąpienia objawów alergii u dzieci obciążonych w wywiadzie wypryskiem atopowym, alergicznym nieżytem nosa lub astmą. Podaż probiotyku (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103) prowadzono w okresie prenatalnym (4 tygodnie przed planowanym terminem porodu) u matki, a następnie kontynuowano suplementację przez 6 miesięcy po porodzie u dziecka. Dowiedziono, że w grupie otrzymującej probiotyk w 2. r.ż. wyprysk atopowy występował dwukrotnie rzadziej, pomimo predyspozycji genetycznej, aniżeli w grupie otrzymującej placebo. Badanie to wydłużono o follow-up i wykazano, że u dzieci z grupy otrzymującej probiotyk, w wieku 4 oraz 7 lat, cały czas odnotowywano redukcję występowania wyprysku atopowego w porównaniu do grupy otrzymującej placebo (81,209).

Aktualne stanowisko Światowej Organizacji ds. Alergii (ang. World Allergy Organization, WAO) z 2015 r. mówi o korzyści netto, ze stosowania probiotyków w celu redukcji ryzyka wystąpienia wyprysku (atopowego zapalenia skóry), ale nie innych

objawów alergii (210). W dokumencie tym, wspomina się o 3 przypadkach, w których rozważyć należy podaż probiotyków:

Wskazanie 1: u kobiet w ciąży z wysokim ryzykiem wystąpienia alergii u dzieci. (zalecenia warunkowe, bardzo niska jakość danych).

Wskazanie 2: u kobiet karmiących piersią niemowlęta o wysokim ryzyku rozwoju alergii. (zalecenia warunkowe, bardzo niska jakość danych).

Wskazanie 3: u niemowląt z wysokim ryzykiem rozwoju alergii. (zalecenia warunkowe, bardzo niska jakość danych).

Istotnym problemem dla rodziców jest także kolka niemowlęca i możliwości jej łagodzenia. W przeglądzie systematycznym, oceniającym 17 badań z zastosowaniem probiotyków w łagodzeniu objawów kolki wykazano, iż podaż szczepu *Lactobacillus reuteri* DSM 17928, w dawce  $1 \times 10^8$ , przez 3-4 tygodni, jest bardziej skuteczna w redukcji objawów, aniżeli placebo (211).

Dla potwierdzenia danych na temat szczepozależności probiotyków i konieczności zastosowania ich, tylko i wyłącznie zgodnie z danymi uzyskanymi w badaniach klinicznych, warto przytoczyć tu pracę Rojas i wsp. (212), którzy oceniali wpływ *Lactobacillus reuteri* DSM 17928 na redukcję śmiertelności oraz zakażeń szpitalnych u wcześniaków. Do badania włączono 750 noworodków, z urodzeniową masą ciała  $< 2000$ g. Wykazano, iż zastosowanie szczepu probiotycznego nie wpłynęło istotnie, na oceniane przez badaczy pierwszorzędowe punkty końcowe tj. zgon lub zakażenie szpitalne. Wykazano, jednak trend w kierunku niższego odsetka zapalenia płuc ( $p=0,06$ ) oraz nieistotne statystycznie zmniejszenie o 40% martwiczego zapalenia jelit noworodków (2,4% vs. 4,0%;  $p=0,23$ ) w grupie przyjmującej probiotyki. Powyższe dane wskazują, iż szczep *Lactobacillus reuteri* DSM 17928, pomimo pozytywnego działania prewencyjnego w przypadku kolki niemowlęcej nie powinien być stosowany jako probiotyk stosowany na oddziałach intensywnej terapii noworodka celem zmniejszenia śmiertelności oraz zakażeń szpitalnych. Oczywiście dane te powinny być potwierdzone większą ilością badań klinicznych.

Pomimo wielu pozytywnych badań z zastosowaniem probiotyków nasuwa się jednak szereg pytań, w tym czy i jak stosować probiotyki u noworodków, a zwłaszcza u wcześniaków? W jakich wskazaniach je podawać oraz jakie zastosować środki ostrożności. Ostateczna decyzja w dalszym ciągu należy do kierownika oddziału

noworodkowego oraz indywidualnych decyzji lekarzy specjalistów, w tym pediatrów i neonatologów.

W najnowszym dokumencie z 2018 r., panel ekspertów powołany przez Europejskie Stowarzyszenie Pediatriczne (ang. European Paediatric Association) podsumował wytyczne oraz zalecenia dotyczące stosowania probiotyków w opiece zdrowotnej dla dzieci. Zespół stwierdził, że konkretne szczepy probiotyczne są skuteczne w zapobieganiu biegunkom poantybiotykowych oraz szpitalnym, leczeniu wirusowego zakażenia przewodu pokarmowego oraz kolki, u niemowląt karmionych piersią. Jednakże należy zachować szczególną ostrożność w przypadku wcześniaków, pacjentów z upośledzeniem odpornością i pacjentów krytycznie chorych z cewnikami żył centralnych, chorobą zastawek serca i zespołem krótkiego jelita (213).

### **1.8. Prebiotyki**

Prebiotyki to składniki żywności nie podlegające trawieniu przez nasze enzymy jelitowe (np. fruktooligosacharydy, oligosacharydy, inulina, skrobia oporna), które mogą korzystnie oddziaływać na organizm człowieka na drodze selektywnej stymulacji w okrężnicy wzrostu i/lub aktywności jednego lub określonej liczby gatunków (szczepów) korzystnych dla zdrowia gospodarza bakterii (214).

Kryteria, które muszą spełniać substancje prebiotyczne:

- Nie mogą być hydrolizowane, ani wchłaniane w górnych odcinkach przewodu pokarmowego,
- Muszą podlegać selektywnej fermentacji przez potencjalnie korzystne bakterie, bytujące w jelicie grubym.
- Muszą korzystnie modyfikować skład mikroflory jelita grubego,
- Uzyskany efekt musi być korzystny dla zdrowia gospodarza.

Prebiotyki dostarczane z pokarmem, na drodze fermentacji, przetwarzane są przez mikrobiotę jelitową, która rozkłada je do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, SCFA (masłowego, octowego, propionowego), które z kolei wywierają pozytywny wpływ na kolonocyty, w tym uszczelniają barierę jelitową i odżywiają śluzówkę jelit. Należy, tu zaznaczyć ich jelito odżywiane jest właśnie ze światła, a nie drogą krwi.

Jak już wspomniano wcześniej, mleko kobiece, jest obfite w oligosacharydy (HMO), które jako substrat dla określonych szczepów bakteryjnych, stymulują prawidłową kolonizację jelit noworodka (215). W związku z tym, stało się powszechne, stosowanie w mieszankach mlekozastępczych dla noworodków frukto- i oligosacharydów celem „naśladowania” działania naturalnych HMO z mleka matki. W przeglądzie systematycznym, opublikowanym przez polski zespół, pod kierownictwem prof. Hanny Szajewskiej, oceniano dowody dotyczące efektów zdrowotnych i bezpieczeństwa podawania preparatów mlekozastępczych uzupełnionych o pro- i/lub prebiotyki w porównaniu z formułami niewzbogaconymi. Badacze podają, że podawanie preparatów suplementowanych prebiotykiem zdrowym dzieciom nie budzi zastrzeżeń w aspekcie bezpieczeństwa. Możliwe są pewne korzystne efekty kliniczne, głównie lepsza konsystencja stolca, co może być korzystne u niektórych niemowląt. Obecnie nie ma żadnych wiarygodnych dowodów, które zalecałyby rutynowe stosowanie mieszanek suplementowanych prebiotykiem u noworodków i niemowląt. Ten ostatni wniosek może być wynikiem niewielkiej ilości danych dotyczących konkretnych prebiotyków, a nie rzeczywistym brakiem efektu (216). Podobne pytania zadaje się również w aspekcie zasadności podawania prebiotyków kobietom ciężarnym. W badaniu przeprowadzonym przez Shadid i wsp. (217) oceniano suplementację galaktooligosacharydami (GOS) oraz fruktooligosacharydami (FOS) w ostatnim trymestrze ciąży na mikrobiotę jelitową matki i noworodka. Do analizy włączono 48 kobiet ciężarnych, które suplementowano 3 razy na dobę/3 g GOS/FOS (w stosunku 9:1) lub maltodekstryną (placebo), od 25 tygodnia ciąży do momentu porodu. Odsetek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* u matek był istotnie wyższy w grupie suplementowanej niż w grupie placebo, natomiast liczba *Lactobacillus* nie różniła się istotnie między grupami. Z kolei, u noworodków, zarówno odsetek *Bifidobacterium*, jak i *Lactobacillus* był podobny w obu analizowanych grupach i nie różnił się istotnie. Nie wykazano żadnych istotnych różnic w aspekcie wieku ciążowego w obu analizowanych grupach.

W 2011 r. Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii Dziecięcej, Hepatologii i Żywienia (ang. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, ESPGHAN) uznało, że nie ma wystarczających dowodów, aby zalecać rutynowe stosowanie mieszanek wzbogaconych prebiotykami u niemowląt (218). W najnowszym przeglądzie wykazano jednak, że podawanie prebiotyków w pierwszym roku życia obniża ryzyko zachorowania na nawrotowe świsty, astmę oraz alergię



pokarmową (219). Aktualnie WAO sugeruje podawanie prebiotyków u niemowląt karmionych mieszankami i jednocześnie nie zaleca podawania prebiotyków u niemowląt karmionych wyłącznie piersią (220). W roku 2016, w którym powstały zalecenia WAO, badacze nie znaleźli żadnego badania dotyczącego suplementacji prebiotykami u kobiet w ciąży lub karmiących piersią na ryzyko wystąpienia alergii. W związku z tym panel WAO zdecydował się nie udzielać zaleceń dotyczących suplementacji prebiotycznej w okresie ciąży lub karmienia piersią. Zalecenia WAO dotyczące suplementacji prebiotykami w celu zapobiegania alergii mają na celu wsparcie rodziców, klinicyстів i innych pracowników służby zdrowia w podejmowaniu decyzji, czy stosować prebiotyki w celu zapobiegania alergii u zdrowych, urodzonych o czasie niemowląt.

## 2. Cel

Mikrobiota jelitowa stanowi istotny element w zachowaniu homeostazy organizmu, a okres noworodkowy jest kluczowy dla prawidłowości procesu kolonizacji. Odpowiednia mikrobiota ma znaczenie w rozwoju tolerancji immunologicznej, dojrzewaniu nabłonka jelitowego, a przez to prawidłowej pracy układu odpornościowego, co przekłada się długofalowo na zdrowie człowieka. Zaburzenia profilu mikrobioty jelitowej związane są z szeregiem jednostek chorobowych, w tym także chorób cywilizacyjnych.

Głównym celem badania była ocena wpływu wybranych czynników na mikrobiotę jelitową noworodków. Cele szczegółowe:

- 1) Ocena wpływu wieku ciążowego na mikrobiotę jelitową noworodków.
- 2) Ocena wpływu sposobu porodu na mikrobiotę jelitową noworodków.
- 3) Ocena porodu domowego jako wzorca kolonizacji jelit noworodków.

### 3. Materiały i metody

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (UMP), uchwała nr 157/14 z dn. 13.02.2014 (Aneks nr 1 z dn. 05.03.2015, Aneks nr 2 z dn. 11.06.2015, Aneks nr 3 z dn. 09.11.2017).

Do badania włączono 124 noworodki, w tym 110 hospitalizowanych w Katedrze Neonatologii, Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP oraz 14 urodzonych w warunkach domowych. Udział dziecka w badaniu poprzedzony był uzyskaniem pisemnej zgody od matki. Badanie prowadzono od 2014 do 2017 r.

Noworodki podzielono na trzy grupy:

**Grupa I** – noworodki przedwcześnie urodzone; w tym urodzone poprzez cięcie cesarskie oraz siłami natury.

Kryteria włączenia: wiek ciążowy  $<32$ . tc., urodzeniowa masa ciała  $<2,500$  g,

Kryteria wyłączenia: zmiany organiczne przewodu pokarmowego, wady wrodzone.

**Grupa II** – noworodki donoszone; w tym urodzone poprzez cięcie cesarskie oraz siłami natury.

Kryteria włączenia: wiek ciążowy  $\geq 37$ . tc., urodzeniowa masa ciała  $\geq 2,500$ g,

Kryteria wyłączenia: zmiany organiczne przewodu pokarmowego, wady wrodzone.

**Grupa III** – noworodki donoszone urodzone fizjologicznie w warunkach domowych.

Kryteria włączenia: wiek ciążowy  $\geq 37$ . tc., urodzeniowa masa ciała  $\geq 2,500$ g,

Kryteria wyłączenia: zmiany organiczne przewodu pokarmowego, wady wrodzone.

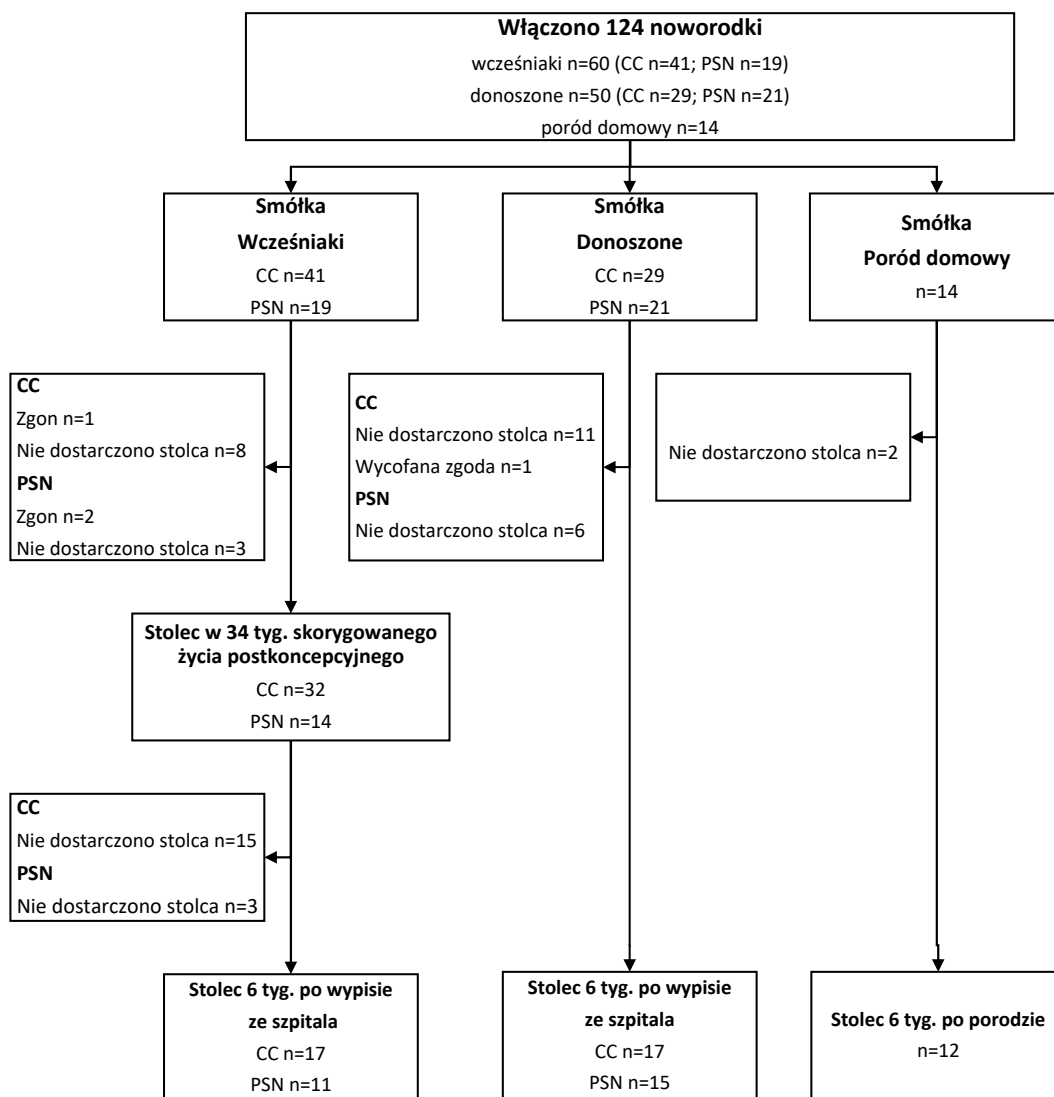
Materiałem do badania był stolec pobierany w następujących punktach czasowych:

Grupa I: smółka, stolec w 34. tygodniu skorygowanego życia postkonceptyjnego oraz stolec 6 tygodni od wypisu ze szpitala,

Grupa II: smółka i stolec 6 tygodni od wypisu ze szpitala,

Grupa III: smółka i stolec 6 tygodni po porodzie.

Próbki stolca pobierano z pieluchy, jak najszybciej po wypróżnieniu, do sterylnych probówek i szczelnie zamykano. Materiał niezwłocznie przewożono do laboratorium Instytutu Mikrobiologii w Poznaniu. Do czasu dostarczenia do laboratorium materiał przechowywano w temp. 2-8°C. Schemat włączenia do badań przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat włączenia noworodków do badań w poszczególnych grupach.

PSN – poród siłami natury, CC – cięcie cesarskie

Z każdej pobranej próbki wykonano następujące analizy:

- Posiew mikrobiologiczny w kierunku ilościowej oceny wybranych mikroorganizmów: *Escherichia coli*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., grzybów drożdżopodobnych,
- Badanie molekularne za pomocą Real-time PCR (qPCR) w kierunku: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. oraz ogólnej liczby bakterii (TBC, ang. total bacterial count).

Dodatkowo zbierano informacje w postaci ankiety od każdej matki dotyczące jej stanu zdrowia, jak również informacje odnośnie noworodka.

#### ➤ **Posiew mikrobiologiczny**

W celu wykonania posiewu w kierunku wybranych bakterii pobierano 0,25 g smółki/stolca do probówki z 2,25 ml jałowego roztworu NaCl 0,85%. Probówkę mieszano na mieszadle celem homogenizacji. Tak przygotowana próbka stanowiła rozcieńczenie  $10^{-1}$  badanego materiału. Następnie wykonywano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń, od  $10^{-2}$  do  $10^{-8}$  dla każdej badanej próbki. W tym celu przenoszono 100  $\mu$ l zawiesiny kału z rozcieńczenia  $10^{-1}$  do probówki z zawartością 900  $\mu$ l NaCl 0,85% i uzyskiwano rozcieńczenie  $10^{-2}$ . Następnie przenoszono 100  $\mu$ l zawiesiny kału z rozcieńczenia  $10^{-2}$  do probówki z zawartością 900  $\mu$ l NaCl 0,85% i uzyskiwano rozcieńczenie  $10^{-3}$ . Postępowano tak aż do uzyskania ostatniego rozcieńczenia czyli  $10^{-8}$ . Następnie w celu wykonania posiewu mikrobiologicznego przenoszono po 50  $\mu$ l zawiesiny z określonych rozcieńczeń, zaczynając od najwyższego ( $10^{-8}$ ) na poszczególne podłoża mikrobiologiczne. Zawiesinę rozprowadzano po podłożach diagnostycznych jałową eżą.

Do hodowli poszczególnych mikroorganizmów użyto następujących mikrobiologicznych podłoży diagnostycznych:

- Columbia agar z 5% krwią baranią (*Becton Dickinson*): nieselektywne, uniwersalne podłoże stosowane do hodowli tlenowych i beztlenowych, niewymagających bakterii.

- chromid CPSE agar (*BioMerieux*): podłoże chromogenne do izolacji, oceny ilościowej oraz bezpośredniej identyfikacji *E. coli*, *Proteus* i *Enterococcus* oraz *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Citrobacter* (KESC).
- Rogosa Agar + TMB + Peroksydaza (*Heipha*): w celu izolacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus*.
- SPM-Agar z Polimiksyną (*Heipha*): w celu izolacji bakterii z rodzaju *Clostridium*.
- Enterococcosel agar (*Graso*): w celu izolacji i potwierdzenia ziarenkowców z rodzaju *Enterococcus*.

Posiane podłoże SPM niezwłocznie umieszczano w anaerostatach z generatorem warunków beztlenowych (GENbox anaer, *BioMerieux*) i wskaźnikiem atmosfery beztlenowej i inkubowano w 37<sup>0</sup>C przez 48 godzin. Posiane podłoże Rogosa Agar + TMB + Peroksydaza umieszczano w ekcykatorze z generatorem atmosfery 15% CO<sub>2</sub> (Genbag CO<sub>2</sub>, *BioMerieux*) i inkubowano w 37<sup>0</sup>C przez 48 godz. Posiane podłoża: CPSE agar, Enterococcosel oraz Columbia agar umieszczano w warunkach tlenowych i inkubowano w 37<sup>0</sup>C przez 18-24 godz.

W celu wykonania posiewu w kierunku grzybów drożdżopodobnych pobierano 0,25 g stolca do próbki z 2,5 ml trypsyny oraz 25 µl antybiotyku (Penicylina/Streptomycyna, *Sigma-Aldrich*), w celu zahamowania wzrostu bakterii. Odpowiednio przygotowaną próbkę, po rozmieszaniu na mieszadle, umieszczano w komorze inkubacyjno-wytrząsającej w temperaturze 37<sup>0</sup>C na 15 min w celu nadtrawienia resztek pokarmowych, mogących utrudniać wzrost grzybom. Po tym czasie 400 µl zawiesiny przenoszono do 1,6 ml roztworu PBS, celem wypłukania pozostałości enzymu trawiennego.

Następnie w celu wykonania posiewu przenoszono po 100 µl zawiesiny na podłoże Sabouraud agar z gentamycyną i chloramfenikolem (*Becton Dickinson*). Zawiesinę rozprowadzano po podłożu jałową eżą. Posiane podłoże inkubowano w 37<sup>0</sup>C oraz 25<sup>0</sup>C przez 48 godzin w warunkach tlenowych. W przypadku wzrostu kolonii grzybów przeprowadzano identyfikację - grzyby drożdżopodobne identyfikowano wstępnie do gatunku przy użyciu podłoża chromogenego *Candida* chromagar (*Becton Dickinson*), a pleśniowe w oparciu o preparat bezpośredni i klucz mikologiczny. W przypadkach wymagających zastosowania dokładniejszych metod identyfikacyjnych, zastosowano

panele biochemiczne RapID™ YEAST PLUS System (*Remel*) z 18 substratami chemicznymi.

➤ **Analiza genetyczna**

○ **Izolacja DNA**

Izolację bakteryjnego DNA z próbki stolca wykonywano za pomocą zestawu DNA Stool Mini Kit (*Qiagen*). W tym celu odważano 180-220 mg stolca do sterylnej probówki o pojemności 2ml. Następnie dodawano 1,0 ml buforu InhibitEX i i mieszano na vortexie przez ok. 1 min. do całkowitej homogenizacji próbki. Probówkę z próbką umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 70°C i inkubowano przez 5 minut. Następnie próbkę mieszano na vortexie przez 15 sekund, a dalej wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Do nowej probówki o pojemności 1,5 ml przenoszono 15 µl proteinazy K, a następnie dodawano do niej 200 µl nadsącza uzyskanego w poprzednim etapie oraz 200 µl buforu trawiącego AL i mieszano na vortexie przez 15 sekund. Probówkę umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 70°C i inkubowano przez 10 minut. Następnie probówkę wirowano przez 15 sekund w celu usunięcia kropel z wieczka. Dodawano 200 µl etanolu i mieszano na vortexie przez 15 sekund. Następnie probówkę wirowano przez 15 sekund w celu usunięcia kropel z wieczka. Całą zawartość probówki przenoszono na kolumnę QIAamp umieszczoną na probówce odbierającej i wirowano 1 min/14000 rpm. Kolumnę przekładano do nowej probówki odbierającej, przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 500µl buforu płuczającego AW1, wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Kolumnę przekładano do nowej probówki odbierającej, a przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 500µl buforu płuczającego AW2 i wirowano przez 3 minuty przy prędkości 14000 rpm. Po tym etapie wykonywano dodatkowe wirowanie na nowej probówce odbierającej przez 3 min przy prędkości 14000rpm. Kolumnę przekładano do nowej probówki o pojemności 1,5ml, przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 200 µl buforu elucyjnego AE, inkubowano 1 minutę, a następnie wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Po wirowaniu kolumnę odrzucano a probówkę zawierającą przesącz z wyizolowanym DNA zachowywano do analizy.

Izolację bakteryjnego DNA ze smółki wykonywano za pomocą zestawu DNA Stool Mini Kit (*Qiagen*) z modyfikacją opisaną uprzednio (221,222). W tym celu odważano 250 mg smółki do probówki zawierającej 0,5 g kulek cyrkoniowych (Ø 0,1 mm) (BeadBug™ prefilled tubes with 0.5 mm Zirconium beads, triple-pure, high impact, *Merck*). Następnie do probówki dodawano wysterylizowane 4 szklane kulki (Ø 3 mm)

(Merck) i 1ml przygotowanego bezpośrednio przed izolacją buforu do lizy (500mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8), 50mM EDTA – autoklawowano, a następnie dodawano 4%SDS). Następnie próbkę mieszano przy użyciu młyna miksującego MM400 (Retsch) w temperaturze pokojowej 3 x 1 min przy prędkości 5500 rpm, pomiędzy każdym mieszaniem próbkę chłodzono na lodzie. Po tym etapie ogrzewano próbkę przez 15 min na bloku grzejnym w temperaturze 95°C, worteksując co 5 min. Po tym etapie chłodzono próbkę na lodzie i wirowano 5 min/14000 rpm. Do nowej próbki o pojemności 2 ml przenoszono 25µl proteiny K, a następnie dodawano 600 µl supernatantu uzyskanego po wirowaniu oraz 600µl buforu AL i dokładnie worteksowano. Inkubowano przez 10 min w temperaturze 70°C. Dodawano 600µl etanolu (96-100%) i worteksowano. Następnie 600 µl uzyskanego lizatu przenoszono na kolumnę QIAamp umieszczoną na próbce odbierającej i wirowano 1 min/14000 rpm. Po wirowaniu kolumnę przenoszono na nową próbkę odbierającą i ponownie przenoszono 600µl lizatu i wirowano 1 min/14000 rpm. Postępowano tak do przeniesienia całego lizatu tj. 3 x 600µl. Na kolumnę dodawano 500µl buforu AW1, wirowano 1 min/14000 rpm. Kolumnę przekładano do nowej próbki odbierającej, a przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 500µl buforu płuczającego AW2 i wirowano przez 3 minuty przy prędkości 14000 rpm. Po tym etapie wykonywano dodatkowe wirowanie na nowej próbce odbierającej przez 3 min przy prędkości 14000rpm. Kolumnę przekładano do nowej próbki o pojemności 1,5ml, przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 100µl buforu ATE, inkubowano 1 minutę, a następnie wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Po wirowaniu na kolumnę na tej samej próbce dodawano 100 µl buforu ATE, inkubowano przez 1 min, a następnie wirowano przez 1 min/14000 rpm. Po wirowaniu kolumnę odrzucano a próbkę zawierającą przesącz z wyizolowanym DNA zachowywano do analizy.

#### ○ **Real-time PCR (qPCR)**

Analizy wykonywano na aparacie 7300 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*). W łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) stosowane są startery (ang. primers), czyli krótkie oligonukleotydy, o sekwencji zaprojektowanej specjalnie dla badanego fragmentu DNA. Umożliwiają one polimerazie DNA połączenie z matrycą. Amplifikacja określonego rejonu DNA wymaga zawsze obecności dwóch starterów, otaczających żądany fragment z obu stron, są to tzw. starter forward (F) i starter



reverse (R). Specyficzne startery (Sigma Aldrich) dla oznaczanych w badaniu mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Specyficzne startery dla poszczególnych mikroorganizmów i ogólnej liczby bakterii.

Nazwa	Opis produktu	Sekwencja
<b>Praus-F480</b>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> starter forward	CAGCAGCCGCGGTAAA
<b>Praus-R631</b>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> starter reverse	CTACCTCTGCACTACTCAAGAAA
<b>Akk.muc-F</b>	<i>Akkermansia muciniphila</i> starter forward	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
<b>Akk.muc-R</b>	<i>Akkermansia muciniphila</i> starter reverse	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT
<b>F-Bifid09c</b>	<i>Bifidobacterium</i> spp. starter forward	CGGGTGAGTAATGCGTGACC
<b>R-Bifid06</b>	<i>Bifidobacterium</i> spp. starter reverse	TGATAGGACGCGACCCCA
<b>Bacter11</b>	<i>Bacteroides</i> spp. starter forward	CCTWCGATGGATAGGGGTT
<b>Bacter08</b>	<i>Bacteroides</i> spp. starter reverse	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG
<b>Uni-F340</b>	Starter uniwersalny forward	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
<b>Uni-R514</b>	Starter uniwersalny reverse	ATTACCGCGGCTGCTGGC

W technice Real-time PCR stosowana jest krzywa standardowa, w odniesieniu do której interpretowane są oznaczenia poszczególnych próbek. Krzywą standardową otrzymuje się poprzez rozcieńczenia standardu DNA o znanym stężeniu badanego parametru. Standardy do analizy produkowane były w Instytucie Mikroekologii w Herborn, Niemcy. W tabeli 4 przedstawiono standardy użyte w badaniu.

Tabela 4. Specyficzne standardy dla poszczególnych mikroorganizmów i ogólnej liczby bakterii.

Nazwa	Opis produktu
<i>Bifidobacterium infantis</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Bifidobacterium</i> spp., izolowany z <i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Bacteroides</i> spp., izolowany z <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Akkermansia muciniphila</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Akkermansia muciniphila</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA	Standard do oznaczeń całkowitej liczby bakterii izolowany z <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

W technice qPCR reakcja zachodzi w mieszaninie reakcyjnej QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (*Qiagen*) zawierającej odpowiednie stężenie jonów magnezu, deoksyoligonukleotydy (dNTP), znacznik fluorescencyjny SYBR green, znacznik referencyjny ROX, polimerazę DNA, do którego dodaje się wodę do reakcji PCR, wolną od RNAz - RNase-Free Water (*Qiagen*) startery i wyizolowany z próbek DNA. Reakcja przeprowadzana była na płytkach 96-dołkowych MicroAmp Optical 96-well Plate (*Applied Biosystems*), każda próbka, standard i kontrola oznaczana była w duplikacie. Dla każdego badanego parametru, w oparciu o standardy, tworzono krzywą wzorcową (4-punktową) oraz wykonywano oznaczenie kontroli: wysoko dodatniej (H-Co, high control), nisko dodatniej (L-Co, low control) oraz odczynnikowej (NTC, no template control). Do każdego dołka na płytce reakcyjnej nakrapiano po 23  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej oraz 2  $\mu$ l matrycy (odpowiednio standardy do krzywej standardowej, kontrole H-Co, L-Co oraz DNA wyizolowane z analizowanych próbek smółki/stolca). Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednego dołka płytki do PCR przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednego dołka płytki do PCR.

12,5 $\mu$ l	SYBR green master mix
8 $\mu$ l	Woda wolna od RNAz
2,5 $\mu$ l	Mieszanina starterów
2 $\mu$ l	Matrycowe DNA

Tak przygotowaną płytkę do PCR zabezpieczano folią adhezyjną MicroAmp Optical Adhesive Film (*Applied Biosystems*) i umieszczano w termocyklerze. Po zakończeniu reakcji ilościowe wyniki odczytywano w oparciu o system komputerowy (7300 System SDS Software).

### ➤ **Analizy statystyczne**

Na podstawie użytych w badaniu narzędzi diagnostycznych, nie można było określić liczby bakterii, jeśli wynosiła mniej  $10^2$  (cut-off). Dla takich oznaczeń przyjęliśmy wartość 0, co nie oznacza, iż w badanej próbce tych bakterii w ogóle nie było. Jest to ograniczenie metody analitycznej i dla wartości poniżej cut-off nie można określić dokładnej liczby mikroorganizmów. Liczbę bakterii opisano wartością średnią, odchyleniem standardowym, medianą, wartością wyznaczoną dolnym i górnym kwartylem oraz wartością minimalną i maksymalną. Z uwagi na fakt przypisania wartości 0 dla ilości poniżej cut-off w analizach statystycznych zastosowano testy nieparametryczne porównujące nie wartości średnie ( $\bar{x}$ ), ale rozkłady tj. test nieparametryczny Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

Dane kategoryjne opisano liczebnościami i odpowiadającymi im wartościami procentowymi. Dla zbadania zależności zastosowano test Fishera-Freemana-Haltona oraz test u-Gaussa porównujący wartości procentowe.

W analizach statystycznych przyjęto poziom istotności  $\alpha=0,05$ .

W przypadkach, w których nie oznaczono wartości prawdopodobieństwa ( $p$ ), było to spowodowane brakiem różnic między grupami z uwagi na niewykrycie mikroorganizmów w badanej próbce (wartość poniżej cut-off).

Analizy statystyczne były wykonane za pomocą następujących programów statystycznych: Dell Statistica (data analysis software system) v 13. oraz Cytel Studio v 11.1.0

## 4. Wyniki

### 4.1. Charakterystyka populacji

Do końcowej analizy zakwalifikowano 72 noworodki, w tym 28 wcześniaków (38,9%), 32 noworodki donoszone (44,4%) oraz 12 noworodków urodzonych w domu (16,7%). Noworodki podzielono ze względu na sposób porodu, na urodzone siłami natury (PSN) oraz urodzone poprzez cięcie cesarskie (CC). Grupa PSN liczyła łącznie 38 pacjentów (52,8%), a grupa CC 34 pacjentów (47,2%). W tym, dokonano wyróżnienia podzbiorów na wcześniaki urodzone siłami natury (11; 15%) oraz poprzez CC (17; 24%), oraz na dzieci donoszone urodzone siłami natury (15; 21%) oraz poprzez CC (17; 24%). Wszystkie noworodki urodzone w domu przyszły na świat siłami natury (12, 15%). Analizowane grupy pod względem płci były zbliżone, tj. 34 dziewczynki (47,2%) i 38 chłopców (52,8%). Większość noworodków urodziła się w szpitalu 83,3%, a 16,7% w domu. Podstawowe informacje na temat grup badanych przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Podstawowe informacje na temat charakterystyki noworodków i sposobu porodu.

		Częstość (n)	Procent (%)
Grupy badane	Wczesniaki	28	38,9
	Donoszone	32	44,4
	Urodzone w domu	12	16,7
Płeć dziecka	Dziewczynka	34	47,2
	Chłopiec	38	52,8
Miejsce urodzenia dziecka	Szpital	60	83,3
	Dom	12	16,7
Sposób porodu ogółem	Poród siłami natury	38	52,8
	Cesarskie cięcie	34	47,2
Sposób porodu z podziałem na grupy	Wczesniaki PSN	11	15
	Wczesniaki CC	17	24
	Donoszone PSN	15	21
	Donoszone CC	17	24
	Urodzone w domu PSN	12	15

PSN – poród siłami natury; CC – cięcie cesarskie

Średnia wieku ciążowego w tygodniach ciąży [tc], dla noworodków przedwcześnie urodzonych wynosiła  $30,6tc \pm 1,9$ , dla noworodków donoszonych  $39,2tc \pm 1,3$ , a dla dzieci urodzonych w domu  $39,7tc \pm 0,8$ . Średnia urodzeniowa masa ciała dla wcześniaków wynosiła  $1586,7g \pm 350,9$ , dla noworodków urodzonych o czasie  $3536,3g \pm 517,4$ , a dla dzieci urodzonych w domu  $3620g \pm 369,2$ . Podział populacji ze względu na wiek ciążowy i urodzeniową masę ciała przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Podział populacji ze względu na wiek ciążowy i urodzeniową masę ciała.

		Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch. std. (SD)
Wiek ciążowy [tc]	Wcześnieiki	30,6	38,9	26	32	1,9
	Donoszone	39,2	44,4	37	42	1,3
	Urodzone w domu	39,7	16,7	38	41	0,8
Urodzeniowa masa ciała [g]	Wcześnieiki	1586,7	1622,5	750	2280	350,9
	Donoszone	3536,3	3445	2780	5080	517,4
	Urodzone w domu	3620	3600	2960	4260	369,2

Odch. std. – odchylenie standardowe; tc – tydzień ciąży

#### 4.2. Analiza grup badanych

Na wstępie dokonano analiz porównawczych pomiędzy badanymi grupami pod kątem rodzaju żywienia początkowego jak i po 6. tygodniach od wypisu ze szpitala; obecności *Streptococcus agalactiae* (GBS) u matki, co tożsame było z zastosowania śródporodowej antybiotykoterapii; stosowanych antybiotyków u matki w przebiegu całej ciąży (poza GBS); palenia tytoniu przed ciążą oraz w trakcie ciąży; czy ciąża była pojedyncza czy mnoga; czasu pęknięcia pęcherza płodowego. Jako karmienie naturalne przyjęto wyłączone karmienie mlekiem matki, z kolei karmienie sztuczne to wyłącznie karmienie mieszankami mlekozastępczymi, a karmienie mieszane to jednoczesne karmienie pokarmem kobiecym i mieszankami mlekozastępczymi. W przypadku określenia żywienia początkowego, dwa noworodki przedwcześnie urodzone zostały wykluczone z analizy gdyż karmione były wyłącznie parenteralnie. U pozostałych wcześniaków dla określenia żywienia początkowego analizę porównawczą wykonano w odniesieniu do źródła pokarmu w żywieniu enteralnym.

Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy ( $p=0,4827$ ) między rodzajem żywienia początkowego we wszystkich analizowanych grupach. Porównując częstość występowania GBS u matki wykazano istotną statystycznie różnicę w analizowanych grupach ( $p=0,0216$ ). Zależność ta dotyczyła grupy wcześniaków i noworodków donoszonych ( $p=0,0063$ ). Częściej matka skolonizowana była przez *Streptococcus agalactiae* w grupie

noworodków przedwcześnie urodzonych. Z kolei, nie stwierdzono istotnych różnic względem występowania GBS u matki, pomiędzy grupą noworodków donoszonych a urodzonymi w domu oraz między wcześniakami a noworodkami urodzonymi w domu. Dokonano także porównania stosowania antybiotyków u matek w przebiegu całej ciąży, z wykluczeniem śródporodowej antybiotykoterapii z uwagi na obecność GBS, którą analizowano powyżej. Wykazano, iż analizowane grupy różniły się statystycznie ( $p=0,0315$ ) po względem tej zmiennej. Istotnie statystyczną różnicę stwierdzono między grupą noworodków donoszonych a urodzonymi w domu ( $p=0,0394$ ), gdzie antybiotyki były częściej stosowane u matek rodzących w szpitalu, oraz wcześniakami a noworodkami urodzonymi w domu ( $p=0,0108$ ), gdzie antybiotykoterapia była częstsza u matek wcześniaków. Między wcześniakami a noworodkami donoszonymi nie stwierdzono takiej różnicy ( $p=0,3725$ ). Nie wykazano różnic między grupami pod względem palenia tytoniu zarówno przed ciążą ( $p=0,1650$ ) jak i w trakcie ciąży ( $p=0,3052$ ). Pod względem częstości występowania ciąży pojedynczej vs. mnogiej analizowane grupy różniły się statystycznie ( $p=0,0004$ ). Ciąża mnoga występowała najczęściej w grupie wcześniaków (42,86%) i wykazano znamienne różnicę statystyczną względem tej zmiennej pomiędzy wcześniakami a noworodkami donoszonymi ( $p=0,0008$ ), oraz między wcześniakami a dziećmi urodzonymi w domu ( $p=0,0067$ ). Dzieci donoszone oraz dzieci urodzone w domu nie różniły się statystycznie pod względem tego parametru ( $p=0,3754$ ). Porównując czas pęknięcia pęcherza płodowego, nie wykazano istotnej statystycznie różnicy we wszystkich analizowanych grupach ( $p=0,0680$ ). Po upływie 6 tygodni od wypisu ze szpitala wykazano istotnie statystycznie różnicę w formie karmienia ( $p=0,0051$ ). Dla karmienia naturalnego zależność tą stwierdzono między grupami noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu oraz urodzonych w domu ( $p=0,0004$ ), oraz wcześniakami a noworodkami urodzonymi w domu ( $p=0,0032$ ), gdzie matki rodzące w domu częściej karmiły piersią. Dla karmienia sztucznego wykazano statystyczną zależność tylko między wcześniakami a dziećmi urodzonymi w domu ( $p=0,0398$ ), które w ogóle nie były karmione mieszankami mlekozastępczymi. Dla karmienia mieszanego także istotnie statystyczną różnicę stwierdzono dla grupy wcześniaki vs. urodzone w domu ( $p=0,0136$ ), i w tym przypadku także żadne dziecko urodzone w domu nie było karmione w sposób mieszany. Analizę porównawczą badanych grup przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Analiza porównawcza grup badanych.

		Wcześnieiki I		Donoszone II		Dom III		p*
		n	%	n	%	n	%	
Żywienie początkowe***	Karmienie naturalne	22	84,62	30	93,75	12	100	<b>0,4827</b>
	Karmienie sztuczne	2	7,69	0	0	0	0	
	Karmienie mieszane	2	7,69	2	6,25	0	0	
Obecność GBS	Dodatni	11	39,29	3	9,38	3	25	<b>0,0216</b> I vs. II <b>0,0063</b> II vs. III <b>0,1788</b> I vs. III <b>0,3852</b>
	Ujemny	17	60,71	29	90,63	9	75	
Antybiotyki u matki w przebiegu całej ciąży (poza GBS)	Tak	11	39,29	9	28,13	0	0	<b>0,0315</b> I vs. II <b>0,3725</b> II vs. III <b>0,0394</b> I vs. III <b>0,0108</b>
	Nie	17	60,71	23	71,88	12	100	
Palenie tytoniu przed ciążą	Tak	5	17,86	8	25	0	0	<b>0,1650</b>
	Nie	23	82,14	24	75	12	100	
Palenie tytoniu w trakcie ciąży	Tak	2	7,14	0	0	0	0	<b>0,3052</b>
	Nie	26	92,86	32	100	12	100	
Ciąża	Pojedyncza	16	57,14	30	93,75	12	100	<b>0,0004</b> I vs. II <b>0,0008</b> II vs. III <b>0,3754</b> I vs. III <b>0,0067</b>
	Mnoga	12	42,86	2	6,25	0	0	
Pęknięcie pęcherza płodowego	W trakcie porodu	14	50	16	53	9	82	<b>0,0680**</b>
	Przed porodem <18 h	4	14	12	40	2	18	
	Przed porodem 18 h - 7 dni	6	22	2	7	0	0	
	Przed porodem >7 dni	4	14	0	0	0	0	
Żywienie po 6 tygodniach	Karmienie naturalne	9	36	15	50	11	100	<b>0,0051</b> I vs. II <b>0,2972</b> II vs. III <b>0,0004</b> I vs. III <b>0,0032</b> I vs. II <b>0,6188</b> II vs. III <b>0,0751</b> I vs. III <b>0,0398</b>
	Karmienie sztuczne	6	24	9	30	0	0	



	Karmienie mieszane	10	40	6	20	0	0	I vs. II <b>0,1039</b> II vs. III <b>0,1084</b> I vs. III <b>0,0136</b>
--	--------------------	----	----	---	----	---	---	---

GBS – *Streptococcus agalactiae*, paciorkowce gr. B (ang. Group B *Streptococcus*)

\* wartość prawdopodobieństwa testu Fishera-Freemana-Haltona

\*\* wartość prawdopodobieństwa testu Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna

\*\*\* dwa noworodki przedwcześnie urodzone zostały wykluczone z analizy, gdyż karmione były wyłącznie parenteralnie

Dodatkowo, między badanymi grupami porównano częstość stosowania antybiotyków. Wykazano istotną statystycznie różnicę ( $p < 0,0001$ ) między stosowaniem antybiotyków u pacjentów w obu analizowanych grupach. U wcześniaków antybiotykoterapię zastosowano aż u 75% dzieci, natomiast zarówno żaden noworodek donoszony jak i urodzony w domu nie miał włączonego leczenia przeciwbakteryjnego. Porównując różnice między wcześniakami a pozostałymi grupami, wykazano istotnie statystyczną różnicę między grupą wcześniaki vs. donoszone ( $p = 0,0026$ ). Natomiast różnica wcześniaki vs. dom była na granicy istotności statystycznej ( $p = 0,0565$ ), co było spowodowane wyłącznie małą liczebnością w grupie dzieci urodzonych w domu. Wyniki przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Częstość stosowania antybiotyków u wcześniaków i noworodków donoszonych.

		Wcześniaki I		Donoszone II		Dom III		$p^*$
		n	%	n	%	n	%	
Stosowanie antybiotyków u noworodka	Tak	21	75	0	0	0	0	<b>0,0001</b>
	Nie	7	25	32	100	12	100	I vs. II <b>0,0026</b> I vs. III <b>0,0565</b>

\* wartość prawdopodobieństwa testu Fishera-Freemana-Haltona

W grupie wcześniaków z wdrożoną terapią antybiotykową, trzynastu dzieci otrzymywało leczenie do 3 dni (ampicylina+gentamycyna), a ośmiu dzieci powyżej 7 dni (ampicylina+gentamycyna+meronem+wankomycyna).

### 4.3. Analiza profilu mikrobioty

W celu analizy profilu mikrobioty u dzieci urodzonych w szpitalu, dokonano porównania składu mikroorganizmów u wcześniaków i noworodków donoszonych.

#### 4.3.1. Analiza profilu mikrobioty w smółce

W tabeli 10 przedstawiono porównanie między poszczególnymi mikroorganizmami w smółce względem wieku ciążowego ( wcześniaki vs. donoszone), a na wykresie 1 przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych mikroorganizmów w smółce u noworodków donoszonych i przedwcześnie urodzonych.

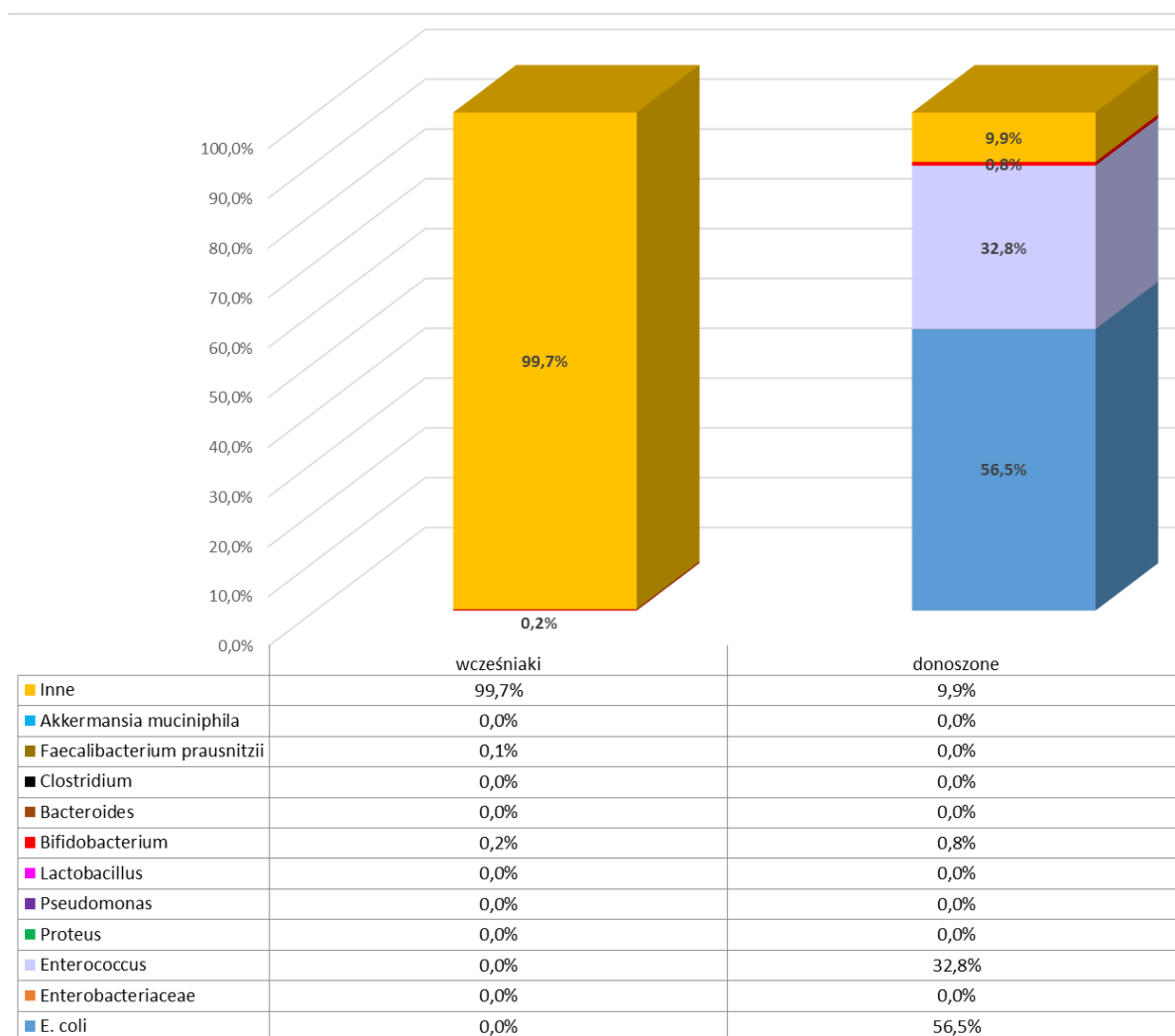
Tabela 10. Porównanie ilościowe składu mikrobioty w zależności od wieku ciążowego w smółce.

	Ogółem		<i>p</i> *
	Wcześniaki N=28	Donoszone N=32	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=25015813$ SD=87983646 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=400000000$ Q25=0, Q75=0	<b>0,0096</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=6250$ SD=35355 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=200000$ Q25=0, Q75=0	<b>0,3671</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=14$ SD=52 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=200$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=14514888$ SD=70627222 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=400000000$ Q25=0, Q75=30000	<b>0,0015</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=6$ SD=35 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=200$ Q25=0, Q75=0	<b>0,3671</b>

<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=288$ SD=844 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=4000$ Q25=0, Q75=0	<b>0,0175</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=2483$ SD=828 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=42600$ Q25=0, Q75=583	$\bar{x}=333103$ SD=1818821 Me=6100 $x_{min}=0, x_{max}=10300000$ Q25=0, Q75=13950	<b>0,0002</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=61$ SD=154 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=550$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=503$ SD=1733 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=9540$ Q25=0, Q75=0	<b>0,3177</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1372$ SD=1493 Me=857 $x_{min}=0, x_{max}=4280$ Q25=0, Q75=2630	$\bar{x}=1158$ SD=1685 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=5000$ Q25=0, Q75=2800	<b>0,4802</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=25$ SD=141 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=800$ Q25=0, Q75=0	<b>0,3671</b>
TBC	$\bar{x}=1242329$ SD=3015250 Me=249000 $x_{min}=39200$ $x_{max}=13700000$ Q25=60600, Q75=879000	$\bar{x}=44252937$ SD=216091564 Me=651000 $x_{min}=101000$ $x_{max}=1220000000$ Q25=120000 Q75=901000	<b>0,0718</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0, x_{max}=0$ Q25=0, Q75=0	-

\* wartość prawdopodobieństwa testu nieparametrycznego Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny

Pomiędzy wcześniakami a noworodkami donoszonymi wykazano istotnie statystyczną różnicę względem liczby poszczególnych mikroorganizmów w smółce: *E. coli* (p=0,0096), *Enterococcus* (p=0,0015), *Lactobacillus* (p=0,0175) i *Bifidobacterium* (p=0,0002). Noworodki donoszone charakteryzowały się wyższą liczbą wszystkich wymienionych bakterii. Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w liczbie: *Enterobacteriaceae*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *F. prausnitzii*, *A. muciniphila*, ogólnej liczbie bakterii (TBC) oraz grzybów drożdżopodobnych.



Wykres 1. Rozkład procentowy mikrobioty smółki u noworodków donoszonych i wcześniaków.

Zaobserwowano znaczną różnicę w rozkładzie procentowym bakterii w smółce między noworodkami donoszonymi, a wcześniakami. W grupie noworodków donoszonych smółka była zdominowana głównie przez bakterie *E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Z kolei, w smółce noworodków przedwcześnie urodzonych nie zaobserwowano podobnego rozkładu, a przewagę procentową miały bakterie (inne), które nie były analizowane w niniejszym badaniu.

Następnie dokonano analizy porównawczej między poszczególnymi mikroorganizmami w smółce względem wieku ciążowego z podziałem na sposób porodu. Wyniki przedstawiono w tabeli 11. Na wykresie 2 przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych mikroorganizmów w smółce u noworodków donoszonych i przedwcześnie urodzonych, z uwzględnieniem sposobu porodu.

Tabela 11. Porównanie ilościowe składu mikrobioty w smółce w zależności od wieku ciążowego z uwzględnieniem sposobu porodu.

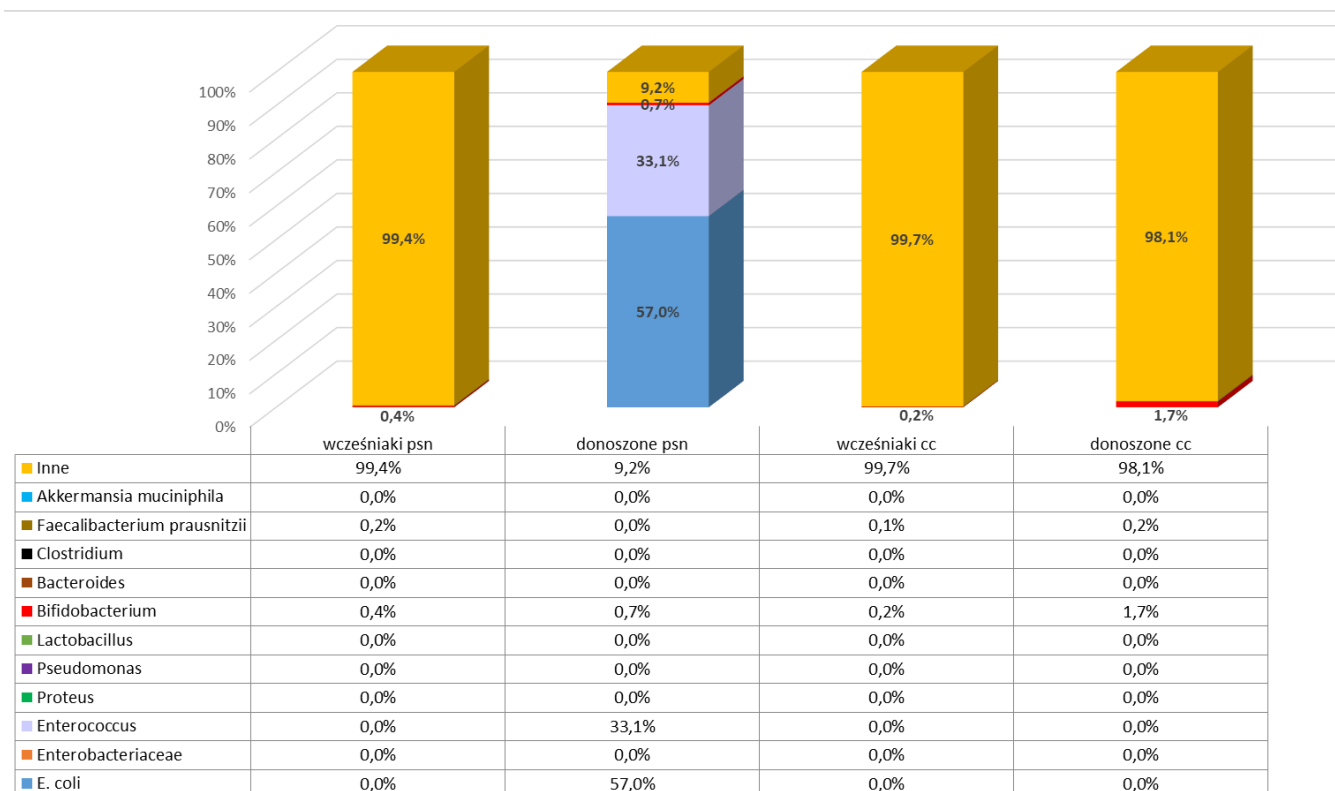
	Sposób porodu					
	PSN		<i>p</i> *	CC		<i>p</i> *
	Wcześnieiki N=11	Donoszone N=15		Wcześnieiki N=17	Donoszone N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=53367067$ SD=12457912 9 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=40000000$ 0 Q25=0 Q75=200000	<b>0,0116</b>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=13333$ SD=51640 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4363</b>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-

<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=30965093$ SD=10246727 9 Me=40000 $x_{min}=0$ $x_{max}=40000000$ 0 Q25=2000 Q75=6000000	<b>0,0001</b>	$\bar{x}=24$ SD=66 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	<b>0,1633</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=13$ SD=52 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4363</b>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=480$ SD=1110 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=4000$ Q25=0 Q75=200	<b>0,0416</b>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=118$ SD=485 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,3466</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=2032$ SD=3914 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=10000$ Q25=0 Q75=1390	$\bar{x}=698088$ SD=265634 Me=7800 $x_{min}=0$ $x_{max}=10300000$ Q25=4520 Q75=14100	<b>0,0048</b>	$\bar{x}=2775$ SD=10293 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=42600$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=11058$ SD=18188 Me=2560 $x_{min}=0$ $x_{max}=54600$ Q25=0 Q75=9400	<b>0,0196</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=50$ SD=166 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=550$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=885$ SD=2490 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=9540$ Q25=0 Q75=392	<b>0,2579</b>	$\bar{x}=68$ SD=151 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=414$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=165$ SD=370 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1030$ Q25=0 Q75=0	<b>0,8358</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =1283 SD=1405 Me=694 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3640 Q25=0 Q75=2380	$\bar{x}$ =463 SD=1190 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3820 Q25=0 Q75=0	<b>0,1120</b>	$\bar{x}$ =1429 SD=1587 Me=1020 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =4280 Q25=0 Q75=2740	$\bar{x}$ =1171 SD=1846 Me=2260 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =5000 Q25=0 Q75=3060	<b>0,7024</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =53 SD=207 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =800 Q25=0 Q75=0	<b>0,4363</b>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-
TBC	$\bar{x}$ =570418 SD=545907 Me=372000 $x_{min}$ =55400 $x_{max}$ =160000 Q25=74800 Q75=1010000	$\bar{x}$ =93649467 SD=31380791 4 Me=632000 $x_{min}$ =108000 $x_{max}$ =12200000 00 Q25=135000 Q75=2020000	<b>0,1460</b>	$\bar{x}$ =1677094 SD=3826856 Me=97400 $x_{min}$ =39200 $x_{max}$ =13700000 Q25=56000 Q75=798000	$\bar{x}$ =667765 SD=872729 Me=670000 $x_{min}$ =101000 $x_{max}$ =3820000 Q25=116000 Q75=784000	<b>0,2415</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya; PSN – poród siłami natury; CC – cięcie cesarskie;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny

Wykazano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *E. coli* (p=0,0116), *Enterococcus* (p=0,0001), *Lactobacillus* (p=0,0416) oraz *Bifidobacterium* (p=0,0048) w smółce, między wcześniakami urodzonymi siłami natury a noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury. U noworodków donoszonych urodzonych siłami natury stwierdzono wyższą liczbę wszystkich wymienionych powyżej rodzajów bakterii. Pomędzy wcześniakami a noworodkami donoszonymi urodzonymi przez CC wykazano istotnie statystyczną różnicę wyłącznie między liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* (p=0,0196), która była wyższa u noworodków donoszonych.



Wykres 2. Rozkład procentowy mikrobioty smółki u noworodków donoszonych i wcześniaków z uwzględnieniem sposobu porodu.

Zaobserwowano znaczną różnicę w rozkładzie procentowym bakterii w smółce między noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury, a pozostałymi badanymi grupami. W grupie noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie smółka była zdominowana głównie przez bakterie *E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*. Z kolei, w smółce noworodków donoszonych urodzonych poprzez CC, jak i przedwcześnie urodzonych poprzez CC oraz siłami natury, nie zaobserwowano podobnego rozkładu, a przewagę procentową miały bakterie (inne), które nie były analizowane w niniejszym badaniu. U noworodków donoszonych urodzonych przez cięcie cesarskie zaobserwowano wyższy odsetek *Bifidobacterium* w porównaniu z pozostałymi grupami.

#### 4.3.2. Analiza profilu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala

W tabeli 12 przedstawiono porównanie między poszczególnymi mikroorganizmami w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem wieku ciążowego (wcześniejsi vs. donoszone), a na wykresie 3 przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych



mikroorganizmów w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala u noworodków donoszonych i przedwcześnie urodzonych.

Tabela 12. Porównanie ilościowe składu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala w zależności od wieku ciążowego.

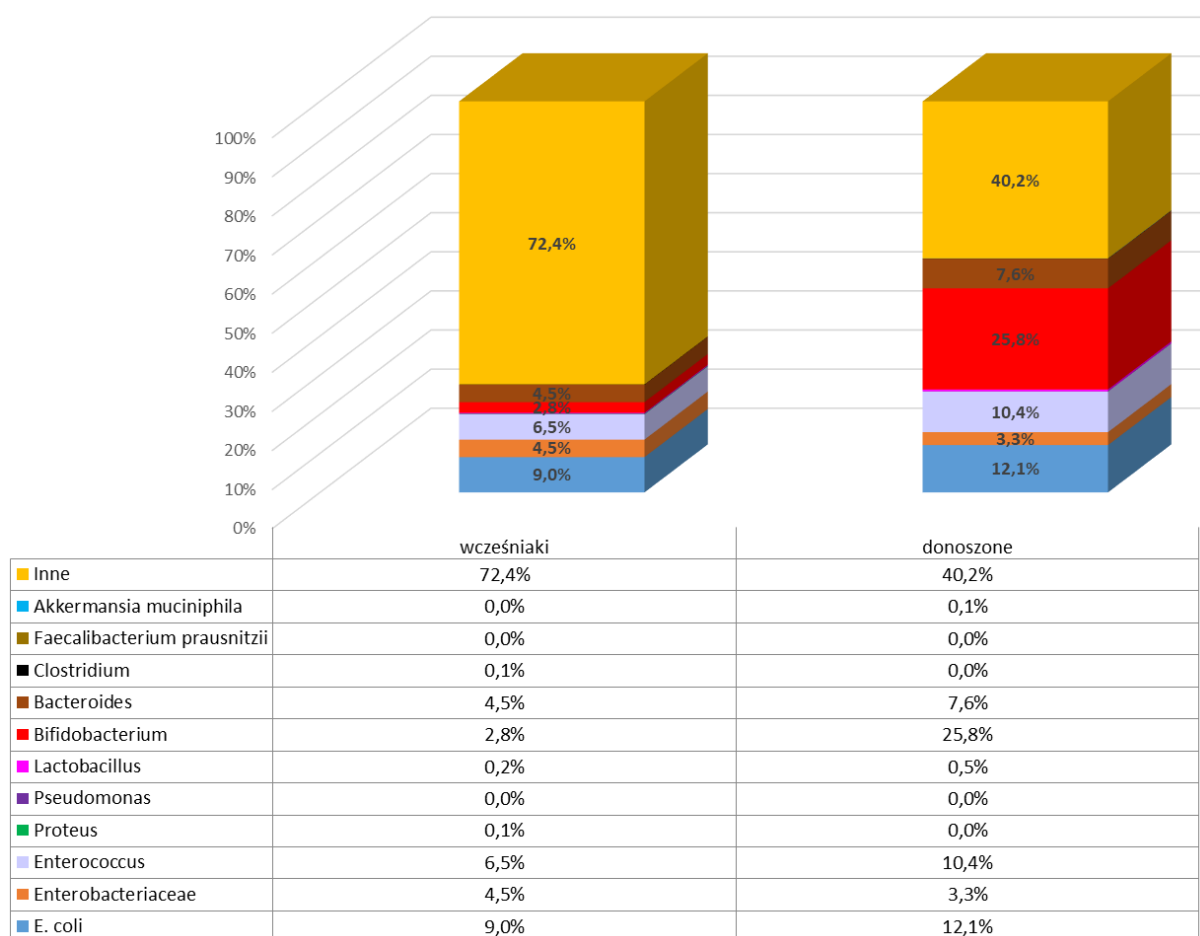
	Ogółem		<i>p</i> *
	Wcześniaki N=28	Donoszone N=32	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =273928571 SD=212800364 Me=300000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =800000000 Q25=100000000 Q75=350000000	$\bar{x}$ =336125000 SD=496853827 Me=200000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000000 Q25=3000000 Q75=450000000	<b>0,4508</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =135857143 SD=221655006 Me=35000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =800000000 Q25=3000000 Q75=100000000	$\bar{x}$ =91903125 SD=175841067 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =600000000 Q25=0 Q75=950000000	<b>0,0472</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =196143036 SD=195551023 Me=100000000 $x_{min}$ =5000 $x_{max}$ =800000000 Q25=55000000 Q75=300000000	$\bar{x}$ =288513750 SD=490081306 Me=100000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000000 Q25=10000000 Q75=400000000	<b>0,5765</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =3871429 SD=18876300 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =625000 SD=3535534 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=0	<b>0,1338</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-

<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =7075000 SD=7226731 Me=4000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=2000000 Q75=8500000	$\bar{x}$ =14565000 SD=25424836 Me=5500000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000000 Q25=150000 Q75=20000000	<b>0,9464</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =83602629 SD=328700351 Me=9990000 $x_{min}$ =81600 $x_{max}$ =1750000000 Q25=2810000 Q75=25800000	$\bar{x}$ =717649675 SD=2178841000 Me=23400000 $x_{min}$ =34000 $x_{max}$ =8900000000 Q25=7160000 Q75=81200000	<b>0,06506</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =135230148 SD=601088893 Me=154 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3160000000 Q25=0 Q75=2220560	$\bar{x}$ =211094287 SD=507146141 Me=1325 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2720000000 Q25=233 Q75=237000000	<b>0,0201</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ =1871429 SD=4287150 Me=200000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=750000	$\bar{x}$ =852294 SD=1960734 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =9000000 Q25=0 Q75=400000	<b>0,0963</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =1710 SD=1707 Me=1175 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6020 Q25=0 Q75=3140	$\bar{x}$ =1366 SD=1973 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6620 Q25=0 Q75=2760	<b>0,1376</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ =37500 SD=198431 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1050000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =1393143 SD=7703721 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =43600000, Q25=0 Q75=0	<b>0,0817</b>
TBC	$\bar{x}$ =3032929000 SD=3497751000 Me=1385000000 $x_{min}$ =48200000 $x_{max}$ =15400000000 Q25=679000000 Q75=4780000000	$\bar{x}$ =2778302000 SD=1902004000 Me=5240000000 $x_{min}$ =532000 $x_{max}$ =5240000000 Q25=488000000 Q75=4160000000	<b>0,8863</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=4185$	$\bar{x}=11556$	<b>0,6781</b>
	SD=19251	SD=42283	
	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=100000$	$x_{max}=200000$	
	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD - odchylenie standardowe, Me - mediana,  $x_{min}$  - wartość minimalna,  $x_{max}$  - wartość maksymalna, Q25 - kwartył dolny, Q75 - kwartył górny

Pomiędzy wcześniakami a noworodkami donoszonymi wykazano istotnie statystyczną różnicę względem liczby *Enterobacteriaceae* (p=0,0472) oraz *Bacteroides* (p=0,0201), w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala. Noworodki przedwcześnie urodzone charakteryzowały się wyższą liczbą *Enterobacteriaceae*, z kolei noworodki donoszone wyższą liczbą bakterii z rodzaju *Bacteroides*.



Wykres 3. Rozkład procentowy mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala u noworodków donoszonych i wcześniaków.

Zaobserwowano większy udział procentowy w mikrobiocie jelit noworodków urodzonych o czasie w zakresie *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Bacteroides* w porównaniu z noworodkami urodzonymi przedwcześnie.

Następnie dokonano analizy porównawczej między poszczególnymi mikroorganizmami w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala, względem wieku ciążowego z podziałem na sposób porodu. Wyniki przedstawiono w tabeli 13. Na wykresie 4 przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych mikroorganizmów w smółce u noworodków donoszonych i przedwcześnie urodzonych, z uwzględnieniem sposobu porodu.

Tabela 13. Porównanie ilościowe składu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala w zależności od wieku ciążowego, z uwzględnieniem sposobu porodu.

	Sposób porodu					
	PSN		<i>p</i> *	CC		<i>p</i> *
	Wcześnieiki N=11	Donoszone N=15		Wcześnieiki N=17	Donoszone N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =1872727 27 SD=1406478 52 Me=1000000 00 $x_{min}=0$ $x_{max}=4000000$ 00 Q25=100000 000 Q75=300000 000	$\bar{x}$ =405066667 SD=51711776 3 Me=20000000 0 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ 00 Q25=7000000 0 Q75=5000000 00	<b>0,3730</b>	$\bar{x}$ =3300000 00 SD=2356904 75 Me=3000000 00 $x_{min}=0$ $x_{max}=8000000$ 00 Q25=200000 000 Q75=600000 000	$\bar{x}$ =275294118 SD=485722627 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=200000000$ 0 Q25=0 Q75=40000000 0	<b>0,0904</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =1958181 82 SD=2254088 81 Me=9000000 0 $x_{min}=2000000$ $x_{max}=6000000$ 00 Q25=800000 0 Q75=500000 000	$\bar{x}$ =43393333 SD=15451668 6 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=60000000$ 0 Q25=0 Q75=400000	<b>0,0002</b>	$\bar{x}$ =9705882 4 SD=2169828 54 Me=1000000 0 $x_{min}=0$ $x_{max}=8000000$ 00 Q25=0 Q75=600000 00	$\bar{x}$ =134705882 SD=186718962 Me=900000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=600000000$ Q25=0 Q75=20000000 0	<b>0,5232</b>

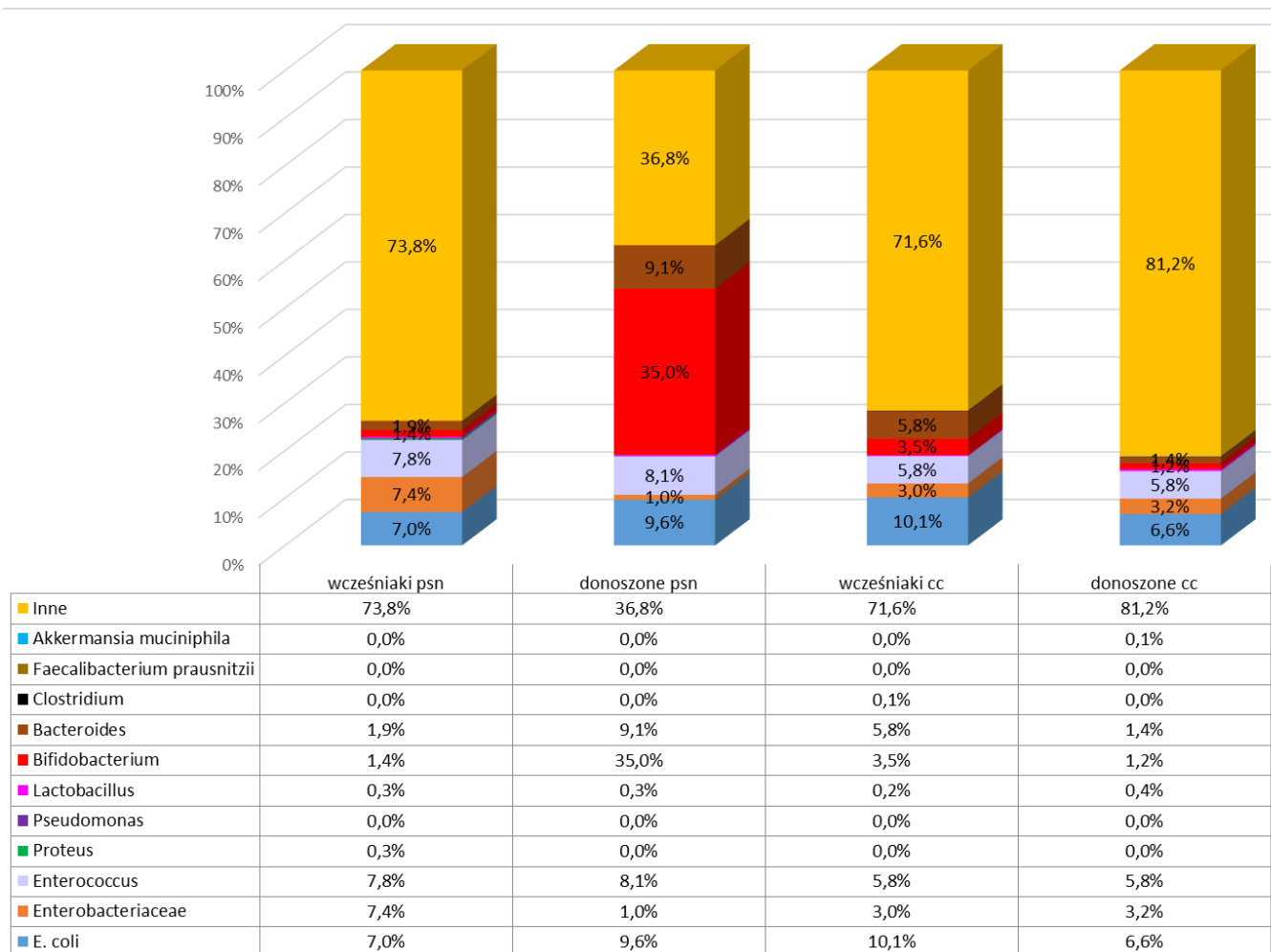
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =2072727 27 SD=2373643 15 Me=1000000 00 $x_{min}$ =5000000 0 $x_{max}$ =8000000 00 Q25=500000 00 Q75=400000 000	$\bar{x}$ =341762667 SD=68626371 2 Me=4000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000 00 Q25=400000 Q75=400000 00	<b>0,1670</b>	$\bar{x}$ =1889414 71 SD=1708111 26 Me=2000000 00 $x_{min}$ =5000 $x_{max}$ =6000000 00 Q25=600000 00 Q75=200000 000	$\bar{x}$ =241529412 SD=219673086 Me=200000000 $x_{min}$ =2000000 $x_{max}$ =600000000 Q25=80000000 Q75=40000000 0	<b>0,6144</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =9090909 SD=3015113 4 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1000000 00 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =1333333 SD=5163978 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000 Q25=0 Q75=0	<b>0,8223</b>	$\bar{x}$ =494118 SD=1500196 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6000000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	<b>0,0802</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =9245455 SD=8770560 Me=6000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000 0 Q25=200000 0 Q75=200000 00	$\bar{x}$ =13126667 SD=25210385 Me=6000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1000000 0 Q25=200000 Q75=200000 0	<b>0,6362</b>	$\bar{x}$ =5670588 SD=5892343 Me=4000000 $x_{min}$ =400000 $x_{max}$ =2000000 0 Q25=200000 0 Q75=600000 0	$\bar{x}$ =15834118 SD=26318706 Me=5000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000000 Q25=100000 Q75=20000000	<b>0,5910</b>

<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =3771414 5 SD=5544593 1 Me=1580000 0 $x_{min}$ =81600 $x_{max}$ =1670000 00 Q25=318000 0 Q75=570000 00	$\bar{x}$ =147246400 0 SD=30588030 00 Me=42800000 $x_{min}$ =34000 $x_{max}$ =89000000 00 Q25=3820000 Q75=2420000 00	<b>0,3241</b>	$\bar{x}$ =1132951 76 SD=4219220 94 Me=9680000 $x_{min}$ =250000 $x_{max}$ =1750000 000 Q25=276000 0 Q75=182000 00	$\bar{x}$ =51637271 SD=76255293 Me=20000000 $x_{min}$ =35600 $x_{max}$ =280000000 Q25=10500000 Q75=43200000	<b>0,1432</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =4996736 4 SD=1586302 12 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =5280000 00 Q25=0 Q75=444000 0	$\bar{x}$ =385000659 SD=70128913 9 Me=19000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =27200000 00 Q25=424 Q75=5720000 00	<b>0,0159</b>	$\bar{x}$ =1904001 85 SD=7653416 75 Me=308 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3160000 000 Q25=0 Q75=1120	$\bar{x}$ =57647489 SD=120905707 Me=584 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =428000000 Q25=0 Q75=2220	<b>0,3915</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ =705455 SD=1777011 Me=20000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6000000 Q25=40000 Q75=500000	$\bar{x}$ =357333 SD=893560 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3000000 Q25=0 Q75=60000	<b>0,2246</b>	$\bar{x}$ =2625882 SD=5244296 Me=400000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000 0 Q25=40000 Q75=200000 0	$\bar{x}$ =1289024 SD=2513504 Me=10000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =9000000 Q25=0 Q75=200000	<b>0,3025</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =1425 SD=1406 Me=1150 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3520 Q25=0 Q75=2700	$\bar{x}$ =577 SD=1585 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =5820 Q25=0 Q75=0	<b>0,0381</b>	$\bar{x}$ =1894 SD=1895 Me=1200 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6020 Q25=377 Q75=3440	$\bar{x}$ =2062 SD=2061 Me=2640 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6620 Q25=0 Q75=3200	<b>1,0000</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =80 SD=310 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1200 Q25=0 Q75=0	<b>0,4363</b>	$\bar{x}$ =61765 SD=254662 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1050000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =2622316 SD=10562235 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =43600000 Q25=0 Q75=2860	<b>0,0972</b>

TBC	$\bar{x}$ =2660109 000 SD=2293164 000 Me=1460000 000 $x_{min}$ =9520000 0 $x_{max}$ =6400000 000 Q25=596000 000 Q75=528000 0000	$\bar{x}$ =121237680 0 SD=17507110 00 Me=45200000 0 $x_{min}$ =532000 $x_{max}$ =52400000 00 Q25=1380000 00 Q75=9160000 00	<b>0,0379</b>	$\bar{x}$ =3274165 000 SD=4147446 000 Me=1260000 000 $x_{min}$ =4820000 0 $x_{max}$ =1540000 0000 Q25=702000 000 Q75=476000 0000	$\bar{x}$ =4160000000 SD=0 Me=416000000 0 $x_{min}$ =416000000 0 $x_{max}$ =416000000 0 Q25=41600000 00 Q75=41600000 00	<b>0,1221</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}$ =9364 SD=30074 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =17417 SD=57557 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000 Q25=0 Q75=0	<b>0,9629</b>	$\bar{x}$ =625 SD=2500 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =10000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =6867 SD=25776 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000 Q25=0 Q75=0	<b>0,5377</b>

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya; PSN – poród siłami natury; CC – cięcie cesarskie;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny

Wykazano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *Enterobacteriaceae* (p=0,0002), *Bacteroides* (p=0,0159), *F. prausnitzii* (p=0,0381) oraz ogólnej liczby bakterii TBC (p=0,0379) w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala, między wcześniakami urodzonymi siłami natury a noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury. U wcześniaków stwierdzono wyższą liczbę *Enterobacteriaceae*, *F. prausnitzii*, TBC, a u noworodków donoszonych *Bacteroides*. Pomiedzy wcześniakami a noworodkami donoszonymi urodzonymi przez CC nie wykazano żadnych istotnie statystycznych różnic w stolcu po 6 tygodniach od wypisu ze szpitala między analizowanymi mikroorganizmami.



Wykres 4. Rozkład procentowy mikrobioty w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala u noworodków donoszonych i wcześniaków z uwzględnieniem sposobu porodu.

Zbiorczy wykres przedstawiający procentowy rozkład mikrobioty jelit noworodków pokazuje, że w 6 tygodniu życia tylko noworodki urodzone o czasie drogą fizjologiczną prezentują optymalny profil mikrobioty jelita z przewagą *Bifidobacterium* i *Bacteroides*.

#### 4.4. Analiza modyfikacji mikrobioty w zależności od czasu

Porównano także zmianę profilu mikrobioty w czasie, czyli dwóch punktach czasowych (smółka vs. stolec 6 tygodni po wypisie ze szpitala) dla noworodków donoszonych oraz trzech punktach czasowych (smółka vs. stolec w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego vs. stolec 6 tygodni po wypisie ze szpitala) dla noworodków przedwcześnie urodzonych.



#### 4.4.1. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych siłami natury

W tabeli 14 przedstawiono zmianę profilu mikrobioty w czasie, w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki, u noworodków donoszonych urodzonych siłami natury.

Tabela 14. Analiza modyfikacji składu ilościowego mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie.

	Donoszone PSN N=15		<i>p</i> *
	Smółka	6 tygodni po wypisie ze szpitala	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =53367067 SD=124579129 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =400000000 Q25=0 Q75=200000	$\bar{x}$ =405066667 SD=517117763 Me=200000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=70000000 Q75=500000000	<b>0,0015</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =13333 SD=51640 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =43393333 SD=154516686 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =600000000 Q25=0 Q75=400000	<b>0,0679</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =30965093 SD=102467279 Me=40000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =400000000 Q25=200 Q75=600000	$\bar{x}$ =341762667 SD=686263712 Me=40000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=400000 Q75=400000000	<b>0,0045</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =13 SD=52 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =1333333 SD=5163978 Me=0 $x_{min}$ =20000000 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-

<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=480$ SD=1110 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=4000$ Q25=0 Q75=200	$\bar{x}=13126667$ SD=25210385 Me=6000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=200000 Q75=20000000	<b>0,0019</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=698088$ SD=2656324 Me=7800 $x_{min}=0$ $x_{max}=10300000$ Q25=4520 Q75=14100	$\bar{x}=1472464000$ SD=3058803000 Me=42800000 $x_{min}=34000$ $x_{max}=8900000000$ Q25=3820000 Q75=242000000	<b>0,0007</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=885$ SD=2490 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=9540$ Q25=0 Q75=392	$\bar{x}=385000659$ SD=701289139 Me=19000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=2,720000000$ Q25=424 Q75=572000000	<b>0,0012</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=357333$ SD=893560 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=3000000$ Q25=0 Q75=60000	<b>0,0679</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=463$ SD=1190 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=3820$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=577$ SD=1585 Me=0,00 $x_{min}=0$ $x_{max}=5820$ Q25=0 Q75=0	<b>0,7150</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=53$ SD=207 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=800$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=80$ SD=310 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1200$ Q25=0 Q75=0	<b>0,6547</b>

TBC	$\bar{x}=93649470$ SD=313807900 Me=632000 $x_{min}=108000$ $x_{max}=1220000000$ Q25=135000 Q75=2020000	$\bar{x}=1212377000$ SD=1750711000 Me=452000000 $x_{min}=532000$ $x_{max}=5240000000$ Q25=138000000 Q75=916000000	<b>0,0008</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=17417$ SD=57557 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,1797</b>

\* wartość prawdopodobieństwa testu Wilcoxon;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny

W tej grupie noworodków wykazano istotnie statystyczną różnicę w zmianie liczebności następujących mikroorganizmów w czasie: *E. coli* (0,0015), *Enterococcus* (p=0,0045), *Lactobacillus* (p=0,0019), *Bifidobacterium* (p=0,0007), *Bacteroides* (p=0,0012) oraz TBC (p=0,0008). We wszystkich przypadkach wymienionych powyżej bakterii, w stolcu po 6 tygodniach względem smółki, było ich znacząco więcej.

#### **4.4.2. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych poprzez CC**

W tabeli 15 przedstawiono zmianę profilu mikrobioty w czasie, w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki, u noworodków donoszonych urodzonych siłami natury.

Tabela 15. Analiza modyfikacji składu ilościowego mikrobioty w czasie u noworodków donoszonych urodzonych poprzez CC.

	Donoszone CC N=17		<i>p</i> *
	Smółka	6 tygodni po wypisie ze szpitala	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=275294118$ SD=485722627 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000000000$ Q25=0 Q75=400000000	<b>0,0034</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=134705882$ SD=186718962 Me=90000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=600000000$ Q25=0 Q75=200000000	<b>0,0051</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=241529412$ SD=219673086 Me=200000000 $x_{min}=2000000$ $x_{max}=600000000$ Q25=80000000 Q75=400000000	<b>0,0003</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-

<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=118$ SD=485 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=15834118$ SD=26318706 Me=5000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=100000 Q75=20000000	<b>0,0008</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=11058$ SD=18188 Me=2560 $x_{min}=0$ $x_{max}=54600$ Q25=0 Q75=9400	$\bar{x}=51637271$ SD=76255293 Me=20000000 $x_{min}=35600,00,$ $x_{max}=280000000,$ Q25=10500000 , Q75=43200000	<b>0,0003</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=165$ SD=370 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1030$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=57647489$ SD=120905707 Me=584,0000 $x_{min}=0$ $x_{max}=428000000$ Q25=0 Q75=2220	<b>0,0076</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=1289024$ SD=2513504 Me=10000 $x_{min}=0$ $x_{max}=9000000$ Q25=0 Q75=2000000	<b>0,0033</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1771$ SD=1846 Me=2260 $x_{min}=0$ $x_{max}=5000$ Q25=0 Q75=3060	$\bar{x}=2062$ SD=2061 Me=2640 $x_{min}=0$ $x_{max}=6620$ Q25=0 Q75=3200	<b>0,3465</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=2622316$ SD=10562235 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=43600000$ Q25=0 Q75=2860	<b>0,0432</b>
TBC	$\bar{x}=667764$ SD=872729 Me=670000 $x_{min}=101000$ $x_{max}=3820000$ Q25=116000 Q75=784000	$\bar{x}=4160000000$ SD=0 Me=4160000000 $x_{min}=4160000000$ $x_{max}=4160000000$ Q25=4160000000 Q75=4160000000	<b>0,0003</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$	$\bar{x}=6867$	<b>0,1797</b>
	SD=0	SD=25776	
	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=0$	$x_{max}=100000$	
	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Wilcoxon;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; CC – cięcie cesarskie

W tej grupie noworodków wykazano istotnie statystyczną różnicę w zmianie liczebności następujących mikroorganizmów w czasie: *E. coli* (0,0034), *Enterobacteriaceae* (p=0,0051), *Enterococcus* (0,0003), *Lactobacillus* (p=0,0008), *Bifidobacterium* (p=0,0003), *Bacteroides* (p=0,0076), *Clostridium* (p=0,0033), *A. muciniphila* (p=0,0432) oraz TBC (p=0,0003). We wszystkich przypadkach wymienionych powyżej bakterii, w stolcu po 6 tygodniach względem smółki, było ich znamienne więcej.

#### **4.4.3. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych siłami natury**

W tabeli 16 przedstawiono zmianę profilu mikrobioty w czasie, w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem stolca w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego oraz smółki, u wcześniaków urodzonych siłami natury.

Tabela 16. Analiza modyfikacji składu ilościowego mikrobioty w czasie u wcześniaków urodzonych fizjologicznie.

	Wcześniaki PSN N=11			<i>p</i> *
	Smółka I	34. tydz. skorygowanego życia postkonceptyj- nego II	6 tygodni po wypisie ze szpitala III	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=318181818$ SD=594673325 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000000000$ Q25=0 Q75=400000000	$\bar{x}=187272727$ SD=140647852 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=400000000$ Q25=100000000 Q75=300000000	<b>0,0067</b>  I vs. II <b>0,0990</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0231</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=245454545$ SD=246429042 Me=300000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=800000000$ Q25=0 Q75=400000000	$\bar{x}=195818182$ SD=225408881 Me=900000000 $x_{min}=2000000$ $x_{max}=600000000$ Q25=8000000 Q75=500000000	<b>0,0022</b>  I vs. II <b>0,0167</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0085</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=230001818$ SD=265177450 Me=200000000 $x_{min}=20000$ $x_{max}=800000000$ Q25=300000000 Q75=400000000	$\bar{x}=207272727$ SD=237364315 Me=100000000 $x_{min}=50000000$ $x_{max}=800000000$ Q25=500000000 Q75=400000000	<b>0,0002</b>  I vs. II <b>0,0060</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0002</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=9090909$ SD=30151134 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,3679</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-

<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=2221818$ SD=3459774 Me=600000 $x_{min}=0$ $x_{max}=10000000$ Q25=0 Q75=6000000	$\bar{x}=9245455$ SD=8770560 Me=6000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=2000000 Q75=2000000	<b>0,0006</b>  I vs. II <b>0,1650</b> II vs. III <b>0,3295</b> I vs. III <b>0,0013</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=2032$ SD=3914 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=10000$ Q25=0 Q75=1390	$\bar{x}=977740$ SD=1489623 Me=156000 $x_{min}=3140$ $x_{max}=4100000$ Q25=40800 Q75=2680000	$\bar{x}=37714145$ SD=55445931 Me=15800000 $x_{min}=81600$ $x_{max}=167000000$ Q25=3180000 Q75=57000000	<b>&lt;0,0001</b>  I vs. II <b>0,0315</b> II vs. III <b>0,1650</b> I vs. III <b>0,0001</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=50$ SD=166 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=550$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=204$ SD=288 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=672$ Q25=0 Q75=566	$\bar{x}=49967364$ SD=158630212 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=528000000$ Q25=0 Q75=4440000	<b>0,1117</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=2258727$ SD=6004342 Me=2000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=0 Q75=800000	$\bar{x}=705455$ SD=1777011 Me=20000 $x_{min}=0$ $x_{max}=6000000$ Q25=0 Q75=500000	<b>0,0564</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1283$ SD=1405 Me=694 $x_{min}=0$ $x_{max}=3640$ Q25=0 Q75=2380	$\bar{x}=3502$ SD=3959 Me=2560 $x_{min}=0$ $x_{max}=13700$ Q25=535 Q75=5660	$\bar{x}=1425$ SD=1406 Me=1150 $x_{min}=0$ $x_{max}=3520$ Q25=0 Q75=2700	<b>0,0258</b>  I vs. II <b>0,0426</b> II vs. III <b>0,2642</b> I vs. III <b>1,0000</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=933$ SD=2283 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=7260$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	<b>0,13534</b>
TBC	$\bar{x}=570418$ SD=545907 Me=372000 $x_{min}=55400$ $x_{max}=1600000$ Q25=74800 Q75=1010000	$\bar{x}=2987796000$ SD=2816588000 Me=2020000000 $x_{min}=758000$ $x_{max}=8440000000$ Q25=672000000 Q75=5100000000	$\bar{x}=2660109000$ SD=2293164000 Me=1460000000 $x_{min}=95200000$ $x_{max}=6400000000$ Q25=596000000 Q75=5280000000	<b>0,0003</b>  I vs. II <b>0,0009</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,00194</b>



Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$	$\bar{x}=22727$	$\bar{x}=9364$	<b>0,2231</b>
	SD=0	SD=0	SD=0	
	Me=0	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=0$	$x_{max}=200000,0$	$x_{max}=100000$	
	Q25=0	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Friedmana z testem wielokrotnych porównań Dunna;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; PSN – poród siłami natury

W tej grupie noworodków wykazano istotnie statystyczną różnicę w zmianie liczebności następujących mikroorganizmów w czasie: *E. coli* (p=0,0067), dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0231); *Enterobacteriaceae* (p=0,0022), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki (p=0,0167) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0085), nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem stolca w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego; *Enterococcus* (p=0,0002), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki (p=0,0060) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0002); *Lactobacillus* (p=0,0006), dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0013); *Bifidobacterium* (p<0,0001), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki (p=0,0315) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0001); *F. prausnitzii* (p=0,0258), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki (p=0,0426) oraz TBC (p=0,0003), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki (p=0,0009) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki (p=0,0019).

We wszystkich przypadkach wymienionych powyżej bakterii, w stolcu po 6 tygodniach oraz w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki, było ich znamienne więcej.

#### 4.4.4. Analiza modyfikacji mikrobioty w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych poprzez CC

W tabeli 17 przedstawiono zmianę profilu mikrobioty w czasie, w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem stolca w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego oraz smółki, u wcześniaków urodzonych poprzez cięcie cesarskie.

Tabela 17. Analiza modyfikacji składu ilościowego mikrobioty w czasie u wcześniaków urodzonych poprzez cesarskie cięcie.

	Wcześniaki CC N=17			<i>p</i> *
	Smółka I	34. tydz. skorygowanego życia postkonceptyj- nego II	6 tygodni po wypisie ze szpitala III	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=261764706$ SD=236860594 Me=400000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=600000000$ Q25=0 Q75=400000000	$\bar{x}=330000000$ SD=235690475 Me=300000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=800000000$ Q25=200000000 Q75=600000000	<b>&lt;0,0001</b>  I vs. II <b>0,0081</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0007</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=186470588$ SD=308604544 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1000000000$ Q25=0 Q75=200000000	$\bar{x}=97058824$ SD=216982854 Me=10000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=800000000$ Q25=0 Q75=60000000	<b>0,0024</b>  I vs. II <b>0,0491</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0387</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=24$ SD=66 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=115905882$ SD=126372270 Me=80000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=400000000$ Q25=20000000 Q75=200000000	$\bar{x}=188941471$ SD=170811126 Me=200000000 $x_{min}=5000$ $x_{max}=600000000$ Q25=60000000 Q75=200000000	<b>&lt;0,0001</b>  I vs. II <b>0,0009</b> II vs. III <b>0,5951</b> I vs. III <b>0,0001</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=494118$ SD=1500196 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=6000000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,0598</b>

<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=9075765$ SD=24054288 Me=100000 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=4000 Q75=6000000	$\bar{x}=5670588$ SD=5892343 Me=4000000 $x_{min}=400000$ $x_{max}=20000000$ Q25=2000000 Q75=6000000	<b>&lt;0,0001</b> I vs. II <b>0,0034</b> II vs. III <b>0,4347</b> I vs. III <b>0,0001</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=2775$ SD=10293 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=42600$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=36351561$ SD=117152669 Me=2780000 $x_{min}=0$ $x_{max}=484000000$ Q25=25000 Q75=6180000	$\bar{x}=113295176$ SD=421922094 Me=9680000 $x_{min}=250000$ $x_{max}=1750000000$ Q25=2760000 Q75=18200000	<b>&lt;0,0001</b> I vs. II <b>0,0009</b> II vs. III <b>0,9105</b> I vs. III <b>0,0001</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=68$ SD=151 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=414$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=172$ SD=352 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1140$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=190400185$ SD=765341675 Me=308 $x_{min}=0$ $x_{max}=3160000000$ Q25=0 Q75=1120	<b>0,0537</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=547529$ SD=1321780 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=4000000$ Q25=0 Q75=100000	$\bar{x}=2625882$ SD=5244296 Me=400000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=40000 Q75=2000000	<b>0,0003</b> I vs. II <b>0,2590</b> II vs. III <b>0,2590</b> I vs. III <b>0,0018</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1429$ SD=1587 Me=1020 $x_{min}=0$ $x_{max}=4280$ Q25=0 Q75=2740	$\bar{x}=2170$ SD=2525 Me=1720 $x_{min}=0$ $x_{max}=8960$ Q25=202 Q75=2680	$\bar{x}=1894$ SD=1895 Me=1200 $x_{min}=0$ $x_{max}=6020$ Q25=377 Q75=3440	<b>0,8102</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=134$ SD=535 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=2140$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=61765$ SD=254662 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1050000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,6065</b>
TBC	$\bar{x}=1677094$ SD=3826856 Me=97400 $x_{min}=39200$ $x_{max}=13700000$ Q25=56000 Q75=798000	$\bar{x}=2482168000$ SD=2178730000 Me=1660000000 $x_{min}=1210000$ $x_{max}=6640000000$ Q25=600000000 Q75=3760000000	$\bar{x}=3274165000$ SD=4147446000M e=1260000000 $x_{min}=48200000$ $x_{max}=15400000000$ Q25=702000000 Q75=4760000000	<b>&lt;,0001</b> I vs. II <b>0,0002</b> II vs. III <b>1,0000</b> I vs. III <b>0,0001</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$	$\bar{x}=176471$	$\bar{x}=625$	<b>0,6065</b>
	SD=0	SD=0	SD=0	
	Me=0	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=0$	$x_{max}=3000000$	$x_{max}=10000$	
	Q25=0	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Friedmana z testem wielokrotnych porównań Dunna;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; CC – cięcie cesarskie

W tej grupie noworodków wykazano istotnie statystyczną różnicę w zmianie liczebności następujących mikroorganizmów w czasie: *E. coli* ( $p<0,0001$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,0081$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0007$ ); *Enterobacteriaceae* ( $p=0,0024$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,0491$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0387$ ); *Enterococcus* ( $p<0,0001$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,0009$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p<0,0001$ ); *Lactobacillus* ( $p=0,0001$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,034$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0001$ ); *Bifidobacterium* ( $p<0,0001$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,0009$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0001$ ); *Clostridium* ( $p=0,0003$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0018$ ) oraz TBC ( $p<0,0001$ ), dla zmiany liczby bakterii w stolcu w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki ( $p=0,0002$ ) oraz dla zmiany liczby bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala względem smółki ( $p=0,0001$ ).

We wszystkich przypadkach wymienionych powyżej bakterii, w stolcu po 6 tygodniach oraz w 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki, było ich znamiennie więcej.

#### 4.5. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie między badanymi grupami

Następnie dokonano porównania różnic w liczbie poszczególnych mikroorganizmów w czasie w badanych grupach.

##### 4.5.1. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych z podziałem na rodzaj porodu

W tabeli 18 przedstawiono wyniki porównania różnic przyrostu mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych z podziałem na sposób porodu.

Tabela 18. Różnica w liczbie bakterii w czasie w 6 tygodniu względem smółki u noworodków donoszonych.

	Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6 tygodniu względem smółki		$p^*$
	Donoszone PSN N=15	Donoszone CC N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=351699600$ SD=513324381 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000000000$ Q25=70000000 Q75=499800000	$\bar{x}=275294118$ SD=485722627 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=2000000000$ Q25=0 Q75=400000000	<b>0,3902</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=43380000$ SD=154520670 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=600000000$ Q25=0 Q75=200000	$\bar{x}=134705882$ SD=186718962 Me=90000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=600000000$ Q25=0 Q75=200000000	<b>0,0373</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=310797573$ SD=623806384 Me=38000000 $x_{min}=-29960000$ $x_{max}=2000000000$ Q25=398000,0 Q75=394000000	$\bar{x}=241529412$ SD=219673086 Me=200000000 $x_{min}=2000000$ $x_{max}=600000000$ Q25=80000000 Q75=400000000	<b>0,0820</b>

<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =1333320 SD=5163926 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =19999800 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	<b>0,3164</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =13126187 SD=25210345 Me=5998000 $x_{min}$ = -200 $x_{max}$ =100000000 Q25=200000 Q75=19996000	$\bar{x}$ =15834000 SD=26318706 Me=5000000 $x_{min}$ = -2000 $x_{max}$ =100000000 Q25=100000 Q75=20000000	<b>0,7188</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =1471766000 SD=3057288000 Me=42795480 $x_{min}$ =26760,00 $x_{max}$ =8899958000 Q25=3820000 Q75=241986200	$\bar{x}$ =51626212 SD=76259270 Me=20000000 $x_{min}$ =35600 $x_{max}$ =280000000 Q25=10497440 Q75=43200000	<b>0,4061</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =384999775 SD=701289084 Me=19000000 $x_{min}$ = -158 $x_{max}$ =2719999000 Q25=424 Q75=572000000	$\bar{x}$ =57647323 SD=120905791 Me=480 $x_{min}$ = -386 $x_{max}$ =428000000 Q25=0 Q75=1370	<b>0,0228</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ = 357333 SD=893560 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3000000 Q25=0 Q75=60000	$\bar{x}$ =1289024 SD=2513504 Me=10000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =9000000 Q25=0 Q75=2000000	<b>0,0566</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =114 SD=858 Me=0 $x_{min}$ = -1340 $x_{max}$ =2920 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =292 SD=1295 Me=0 $x_{min}$ = -2300 $x_{max}$ =3560 Q25=0 Q75=424	<b>0,3227</b>

<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=27$ SD=384 Me=0 $x_{min}=-800$ $x_{max}=1200$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=2622316$ SD=10562235 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=43600000$ Q25=0 Q75=2860	<b>0,0535</b>
TBC	$\bar{x}=1118727000$ SD=1628678000 Me=451835000 $x_{min}=-1018000$ $x_{max}=5239368000$ Q25=137892000 Q75=915580000	$\bar{x}=4159332000$ SD=872729 Me=4159330000 $x_{min}=4156180000$ $x_{max}=4159899000$ Q25=4159216000 Q75=4159884000	<b>0,0001</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=19000$ SD=60092 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=6867$ SD=25776 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,7100</b>

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; PSN – poród siłami natury, CC – cięcie cesarskie

Porównując między sobą dwie grupy noworodków donoszonych, w zależności od sposobu porodu wykazano, iż różnice w przyroście mikroorganizmów w stolcu w 6. tygodniu względem smółki były istotnie statystyczne dla następujących bakterii: rodziny *Enterobacteriaceae* ( $p=0,0373$ ), gdzie większa różnica w mianie bakterii po 6 tygodniach pobytu w domu była w grupie dzieci urodzonych poprzez CC; *Bacteroides* ( $p=0,0228$ ), gdzie większa różnica w mianie bakterii po 6 tygodniach od wypisu ze szpitala była u noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie; TBC ( $p=0,0001$ ), gdzie większa różnica ogólnej liczby bakterii stwierdzona została u dzieci urodzonych cięciem cesarskim.

#### 4.5.2. Analiza porównawcza różnicy w liczbie mikroorganizmów w czasie u noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na rodzaj porodu

Takie samo porównanie wykonano dla noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na sposób porodu. W tabeli 19 przedstawiono wyniki porównania różnic przyrostu mikroorganizmów w czasie, w 34. tygodniu skorygowanego życia

postkonceptyjnego względem smółki u noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na sposób porodu.

Tabela 19. Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 34. tygodniu skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki u noworodków przedwcześnie urodzonych.

	Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 34 tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki		<i>p</i> *
	Wcześnieiki PSN N=11	Wcześnieiki CC N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =318181818 SD=594673325 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=0 Q75=400000000	$\bar{x}$ =261764706 SD=236860594 Me=400000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =600000000 Q25=0 Q75=400000000	<b>0,4302</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =245454545 SD=246429042 Me=300000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =800000000 Q25=0 Q75=400000000	$\bar{x}$ =186470588 SD=308604544 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =1000000000 Q25=0 Q75=200000000	<b>0,3714</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =230001818 SD=265177450 Me=200000000 $x_{min}$ =20000 $x_{max}$ =800000000 Q25=300000000, Q75=400000000	$\bar{x}$ =115905859 SD=126372271 Me=800000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =400000000 Q25=200000000 Q75=199999800	<b>0,3692</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =19999800 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-



<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =2221818 SD=3459774 Me=600000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =10000000 Q25=0 Q75=6000000	$\bar{x}$ =9075765 SD=24054288 Me=100000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000000 Q25=4000 Q75=6000000	<b>0,4618</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =975708 SD=1489155 Me=156000 $x_{min}$ =2488 $x_{max}$ =4100000 Q25=30800 Q75=2680000	$\bar{x}$ =36348787 SD=117153495 Me=2780000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =484000000 Q25=21820 Q75=6180000	<b>0,3714</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =154 SD=364 Me=0 $x_{min}$ =-550 $x_{max}$ =672 Q25=0 Q75=566	$\bar{x}$ =105 SD=391 Me=0 $x_{min}$ =-414 $x_{max}$ =1140 Q25=0 Q75=0	<b>0,5935</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ =2258727 SD=6004342 Me=2000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=800000	$\bar{x}$ =547529 SD=1321780 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =4000000 Q25=0 Q75=100000	<b>0,5563</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =2219 SD=3214 Me=1660 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =11320 Q25=255 Q75=2560	$\bar{x}$ =797 SD=2164 Me=0 $x_{min}$ =-1640 $x_{max}$ =6440 Q25=-640 Q75=1720	<b>0,0747</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ =933 SD=2283 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =7260 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =134 SD=535 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2140 Q25=0 Q75=0	<b>0,3200</b>
TBC	$\bar{x}$ =2987226000 SD=2816245000 Me=2019022000 $x_{min}$ =702600 $x_{max}$ =8438400000 Q25=670990000 Q75=5098880000	$\bar{x}$ =2480491000 SD=2178755000 Me=1659947400 $x_{min}$ =1127600 $x_{max}$ =6639202000 Q25=599092000 Q75=3759150000	<b>0,7419</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=22727$	$\bar{x}=187500$	<b>0,4158</b>
	SD=60678	SD=750000	
	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=200000$	$x_{max}=3000000$	
	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD - odchylenie standardowe, Me - mediana,  $x_{min}$  - wartość minimalna,  $x_{max}$  - wartość maksymalna, Q25 - kwartył dolny, Q75 - kwartył górny; PSN - poród siłami natury, CC - cięcie cesarskie

W analizowanym przedziale czasowym sposób porodu nie różnił badanych grup pod względem przyrostu liczby mikroorganizmów w czasie i dla żadnego z analizowanych mikroorganizmów nie wykazano istotności statystycznej.

W tabeli 20 przedstawiono wyniki porównania różnic przyrostu mikroorganizmów w czasie, w 6 tygodniu względem smółki u noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na sposób porodu.

Tabela 20. Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6. tygodniu względem smółki u noworodków przedwcześnie urodzonych.

	Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6 tygodniu względem smółki		$p^*$
	Wcześnieiki PSN N=11	Wcześnieiki CC N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}=187272727$ SD=140647852 Me=100000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=400000000$ Q25=100000000 Q75=300000000	$\bar{x}=330000000$ SD=235690475 Me=300000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=800000000$ Q25=200000000 Q75=600000000	<b>0,1447</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}=195818182$ SD=225408881 Me=90000000 $x_{min}=2000000$ $x_{max}=600000000$ Q25=8000000 Q75=500000000	$\bar{x}=97058824$ SD=216982854 Me=10000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=800000000$ Q25=0 Q75=60000000	<b>0,0395</b>

<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}=207272727$ SD=237364315 Me=100000000 $x_{min}=50000000$ $x_{max}=800000000$ Q25=50000000, Q75=400000000	$\bar{x}=188941447$ SD=170811139 Me=199999800 $x_{min}=5000$ $x_{max}=600000000$ Q25=60000000 Q75=200000000	<b>0,9811</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}=9090909$ SD=30151134 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=494118$ SD=1500196 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=6000000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,6429</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=9245455$ SD=8770560 Me=6000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=2000000 Q75=20000000	$\bar{x}=5670588$ SD=5892343 Me=4000000 $x_{min}=400000$ $x_{max}=20000000$ Q25=2000000 Q75=6000000	<b>0,4914</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=37712113$ SD=55446775 Me=15799486 $x_{min}=81600$ $x_{max}=167000000$ Q25=3180000 Q75=57000000	$\bar{x}=113292402$ SD=421911836 Me=9680000 $x_{min}=250000$ $x_{max}=1749957400$ Q25=2759120 Q75=18200000	<b>0,4516</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=49967314$ SD=158630223 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=528000000$ Q25=0 Q75=4440000	$\bar{x}=190400117$ SD=765341693 Me=33 $x_{min}=-372$ $x_{max}=3160000000$ Q25=0 Q75=1120	<b>1,0000</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=705455$ SD=1777011 Me=20000 $x_{min}=0$ $x_{max}=6000000$ Q25=0 Q75=500000	$\bar{x}=2625882$ SD=5244296 Me=400000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=40000 Q75=2000000	<b>0,1650</b>

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=142$ SD=1443 Me=0 $x_{min}=-2380$ $x_{max}=2440$ Q25=-120 Q75=1180	$\bar{x}=465$ SD=1204 Me=180 $x_{min}=-1160$ $x_{max}=3500$ Q25=-20 Q75=499	<b>0,8503</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=61765$ SD=254662 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1050000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4646</b>
TBC	$\bar{x}=2659539000$ SD=2293434000 Me=1459937600 $x_{min}=94222000$ $x_{max}=6399945000$ Q25=595232000 Q75=5279628000	$\bar{x}=3272488000$ SD=4146464000 Me=1259902600 $x_{min}=48144000$ $x_{max}=15399960000$ Q25=701092000 Q75=4759302000	<b>0,8878</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=9364$ SD=30074 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=667$ SD=2582 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=10000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4000</b>

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD - odchylenie standardowe, Me - mediana,  $x_{min}$  - wartość minimalna,  $x_{max}$  - wartość maksymalna, Q25 - kwartył dolny, Q75 - kwartył górny; PSN - poród siłami natury, CC - cięcie cesarskie

W tym przedziale czasowym wykazano istotnie statystyczną różnicę w przyroście bakterii jedynie dla rodziny *Enterobacteriaceae* (p=0,0395). Wcześniaki urodzone siłami natury charakteryzowały się wyższą różnicą liczby *Enterobacteriaceae* w stolcu, w 6. tygodniu względem smółki, aniżeli dzieci urodzone przedwcześnie, ale siłami natury.

W tabeli 21 przedstawiono wyniki porównania różnic przyrostu mikroorganizmów w czasie, w 6. tygodniu względem smółki u noworodków przedwcześnie urodzonych z podziałem na sposób porodu.

Tabela 21. Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6. tygodniu względem 34. tygodnia skorygowanego życia postkonceptyjnego u noworodków przedwcześnie urodzonych.

	Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6 tygodniu względem 34 tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego		<i>p</i> *
	Wcześniaki PSN N=11	Wcześniaki CC N=17	
<i>E. coli</i>	$\bar{x} = -130909091$ SD=634436042 Me=0 $x_{min} = -1900000000$ $x_{max} = 400000000$ Q25= -200000000 Q75=300000000	$\bar{x} = 68235294$ SD=313792035 Me=0 $x_{min} = -3900000000$ $x_{max} = 750000000$ Q25= -200000000 Q75=200000000	<b>0,7230</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x} = -49636364$ SD=284179969 Me= -198000000 $x_{min} = -340000000$ $x_{max} = 600000000$ Q25= -296000000 Q75=100000000	$\bar{x} = -89411765$ SD=270097913 Me=0 $x_{min} = -780000000$ $x_{max} = 400000000$ Q25= -94000000 Q75=20000000	<b>0,9624</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x} = -22729091$ SD=294417131 Me=300000000 $x_{min} = -750000000$ $x_{max} = 350000000$ Q25= -100000000 Q75=200000000	$\bar{x} = 73035588$ SD=179103638 Me=600000000 $x_{min} = -300000000$ $x_{max} = 380000000$ Q25=0 Q75=200000000	<b>0,5556</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x} = 9090909$ SD=30151134 Me=0 $x_{min} = 0$ $x_{max} = 100000000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x} = 494118$ SD=1500196 Me=0 $x_{min} = 0$ $x_{max} = 6000000$ Q25=0 Q75=0	<b>0,6429</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x} = 0$ SD=0 Me=0 $x_{min} = 0$ $x_{max} = 0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x} = 0$ SD=0 Me=0 $x_{min} = 0$ $x_{max} = 0$ Q25=0 Q75=0	-

<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =7023636 SD=8783197 Me=2000000 $x_{min}$ =-2000000 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=19200000	$\bar{x}$ = -3405176 SD=25675493 Me=1900000 $x_{min}$ = -97000000 $x_{max}$ =19996000 Q25= -4000000 Q75=4000000	<b>0,3003</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =36736405 SD=54550453 Me=15775800 $x_{min}$ = -74400 $x_{max}$ =162900000 Q25=3091800 Q75=54320000	$\bar{x}$ =76943615 SD=444579225 Me=2740000 $x_{min}$ = -453600000 $x_{max}$ =1746300000 Q25= -1320000 Q75=12275000	<b>0,0599</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =49967160 SD=158630281 Me=0 $x_{min}$ = -672 $x_{max}$ =528000000 Q25= -436 Q75=4439430	$\bar{x}$ =190400012 SD=765341721 Me=0 $x_{min}$ = -1140 $x_{max}$ =3160000000 Q25=0 Q75=1120	<b>0,7741</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ = -1553273 SD=6522963 Me=0 $x_{min}$ = -19960000 $x_{max}$ =6000000 Q25= -780000 Q75=500000	$\bar{x}$ =2078353 SD=5675359 Me=398000 $x_{min}$ = -4000000 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=2000000	<b>0,2033</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ = -2077 SD=4173 Me= -535 $x_{min}$ = -13700 $x_{max}$ =1230 Q25= -2960 Q75=201	$\bar{x}$ = -372 SD=1548 Me= -110 $x_{min}$ = -2940 $x_{max}$ =2720 Q25= -1532 Q75=520	<b>0,2886</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ = -933 SD=2283 Me=0 $x_{min}$ = -7260 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =65491 SD=262536 Me=0 $x_{min}$ = -2140,00 $x_{max}$ =1050000 Q25=0 Q75=0	<b>0,2160</b>
TBC	$\bar{x}$ = -327687091 SD=4383963000 Me= -350000000 $x_{min}$ = -8060000000 $x_{max}$ =6399242000 Q25= -1924800000 Q75=2440000000	$\bar{x}$ =791996471 SD=4669835000 Me=102000000 $x_{min}$ = -5420000000 $x_{max}$ =13080000000 Q25= -1160000000 Q75=1080000000	<b>0,7419</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x} = -13364$ $SD = 62725$ $Me = 0$ $x_{min} = -197000$ $x_{max} = 50000$ $Q25 = 0$ $Q75 = 0$	$\bar{x} = -186875$ $SD = 750171$ $Me = 0$ $x_{min} = -3000000$ $x_{max} = 10000$ $Q25 = 0$ $Q75 = 0$	<b>0,9682</b>
--------------------------	--	---	---------------

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD - odchylenie standardowe, Me - mediana,  $x_{min}$  - wartość minimalna,  $x_{max}$  - wartość maksymalna, Q25 - kwartył dolny, Q75 - kwartył górny; PSN - poród siłami natury, CC - cięcie cesarskie

W powyższym przedziale czasowym sposób porodu nie różnił badanych grup pod względem przyrostu liczby mikroorganizmów w czasie i dla żadnego z analizowanych mikroorganizmów nie wykazano istotności statystycznej.

#### **4.6. Analiza porównawcza dla noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu oraz w domu**

Z uwagi na to, że poród siłami natury, w warunkach domowych wydaje się być najbardziej optymalny dla zasiedlania mikrobioty jelitowej, postanowiono tę grupę noworodków potraktować jako swoistego rodzaju wzorzec kolonizacji jelit noworodków. W tym celu dobrano pasującą grupę pod względem sposobu porodu, wieku ciążowego oraz masy ciała, ale urodzoną w warunkach szpitalnych celem sprawdzenia czy warunki domowe są nadrzędnym czynnikiem względem pozostałych analizowanych. Wyodrębniono więc dwie grupy tj. noworodki donoszone urodzone fizjologicznie w domu oraz noworodki donoszone urodzone fizjologicznie w szpitalu.

##### **4.6.1. Charakterystyka populacji**

Średnia wieku ciążowego w tygodniach ciąży [tc], dla noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu wynosiła  $39,4tc \pm 1,5$ , dla noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w domu  $39,7tc \pm 0,8$ . Średnia urodzeniowa masa ciała dla noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu wynosiła  $3625,3g \pm 519,4$ , a dla dzieci urodzonych w domu  $3620g \pm 369,2$ . Badane grupy nie różniły się istotnie pod kątem wieku ciążowego oraz urodzeniowej masy ciała. Podział populacji ze względu na wiek ciążowy i urodzeniową masę ciała przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Podział populacji ze względu na wiek ciążowy i urodzeniową masę ciała.

		Średnia	Minimum	Maksimum	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Odch. std. (SD)	<i>p</i> *
Wiek ciążowy [tc]	Dom	39,7	38	41	39	40	0,8	0,6304
	Szpital	39,4	37	42	38	41	1,5	
Urodzeniowa masa ciała [g]	Dom	3620	2960	4260	3400	3760	369,2	0,9586
	Szpital	3625,3	2940	4330	3060	4190	519,4	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya; Dom – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, Szpital – noworodki donoszone urodzone fizjologicznie w szpitalu; tc – tydzień ciąży

Następnie dokonano analiz porównawczych pomiędzy badanymi grupami pod kątem rodzaju żywienia początkowego jak i po 6 tygodniach od porodu; obecności *Streptococcus agalactiae* (GBS) u matki, co tożsame było z zastosowania śródporodowej antybiotykoterapii; stosowanych antybiotyków u matki w przebiegu całej ciąży (poza GBS); palenia tytoniu przed ciążą oraz w trakcie ciąży; czy ciąża była pojedyncza czy mnoga; czasu pęknięcia pęcherza płodowego. Jako karmienie naturalne przyjęto wyłącznie karmienie mlekiem matki, z kolei karmienie sztuczne to wyłącznie karmienie mieszankami mlekozastępczymi, a karmienie mieszane to jednoczesne karmienie pokarmem kobiecym i mieszankami mlekozastępczymi.

Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy między żadnym z analizowanych parametrów w obu badanych grupach. Wyniki przedstawiono w tabeli 23.



Tabela 23. Analiza porównawcza grup badanych.

		Dom		Szpital		<i>p</i> *
		n	%	n	%	
Żywienie początkowe	Karmienie naturalne	12	100	15	100	-
	Karmienie sztuczne	0	0	0	0	
	Karmienie mieszane	0	0	0	0	
Obecność GBS	Dodatni	3	25	1	6,7	<b>0,2940</b>
	Ujemny	9	75	14	93	
Antybiotyki u matki w przebiegu całej ciąży (poza GBS)	Tak	0	0	3	20	<b>0,2308</b>
	Nie	12	100	12	80	
Palenie tytoniu przed ciążą	Tak	0	0	4	27	<b>0,1060</b>
	Nie	12	100	11	73	
Palenie tytoniu w trakcie ciąży	Tak	0	0	0	0	-
	Nie	12	100	15	100	
Ciąża	Pojedyncza	12	100	15	100	-
	Mnoga	0	0	0	0	
Pęknięcie pęcherza płodowego	W trakcie porodu	9	82	16	53	<b>0,0957</b>
	Przed porodem <18 h	2	18	12	40	
	Przed porodem 18 h - 7 dni	0	0	2	7	
	Przed porodem >7 dni	0	0	0	0	
Żywienie po 6 tygodniach	Karmienie naturalne	12	100	10	67	<b>0,1923</b>
	Karmienie sztuczne	0	0	3	20	
	Karmienie mieszane	0	0	2	13	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Fishera-Freemana-Haltona; Dom – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, Szpital – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w szpitalu.

#### 4.7. Analiza profilu mikrobioty

Dokonano analizy profilu mikrobioty u noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu oraz domu.

##### 4.7.1. Porównanie profilu mikrobioty w smółce w zależności od miejsca urodzenia

W tabeli 24 przedstawiono porównanie między poszczególnymi mikroorganizmami w smółce u noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w domu oraz noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu.

Tabela 24. Porównanie składu ilościowego mikrobioty w smółce w zależności od miejsca urodzenia.

	Poród siłami natury, donoszone		<i>p</i> *
	Dom N=12	Szpital N=15	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =6666800 SD=14974661 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =50000000 Q25=0 Q75=5000500	$\bar{x}$ =53367067 SD=124579129 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =400000000 Q25=0 Q75=200000,0	<b>0,6106</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =13333 SD=51640 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000,0 Q25=0 Q75=0	<b>0,4123</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =23683833 SD=58213520 Me=103000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=0 Q75=11000000	$\bar{x}$ =30965093 SD=102467279 Me=40000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =400000000 Q25=2000 Q75=6000000	<b>0,5544</b>

<i>Proteus</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=13$ SD=52 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=200$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4123</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=33$ SD=115 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=400$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=480$ SD=1110 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=4000$ Q25=0 Q75=200	<b>0,1314</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=1754286$ SD=5874159 Me=435 $x_{min}=0$ $x_{max}=20400000$ Q25=0 Q=7537200	$\bar{x}=698088$ SD=2656324 Me=7800 $x_{min}=0$ $x_{max}=10300000$ Q25=4520 Q75=14100	<b>0,1902</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=61124$ SD=210643 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=730000$ Q25=0 Q75=532	$\bar{x}=885$ SD=2490 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=9540$ Q25=0 Q75=392	<b>0,7396</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1199$ SD=1577 Me=608 $x_{min}=0$ $x_{max}=4440$ Q25=0 Q75=1983	$\bar{x}=463$ SD=1190 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=3820$ Q25=0 Q75=0	<b>0,0229</b>

<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=53$ SD=207 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=800$ Q25=0 Q75=0	<b>0,4123</b>
TBC	$\bar{x}=209503667$ SD=588715035 Me=1705000 $x_{min}=103000$ $x_{max}=2060000000$ Q25=814000 Q75=78700000	$\bar{x}=93649467$ SD=313807914 Me=632000 $x_{min}=108000$ $x_{max}=1220000000$ Q25=135000 Q75=2020000	<b>0,2319</b>
Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=0$ SD=0 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=0$ Q25=0 Q75=0	-

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; Dom – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, Szpital – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w szpitalu.

Pomiędzy noworodkami donoszonymi urodzonymi fizjologicznie w domu a noworodkami donoszonymi urodzonymi fizjologicznie w szpitalu wykazano istotnie statystyczną różnicę tylko względem liczby *F. prausnitzii* ( $p=0,0229$ ), gdzie liczba bakterii w smółce była wyższa u dzieci urodzonych w domu.

#### **4.8. Porównanie profilu mikrobioty w stolcu 6 tygodni po porodzie w zależności od miejsca urodzenia**

Następnie dokonano analizy porównawczej tych samych mikroorganizmów w stolcu 6 tygodni po porodzie. W tabeli 25 przedstawiono porównanie między poszczególnymi mikroorganizmami w stolcu, 6 tygodni po porodzie u noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w domu oraz noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu.

Tabela 25. Porównanie składu ilościowego mikrobioty w zależności od miejsca urodzenia w stolcu 6 tygodni po porodzie.

	Poród siłami natury, donoszone		<i>p</i> *
	Dom N=12	Szpital N=15	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =68333333 SD=72967407 Me=55000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=0 Q75=100000000	$\bar{x}$ =405066667 SD=517117763 Me=200000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000000 Q25=70000000 Q75=500000000	<b>0,0193</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =43333417 SD=78547368 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=0 Q75=60000000	$\bar{x}$ =43393333 SD=154516686 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =600000000 Q25=0 Q75=400000	<b>0,4155</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ =19600000 SD=37965439 Me=2500000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =100000000 Q25=0 Q75=13000000	$\bar{x}$ =341762667 SD=686263712 Me=40000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000000 Q25=400000 Q75=400000000	<b>0,0552</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =1333333 SD=5163978 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=0 Q75=0	<b>0,4123</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-

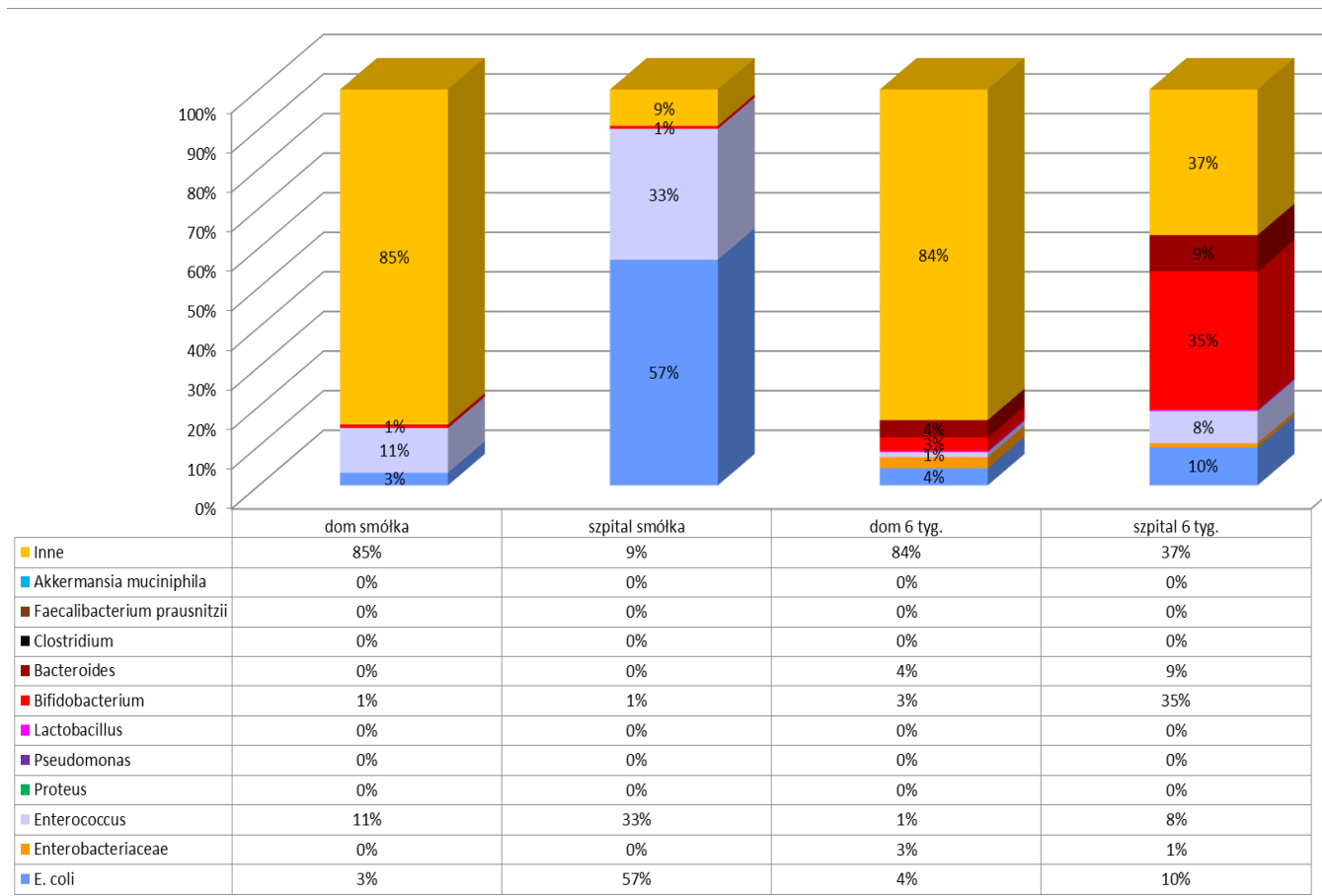
<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}=5572500$ SD=7385550 Me=3000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=20000000$ Q25=35000 Q75=8000000	$\bar{x}=13126667$ SD=25210385 Me=6000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=100000000$ Q25=200000 Q75=20000000	<b>0,5389</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}=52735550$ SD=99460699 Me=7290000 $x_{min}=26600$ $x_{max}=276000000$ Q25=3190000 Q75=34500000	$\bar{x}=1472464000$ SD=3058803000 Me=42800000 $x_{min}=34000$ $x_{max}=8900000000$ Q25=3820000 Q75=242000000	<b>0,1960</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}=67964358$ SD=122243134 Me=666 $x_{min}=0$ $x_{max}=392000000$ Q25=189 Q75=112200000	$\bar{x}=385000659$ SD=701289139 Me=19000000 $x_{min}=0$ $x_{max}=2720000000$ Q25=424 Q75=572000000	<b>0,1564</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}=250000$ SD=866025 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=3000000$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=357333$ SD=893560 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=3000000$ Q25=0 Q75=60000	<b>0,2964</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}=1031$ SD=1718 Me=251 $x_{min}=0$ $x_{max}=4660$ Q25=0 Q75=1022	$\bar{x}=577$ SD=1585 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=5820$ Q25=0 Q75=0	<b>0,1381</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}=560$ SD=1940 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=6720$ Q25=0 Q75=0	$\bar{x}=80$ SD=310 Me=0 $x_{min}=0$ $x_{max}=1200$ Q25=0 Q75=0	<b>0,8720</b>
TBC	$\bar{x}=1565500000$ SD=1517051000 Me=1525000000 $x_{min}=17800000$ $x_{max}=4180000000$ Q25=58700000 Q75=2890000000	$\bar{x}=1212376800$ SD=1750711000 Me=452000000 $x_{min}=532000$ $x_{max}=5240000000$ Q25=138000000 Q75=916000000	<b>0,6783</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$	$\bar{x}=17417$	<b>0,1662</b>
	SD=0	SD=57557	
	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=0$	$x_{max}=200000$	
	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana,  $x_{min}$  – wartość minimalna,  $x_{max}$  – wartość maksymalna, Q25 – kwartył dolny, Q75 – kwartył górny; Dom – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, Szpital – noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w szpitalu.

Pomiędzy noworodkami donoszonymi urodzonymi fizjologicznie w domu a noworodkami donoszonymi urodzonymi fizjologicznie w szpitalu, wykazano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *E. coli* ( $p=0,0193$ ) w stolcu 6 tygodni po porodzie. Dzieci urodzone w szpitalu charakteryzowały się wyższą liczbą *E. coli* w stolcu 6 tygodni po porodzie.

Na wykresie 5 przedstawiono zbiorczo procentowy rozkład mikrobioty zarówno w smółce, jak i stolcu 6 tygodni po porodzie u noworodków donoszonych urodzonych w domu i szpitalu.



Wykres 5. Rozkład procentowy mikrobioty w smółce i stolcu 6 tygodni po porodzie u noworodków donoszonych urodzonych w domu i szpitalu.

Zaobserwowano, u dzieci urodzonych w domu, zarówno w smółce jak i 6 tygodni po porodzie, wyższy odsetek udziału innych bakterii nie ocenianych w badaniu. Profil mikrobioty dzieci urodzonych w domu był bardziej stabilny przez okres prowadzenia analizy.

#### 4.9. Analiza porównawcza różnicy liczby mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu oraz noworodków urodzonych w domu

Następnie dokonano porównania różnic w liczbie poszczególnych mikroorganizmów w czasie w badanych grupach. W tabeli 26 przedstawiono wyniki porównania różnic przyrostu mikroorganizmów w czasie u noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w domu oraz noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie w szpitalu.



Tabela 26. Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6 tygodniu względem smółki u noworodków donoszonych urodzonych w domu i szpitalu.

	Różnica w liczbie bakterii w czasie, w 6 tygodniu względem smółki		<i>p</i> *
	Dom N=12	Donoszone PSN N=15	
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ =61666533 SD=62060651 Me=50000000 $x_{min}$ =-1000 $x_{max}$ =180000000 Q25=0 Q75=100000000	$\bar{x}$ =351699600 SD=513324381 Me=100000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =2000000000 Q25=70000000 Q75=499800000	<b>0,0268</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\bar{x}$ =43333417 SD=78547368 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =200000000 Q25=0 Q75=60000000	$\bar{x}$ =43380000 SD=154520670 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =600000000 Q25=0 Q75=200000	<b>0,4155</b>
<i>Enterococcus</i>	$\bar{x}$ = -4083833 SD=75714821 Me=600000 $x_{min}$ = -200000000 $x_{max}$ =100000000 Q25=0 Q75=4997000	$\bar{x}$ =310797573 SD=623806384 Me=38000000 $x_{min}$ = -29960000 $x_{max}$ =2000000000 Q25=398000 Q75=394000000	<b>0,0480</b>
<i>Proteus</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =1333320 SD=5163926 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =19999800 Q25=0 Q75=0	<b>0,4123</b>
<i>Pseudomonas</i>	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =0 SD=0 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =0 Q25=0 Q75=0	-

<i>Lactobacillus</i>	$\bar{x}$ =5572467 SD=7385528 Me=3000000 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =20000000 Q25=35000 Q75=7999800	$\bar{x}$ =13126187 SD=25210345 Me=5998000 $x_{min}$ =-200 $x_{max}$ =100000000 Q25=200000 Q75=19996000	<b>0,6247</b>
<i>Bifidobacterium</i>	$\bar{x}$ =50981264 SD=95375332 Me=7288485 $x_{min}$ =26600 $x_{max}$ =255600000 Q25=3190000 Q75=34206400	$\bar{x}$ =1471766000 SD=3057288000 Me=42795480 $x_{min}$ =26760 $x_{max}$ =8899958000 Q25=3820000 Q75=241986200	<b>0,1960</b>
<i>Bacteroides</i>	$\bar{x}$ =67903234 SD=122173420 Me=604 $x_{min}$ =-1709 $x_{max}$ =392000000 Q25=-262 Q75=112200000	$\bar{x}$ =384999775 SD=701289084 Me=19000000 $x_{min}$ =-158 $x_{max}$ =2719999000 Q25=424 Q75=572000000	<b>0,0971</b>
<i>Clostridium</i>	$\bar{x}$ =250000 SD=866025 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3000000 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =357333 SD=893560 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =3000000 Q25=0 Q75=60000	<b>0,2964</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\bar{x}$ =-168 SD=1269 Me=0 $x_{min}$ =-3560 $x_{max}$ =1380 Q25=-608 Q75=363	$\bar{x}$ =114 SD=858 Me=0 $x_{min}$ =-1340 $x_{max}$ =2920 Q25=0 Q75=0	<b>0,9381</b>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\bar{x}$ =560 SD=1940 Me=0 $x_{min}$ =0 $x_{max}$ =6720 Q25=0 Q75=0	$\bar{x}$ =27 SD=384 Me=0 $x_{min}$ =-800 $x_{max}$ =1200 Q25=0 Q75=0	<b>0,5315</b>
TBC	$\bar{x}$ =1355996000 SD=1387784000 Me=1194627000 $x_{min}$ =17677000 $x_{max}$ =4179118000 Q25=57598500 Q75=2364620000	$\bar{x}$ =1118727000 SD=1628678000 Me=451835000 $x_{min}$ =-1018000 $x_{max}$ =5239368000 Q25=137892000 Q75=915580000	<b>0,7511</b>

Grzyby drożdżopodobne	$\bar{x}=0$	$\bar{x}=19000$	<b>0,1478</b>
	SD=0	SD=60092	
	Me=0	Me=0	
	$x_{min}=0$	$x_{min}=0$	
	$x_{max}=0$	$x_{max}=200000$	
	Q25=0	Q25=0	
	Q75=0	Q75=0	

\* wartość prawdopodobieństwa testu Manna-Whitneya;  $\bar{x}$  - średnia, SD - odchylenie standardowe, Me - mediana,  $x_{min}$  - wartość minimalna,  $x_{max}$  - wartość maksymalna, Q25 - kwartył dolny, Q75 - kwartył górny; Dom - noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, Szpital - noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w szpitalu.

Porównując między sobą dwie grupy noworodków donoszonych w zależności od miejsca porodu wykazano, iż różnice w przyroście mikroorganizmów w stolcu w 6 tygodniu względem smółki były istotnie statystyczne dla następujących bakterii: *E. coli* (p=0,0268), oraz *Enterococcus* (p=0,0480), gdzie więcej bakterii stwierdzono u noworodków urodzonych w szpitalu.

## 5. Dyskusja

Początkowa kolonizacja jelit noworodka, jest wciąż problemem nie do końca zbadanym, a dane na temat składu mikrobioty samych wcześniaków są w dalszym ciągu ograniczone. W związku z obserwowanym w ostatnim czasie w krajach wysokorozwiniętych wzrostem zachorowalności na alergie, choroby autoimmunizacyjne, autyzm i inne choroby cywilizacyjne, zasadne jest poszukiwanie czynników ryzyka, które mogą być elementem spustowym wystąpienia choroby. W związku z szeregiem pozytywnych funkcji mikrobioty jelitowej oraz licznymi powiązaniem dysbiozy jelitowej jako patomechanizmu wielu chorób, ważne, aby określać także czynniki negatywnie wpływające na mikroorganizmy jelitowe, szczególnie w okresie noworodkowym, który jest decydujący dla prawidłowej kolonizacji jelit.

W związku z powyższym, celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników na mikrobiotę jelit noworodków, w tym terminu, sposobu i miejsca porodu. Postanowiono, określić jak wspomniane czynniki determinują początkową kolonizację jelit dziecka oraz czy poród w warunkach domowych jest swoistego rodzaju wzorcem kolonizacji jelit dziecka. Wiadomym jest, że sposób karmienia wywiera wpływ na mikrobiotę jelitową noworodka. Co prawda, wykazano istotność statystyczną co do formy karmienia (naturalne vs. sztuczne vs. mieszane) w 6 tygodniu po wypisie ze szpitala między badanymi grupami, ale liczebności grup względem tej zmiennej były na tyle małe, że nie analizowano wpływu sposobu karmienia na profil mikrobioty z uwagi na ograniczenia statystyczne. To samo dotyczyło takich zmiennych jak: obecność paciorkowców grupy B u matki, stosowania antybiotyków u matki w trakcie ciąży, faktu czy ciąża była pojedyncza czy mnoga, stosowania antybiotyków u noworodka.

Z uwagi na fakt, iż coraz częściej podkreśla się wewnątrzmaciczną stymulację płodu mikrobiotą pochodzenia matczynego, co potwierdzono m.in. obecnością bakterii już w smółce zdrowych noworodków (75,223), czy płynie owodniowym, krwi pępowinowej oraz łożysku (71,73,79), w niniejszym badaniu postanowiono przebadać skład mikrobioty począwszy od smółki do 6 tygodni po porodzie dla dzieci urodzonych w domu, lub 6 tygodni po wypisie ze szpitala dla pozostałych niemowląt. Analizy składu mikrobiologicznego smółki mogą dostarczyć nowych wskazówek na temat początkowych kolonizatorów jelita i ich potencjalnej roli w zdrowiu i chorobie niemowląt. W prezentowanym badaniu oceniając całkowitą liczbę bakterii (TBC) w smółce wykazano, że we wszystkich badanych grupach, smółki nie były sterylne i znajdowało się w nich

DNA bakterii, co potwierdzają także inne badania (75,105,223,224,225). Począwszy od małej różnorodności i złożoności bakteryjnej smółki, mikrobiota jelitowa dynamicznie i stopniowo się zmienia, osiągając po 2-3 roku życia stan, przypominający skład mikrobioty osoby dorosłej (226,227).

Rozwój mikrobioty jelitowej różni się między niemowlętami urodzonymi przedwcześnie, a donoszonymi, co ukazują wcześniejsze badania (128,131,228-234). U wcześniaków, na początkowym etapie kolonizacji występuje wiele dodatkowych czynników wpływających negatywnie na proces zasiedlania jelit przez drobnoustroje. Zazwyczaj, w tej grupie dzieci poród odbywa się poprzez cesarskie cięcie, występuje częsta ekspozycja na antybiotyki zarówno u matki, jak i noworodka, przedłużone przebywanie na oddziale intensywnej terapii noworodka, częstsze karmienie sztuczne, jak również niedojrzałość fizjologiczna dziecka (235). Wszystkie powyższe czynniki mogą zmienić profil mikrobioty jelitowej noworodków. Układ mikrobioty jelitowej wcześniaków został opisany jako opóźniony oraz mniej różnorodny, aniżeli dzieci urodzonych o czasie (131,132,236). W większości, badania oceniające mikrobiotę jelitową noworodków przedwcześnie urodzonych koncentrowały się na analizie stolca. Natomiast informacje o zmianie składu bakteryjnego począwszy od smółki poprzez późniejsze próbki stolca, w pierwszych tygodniach życia są rzadsze, szczególnie w odniesieniu do wcześniaków (231,232,237). U donoszonych noworodków, urodzonych fizjologicznie, zasiedlanie jelit rozpoczyna się przez bakterie względnie beztlenowe, które zmniejszają w jelitach potencjał redoks, pomagając tym samym, w późniejszej kolonizacji przewodu pokarmowego, bakteriom bezwzględnie beztlenowym jak *Bifidobacterium*, *Bacteroides* czy *Clostridium* (150,231). U wcześniaków zasiedlanie jelit przez ściśle beztlenowce, zwłaszcza bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, jest opóźnione w porównaniu z niemowlętami urodzonymi w terminie. W takim wypadku, u noworodków przedwcześnie urodzonych, dominacja fakultatywnymi beztlenowcami, takimi jak enterobakterie, enterokoki i gronkowce, utrzymują się dłużej, nawet przez kilka tygodni (128,130,131,230,238). Nieprawidłowa kolonizacja jelita u wcześniaków w pierwszych tygodniach życia może wpływać na dojrzewanie bariery jelitowej oraz jej funkcje odżywcze i immunologiczne, zarówno w momencie kolonizacji jak i później (239,240). Badanie dotyczące różnorodności mikrobioty smółki, u sześciu wcześniaków, wykazało związek między małą bioróżnorodnością bakterii w smółce i zwiększonym ryzykiem rozwoju sepsy (241).

W prezentowanej analizie próbki smółki u noworodków donoszonych urodzonych w domu, były zdominowane głównie przez bakterie *E. coli* oraz *Enterococcus*, jak i *Bifidobacterium* co potwierdzają także inne dane (75,223,242). Hansen i wsp. (223) za pomocą techniki FISH oraz PCR przebadali pierwszy wydalony stolec (smółkę), pobrany od piętnastu zdrowych, donoszonych, urodzonych fizjologicznie noworodków. W cytowanym badaniu, jedno dziecko było skolonizowane przez *Enterobacteriaceae*, pozostałe dzieci zasiedlone były od 2 do 5 różnych rodzajów bakterii, a najbardziej liczne były *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* oraz *Bacteroides-Prevotella*. Nie wykazano związku między liczebnością bakterii, a czasem pęknięcia błon płodowych przed porodem, czasem wydalenia smółki lub czasem dostarczenia próbki do laboratorium. Z kolei Jimenez i wsp. (75) podkreślają, że przedłużone przechowywanie próbek, do czasu analizy skutkuje zwiększeniem ogólnej liczby bakterii w smółce. Jimenez i wsp. także analizowali skład mikrobioty smółki u 21 zdrowych, donoszonych noworodków i wykazali, że najliczniej występującymi bakteriami były rodzaje *Enterococcus* oraz *Staphylococcus*. U noworodków tych w smółce stwierdzano także *E. coli*, *Enterobacter* oraz w pojedynczych przypadkach bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Klebsiella* jak również *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Rothia mucilaginosa* (75).

Z kolei, smółki wcześniaków zawierały bakterie, które nie były oceniane w niniejszej analizie. W badaniu 75% wcześniaków miało stosowane antybiotyki w pierwszych dniach życia, w tym trzynaścioro otrzymywało leczenie od 1 do 3 dnia życia (ampicilina+gentamycyny), a ośmioro dzieci powyżej 7 dnia życia (ampicilina+gentamycyna+meronem+wankomycyna). Żadne z dzieci urodzone o czasie bądź w domu nie otrzymało leczenia przeciwbakteryjnego. Niestety analiza wpływu antybiotyków na mikrobiotę jelitową nie została przeprowadzona z powodu małej liczby pacjentów.

W pracy Moles i wsp. (224) oceniającej skład mikrobioty u wcześniaków w pierwszych tygodniach życia, wykorzystującej zarówno techniki konwencjonalnej mikrobiologii, jak i molekularne wykazano, że używając posiewu mikrobiologicznego smółki wcześniaków wykazywały obecność głównie bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, natomiast analizy genetyczne dostarczyły informacji o tym, że smółka zawiera głównie typy *Bacilli* oraz *Firmicutes*. Analizy HITChip wykazały za to, powszechność bakterii

*Lactobacillus plantarum* i *Streptococcus mitis* w badanych smółkach. Ponadto, mikrobiota smółki była osobliwa i różniła się od późniejszych próbek stolca.

W badaniu, wykazano istotnie statystyczną różnicę między liczbą bakterii *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* w smółce między noworodkami przedwcześnie urodzonymi a donoszonymi. Wszystkich wymienionych bakterii było więcej w grupie noworodków donoszonych. Z kolei, analizując stolec po 6 tygodniach od wypisu ze szpitala, wykazano, istotnie statystyczną różnicę, między wcześniakami, a noworodkami urodzonymi o czasie, w liczbie *Enterobacteriaceae*, których było więcej u wcześniaków, oraz *Bacteroides*, których było więcej u dzieci urodzonych o czasie, co jest zgodne z literaturą (238). Warto zwrócić uwagę, że rozkład procentowy bakterii w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala, w grupie noworodków urodzonych przedwcześnie, cały czas prezentował wysoki odsetek innych bakterii jelitowych podobnie jak w smółce. Z kolei, w grupie noworodków urodzonych o czasie w stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala, 26% wszystkich bakterii stanowił rodzaj *Bifidobacterium*. W analizie ilościowej dla bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* nie wykazano istotności statystycznej, aczkolwiek wynik był na granicy ( $p=0,0652$ ). Więcej bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* po 6 tygodniach odnotowano u dzieci urodzonych o czasie, co także jest potwierdzone w literaturze (238). Wykazany w niniejszej pracy niedobór u wcześniaków po 6 tygodniach, bakterii z rodzaju *Bacteroides* i *Bifidobacterium* jest bardzo niekorzystny, albowiem oba rodzaje bakterii wykazują działanie prozdrowotne i są szczególnie pożądane w okresie noworodkowym. Wykazano związek między zmniejszoną liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a ryzykiem wystąpienia chorób atopowych, niedoboru witaminy K, zespołu jelita nadwrażliwego czy autyzmu (243). Z kolei, w przypadku bakterii z rodzaju *Bacteroides*, eksperymenty na modelach zwierzęcych wykazały, że kolonizacja przewodu pokarmowego szczepami *Bacteroides* jest niezbędna dla kształtowania układu immunologicznego gospodarza, w którym pośredniczą receptory TLR oraz inne specyficzne interakcje gospodarz-mikrobiota (243). Zatem wczesna kolonizacja tymi bakteriami jest zasadnicza dla prawidłowego kształtowania odporności oraz modulowania fizjologii u człowieka. Dla pozostałych bakterii różnice po 6 tygodniach się zatarły. Nie mniej jednak duża liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, do których zalicza się m. in. bakterie z rodzaju *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, czyli takie które mogą być potencjalnie patogenne, i często są czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych, w tym zakażenia uogólnionego, szczególnie wśród dzieci

przedwcześnie urodzonych, jest niekorzystna i może być związana z negatywnymi czynnikami działającymi w okresie noworodkowym, w tym wiekiem ciążowym oraz antybiotykoterapią. Wskazuje to na fakt, potwierdzony w światowej literaturze, iż u wcześniaków zwiększony poziom fakultatywnych beztlenowców takich jak np. rodzina *Enterobacteriaceae*, wraz ze zmniejszonym poziomem ścisłych beztlenowców utrzymuje się zdecydowanie dłużej, aniżeli u dzieci urodzonych o czasie, co jest stanem niepożądanym (238). Zwiększona proporcja bakterii względnie tlenowych do beztlenowych, jak i zmniejszona różnorodność bakteryjna, w tym zredukowana ilość bakterii beztlenowych z rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides* związana jest z większym ryzykiem alergii i atopii w późniejszym okresie życia (10,244-246). Ponadto, Mai i wsp. (181) w swojej pracy postulują, iż niedostateczna kolonizacja *Proteobacteria*, do których zalicza się rodzinę *Enterobacteriaceae*, podczas pierwszych tygodni życia, w których rozwija się tolerancja immunologiczna, może skutkować upośledzonym modulowaniem adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej na późniejszą zwiększoną kolonizację *Proteobacteria*, i w konsekwencji dzieci te mogą rozwijać stany patologiczne jelit, w tym NEC.

Bardzo istotnym czynnikiem dla prawidłowej kolonizacji jelit jest sposób porodu (63,158). Biasucci i wsp. (247) w oparciu o wyniki swojej analizy postulują, iż na skład bakterii jelitowych noworodka, w pierwszych trzech dniach życia najsilniej wpływa właśnie sposób porodu. Z kolei Hu i wsp. (105) wykazują, iż smółka zawiera już zróżnicowaną mikrobiotę i nie zależy od sposobu porodu, a bardziej od czynników prenatalnych, w tym statusu zdrowotnego matki. Liczne wcześniejsze badania ujawniły, znaczące różnice w składzie mikrobioty w stolcu, między noworodkami urodzonymi poprzez cesarskie cięcie (CC), a urodzonymi siłami natury (psn) (116,126,225,248). W trakcie porodu fizjologicznego, dziecko kolonizowane jest bakteriami z pochwy i przewodu pokarmowego matki. U dzieci tych, mikroorganizmami dominującymi są: *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. U dzieci urodzonych poprzez cesarskie cięcie obserwuje się kolonizację bakteriami skórnymi, pochodzącymi od matki, ale także od personelu, jak i ze środowiska szpitalnego, w tym *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* i *Clostridium*. Ponadto, noworodki urodzone za pomocą cięcia cesarskiego są zasiedlone przez mniejszą liczbę bakterii, w porównaniu do noworodków urodzonych siłami natury, a kolonizacja przez zasadnicze rodzaje bakterii jak *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides* może być znacznie



opóźniona (235). Gronlund i wsp. (249) za pomocą posiewu mikrobiologicznego wykazali, iż mikrobiota dzieci urodzonych przez cięcie cesarskie może być zaburzona do 6 miesięcy po porodzie. Z kolei inne badanie, już z użyciem technik biologii molekularnej ukazało zmiany w składzie mikroorganizmów dzieci z porodu poprzez CC, nawet do 7 lat po urodzeniu (250). Co istotne, dzieci urodzone cięciem cesarskim mają zwiększone ryzyko występowania alergii, w tym pokarmowej (119), astmy (120), cukrzycy typu 1 (121), celiakii (122), nadwagi i otyłości (123). Coraz częściej podkreśla się, iż nie tyle sama procedura porodu co zastosowanie antybiotykoterapii u matki, z uwagi na operacyjny charakter porodu, jest czynnikiem zakłócającym kolonizację bakteryjną u dzieci urodzonych poprzez CC.

W analizowanym badaniu porównano modyfikację mikrobioty w czasie, w poszczególnych grupach noworodków, w zależności od sposobu porodu. Dla dzieci donoszonych urodzonych siłami natury wykazano, iż po 6 tygodniach od porodu względem smółki, istotnie statystycznie przyrost bakterii, wystąpił w przypadku *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* oraz TBC. Z kolei, u dzieci donoszonych urodzonych cięciem cesarskim wykazano, iż po 6 tygodniach od porodu względem smółki, istotnie statystycznie przyrost bakterii, wystąpił w przypadku większej liczby poszczególnych mikroorganizmów: *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Akkermansia muciniphila* oraz TBC. Przyrost poszczególnych bakterii w czasie jest zjawiskiem fizjologicznym. Wraz z upływem czasu mikrobiota się zmienia, staje się bardziej zróżnicowana i bardziej liczebna (242). Jednakże, co wykazano w niniejszym badaniu, u niemowląt donoszonych, urodzonych siłami natury istotnie statystyczny przyrost bakterii, był wykazany dla mniejszej liczby poszczególnych mikroorganizmów, aniżeli u niemowląt donoszonych urodzonych poprzez CC. Może być to związane z bardziej stabilną mikrobiotą już od początkowej kolonizacji obserwowanej w smółce, u dzieci donoszonych, urodzonych fizjologicznie, co wykazują także w swej pracy Hill i wsp. (251). Badacze wykazali, że mikrobiota noworodków donoszonych, urodzonych spontanicznie siłami natury, pozostawała stabilna zarówno na poziomie typów, jak i rodzajów podczas wszystkich 24 tygodni prowadzonej analizy.

Enck i wsp. (242) za pomocą posiewu mikrobiologicznego przebadali kohortę niemowląt pod kątem zmian w mikrobiocie jelit. Próbkę analizowano co miesiąc. Całkowita liczba bakterii (TBC) oraz liczba poszczególnych gatunków drobnoustrojów analizowanych

w badaniu, były najwyższe w pierwszym roku życia i zmniejszyły się w ciągu pierwszych 2 lat, po czym stabilizowały się. U analizowanych niemowląt, liczba TBC wzrastała do 5 miesiąca życia, następnie malała podczas wprowadzenia pokarmu stałego i osiągnęła najwyższy poziom ok. 9-10 miesiąca życia. Liczba bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz *Lactobacillus* rosła wraz z wiekiem, podczas gdy liczebność bakterii z rodzaju *Enterococcus* oraz *E. coli* zmniejszała się, a bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pozostawały stabilne, przez cały okres prowadzenia badania.

Następnie wykonano taką samą analizę modyfikacji mikrobioty w czasie, ale dla noworodków przedwcześnie urodzonych. W niniejszym badaniu wszystkie badane dzieci były równe wiekowo tylko w przypadku oznaczeń smółki. Takie samo podejście prezentował Hill i wsp. w cytowanej już powyżej analizie (251). W punkcie czasowym 6 tygodni po wypisie ze szpitala, dzieci donoszone wiekowo miały 6 tydzień życia, natomiast wiek wcześniaków był różny, gdyż wypisywane były ze szpitala w czasie osiągnięcia przez nie 34-36. tygodnia skorygowanego życia postkonceptyjnego. Miało to na celu zagwarantowanie, że wszystkie dzieci przedwcześnie urodzone, będą miały ten sam wiek postkonceptyjny podczas pobierania próbek w późniejszych punktach czasowych, ponieważ jak wcześniej postulowano, to wiek postkonceptyjny, a nie wiek urodzeniowy, jest główną determinantą profilu mikrobioty u wcześniaków (252). U wcześniaków z porodu siłami natury wykazano istotnie statystyczną różnicę w przyroście następujących mikroorganizmów: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *F. prausnitzii* i TBC między 34. tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego a smółką, oraz *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, TBC między 6 tygodniem od wypisu ze szpitala a smółką. U wcześniaków urodzonych cięciem cesarskim wykazano istotnie statystyczną różnicę w przyroście następujących mikroorganizmów: *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, TBC między 34 tyg. skorygowanego życia postkonceptyjnego a smółką, oraz *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, TBC między 6 tygodniem od wypisu ze szpitala a smółką. W żadnym z powyższych, nie wykazano istotności statystycznej dla przyrostu mikroorganizmów między 6 tygodniem od wypisu ze szpitala, a osiągnięciem przez dziecko skorygowanego wieku postkonceptyjnego, co może sugerować, iż uzyskanie dojrzałości fizjologicznej u wcześniaków, mierzonej w skorygowanych tygodniach życia postkonceptyjnego, wpływa na mikrobiotę jelitową noworodków

przedwcześnie urodzonych, szczególnie na poziom beztlenowców, jak podaje piśmiennictwo (252).

Następnie, dokonano porównania różnicy przyrostu poszczególnych mikroorganizmów w badanych punktach czasowych, osobno dla dzieci urodzonych przedwcześnie oraz o czasie, z rozgraniczeniem sposobu porodu (CC vs. psn). Wśród dzieci donoszonych urodzonych poprzez CC oraz siłami natury, wykazano istotnie statystyczną różnicę w różnicy przyrostu mikroorganizmów w 6. tygodniu względem smółki dla rodziny *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* oraz całkowitej liczby bakterii. Różnica w przyroście bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz TBC była wyższa u dzieci urodzonych przez CC. Z kolei, większą różnicę w przyroście bakterii z rodzaju *Bacteroides* stwierdzono u dzieci z porodu siłami natury, co jest bardzo korzystnym zjawiskiem. Po 6 tygodniach pobytu w domu było ich więcej. Zredukowana liczba *Bacteroides* u dzieci urodzonych poprzez cięcie cesarskie została potwierdzona także przez Jakobsson i wsp. (117). Badacze za pomocą pirosekwencjonowania 16S rRNA analizowali skład mikrobioty u dzieci urodzonych fizjologicznie oraz przez CC, przez okres od pierwszego tygodnia, do 2 roku życia. Dodatkowo w surowicy mierzono poziom chemokin związanych z odpowiedzią Th1 oraz Th2. Badacze wykazali, że dzieci urodzone przez cesarskie cięcie miały mniej zróżnicowaną mikrobiotę w ciągu pierwszych 2 lat życia. Niemowlęta te, wykazywały zredukowaną liczbę i różnorodność typu *Bacteroidetes*. Ponadto, u dzieci urodzonych poprzez CC wykazano zmniejszoną odpowiedź Th1 podczas pierwszych 2 lat życia. Prawidłowa początkowa kolonizacja jelit jest kluczowa, dla rozwoju układu odpornościowego i tolerancji immunologicznej. Brak równowagi cytokinowej Th1/Th2 podczas dojrzewania układu odpornościowego, może być podstawą rozwoju chorób alergicznych, z uwagi na nadmierną odpowiedź typu Th2, pozostałą jeszcze z okresu prenatalnego. Jakobsson i wsp. wykazali, że poród fizjologiczny związany jest z wyższym stężeniem chemokin związanych z odpowiedzią Th1 w okresie niemowlęctwa (117). Inne badania także potwierdzają zredukowaną liczbę bakterii z rodzaju *Bacteroides* u noworodków urodzonych poprzez cesarskie cięcie (158,248,249,253). Zwiększony poziom bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* u dzieci urodzonych poprzez CC, może być niekorzystnym zjawiskiem i być związany z infekcjami bądź dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego (243). Dla bakterii z rodzaju *Clostridium* wynik był na granicy istotności statystycznej ( $p=0,0566$ ), i większą różnicę w niekorzystnym przyroście bakterii stwierdzono u dzieci z grupy CC. Co także jest

zgodne z literaturą (158,249). Wyższy poziom TBC w grupie dzieci donoszonych, urodzonych przez cesarskie cięcie, wykazany w niniejszej pracy jest sprzeczny z literaturą, gdzie najczęściej raportuje się niższy poziom całkowitej liczby bakterii u dzieci urodzonych poprzez CC (235,254). Może to być związane z różnymi technikami oznaczeń mikrobioty używanych w różnych badaniach naukowych. Aktualnie częściej oznacza się jednak bioróżnorodność mikrobioty, aniżeli całkowitą liczbę bakterii (118). Nie wykazano różnicy w przyroście po 6 tygodniach bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* między analizowanymi grupami. Co prawda, poród poprzez cesarskie cięcie opisywany jest powszechnie w piśmiennictwie jako związany ze zredukowaną ilością prozdrowotnych bakterii rodzaju *Bifidobacterium* (158,248,253), nie mniej istnieją także prace, które takiej zależności nie wykrywają (255). Aczkolwiek, pomimo braku różnicy w przyroście w danych punktach czasowych, to jednak, co już wspomniano powyżej, w niniejszej analizie, w samej smółce liczba bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* różniła się między badanymi grupami.

Dokonano także porównania w przyroście mikroorganizmów między grupami wcześniaków, z rozgraniczeniem na sposób porodu. Porównując różnice w przyroście mikroorganizmów u wcześniaków rodzonych siłami natury oraz poprzez CC, w 34. tygodniu skorygowanego życia postkonceptyjnego względem smółki, nie wykazano istotności statystycznej w odniesieniu do żadnego badanego drobnoustroju. Zarówno jedna, jak i druga grupa była leczona antybiotykami oraz działały na nie takie same warunki środowiska szpitalnego. Porównując z kolei, różnice w przyroście mikroorganizmów w 6 tygodniu po wypisie ze szpitala względem smółki, wykazano istotnie statystyczną różnicę jedynie w odniesieniu do bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. U wcześniaków urodzonych fizjologicznie stwierdzono wyższą różnicę w przyroście tej grupy mikroorganizmów, aniżeli u dzieci urodzonych poprzez CC. Jest to dość zaskakujące, ale może być związane z innymi czynnikami działającymi w tym czasie, antybiotyki, sposób karmienia, środowisko domowe. Analizując natomiast różnice w przyroście mikroorganizmów w 6 tygodniu po wypisie ze szpitala względem stolca w 34. tygodniu skorygowanego życia postkonceptyjnego nie wykazano istotności statystycznej w odniesieniu do żadnego badanego drobnoustroju u wcześniaków rodzonych siłami natury oraz poprzez CC. Wynika z tego, iż dojrzewanie dziecka przedwcześnie urodzonego wpływa na kolonizację szeregiem rodzajów bakterii, natomiast sam sposób porodu u wcześniaków determinuje przyrost jedynie *Enterobacteriaceae*

między 6 tygodniem po wypisie ze szpitala a smółką. Postanowiono porównać także łącznie między sobą dzieci urodzone przedwcześnie oraz o czasie, z rozgraniczeniem sposobu porodu, co jest jednym z zasadniczych punktów niniejszej analizy. Dokonano porównania wcześniaków urodzonych siłami natury z dziećmi donoszonymi urodzonymi siłami natury, jak również wcześniaków urodzonych poprzez CC z noworodkami donoszonymi urodzonymi przez CC. Porównując skład mikroorganizmów w smółce, wykazano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* w dwóch grupach dzieci ( wcześniaki vs. donoszone) urodzonych siłami natury. Wszystkich wymienionych bakterii w smółce było więcej u dzieci donoszonych urodzonych fizjologicznie, aniżeli u wcześniaków urodzonych fizjologicznie. Zatem sposób porodu i wiek ciążowy łącznie istotnie wpływały na poziom tych drobnoustrojów. Porównując liczebności drobnoustrojów w smółce u dzieci urodzonych poprzez CC ( wcześniaki vs. donoszone) wykazano jedynie istotnie statystyczną różnicę dla liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, których było istotnie więcej u dzieci donoszonych urodzonych poprzez CC, aniżeli wcześniaków urodzonych poprzez CC. Dla porównania, przytaczając przedstawione już powyżej dane, sam wiek ciążowy ( donoszone vs. wcześniaki) bez rozróżnienia na sposób porodu, także różnicował istotnie liczebności bakterii *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* w smółce. Można zatem wnioskować, iż wiek ciążowy istotnie moduluje liczebność wyżej wymienionych mikroorganizmów, jednakże co istotne, najsilniej wpływa na liczbę *Bifidobacterium*. Skoro, porównując między sobą wcześniaki oraz dzieci donoszone, gdzie obie grupy były rodzone poprzez CC, jak również wcześniaki z noworodkami donoszonymi, gdzie obie grupy były rodzone fizjologicznie, jednym rodzajem bakterii, który się pokrywał i wykazywał istotność statystyczną w obu przypadkach był właśnie rodzaj *Bifidobacterium*. Jest to zgodne z badaniem wykonanym przez Butel i wsp. (128), gdzie wykazano, że na kolonizację przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, nie miała wpływu masa urodzeniowa, sposób porodu oraz antybiotykoterapia u matki lub dziecka, ale właśnie wiek ciążowy. Obecność *Bifidobacterium* stwierdzano u dzieci, urodzonych w wieku ciążowym powyżej 32,9 tygodni. Badacze postulują, iż taki czynnik jak wiek ciążowy, wydaje się być główną determinantą kolonizacji wcześniaka przez *Bifidobacterium*, a fakt ten powinien być brany pod uwagę w celach modulacji mikrobioty jelitowej u noworodków przedwcześnie urodzonych, mającej głównie na celu zmniejszenie częstości występowania NEC. Podobne wnioski można postawić analizując rozkład

procentowy mikrobioty w smółce u noworodków donoszonych i wcześniaków, z uwzględnieniem rodzaju porodu. Tylko noworodki donoszone urodzone fizjologicznie wykazywały najbardziej zróżnicowany profil mikrobioty jelitowej, odpowiadający gatunkowo potencjalnie mikrobiocie przewodu pokarmowego matki.

Kontynuując analizę i porównując skład mikroorganizmów 6 tygodni po wypisie ze szpitala wykazano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium prausnitzii* oraz TBC między wcześniakami a noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury. U dzieci donoszonych urodzonych fizjologicznie stwierdzono więcej bakterii z rodzaju *Bacteroides*, z kolei u wcześniaków urodzonych fizjologicznie więcej *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii* oraz TBC. Zatem wyniki tego badania wykazały, że poród fizjologiczny oraz wiek ciążowy łącznie istotnie wpływały na poziom tych drobnoustrojów 6 tygodni po wypisie ze szpitala. Natomiast nie wykazano istotności statystycznej dla żadnego z badanych mikroorganizmów w stolcu, 6 tygodni po wypisie ze szpitala u dzieci urodzonych poprzez CC ( wcześniaki vs. donoszone). Wydaje się więc, że cięcie cesarskie niestety ma równie negatywny wpływ na kształtowanie się mikrobioty nawet po 6 tygodniach przebywania dziecka w domu jak samo wcześniactwo. Mało jest danych na temat kolonizacji noworodków przez *Faecalibacterium prausnitzii*. Bakteria ta, to bezwzględny beztlenowiec, jeden z najliczniejszych mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym osób dorosłych. *F. prausnitzii* to jeden z głównych producentów kwasu masłowego w jelitach, czyli krótkołańcuchowego kwasu tłuszczowego, o prozdrowotnych właściwościach, stanowiącego zasadnicze źródło energii dla kolonocytów. Zredukowana liczba *F. prausnitzii* związana jest z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz nowotworem jelita grubego. Ponadto, bakteria ta wywiera pozytywny wpływ na homeostazę mikrobioty jelitowej i wiąże się z szeregiem procesów metabolicznych w błonie śluzowej człowieka (243). Co więcej, na modelu zwierzęcym, wykazano przeciwzapalne właściwości *F. prausnitzii* (256). Dalsze analizy oceniające sukcesję tej bakterii w przypadku niemowląt są niezbędne. Zmniejszona liczebność *F. prausnitzii* podczas porodu siłami natury powinna być celem przyszłych badań mikrobioty u wcześniaków.

Podobne porównanie, jak w niniejszej pracy, 4 grup noworodków wykonali Hill i wsp. (251). Badacze porównali między sobą kohortę 192 dzieci, złożoną z noworodków donoszonych urodzonych siłami natury oraz poprzez CC, jak również wcześniaków urodzonych siłami natury oraz poprzez CC. Stolec analizowany był od pierwszego do

24 tygodnia życia, za pomocą metod molekularnych (sekwencjonowanie regionu V4-V5 16S rRNA) oraz hodowli mikrobiologicznej. Niestety badacze nie analizowali smółki. Wykazano, że sposób porodu oraz wiek ciążowy łącznie, istotnie wpływały na profil mikrobioty jelitowej dzieci, co wykazano także w niniejszej pracy. W badaniu Hill i wsp. w wieku 1 tygodnia, skład mikrobioty jelit noworodków donoszonych urodzonych poprzez CC (FT-CS), był znacząco różny od składu mikrobioty wcześniaków CC (PT-CS) oraz noworodków donoszonych urodzonych fizjologicznie (FT-SVD). Wykazano także istotne różnice między wcześniakami CC oraz noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury. Mała liczebność wcześniaków psn (PT-SVD) ( $n = 4$ ) nie pozwoliła na analizy statystyczne, ale badacze zwracają uwagę, że profil mikrobiotyczny tej grupy znajdował się pomiędzy grupą wcześniaków CC a noworodków donoszonych psn. Badacze wykazali, że w 8 tygodniu życia, grupa FT-CS różniła się znacząco od PT-CS i FT-SVD pod względem składu mikrobioty. Grupy FT-SVD i PT-CS także różniły się istotnie. Dodatkowo, wszystkie trzy grupy miały znacząco różną kompozycję mikrobioty w 8 tygodniu życia. Ten punkt czasowy był najbliższy punktowi czasowemu w niniejszym badaniu, gdzie analizowano stolec w 6 tygodniu życia. Po 24 tygodniach nie wykazywano już różnicy w składzie mikrobioty między grupami PT-CS i FT-CS, podczas gdy mikrobiota FT-CS i FT-SVD nadal istotnie się różniła. Zatem w tym punkcie czasowym, to sposób porodu w dalszym ciągu wywierał zmiany na skład mikrobioty, a wcześniejsze różnice wynikające z wieku ciążowego zostały wyeliminowane. We wszystkich punktach czasowych istniało duże indywidualne zróżnicowanie profilu mikrobioty, w każdej z badanej grupy dzieci, ukazując odmienny sposób kolonizacji mikrobioty zależnej od wieku ciążowego i sposobu porodu. Dzieci donoszone urodzone fizjologicznie, miały najbardziej stabilną mikrobiotę przez cały okres badania. Niemowlęta donoszone urodzone poprzez cesarskie cięcie, wykazywały większą liczbę *Firmicutes* i zredukowaną liczebność *Actinobacteria* po pierwszym tygodniu życia, w porównaniu z niemowlętami donoszonymi urodzonymi fizjologicznie. Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy w liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w 1 tygodniu życia między FT-CS i FT-SVD, choć pozornie różnica ta była znacząca (19 vs. 48%). Co więcej, nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w liczbie *Bifidobacterium* pomiędzy tymi dwoma grupami, w żadnym z badanych punktów czasowych.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano istotnie statystyczną różnicę w liczbie *Bifidobacterium* jedynie w smółce, między noworodkami donoszonymi

z różnych sposobów porodu (CC vs. psn), oraz między wcześniakami z różnych sposobów porodu (CC vs. psn). W czasie 6 tygodni po wypisie ze szpitala także nie stwierdzono już tej różnicy, co jest zgodne z niedawno opublikowaną pracą Hill i wsp. (251). Zespół Hill i wsp. wykazał, że liczba *Bacteroides* jest większa u dzieci donoszonych urodzonych siłami natury, w porównaniu z dziećmi donoszonymi urodzonymi przez CC w wieku 1. i 4. tygodni życia, ale nie w późniejszych punktach czasowych.

W niniejszej pracy, różnicę w liczbie *Bacteroides* między noworodkami donoszonymi urodzonymi siłami natury, w porównaniu z dziećmi donoszonymi urodzonymi przez CC, wykazano jedynie 6 tygodni po wypisie ze szpitala. Zatem ta różnica utrzymywała się dłużej, niż w badaniu Hill i wsp. (251). Hill i wsp. wykazali także, że liczba bakterii z rodzaju *Clostridium* była wyższa u dzieci donoszonych urodzonych poprzez CC, w stosunku do dzieci donoszonych urodzonych siłami natury w 1. tygodniu życia. W niniejszej pracy nie wykazano takiej zależności ani w smółce, ani 6 tygodni po wypisie ze szpitala między analizowanymi grupami. Dodatkowo analiza procentowego rozkładu bakterii w 6. tygodniu życia, pokazała wyraźną różnicę w składzie bakterii jelitowych na korzyść noworodków urodzonych o czasie siłami natury, z przewagą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz wyższym udziałem procentowym *Bacteroides* w porównaniu z pozostałymi grupami. Ta obserwacja wyraźnie wskazuje, że tylko poród o czasie, siłami natury może zapewnić optymalny profil mikrobioty jelit w 6. tygodniu życia.

Mało jest danych na temat porodu domowego i mikrobioty jelitowej dziecka. Można wnioskować, iż poród w warunkach domowych i brak narażenia na szpitalne mikrobiologiczne czynniki zakaźne jest najbardziej optymalnym dla pierwotnej kolonizacji dziecka. Także redukcja stresu u matki, dzięki obecności w zaciszu domowym, powinna pozytywnie wpływać na dobrostan organizmu jak i samą mikrobiotę. Jak podkreśla Penders i wsp. (158) noworodek donoszony, urodzony fizjologicznie w domu, karmiony mlekiem matki ma najbardziej optymalną mikrobiotę jelitową, i dziecko takie cechuje się dużą liczbą bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, przy jednoczesnej małej liczbie *E. coli* i *Clostridium difficile*. W badaniu postanowiono porównać noworodki donoszone, urodzone fizjologicznie w domu, oraz dobrane do nich pod względem wieku ciążowego, masy urodzeniowej oraz żywienia, noworodki donoszone, ale urodzone standardowo w szpitalu. Postanowiono ocenić profil mikrobioty w zależności od miejsca urodzenia zarówno w smółce jak i 6 tygodni po porodzie.



W prezentowanej analizie wykazano istotność statystyczną w smółce w przypadku liczby bakterii *Faecalibacterium prausnitzii* między noworodkami donoszonymi urodzonymi w domu a noworodkami donoszonymi urodzonymi w szpitalu. Większą liczebnością *F. prausnitzii* w smółce, charakteryzowały się dzieci urodzone w domu. Z kolei, 6 tygodni po porodzie wykazano istotnie statystyczną różnicę dla *E. coli*, co jest zgodne z literaturą i podobnie jak w badaniu przeprowadzonym przez Penders i wsp. (158) bakterii tej było więcej u dzieci urodzonych w szpitalu. Praca opublikowana przez Penders i wsp. oceniała jednak dużo większą liczbę dzieci, a badacze nie oceniali liczby *F. prausnitzii*. Porównując w niniejszej pracy różnicę w liczbie bakterii w czasie, w 6. tygodniu względem smółki u noworodków donoszonych urodzonych w domu i szpitalu wykazano, istotność statystyczną dla bakterii z rodzaju *E. coli* oraz *Enterococcus*. Analiza rozkładu procentowego bakterii w smółce oraz w 6. tygodniu życia u noworodków urodzonych w domu wykazała znaczny udział bakterii, które nie były oceniane w badaniu. Tak znaczna różnica udziału procentowego tych bakterii w smółce noworodków urodzonych w domu może sugerować obecność w środowisku domowym odmiennej mikrobioty w porównaniu z mikrobiotą szpitalną, co powoduje, że odsetek udziału bakterii jak: *E. coli* czy *Enterococcus* jest znacznie mniejszy, co może utrudniać interpretację wyników w 6. tygodniu życia. Wydaje się, że profil mikrobioty jelitowej noworodków urodzonych w domu jest nadal bardzo słabo poznany, a mała liczba noworodków urodzonych w domu w badaniu uniemożliwia wyciągnięcia konkretnych wniosków.

W analizie przeprowadzonej przez van Nimwegen i wsp. (257) wykazano, że nie tyle sam sposób porodu, co właśnie miejsce porodu (dom vs. szpital) mają związek z ryzykiem wystąpienia astmy. Dzieci, które w wywiadzie miały przynajmniej jedno z rodziców z chorobą atopową, miały dużo mniejsze ryzyko astmy, kiedy były rodzone fizjologicznie w domu, aniżeli dzieci rodzone fizjologicznie w szpitalu. Badacze zaobserwowali podobną zależność, choć nieistotną statystycznie, dla ryzyka wystąpienia alergii pokarmowej. Korelacje te były zależne od kolonizacji dzieci przez *Clostridium difficile*. Kolonizacja przez *C. difficile* w pierwszym miesiącu życia była związana z występowaniem świszczącego oddechu i egzemy w ciągu pierwszych 6-7 lat życia oraz z astmą w wieku 6 i 7 lat. Wykazany w niniejszej pracy brak większych różnic w mikrobiocie między analizowanymi grupami, może być związany z małą liczebnością badanych grup. Innym czynnikiem uniemożliwiającym uzyskanie wyraźnych różnic w profilu mikrobioty jelitowej w 6. tygodniu życia między badanymi grupami mogło być wysokie miano

pozostałych bakterii nieocenianych w tym badaniu w grupie noworodków urodzonych w domu. Na pewno dalsze analizy, z większą liczbą badanych pacjentów są niezbędne z uwagi na fakt, iż poród domowy jest bardzo interesującym zagadnieniem, szczególnie w przypadku obserwowanego globalnie, niepokojącego trendu, związanego ze wzrostem liczby porodów poprzez cesarskie cięcie (63).

Mikrobiota jelitowa sprzyja rozwojowi i dojrzewaniu układu odpornościowego, a nieprawidłowa kolonizacja na etapie niemowlęctwa związana jest krótkofalowo z ciężkimi zakażeniami przewodu pokarmowego, sepsą oraz NEC, a długofalowo z chorobami cywilizacyjnymi (235,248). Jak ukazują badania, zaburzenia profilu mikrobioty jelitowej w okresie niemowlęctwa mogą poprzedzać wystąpienie choroby w późniejszym etapie życia, zatem skład mikroorganizmów jelitowych może być swoistego rodzaju markerem prognostycznym. W badaniu przeprowadzonym przez Kalliomaki i wsp. (258) oceniano różnice w profilu mikrobioty jelitowej, w 3. tygodniu oraz 3. miesiącu życia, u dzieci, u których w pierwszym roku życia stwierdzono alergię (potwierdzoną testami skórnymi). Dowiedziono, iż w punkcie czasowym 3 tygodni, dzieci alergiczne miały więcej bakterii z rodzaju *Clostridium*, a mniej *Bifidobacterium*, aniżeli dzieci, które w pierwszym roku życia nie prezentowały objawów choroby. Z kolei, w badaniu follow-up, przeprowadzonym przez zespół Sjogren i wsp. (259), oceniano zmiany w mikrobiocie u dzieci, które w wieku 5 lat rozwinęły alergię, w porównaniu do zdrowych kontroli. Próbkę stolca do analizy pobierano w 1. tygodniu oraz w 1. i 2. miesiącu życia dzieci. Wykazano, że dzieci z alergią były znacznie rzadziej skolonizowane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*), *Bifidobacterium adolescentis*, jak i *Clostridium difficile*, w ciągu pierwszych 2 miesięcy życia. Bardziej zróżnicowana mikrobiota jelit we wczesnym okresie życia, szczególnie obecność *Bifidobacterium*, może zapobiegać rozwojowi alergii w późniejszym czasie. W badaniu przeprowadzonym przez Abrahamsson i wsp. (260) dowiedziono, iż obniżenie bioróżnorodności mikrobioty, w 1. tygodniu oraz 1. miesiącu życia, może indukować astmę w wieku 7 lat. Dane te potwierdzają tezę, iż stan zdrowia dziecka jest programowany w okresie wczesnego niemowlęctwa, czyli w czasie kształtowania się mikrobioty jelitowej. Dalsze badania powinny badać różnorodność i stopień kolonizacji mikrobioty jelitowej niemowląt w odniesieniu do szeregu czynników, zarówno prenatalnych, o których coraz częściej się wspomina, jak i perinatalnych i postnatalnych oraz ich szerokiego wpływu na późniejsze zdrowie człowieka na każdym etapie życia.

Podsumowując wyniki badań tej pracy można stwierdzić, że noworodki urodzone przedwcześnie w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym mogłyby skorzystać na suplementacji wieloszczepowej bakteriami: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *E. coli*. Oczywiście należałoby przeprowadzić badania kliniczne określające profil bezpieczeństwa i skuteczność takiego postępowania terapeutycznego. Warto również przy planowaniu takich badań zadbać o analizę efektów długofalowych, takich jak występowanie chorób atopowych, alergicznych czy w szerszym znaczeniu chorób cywilizacyjnych w zależności od stosowanej suplementacji probiotycznej w grupach zwiększonego ryzyka, jakim jest wcześniactwo.

Na końcu należy wspomnieć o dwóch istotnych rzeczach. Po pierwsze, bardzo ważne jest standaryzowanie metod analitycznych do oceny mikrobioty jelitowej. Różne techniki oznaczeń, mogą wpływać w mniejszym lub większym stopniu na końcowy wynik badania, co ma istotny wpływ na interpretację uzyskanych danych.

Po drugie, w prezentowanej pracy istnieje kilka ograniczeń metodologicznych, które należy zaznaczyć. Jedną z nich są użyte m.in. poza metodą molekularną Real-Time PCR, także metody oparte na standardowym posiewie mikrobiologicznym, które niestety nie są w stanie wykryć znamiennej liczby gatunków ludzkiej mikrobioty. Aktualnie, w większości badań oceniających mikrobiotę jelitową wykorzystuje się techniki molekularne oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS), które analizują zbiorczo cały materiał genetyczny w danej próbce. Jednakże, dla najliczniej występujących mikroorganizmów jelitowych, bezpośrednie porównanie metod konwencjonalnej mikrobiologii oraz technik molekularnych wykazały podobne wyniki (261). Ponadto, warto zauważyć, iż smółka oraz stolec dziecka w pierwszych miesiącach życia nie jest jeszcze tak obfity w drobnoustroje jak u osoby dorosłej, zatem wykorzystanie mniej zaawansowanych technik może być zasadne. Drugim ograniczeniem jest mała liczebność badanych grup, co niestety uniemożliwiło w prezentowanej analizie na ocenę wpływu pozostałych czynników jak: forma karmienia, stosowanie antybiotyków u matki oraz noworodka na skład mikrobioty jelitowej dziecka.

Znajomość optymalnego składu mikrobioty na poszczególnych etapach rozwoju może przyczynić się do opracowania szeregu metod modulujących skład mikrobioty jelitowej, w tym pre-, probiotyków i innych. Bardzo ważna jest także edukacja kobiet oraz pracowników opieki medycznej, w tym lekarzy, pielęgniarek, położnych i innych

na temat wszystkich czynników mogących negatywnie wpływać na mikrobiotę jelitową dziecka i opracowywanie schematów, które te czynniki będą skutecznie ograniczać.

## 6. Wnioski

- 1) Wiek ciążowy wydaje się być zasadniczy dla początkowej kolonizacji jelit dziecka, przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*.
- 2) Rodzaj porodu wpływa na profil mikrobioty jelitowej tylko u noworodków urodzonych o czasie. Poród siłami natury gwarantuje optymalny skład mikrobioty smółki i stolca 6 tygodni po wypisie ze szpitala u dzieci donoszonych. Z kolei, u wcześniaków wpływ pozostałych czynników negatywnie wpływających na profil mikrobioty jelitowej jest tak duży, że sam poród siłami natury nie rekompensuje zaburzeń składu mikrobioty zarówno w smółce, jak i 6 tygodni po wypisie ze szpitala.
- 3) Mikrobiota jelitowa dzieci donoszonych, urodzonych fizjologicznie w domu jest bardziej stabilna, aniżeli noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu. Należy kontynuować badania w celu określenia wpływu porodu w środowisku domowym na kolonizację jelit w okresie niemowlęctwa.

Podsumowując, w oparciu o przedstawioną analizę, noworodki urodzone przedwcześnie w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym potencjalnie mogłyby być suplementowane od pierwszego dnia życia następującymi szczepami bakterii: *E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Przyszłe badania kliniczne powinny określić przede wszystkim profil bezpieczeństwa i skuteczność takiej wieloszczepowej terapii suplementacyjnej.

## 7. Streszczenie w j. polskim

Mikrobiota jelitowa, czyli zespół mikroorganizmów przewodu pokarmowego, jest kluczowa dla zachowania homeostazy organizmu. Pełni szereg funkcji w tym, wpływa na prawidłową pracę układu pokarmowego, dojrzewanie nabłonka jelitowego, perystaltykę jelit, trawienie, produkcję witamin, przyswajanie składników odżywczych, metabolizm kwasów żółciowych oraz fermentację błonnika pokarmowego do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA). Funkcje mikrobioty nie ograniczają się wyłącznie do jej miejsca bytowania czyli, przewodu pokarmowego. Jej działalność obejmuje także układ immunologiczny oraz nerwowy (oś jelito-mózg). Autochtoniczne bakterie koordynują pracę układu immunologicznego, poprzez wpływ na równowagę cytokinową Th1/Th2/Th17 oraz indukcję mechanizmów nieswoistych jak sIgA czy defensyn. Dowiedziono, iż nieodpowiedni skład mikrobioty jelitowej może być czynnikiem ryzyka szeregu jednostek chorobowych, w tym NEC, celiakii, otyłości, nieswoistych chorób zapalnych jelit, w tym choroby Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, zespołu jelita nadwrażliwego, kolki niemowlęcej, alergii, atopowego zapalenia skóry, autyzmu, depresji chorób metabolicznych, autoimmunizacyjnych i innych chorób cywilizacyjnych. Bardzo istotny dla składu mikroorganizmów jelitowych, a przez to zdrowia jest proces początkowej kolonizacji noworodka. Coraz częściej postuluje się o znaczeniu pierwszych 1000 dni, począwszy od poczęcia do pierwszych dwóch lat życia dziecka, w długofalowym programowaniu zdrowia organizmu. Pionierski mikrobiom, moduluje organizm dziecka na wielu płaszczyznach, w tym wpływa na dojrzewanie nabłonka jelitowego oraz aktywację układu immunologicznego. Zaburzenia w składzie mikrobioty jelitowej na tym etapie, mogą wiązać się z rozwojem alergii, atopii, oraz innych chorób cywilizacyjnych powiązanych z dysbiozą jelitową. Na kolonizację jelit noworodka wpływa wiele czynników, które możemy podzielić na prenatalne, perinatalne oraz postnatalne. Do najważniejszych należy wiek ciążowy, sposób porodu oraz forma karmienia dziecka, ale coraz częściej podnosi się także istotną rolę matki i jej stylu życia w trakcie ciąży na mikrobiotę jelit jej potomka.

Celem badania była ocena wpływu wieku ciążowego, sposobu porodu na mikrobiotę jelit noworodków oraz ocena porodu domowego, jako wzorca kolonizacji jelit noworodków.

Materiał do badań stanowiły próbki smółki oraz stolca pobrane od noworodków przedwcześnie urodzonych (CC=17, PSN=11), noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu (CC=17, PSN=15), oraz noworodków donoszonych urodzonych w domu (PSN=12). Wśród wcześniaków pobierano smółkę, stolec w 34. tygodniu skorygowanego życia postkonceptyjnego oraz stolec 6 tygodni od wypisu ze szpitala; wśród noworodków donoszonych, urodzonych zarówno w szpitalu jak i w domu pobierano smółkę oraz stolec 6 tygodni po porodzie. Z każdej pobranej próbki wykonano następujące analizy: posiew mikrobiologiczny w kierunku ilościowej oceny wybranych mikroorganizmów: *Escherichia coli*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., grzybów drożdżopodobnych oraz badanie molekularne za pomocą Real-time PCR (qPCR) w kierunku: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. oraz ogólnej liczby bakterii (TBC). W analizach statystycznych zastosowano testy nieparametryczne porównujące rozkłady tj. test nieparametryczny Manna-Whitneya, test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. Dane kategoryjne opisano liczebnościami i odpowiadającymi im wartościami procentowymi. Dla zbadania zależności zastosowano test Fishera-Freemana-Haltona oraz test u-Gaussa porównujący wartości procentowe.

Wyniki. Wykazano, że we wszystkich badanych grupach, smółki nie były sterylne i znajdowało się w nich DNA bakterii.

Profil mikrobioty smółki noworodków donoszonych, urodzonych w szpitalu charakteryzował się wyższą liczbą bakterii *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, aniżeli profil smółki wcześniaków. W stolcu 6 tygodni po wypisie ze szpitala noworodki przedwcześnie urodzone charakteryzowały się wyższą liczbą bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, z kolei noworodki donoszone wyższą liczbą bakterii z rodzaju *Bacteroides*. Porównując między sobą dzieci urodzone fizjologicznie wykazano, że noworodki donoszone charakteryzują się wyższą liczbą *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, w smółce aniżeli wcześniaki, a 6 tygodni po wypisie ze szpitala u dzieci donoszonych stwierdzono więcej bakterii z rodzaju *Bacteroides*, a z kolei u wcześniaków więcej *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii* oraz TBC. Porównując dzieci urodzone poprzez CC wykazano, że noworodki donoszone charakteryzują się wyższą liczbą *Bifidobacterium*, w smółce aniżeli wcześniaki,

a 6 tygodni po wypisie ze szpitala nie wykazano istotności statystycznej dla żadnego z badanych mikroorganizmów w grupie dzieci rodzonych poprzez cesarskie cięcie.

Pomiędzy noworodkami donoszonymi, urodzonymi fizjologicznie w domu a noworodkami donoszonymi, urodzonymi fizjologicznie w szpitalu, w smółce wykazano istotnie statystyczną różnicę tylko względem liczby *F. prausnitzii*, gdzie liczba bakterii w była wyższa u dzieci urodzonych w domu. Z kolei, w stolcu 6 tygodni po porodzie dzieci urodzone w szpitalu charakteryzowały się wyższą liczbą *E. coli* aniżeli dzieci urodzone w domu.

Wnioski. Preferowanym rodzajem porodu jest poród drogami natury. Ten rodzaj porodu gwarantuje optymalny skład mikrobioty smółki i stolca 6 tygodni po wypisaniu ze szpitala u dzieci donoszonych. Z kolei, u wcześniaków wpływ pozostałych czynników negatywnie wpływających na profil mikrobioty jelitowej jest tak duży, że sam poród siłami natury nie rekompensuje zaburzeń składu mikrobioty zarówno w smółce, jak i 6 tygodni po wypisie ze szpitala. Mikrobiota jelitowa dzieci donoszonych, urodzonych fizjologicznie w domu jest bardziej stabilna, aniżeli noworodków donoszonych urodzonych w szpitalu. Należy kontynuować badania w celu określenia wpływu porodu w środowisku domowym na kolonizację jelit w okresie niemowlęctwa.

Podsumowując, w oparciu o przedstawioną analizę, noworodki urodzone przedwcześnie w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym, potencjalnie mogłyby być suplementowane od pierwszego dnia życia następującymi rodzajami bakterii: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *E. coli*. Przyszłe badania kliniczne powinny określić przede wszystkim profil bezpieczeństwa i skuteczność takiej wieloszczepowej terapii suplementacyjnej.



## 8. Abstract

Introduction: Gut microbiota is composed of all microorganisms which are located in the lumen of intestines, and plays an important role in whole body homeostasis. It regulates function of the digestive system, controls maturation of the gut epithelium, peristalsis, digestion, vitamin production, food absorption, fatty acid metabolism and dietary fiber fermentation to short chain fatty acids. But microbiota function is not only limited to gut lumen. Its' impact is much larger. It stimulates immune response and regulates gut-brain axis. Gut bacteria influence cytokine balance between Th1/Th2/Th17 and are responsible for production of non-specific sIgA and defensins. Gut dysbiosis can be responsible for many diseases such as NEC, celiac disease, obesity, chronic enterocolitis, Crohn disease, irritable bowel syndrome, infantile colic, atopic dermatitis, autism, depression and autoimmune diseases, and finally non-communicable diseases. Thus very crucial is initial priming of the neonatal digestive system with optimal microbiota. There is substantial new information on the role of first 1000 days from conception on the development of optimal microbiome and human body programming. There are several perinatal factors which can influence initial neonatal bacterial priming, such as: nutrition during pregnancy, gestational age, mode of delivery, perinatal antibiotic therapy, nicotine exposure during pregnancy.

Aim: The aim of the study was to establish the role of the gestational age and mode of delivery on the neonatal microbiota profile with reference arm of the microbiota of the newborns born at home.

Methods: Study material consisted of the meconium and stools collected from preterm infants delivered by c-section (n=17) and vaginal delivery (n=11), term infants delivered by c-section (n=17) and vaginal delivery (n=15), and term infants born at home (n=12). The samples were collected at 2-3 days of life, 34 week post conceptual age and at 6 weeks after being discharged from the hospital for the premature infants and at 2-3 days of life and at 6 weeks after delivery for term infants. The following analyses were performed for each biological sample: microbiological culture aimed at: *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp., molecular analysis with qPCR aimed at: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. and total bacterial count (TBC). The following statistical tests were utilized; non-parametric

Mann Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn test and correlations were tested with Fisher-Freeman and percentages with u-Gauss test.

Results: None of the meconium sample was sterile. Microbiota profile of the term infants' meconium had higher titers of the following bacteria: *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, in comparison to premature infants. After 6 weeks being home premature infants had higher level of: *Enterobacteriaceae*, and term infants had higher level of *Bacteroides*. When mode of the delivery was analysed, it has been shown that vaginally delivered term infants had higher levels of *E. coli*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* in the meconium and they had more *Bacteroides* in the stool after 6 weeks being home in comparison to preterm infants. On the other hand preterm infants had higher levels of *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii* and TBC. Infants delivered by c-section when born at term had higher levels of *Bifidobacterium* in the meconium than preterm but this difference was not seen any more in the stool after 6 weeks being home. When analyzed samples from infants born at home the only difference between vaginally delivered in the hospital and at home was the level of *F. prausnitzii* which was higher among those born at home. There was more *E. coli* in the stool after being home for 6 weeks among those born in the hospital vs. born at home.

Conclusions: Vaginal delivery is preferred mode of delivery assuring the most optimal microbiota priming for mature infants which can be observed in the stool profile at 6 weeks of being home. On the other hand impact of other factors negatively influencing gut microbiota of a preterm infant is so significant that vaginal delivery can not compensate its' negative impact on meconium and stool after 6 weeks being home. Microbiota of the term and born at home infants is more stable in comparison to those born in the hospital. There is need to continue studies on the role of home delivery on the neonatal microbiota.

In summary, it can be speculated that infants born at the GPSK in Poznan can benefit by multistrain probiotic supplementation with *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *E. coli* if born prematurely. Further studies should establish safety and efficacy profile of such therapeutic approach.

## 9. Literatura

- 1) Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *J Nutr.* 2007;137(1 Suppl):259S-266S.
- 2) Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, et al. The human microbiome project. *Nature.* 2007;18;449(7164):804-10.
- 3) Bartnicka A, Gałęcka M, Mazela J. Wpływ czynników prenatalnych i postnatalnych na mikrobiotę jelitową noworodków. *Standardy Medyczne Pediatria.* 2016;13:165-172.
- 4) Schwartz A. Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2016;902:v.
- 5) Cenit MC, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients.* 2015;7(8):6900-23.
- 6) McMurtry VE, Gupta RW, Tran L, Blanchard EE 4<sup>th</sup>, et al. Bacterial diversity and Clostridia abundance decrease with increasing severity of necrotizing enterocolitis. *Microbiome.* 2015 Mar 23;3:11.
- 7) Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474:307-317.
- 8) Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20:8886-8897.
- 9) Dubois NE, Gregory KE. Characterizing the Intestinal Microbiome in Infantile Colic: Findings Based on an Integrative Review of the Literature. *Biol Res Nurs.* 2016;18(3):307-15.
- 10) Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:342-446.
- 11) Santiago HC, Nutman TB. Human Helminths and Allergic Disease: The Hygiene Hypothesis and Beyond. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(4):746-753.
- 12) Reddy BL, Saier MH. Autism and our intestinal microbiota. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2015;25:51-55.

- 13) Kim YK, Shin C. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiological Mechanisms and Novel Treatments. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Sep 15. doi: 10.2174/1570159X15666170915141036. [Epub ahead of print]
- 14) Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;38:1-7.
- 15) Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, et al. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Benef Microbes*. 2017;8(4):545-556.
- 16) Moran CP, Shanahan F. Gut microbiota and obesity: role in aetiology and potential therapeutic target. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):585-97.
- 17) Lerner A, Aminov R, Matthias T. Dysbiosis May Trigger Autoimmune Diseases via Inappropriate Post-Translational Modification of Host Proteins. *Front Microbiol*. 2016;5:7:84.
- 18) Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*. 2008;57(10):2555-62.
- 19) Vaghef-Mehrabany E, Alipour B, Homayouni-Rad A, Sharif SK, et al. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*. 2014;30(4):430-5.
- 20) Jacqueline C, Brazier L, Faugère D, Renaud F, et al. Can intestinal microbiota be associated with non-intestinal cancers? *Sci Rep*. 2017;7(1):12722.
- 21) Feng Q, Chen WD, Wang YD. Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. *Front Microbiol*. 2018;9:151.
- 22) Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet' Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001;15(7):8.
- 23) Pace NR, Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol*. 1986;9:1–55.
- 24) Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*.

- 1985; 49:1379–1384.
- 25) Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 1998;5(10):R245-9.
  - 26) Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312(5778):1355–1359.
  - 27) Olszewska J, Jagusztyn-Krynicka EK. Human Microbiome Project – Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol.* 2012;51,4:243-256.
  - 28) NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23.
  - 29) Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-80.
  - 30) The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207–214.
  - 31) Reyniers JA. Germfree Vertebrates: Present Satus. *Annals of New York Academy of Science.* 1959;78:3-16.
  - 32) Grover M, Kashyap PC. Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(6):745-8.
  - 33) Sirisinha S. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2016;34(4):249-264.
  - 34) Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J.* 2013;7(4):707-17.
  - 35) Goodrich JK, Davenport ER, Beaumont M, Jackson MA, et al. Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):731-43.
  - 36) Nowak A, Libudzisz Z. Mikroorganizmy jelitowe człowieka. *Standardy Medyczne Pediatria.* 2008;5:372-379.
  - 37) Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.

- 38) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780-5.
- 39) Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MAA, Pajeki D, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007 Feb;62(1):47-54.
- 40) Santana RNS, Santos VS, Ribeiro-Júnior RF, Freire MS, et al. Use of ranitidine is associated with infections in newborns hospitalized in a neonatal intensive care unit: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):375.
- 41) Terrin G, Passariello A, De Curtis M, Manguso F, et al. Ranitidine is associated with infections, necrotizing enterocolitis, and fatal outcome in newborns. *Pediatrics*. 2012;129(1):e40-5. doi: 10.1542/peds.2011-0796.
- 42) Su T, Lai S, Lee A, He X, Chen S. Meta-analysis: proton pump inhibitors moderately increase the risk of small intestinal bacterial overgrowth. *J Gastroenterol*. 2017. doi: 10.1007/s00535-017-1371-9. [Epub ahead of print].
- 43) Gupta RW, Tran L, Norori J, Ferris MJ, et al. Histamine-2 receptor blockers alter the fecal microbiota in premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(4):397-400.
- 44) Cukrowska B, Klewicka E. Programowanie mikrobiotyczne – homeostaza mikrobioty jelitowej a ryzyko chorób cywilizacyjnych. *Standardy Medyczne Pediatria*. 2014;11:913-922.
- 45) Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e34242. doi: 10.1371/journal.pone.0034242. Epub 2012 Jun 13.
- 46) Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Mol Microbiol*. 2006;59(6):1639-50.
- 47) Lewandowska M. Microbiota of human gastrointestinal tract. *Food Chemistry and Biotechnology*. 2010;74,1081:39-50.
- 48) MacDonald TT. The gut is still the biggest lymphoid organ in the body. *Mucosal Immunol* 2008;1:246-247.

- 49) Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15451-5.
- 50) Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;2014:872725.
- 51) Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*. 2011 Mar;23(3):187-92.
- 52) Cox LM, Weiner HL. Microbiota Signaling Pathways that Influence Neurologic Disease. *Neurotherapeutics*. 2018;15(1):135-145.
- 53) Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361:512-519.
- 54) Shanahan F. The host-microbe interact within the gut. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 16, 915-931, 2002
- 55) Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10452-10459.
- 56) Cukrowska B. Znaczenie programowania mikrobiotycznego w rozwoju przewlekłych chorób infekcyjnych. *Standardy Medyczne Pediatria*. 2016;13:1019-1028.
- 57) Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(6):681-9.
- 58) Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:799-809.
- 59) Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. PZWL, 2009:262-276.
- 60) Strzępa A, Szczepanik M. Wpływ naturalnej flory jelitowej na odpowiedź immunologiczną. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2013;67:908-920.
- 61) Gregorczyk-Maślanka K, Kurzawa R. Mikrobiota organizmu ludzkiego i jej wpływ na homeostazę immunologiczną – część I. *Alergia Astma Immunologia* 2016;21(3): 146-150.
- 62) Lauterbach R, Michalski P, Lauterbach JP. Probiotyki – możliwości zastosowania z punktu widzenia neonatologa. *Postępy neonatologii*. 2015;2(21):29-34.

- 63) Neu J, Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol*. 2011;38(2):321-31.
- 64) Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H. Limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+: fizjologia i rola tych komórek w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. *Postepy Hig Med Dosw*. (online). 2005;59:362-3.
- 65) Śledź-Gawrońska B. Rola limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+ w rozwoju zaburzeń o podłożu immunologicznym. *Journal of Laboratory Diagnostics*. 2010;46,2:147-153.
- 66) Żylicz M, Bocian K, Korczak-Kowalska G. Komórki regulatorowe: powstawanie, mechanizmy i efekty działania oraz możliwe wykorzystanie w transplantologii. *Postepy Hig Med Dosw*. (online). 2005;59:160-171.
- 67) Fala AM. Alergia, choroby alergiczne, astma. Tom I. *Medycyna Praktyczna*. 2010.
- 68) Kim BJ, Lee SY, Kim HB, Lee E, Hong SJ. Environmental changes, microbiota and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6:389-400.
- 69) Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol*. 1998;160:4730-4737.
- 70) Szewc M, Bartnicka A, Mazela J. Transfer mikrobioty pochwy – skuteczny i bezpieczny sposób na odbudowę mikrobioty noworodka urodzonego przez cięcie cesarskie? *Ginekologia po dyplomie*. 2017;5(111):53-61.
- 71) DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3(8):e3056. doi: 10.1371/journal.pone.0003056.
- 72) Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res*. 2005 Mar;57(3):404-11.
- 73) Jimenez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005;51:270-274.



- 74) Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6(237):237ra65.
- 75) Jimenez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008;159(3):187-93.
- 76) Bakardjiev AI, Theriot, JA, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):e66.
- 77) Pararas MV, Skevaki CL, Kafetzis DA. Preterm birth due to maternal infection: causative pathogens and modes of prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:562–569.
- 78) Pettker CM, Buhimschi IA, Magloire LK, Sfakianaki AK, et al. Value of placental microbial evaluation in diagnosing intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*. 2007;109:739–749.
- 79) Satokari R, Grönroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Bifidobacterium and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(1):8-12.
- 80) Chałubiński M, Kowalski ML. Fragmenty bakteryjnego DNA o właściwościach immunomodulacyjnych (CpG DNA) - związek z chorobami alergicznymi. *Alergia Astma Immunologia*. 2003;8(1):1-7.
- 81) Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9372):1869-71.
- 82) Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*. 2014 Mar 10;9(3):e90784. doi: 10.1371/journal.pone.0090784.
- 83) Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Front Microbiol*. 2016;7:1031. doi: 10.3389/fmicb.2016.01031.
- 84) Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470-80. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.008.
- 85) Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(6):e36466. doi: 10.1371/journal.pone.0036466.

- 86) Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014;2(1):4. doi: 10.1186/2049-2618-2-4.
- 87) Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms Involved in the Association between Periodontitis and Complications in Pregnancy. *Front Public Health*. 2015;2:290. doi: 10.3389/fpubh.2014.00290. eCollection 2014.
- 88) Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):29-36.
- 89) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
- 90) DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9. doi: 10.4065/83.4.460.
- 91) Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):894-9.
- 92) Santacruz A, Collado MC, García-Valdés L, Segura MT, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr*. 2010;104(1):83-92. doi: 10.1017/S0007114510000176.
- 93) Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(5):1023-30.
- 94) Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatr Res*. 2012;72(1):77-85.
- 95) Galley JD, Bailey M, Kamp Dush C, Schoppe-Sullivan S, Christian LM. Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PLoS One*. 2014 Nov 19;9(11):e113026. doi: 10.1371/journal.pone.0113026.

- 96) Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):534-8.
- 97) Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, et al. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev.* 2002;70(1-2):3-14.
- 98) Beydoun H, Saftlas AF. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008;22(5):438-66.
- 99) Sausenthaler S, Rzehak P, Chen CM, Arck P, et al. Stress-related maternal factors during pregnancy in relation to childhood eczema: results from the LISA Study. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(6):481-7.
- 100) Cookson H, Granell R, Joinson C, Ben-Shlomo Y, Henderson AJ. Mothers' anxiety during pregnancy is associated with asthma in their children. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(4):847-53.
- 101) Beijers R, Jansen J, Riksen-Walraven M, de Weerth C. Maternal prenatal anxiety and stress predict infant illnesses and health complaints. *Pediatrics.* 2010;126(2):e401-9. doi: 10.1542/peds.2009-3226. Epub 2010 Jul 19.
- 102) Bailey MT, Lubach GR, Coe CL. Prenatal stress alters bacterial colonization of the gut in infant monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:414-421.
- 103) Zijlmans MA, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;53:233-45.
- 104) Zijlmans MA, Beijers R, Riksen-Walraven MJ, de Weerth C. Maternal late pregnancy anxiety and stress is associated with children's health: a longitudinal study. *Stress.* 2017;20(5):495-504.
- 105) Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS One.* 2013;8(11):e78257. doi: 10.1371/journal.pone.0078257.
- 106) Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, et al. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(2):198-211.

- 107) Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Oberfield S, et al. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(4):665-70.
- 108) Arboleya S, Sánchez B, Solís G, Fernández N, et al. Impact of Prematurity and Perinatal Antibiotics on the Developing Intestinal Microbiota: A Functional Inference Study. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5). pii: E649. doi: 10.3390/ijms17050649.
- 109) Aloisio I, Quagliariello A, De Fanti S, Luiselli D, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16S rDNA regions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(12):5537-46. doi: 10.1007/s00253-016-7410-2.
- 110) Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG*. 2016;123(6):983-93.
- 111) Corvaglia L, Tonti G, Martini S, Aceti A, et al. Influence of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis for Group B Streptococcus on Gut Microbiota in the First Month of Life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(2):304-8.
- 112) Aloisio I, Mazzola G, Corvaglia LT, Tonti G, et al. Influence of intrapartum antibiotic prophylaxis against group B Streptococcus on the early newborn gut composition and evaluation of the anti-Streptococcus activity of Bifidobacterium strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(13):6051-60.
- 113) Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):690-703.
- 114) Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. 2015;21(2):109-17.
- 115) Marcobal A, Sonnenburg JL. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 4:12-5.
- 116) Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-5.

- 117) Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014;63(4):559-66.
- 118) Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr*. 2008;138,9:1796–1800.
- 119) Papathoma E, Triga M, Fouzas S, Dimitriou G. Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(4):419-24.
- 120) Debley JS, Smith JM, Redding GJ, Critchlow CW. Childhood asthma hospitalization risk after cesarean delivery in former term and premature infants. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(2):228-33.
- 121) Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia*. 2008;51(5):726-35.
- 122) Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*. 2010;125(6):e1433-40.
- 123) Huh SY, Rifas-Shiman SL, Zera CA, Edwards JW, et al. Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study. *Arch Dis Child*. 2012;97(7):610-6.
- 124) de Almeida MF, Guinsburg R, da Costa JO, Anchieta LM, et al. Non-urgent caesarean delivery increases the need for ventilation at birth in term newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2010 Sep;95(5):F326-30.
- 125) Główny Urząd Statystyczny. Zdrowie i ochrona zdrowia w 2012 r. Warszawa; 2014.
- 126) Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016;22(3):250-3.
- 127) Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC, 2010; <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5910.pdf>
- 128) Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(5):577-82.

- 129) Arboleya S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015;166(3):538-44.
- 130) Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, et al. M. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;79(3):763-72.
- 131) Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, et al. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;57(1):128-38.
- 132) Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr.* 2011;158(3):390-6.
- 133) Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med.* 2011;364(3):255-64.
- 134) Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6(6):e21313. doi: 10.1371/journal.pone.0021313. Epub 2011 Jun 17.
- 135) LaTuga MS, Stuebe A, Seed PC. A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Semin Reprod Med.* 2014 Jan;32(1):68-73.
- 136) Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe.* 2011;17(6):478-82.
- 137) Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(5):1035S-1045S.
- 138) Martín R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2638-44.
- 139) Solís G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe.* 2010 Jun;16(3):307-10.
- 140) Wang X, Lu H, Feng Z, Cao J, et al. Development of Human Breast Milk Microbiota-Associated Mice as a Method to Identify Breast Milk Bacteria

- Capable of Colonizing Gut. *Front Microbiol.* 2017;8:1242. doi: 10.3389/fmicb.2017.01242.
- 141) Jeurink PV, van Berghenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, March 2013;4(1):17-30.
- 142) Arroyo R, Martin V, Maldonado A, Jimenez E, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;50:1551-1558.
- 143) Orczyk-Pawilowicz M, Wesołowska A. Różnice w biochemicznym składzie mleka matek wcześniaków i noworodków urodzonych o czasie - aspekt żywieniowy i terapeutyczny. *Standardy Medyczne Pediatria*. 2013;10:677-686.
- 144) Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J Prot Res* 2010;9:4138–4151.
- 145) Karav S, Le Parc A, Leite Nobrega de Moura Bell JM, Frese SA, et al. Oligosaccharides Released from Milk Glycoproteins Are Selective Growth Substrates for Infant-Associated Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(12):3622-30.
- 146) Schell MA, Karmirantzou M, Snel, B, Vilanova D, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:14422-14427.
- 147) Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatr Res*. 2015;77:229-35.
- 148) Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol*. 2014;34(8):599-605.
- 149) Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(3):544-51.
- 150) Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.

- 151) Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, Tateyama A, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(1):80-7.
- 152) Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, Wall R, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5811-20.
- 153) Saari A, Virta LJ, Sankilampi U, Dunkel L, Saxen H. Antibiotic exposure in infancy and risk of being overweight in the first 24 months of life. *Pediatrics.* 2015;135(4):617-26.
- 154) Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(10):1290-8.
- 155) Mbakwa CA, Scheres L, Penders J, Mommers M, et al. Early Life Antibiotic Exposure and Weight Development in Children. *J Pediatr.* 2016;176:105-113.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.06.015.
- 156) Korpela K, Zijlmans MA, Kuitunen M, Kukkonen K, et al. Childhood BMI in relation to microbiota in infancy and lifetime antibiotic use. *Microbiome.* 2017;5(1):26. doi: 10.1186/s40168-017-0245-y.
- 157) Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(1):77-84.
- 158) Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511-21.
- 159) Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2013;9(1):15. doi: 10.1186/1710-1492-9-15.
- 160) Fall T, Lundholm C, Ortqvist AK, Fall K, et al. Early Exposure to Dogs and Farm Animals and the Risk of Childhood Asthma. *JAMA Pediatr.* 2015;169(11):e153219. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.3219.



- 161) Thorsteinsdottir S, Thyssen JP, Stokholm J, Vissing NH, et al. Domestic dog exposure at birth reduces the incidence of atopic dermatitis. *Allergy*. 2016;71(12):1736-1744.
- 162) Wernroth ML, Svennblad B, Fall K, Fang F, et al. Dog Exposure During the First Year of Life and Type 1 Diabetes in Childhood. *JAMA Pediatr*. 2017;171(7):663-669.
- 163) Wu P, Feldman AS, Rosas-Salazar C, James K, et al. Relative Importance and Additive Effects of Maternal and Infant Risk Factors on Childhood Asthma. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151705. doi: 10.1371/journal.pone.0151705.
- 164) Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60.
- 165) Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet*. 2006;368(9543):1271-83.
- 166) Lin HY, Chang JH, Chung MY, Lin HC. Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm very low birth weight infants: is it feasible? *J Formos Med Assoc*. 2014;113(8):490-7.
- 167) Gagliardi L, Bellù R, Cardilli V, De Curtis M; Network Neonatale Lombardo. Necrotising enterocolitis in very low birth weight infants in Italy: incidence and non-nutritional risk factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47(2):206-10.
- 168) Salhab WA, Perlman JM, Silver L, Sue Broyles R. Necrotizing enterocolitis and neurodevelopmental outcome in extremely low birth weight infants <1000 g. *J Perinatol*. 2004;24(9):534-40.
- 169) Bedrick AD. Necrotizing enterocolitis: neurodevelopmental "risky business". *J Perinatol*. 2004;24(9):531-3.
- 170) Anderson S. Probiotics for Preterm Infants: A Premature or Overdue Necrotizing Enterocolitis Prevention Strategy? *Neonatal Netw*. 2015;34(2):83-101.
- 171) Choi YY. Necrotizing enterocolitis in newborns: update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies. *Korean J Pediatr*. 2014; 57(12):505–513.
- 172) Patel RM, Denning PW. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*. 2015;78(3):232-8.
- 173) Luton A. Transfusion-associated necrotizing enterocolitis: translating knowledge into nursing practice. *Neonatal Netw*. 2013;32(3):167-74.

- 174) Grishin A, Papillon S, Bell B, Wang J, Ford HR. The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2013;22(2):69-75.
- 175) Siu YK, Ng PC, Fung SC, Lee CH, et al. Double blind, randomised, placebo controlled study of oral vancomycin in prevention of necrotising enterocolitis in preterm, very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;79(2):F105-9.
- 176) Grylack LJ, Scanlon JW. Oral gentamicin therapy in the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. A controlled double-blind trial. *Am J Dis Child.* 1978;132(12):1192-4.
- 177) Warner BB, Deych E, Zhou Y, Hall-Moore C, et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *Lancet.* 2016;387(10031):1928-36.
- 178) Ward DV, Scholz M, Zolfo M, Taft DH, et al. Metagenomic Sequencing with Strain-Level Resolution Implicates Uropathogenic *E. coli* in Necrotizing Enterocolitis and Mortality in Preterm Infants. *Cell Rep.* 2016;14(12):2912-24.
- 179) Heida FH, van Zoonen AGJF, Hulscher JBF, Te Kiefte BJC, et al. A Necrotizing Enterocolitis-Associated Gut Microbiota Is Present in the Meconium: Results of a Prospective Study. *Clin Infect Dis.* 2016;62(7):863-870.
- 180) Cassir N, Benamar S, Khalil JB, Croce O, et al. *Clostridium butyricum* Strains and Dysbiosis Linked to Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Clin Infect Dis.* 2015;61(7):1107-15.
- 181) Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, et al. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 2011;6(6):e20647. doi: 10.1371/journal.pone.0020647.
- 182) Zhou Y, Shan G, Sodergren E, Weinstock G, et al. Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: a case-control study. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118632. doi: 10.1371/journal.pone.0118632.
- 183) Niemarkt HJ, de Meij TG, van de Velde ME, van der Schee MP, et al. Necrotizing enterocolitis: a clinical review on diagnostic biomarkers and the role of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Feb;21(2):436-44.

- 184) Sim K, Shaw AG, Randell P, Cox MJ, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clin Infect Dis*. 2015;60(3):389-97.
- 185) Claud EC, Keegan KP, Brulc JM, Lu L, et al. Bacterial community structure and functional contributions to emergence of health or necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):20. doi: 10.1186/2049-2618-1-20.
- 186) Smith B, Bodé S, Skov TH, Mirsepasi H, et al. Investigation of the early intestinal microflora in premature infants with/without necrotizing enterocolitis using two different methods. *Pediatr Res*. 2012;71(1):115-20.
- 187) Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J*. 2009;3(8):944-54.
- 188) Szewc M, Sieradzka K, Bartnicka A, Gałęcka M, Mazela J. Mikrobiota jelitowa i probiotyki a martwicze zapalenie jelit. *Standardy medyczne pediatria*. 2016;13:701-710.
- 189) Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Agricultural Organization of the United Nations* [online], <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (2002).
- 190) Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
- 191) Szajewska H. Probiotyki – aktualny stan wiedzy i zalecenia dla praktyki klinicznej. *Medycyna Praktyczna. Lekarz Rodzinny*. 2017;5(223):56-70.
- 192) Jacobs SE, Tobin JM, Opie GF, Donath S, et al. Probiotic effects on late-onset sepsis in very preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*. 2013 Dec;132(6):1055-62.
- 193) Underwood MA, Salzman NH, Bennett SH, Barman M, et al. A randomized placebo-controlled comparison of 2 prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: impact on weight gain, intestinal microbiota, and fecal short-chain fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48:216–25.

- 194) Samanta M, Sarkar M, Ghosh P, Ghosh Jk, et al. Prophylactic probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in very low birth weight newborns. *J Trop Pediatr.* 2009;55:128–31.
- 195) Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2005;115:1–4.
- 196) Fernández-Carrocera LA, Solis-Herrera A, Cabanillas-Ayón M, Gallardo-Sarmiento RB, et al. Double-blind, randomised clinical assay to evaluate the efficacy of probiotics in preterm newborns weighing less than 1500 g in the prevention of necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98:F5–9.
- 197) Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr.* 2005;147:192–6.
- 198) Szajewska H, Guandalini S, Morelli L, Van Goudoever JB, Walker A. Effect of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* supplementation in preterm infants: a systematic review of randomized controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51:203–9.
- 199) Aceti A, Gori D, Barone G, Callegari ML, et al. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Ital J Pediatr.* 2015;41:89.
- 200) AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(4):CD005496. doi: 10.1002/14651858.CD005496.pub4.
- 201) Yang Y, Guo Y, Kan Q, Zhou XG, et al. A meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Braz J Med Biol Res.* 2014 ;47(9):804-10.
- 202) Patel RM, Underwood MA. Probiotics and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2018;27(1):39-46.
- 203) Güney-Varal. The effect of early administration of combined multi-strain and multi-species probiotics on gastrointestinal morbidities and mortality in preterm infants: A randomized controlled trial in a tertiary care unit. *Turk J Pediatr.* 2017;59(1):13-19.

- 204) Denkel LA, Schwab F, Garten L, Geffers C, et al. Dual-strain probiotics reduce NEC, mortality and neonatal bloodstream infections among extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2017;102(6):F559-F560.
- 205) Zhang GQ, Hu HJ, Liu CY, Shakya S, Li ZY. Probiotics for Preventing Late-Onset Sepsis in Preterm Neonates: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(8):e2581. doi: 10.1097/MD.0000000000002581.
- 206) Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, Patole SK. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med.* 2011;9:92.
- 207) Parker R. Probiotic guideline for necrotizing enterocolitis prevention in very low-birth-weight neonates. *Adv Neonatal Care* 2014;14:88-95.
- 208) Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001;357(9262):1076-9.
- 209) Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(4):1019-21.
- 210) Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, Ahn K, et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organ J.* 2015;8(1):4. doi: 10.1186/s40413-015-0055-2. eCollection 2015.
- 211) Harb T, Matsuyama M, David M, Hill RJ. Infant Colic-What works: A Systematic Review of Interventions for Breast-fed Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016 May;62(5):668-86.
- 212) Rojas MA, Lozano JM, Rojas MX, Rodriguez VA, et al. Prophylactic probiotics to prevent death and nosocomial infection in preterm infants. *Pediatrics.* 2012;130(5):e1113-20.
- 213) Hojsak I, Fabiano V, Pop TL, Goulet O, et al. European guidance on paediatric use of probiotics states that benefits are limited to several conditions and urges caution with specific vulnerable groups. *Acta Paediatr.* 2018 Feb 15. doi: 10.1111/apa.14270.

- 214) Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004;17:259–75.
- 215) Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev.* 2015 Nov;91(11):619-22.
- 216) Skórka A, Pieścik-Lech M, Kołodziej M, Szajewska H. Infant formulae supplemented with prebiotics: Are they better than unsupplemented formulae? An updated systematic review. *Br J Nutr.* 2018:1-16. doi: 10.1017/S0007114518000120.
- 217) Shadid R, Haarman M, Knol J, Theis W, et al. Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity-a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr.* 2007 Nov;86(5):1426-37.
- 218) Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(2):238-50.
- 219) Cuello-Garcia C, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ, et al. Prebiotics for the prevention of allergies: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(11):1468-1477.
- 220) Cuello-Garcia CA, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Prebiotics. *World Allergy Organ J.* 2016;9:10. doi: 10.1186/s40413-016-0102-7. eCollection 2016.
- 221) Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):219-26.
- 222) Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3854-9.
- 223) Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota.

- PLoS One. 2015;10(7):e0133320. doi: 10.1371/journal.pone.0133320. eCollection 2015.
- 224) Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013;8(6):e66986. doi: 10.1371/journal.pone.0066986.
- 225) Shi YC, Guo H, Chen J, Sun G, et al. Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section. *Sci Rep*. 2018;8(1):3255. doi: 10.1038/s41598-018-21657-7.
- 226) Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*. 2013;21(4):167-73.
- 227) Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486:222–227.
- 228) Ruiz L, Moles L, Gueimonde M, Rodriguez JM. Perinatal Microbiomes' Influence on Preterm Birth and Preterms' Health: Influencing Factors and Modulation Strategies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63(6):e193-e203.
- 229) Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømmen K, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep*. 2018;8(1):2453. doi: 10.1038/s41598-018-20827-x.
- 230) Gewolb I, Schwalbe R, Taciak V, Harrison T, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child. Fetal Neonatal Ed*. 1999;80:F167–F173.
- 231) LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, Goldberg RN, et al. Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One*. 2011;6(12):e27858. doi: 10.1371/journal.pone.0027858.
- 232) Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, et al. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr*. 2010;156: 20–25.
- 233) Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985;144:186–190.

- 234) Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 2003;54:393–399.
- 235) Jańczewska I, Domżalska-Popadiuk I. Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodków oraz wpływ czynników modyfikujących mikrobiotę jelitową na zachowanie zdrowia. *Forum Zakażeń.* 2016;7(6):443-448.
- 236) Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe.* 2010;16: 362–370.
- 237) Gómez M, Moles L, Espinosa-Martos I, Bustos G, et al. Bacteriological and Immunological Profiling of Meconium and Fecal Samples from Preterm Infants: A Two-Year Follow-Up Study. *Nutrients.* 2017;9(12). pii: E1293. doi: 10.3390/nu9121293.
- 238) Arboleya S, Solís G, Fernández N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? *Gut Microbes.* 2012;3(6):583-8.
- 239) Sharma R, Young C, Neu J. Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:305879. doi: 10.1155/2010/305879.
- 240) Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, Raimondi F, et al. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr.* 2013;39:15. doi: 10.1186/1824-7288-39-15.
- 241) Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012;201297(6): F456–462.
- 242) Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwiertz A, et al. The effects of maturation on the colonic microflora in infancy and childhood. *Gastroenterol Res Pract.* 2009;2009:752401. doi: 10.1155/2009/752401.
- 243) Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):996-1047.
- 244) Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(3):587-91.



- 245) Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):129-34.
- 246) Forno E, Onderdonk AB, McCracken J, Litonjua AA, et al. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clin Mol Allergy.* 2008;6:11. doi: 10.1186/1476-7961-6-11.
- 247) Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, et al. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev.* 2010;86 Suppl 1:13-5.
- 248) Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016;16(1):86. doi: 10.1186/s12876-016-0498-0.
- 249) Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;28(1):19-25.
- 250) Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut.* 2004;53(9):1388-9.
- 251) Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, Ulaszewska M, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome.* 2017;5(1):4. doi: 10.1186/s40168-016-0213-y.
- 252) La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, Weinstock GM, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12522-7.
- 253) Hesla HM, Stenius F, Jäderlund L, Nelson R, et al. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the Aladdin birth cohort. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;90(3):791-801.
- 254) Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, et al. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology.* 2008;93(4):236-40.
- 255) Kabeerdoss J, Ferdous S, Balamurugan R, Mechenro J, et al. Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to 6 months: a molecular analysis. *J Nutr Sci.* 2013;2:e18. doi: 10.1017/jns.2013.6.

- 256) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16731-6.
- 257) van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, Postma DS, et al. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):948-55.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2011.07.027.
- 258) Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jan;107(1):129-34.
- 259) Sjögren YM, Jenmalm MC, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy*. 2009 Apr;39(4):518-26.
- 260) Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, et al. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(6):842-50.
- 261) Liu C, Song Y, McTeague M, Vu AW. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;222(1):9-16.

## 10. Załączniki

### 10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

#### Uchwała nr 157/14

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentyści (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 kwietnia 2004r. w sprawie zgłoszenia niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 28 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie warunków przedkwalifikacyjnych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 13 lutego 2014 r.**  
**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**prof. dr hab. Jerzy Szczapa**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Katedra Neonatologii UM w Poznaniu**

**Główny badacz:**

**mgr Anna Bartnicka**

**Członkowie zespołu  
badawczego:**

**prof. dr hab. Jerzy Szczapa**

**prof. dr hab. Janusz Gadzinowski**

**dr Mirosława Gałęcka**

**dr hab. Jan Mazela**

**dr Tomasz Szczapa**

**Temat badań:**

**„Ocena jakościowa i ilościowa mikrobiota jelit oraz stężeń wybranych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u noworodków”.**

**Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku**

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

## 10.1.1. Aneks nr 1



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 274/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 232 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz.U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 05 marca 2015 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**dr hab. n. med. Jan Mazela**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Klinika Zakażeń Noworodka Katedry Neonatologii UM w Poznaniu**

**Główny badacz: mgr Anna Bartnicka**

**Członkowie zespołu  
badawczego:**

**prof. dr hab. Jerzy Szczapa  
prof. dr hab. Janusz Gadzinowski  
dr Mirosława Gałęcka  
dr hab. Jan Mazela  
dr Tomasz Szczapa**

**Temat badań:**

**„Ocena jakościowa i ilościowa mikrobiota jelit oraz stężeń wybranych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u noworodków”.**

**Dot. Uchwały Komisji Bioetycznej nr 157/14 z dnia 13.02.2014r.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na:**

- zmianie brzmienia tematu na „Wpływ wybranych czynników na mikrobiota jelit noworodków”;
  - poszerzeniu zakresu badania o dodatkową ankietę oraz zmianie metodyki badań zgodnie z nową wersją protokołu badawczego – wersja 2 z dnia 24.02.2015r.
  - zmianie kierownika projektu z prof. dr hab. Jerzego Szczapy na dr hab. n. med. Jana Mazelę j.w.
- Jednocześnie Komisja dołączyła do dokumentacji badania uaktualnione formularze Informacji i Świadomej Zgody Pacjenta – wersja 2 z dnia 24.02.2015r.**

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

## 10.1.2. Aneks nr 2



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 680/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad prowadzenia i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 42, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 843); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wyrobów medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 października 2010 r. (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu wiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 11 czerwca 2015 r.**  
**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**dr hab. n. med. Jan Mazela**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Klinika Zakażeń Noworodka Katedry Neonatologii UM w Poznaniu**

**Główny badacz: mgr Anna Bartnicka**

**Członkowie zespołu  
badawczego:**

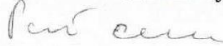
**prof. dr hab. Jerzy Szczapa  
prof. dr hab. Janusz Gadzinowski  
dr Mirosława Gałęcka  
dr hab. Jan Mazela  
dr Tomasz Szczapa**

**Temat badań:**

**„Wpływ wybranych czynników na mikrobiota jelit noworodków”.**

**Dot. Uchwały Komisji Bioetycznej nr 157/14 z dn. 13.02.2014r. oraz 274/15 z dn. 05.03.2015r.**  
**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na modyfikacjach założeń, celu badania i metodyki (odnośnie kryteriów wyłączenia, liczebności grup badanych i grupy interwencyjnej), jak i wykonaniu dodatkowego oznaczenia mikroflory przewodu pokarmowego w 6 miesięcy życia dziecka w grupie badanej I oraz poszerzeniu projektu o dodatkową ankietę dot. tolerancji preparatu probiotycznego. Zmiany zgodnie z protokołem wersja 3, z dnia 03.06.2015r.**

Przewodniczący Komisji

  
prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

### 10.1.3. Aneks nr 3



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

#### Uchwała nr 1113/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 09 listopada 2017 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**dr hab. n. med. Jan Mazela**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Klinika Zakażeń Noworodka Katedry Neonatologii UM w Poznaniu**

**Główny badacz:**

**mgr Anna Bartnicka**

**Członkowie zespołu**

**badawczego:**

**prof. dr hab. Jerzy Szczapa**

**prof. dr hab. Janusz Gadzinowski**

**dr Mirosława Gałęcka**

**dr hab. Jan Mazela**

**dr Tomasz Szczapa**

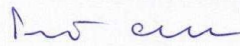
**Temat badań:**

**„Wpływ wybranych czynników na mikrobiotę jelit noworodków”.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badawczego z „Wpływ wybranych czynników na mikrobiota jelit noworodków” na powyższy oraz poszerzenie metodyki, zgodnie z Aneks nr 3 z dnia 09.11.2017r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 157/14 z dnia 13.02.2014r.**

**(Aneks nr 1 z 05.03.2015r., Aneks nr 2 z dn. 11.06.2015r.).**

Przewodniczący Komisji

  
prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

## 10.2. Wykaz stosowanych ankiet

### 10.2.1. Protokół informacji medycznej

#### PROTOKÓŁ INFORMACJI MEDYCZNEJ

Data wypełnienia protokołu: .....

Data pobrania materiału: .....

Numer badania: .....

1. Imię i nazwisko matki .....
2. Imię i nazwisko noworodka .....
3. Data, godzina urodzenia noworodka .....
4. Rok urodzenia matki .....

5. Przebieg ciąży:
- |                               | TAK                      | NIE                      |                          |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Krwawienie przed 28 tyg.      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Krwawienie po 28 tyg.         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Niewydolność szyjkowa         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Przedwczesne skurcze          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Niewydolność łożyska          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Wielowodzie                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Małowodzie                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Hipotrofia płodu              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Ciąża mnoga                   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Nieprawidłowe położenie płodu | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Niedokrwiłość                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Zakażenie dróg moczowych      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Uplawy                        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Białkomocz                    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Różyczka                      | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Toksoplazmoza                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| CMV                           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Antygen HBs .....             |                          |                          |                          |
| Grzybica pochwy               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |
| Inne zakażenia                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | (jeśli Tak, jakie: ..... |

6. Poród:
- Poród w ..... tygodniu ciąży; poród który z kolei .....
- Miejsce urodzenia\*: szpital, ambulatorium, dom, inne .....
- Pojedynczy, bliźniaczy\*, bliźnię, które z kolei .....
- Czas trwania I okresu ..... godz., czas trwania II okresu ..... min.
- Pęknięcie pęcherza płodowego\*: w czasie porodu  
przed porodem – liczba godz. ....
- Płyn owodniowy\*: przejrzysty, mętny, zielony, krwisty
- Rodzaj porodu\*: siłami natury, kleszcze, VE, pomoc ręczna, cięcie cesarskie
- Cięcie cesarskie, wskazania .....
- Leki w czasie I i II okresu porodu .....
- Śródporodowa profilaktyka w kierunku GBS: TAK  NIE

Nieprawidłowy przebieg porodu\*: objawy zagrożenia płodu, nieprawidłowa czynność skurczowa macicy, krwawienia w I okresie, stan septyczny, poród przedłużony, nieprawidłowe położenie/ułożenie płodu, nieprawidłowe usytuowanie łożyska, inne nieprawidłowości łożyska,

Opis powikłań.....

(\* właściwe podkreślić)

**7. Stan noworodka po urodzeniu:**

Masa urodzeniowa .....g

Ocena według Apgar

Czas oceny (min)	1	3	5	10
Parametr				
Czynność serca				
Oddech				
Napięcie mięśni				
Odruchy				
Zabarwienie skóry				
<b>Razem liczba pkt.</b>				

Opis nieprawidłowości/wad wrodzonych .....

.....

**8. Obserwacje w oddziale noworodkowym**

Klinika .....

Od ..... do ..... Dni .....

Z jakiego powodu dziecko trafiło na oddział.....

.....

Wentylacja sztuczna od .....do .....Dni .....

Niewydolność krążenia od .....do .....Dni .....

Żywnienie enteralne od.....do .....Dni .....

Żywnienie parenteralne od .....do .....Dni .....

**9. Karmienie:**\* naturalne, sztuczne, mieszane

pokarm ze wzmocniaczem od ..... do ..... doby życia

**10. Czy u noworodka zastosowano leki** TAK  NIE

(jeśli Tak, proszę wymienić wszystkie podane leki:.....

.....



.....  
.....  
.....  
.....

**11. Wyniki wszystkich przeprowadzonych badań laboratoryjny i obrazowych (proszę dołączyć kserokopię)**

**W przypadku wystąpienie NEC**

**12. Data zdiagnozowania choroby** .....

**13. Czynniki ryzyka** .....

**14. Stopień ciężkości choroby wg skali Bella** .....

**15. Zastosowane leczenie** .....

.....  
.....  
.....

**16. Wyniki wszystkich przeprowadzonych badań laboratoryjny i obrazowych (proszę dołączyć kserokopię)**

**17. Inne informacje** .....

.....

## 10.2.2. Ankieta dla matki

### ANKIETA

Data wypełnienia ankiety: .....

Numer badania noworodka: .....

1. **Imię i nazwisko** .....
2. **Rok urodzenia** .....
3. **Badanie w kierunku GBS**                      **GBS +**       **GBS -**       **Brak wyniku**
4. **Choroby ogólne:**

	<b>Pacjent</b>	<b>Rodzina</b>	(ew. jaki typ, od kiedy, jakie leki?)
Astma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Alergia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Choroby tkanki łącznej	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Choroby/zespoły genetyczne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Nadciśnienie tętnicze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Choroba nowotworowa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Choroba wieńcowa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Otyłość	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Padaczka	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Zaburzenia hormonalne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Cukrzyca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
Inne choroby przewlekłe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
5. **Czy paliła Pani papierosy w trakcie ciąży?** (jeśli TAK, proszę podać ile dziennie) .....
6. **Czy paliła Pani papierosy przed zajściem w ciążę?** .....
7. **Czy przyjmowała Pani w czasie ciąży witaminy?** (jeśli TAK, proszę podać jakie) .....
8. **Kiedy ostatnio przyjmowała Pani antybiotyki i z jakiego powodu?** .....
9. **Czy kiedykolwiek przechodziła Pani leczenie lekami immunosupresyjnymi?** (jeśli TAK, proszę podać kiedy i z jakiego powodu) .....
10. **Czy kiedykolwiek wystąpiły u Pani:** (jeśli zdiagnozowano przyczynę proszę podać)

- trudności z zajściem w ciążę	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- poronienia	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- zgony wewnątrzmaciczne	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- poród przez cesarskie cięcie	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- przedterminowy poród	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- urodzenie noworodka z małą masą urodzeniową	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
- urodzenie noworodka z wadą rozwoju	TAK <input type="checkbox"/> NIE <input type="checkbox"/>	.....
11. **Czy przeżyła Pani kiedykolwiek jakieś choroby lub miała wykonywane zabiegi w obrębie dróg moczowo-płciowych** (jeśli TAK, proszę podać kiedy i jakie) .....
12. **Czy stosowała Pani środki antykoncepcyjne?** (jeśli TAK, proszę zaznaczyć jakie, kiedy i jak długo)



### 10.2.3. Ankieta po 6 tygodniach

#### Ankieta po 6 tygodniach od porodu

1) Nazwisko dziecka .....

2) Imię i nazwisko matki .....

3) Data pobrania próbki .....

4) Czy od momentu wypisu z oddziału noworodkowego, dziecko przebywało w międzyczasie w szpitalu? TAK  NIE

Jeśli tak, to:

a) jak długo?.....

b) z jakiego powodu? .....

5) Sposób karmienia dziecka: **naturalne, sztuczne, mieszane**

6) Jeśli dziecko było karmione naturalnie, to jak długo?.....