

lek. Karolina Majewska

**Ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatem
probiotycznym na wybrane parametry dysfunkcji
śródbłonka naczyniowego u otyłych kobiet**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie medycyna**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Bogdański

Promotor pomocniczy: dr n. med. Monika Szulińska

Katedra i Zakład Leczenia Otyłości, Zaburzeń Metabolicznych oraz
Dietetyki Klinicznej



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2018

Składam wyrazy wdzięczności i podziękowania,

Mojemu Promotorowi,

Panu prof. dr hab. n. med. Pawłowi Bogdańskiemu

za inspirację, okazaną pomoc, wsparcie oraz cenne uwagi udzielone w trakcie przygotowywania niniejszej pracy

Mojemu Promotorowi Pomocniczemu,

Pani dr n. med. Monice Szulińskiej

za życzliwość, okazaną pomoc oraz poświęcony czas w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej

Spis treści

1. WSTĘP.....	10
1.1. OTYŁOŚĆ	10
1.1.1. Definicja i klasyfikacja otyłości	11
1.1.2. Epidemiologia i patogeneza otyłości	13
1.1.2.1. Otyłość u kobiet.....	16
1.1.3. Powikłania otyłości.....	16
1.2. ŚRÓDBŁONEK NACZYŃ TĘTNICZYCH	18
1.2.1. Definicja i budowa śródbłonka.....	19
1.2.2. Rola śródbłonka	20
1.2.3. Dysfunkcja śródbłonka i jej konsekwencje	21
1.3. MIKROFLORA PRZEWODU POKARMOWEGO.....	24
1.3.1. Skład mikroflory przewodu pokarmowego.....	24
1.3.2. Czynniki modulujące mikroflorę przewodu pokarmowego.....	27
1.3.3. Funkcje mikroflory	29
1.3.4. Dysbioza – definicja i znaczenie	31
1.4. PROBIOTYKI.....	32
1.4.1. Definicja.....	32
1.4.2. Charakterystyka probiotyków	33
1.4.3. Zastosowanie lecznicze probiotyków	34
2. UZASADNIENIE PODJĘCIA PROBLEMU BADAWCZEGO	38
3. CELE PRACY	40
4. MATERIAŁ.....	41
4.1. Populacja badana	41
4.2. Kryteria kwalifikacyjne.....	41
4.3. Przebieg rekrutacji i charakterystyka badanych grup	42
5. METODYKA BADANIA.....	44

5.1.	Schemat badania	44
5.2.	Badania wykonane podczas kwalifikacji do projektu.....	46
5.2.1.	Badanie podmiotowe	46
5.2.2.	Badanie przedmiotowe.....	46
5.2.2.1.	Pomiary antropometryczne	46
5.2.2.2.	Pomiary ciśnienia tętniczego.....	47
5.3.	Badania wykonane u osób zakwalifikowanych do projektu	48
5.3.1.	Ocena sztywności naczyń tętniczych.....	48
5.3.2.	Badania biochemiczne	50
5.4.	Charakterystyka stosowanego suplementu.....	52
6.	KRYTYKA METODY	54
7.	ANALIZA STATYSTYCZNA	57
8.	WYNIKI.....	58
8.1.	Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej u otyłych kobiet	58
8.2.	Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na stężenie glukozy u otyłych kobiet	60
8.3.	Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u otyłych kobiet	62
8.3.1.	Markery stanu zapalnego (IL-6, TNF- α).....	62
8.3.2.	Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS).....	65
8.3.3.	Homocysteina.....	66
8.3.4.	Wskaźnik sztywności naczyń tętniczych (SI)	68
8.4.	Analiza korelacyjna	69
9.	DYSKUSJA	71
9.1.	Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej u otyłych kobiet	71

9.2. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na stężenie glukozy u otyłych kobiet.....	74
9.3. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry biochemiczne dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u otyłych kobiet	77
9.4. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na wskaźnik sztywności naczyń tętnicznych u otyłych kobiet.....	83
9.5. Podsumowanie.....	84
10. WNIOSKI.....	85
11. STRESZCZENIE.....	86
12. SUMMARY	90
13. SPIS RYCIN.....	94
14. SPIS TABEL.....	95
15. PIŚMIENNICTWO.....	98

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AMPK	kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. <i>AMP-activated protein kinase</i>)
ANG II	angiotensyna II (ang. <i>angiotensin II</i>)
AT III	antytrombina III (ang. <i>antithrombin III</i>)
BED	zespół kompulsywnego jedzenia (ang. <i>binge-eating disorder</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
CAT	katalaza (ang. <i>catalase</i>)
CFU	jednostka tworząca kolonie (ang. <i>colony-forming unit</i>)
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i>)
DBP	rozkurczowe ciśnienie tętnicze (ang. <i>diastolic blood pressure</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DVP	cyfrowa objętość tętna (ang. <i>digital volume pulse</i>)
EASO	Europejskie Towarzystwo Badań nad Otyłością (ang. <i>European Association for the Study of Obesity</i>)
EDHF	śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. <i>European Society of Cardiology</i>)
ESH	Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (ang. <i>European Society of Hypertension</i>)
ET-1	endotelina 1 (ang. <i>endothelin 1</i>)
FFA	wolne kwasy tłuszczowe (ang. <i>free fatty acids</i>)
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
FIAF	czynnik adipocytów indukowany głodem (ang. <i>fasting-induced adipocyte factor</i>)
FMO3	monooksygenaza flawinowa 3 (ang. <i>flavin containing monooxygenase 3</i>)
FOA	Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (ang. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FOS	fruktooligosacharydy (ang. <i>fructooligosaccharides</i>)
FTO	gen podatności na otyłość (ang. <i>Fat Mass and Obesity Associated Gene</i>)
FXR	farnezoidowy receptor X (ang. <i>farnesoid X receptor</i>)
GFR	wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. <i>glomerular filtration rate</i>)

GLP-1	glukagonopodobny peptyd 1 (ang. <i>glucagon-like peptide 1</i>)
GOS	galaktooligosacharydy (ang. <i>galactooligosaccharides</i>)
GPx	peroksydaza glutationu (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
GSH	glutation (ang. <i>glutathione</i>)
HC	obwód bioder (ang. <i>hip circumference</i>)
HDL	lipoproteiny wysokiej gęstości (ang. <i>high-density lipoprotein</i>)
HOMA-IR	wskaźnik insulinooporności (ang. <i>homeostasis model assessment insulin resistance</i>)
ICAM-1	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin-like growth factor</i>)
Il-1	interleukina 1 (ang. <i>interleukin 1</i>)
Il-1 β	interleukina 1 β (ang. <i>interleukin 1β</i>)
Il-6	interleukina 6 (ang. <i>interleukin 6</i>)
Il-8	interleukina 8 (ang. <i>interleukin 8</i>)
Il-10	interleukina 10 (ang. <i>interleukin 10</i>)
Il-12	interleukina 12 (ang. <i>interleukin 12</i>)
Il-18	interleukina 18 (ang. <i>interleukin 18</i>)
IMT	grubość błony wewnętrznej i środkowej tętnicy (ang. <i>intima media thickness</i>)
INF- γ	interferon- γ (ang. <i>interferon-γ</i>)
LDL	lipoproteiny niskiej gęstości (ang. <i>low-density lipoprotein</i>)
LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
MCP-1	czynnik chemotaktyczny monocytów (ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDA	dialdehyd malonowy (ang. <i>malondialdehyde</i>)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAFLD	niealkoholowe stłuszczenie wątroby (ang. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NEC	martwicze zapalenie jelit (ang. <i>necrotizing enterocolitis</i>)
NES	syndrom jedzenia nocnego (ang. <i>night eating syndrome</i>)
NF- κ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (ang. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NK	komórki NK (ang. <i>natural killer</i>)
NO	tlenek azotu (ang. <i>nitric oxide</i>)
OBS	obturacyjny bezdech senny (ang. <i>obstructive sleep apnea</i>)

PAF	czynnik aktywujący płytki (ang. <i>platelet activating factor</i>)
PCOS	zespół policystycznych jajników (ang. <i>polycystic ovary syndrome</i>)
PDGF	płytkowy czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i>)
PGI2	prostaglandyna I2 (ang. <i>prostaglandin I2</i>)
PPT	czas pomiędzy pierwszym a drugim szczytem tętna (ang. <i>peak-to-peak time</i>)
PWV	prędkość fali tętna (ang. <i>pulse wave velocity</i>)
PYY	peptyd YY (ang. <i>peptide YY</i>)
RH-PAT	dylatacja tętnicy indukowana niedokrwieniem (ang. <i>reactive hyperemia peripheral arterial tonometry</i>)
RI	wskaźnik odbicia (ang. <i>reflection index</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
SBP	skurczowe ciśnienie tętnicze (ang. <i>systolic blood pressure</i>)
SCFA	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. <i>short chain fatty acids</i>)
SHBG	globulina wiążąca hormony płciowe (ang. <i>sex hormone binding globulin</i>)
SI	indeks sztywności naczyń (ang. <i>stiffness index</i>)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
TAC	całkowita pojemność antyoksydacyjna (ang. <i>total antioxidant capacity</i>)
TAS	całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (ang. <i>total antioxidant status</i>)
TCH	cholesterol całkowity (ang. <i>total cholesterol</i>)
TG	triglicerydy (ang. <i>triglyceride</i>)
TGR5	receptor błonowy sprzężony z białkiem G (ang. <i>G protein-coupled bile acid receptor</i>)
TLR 4	receptor Toll-podobny 4 (ang. <i>toll-like receptor 4</i>)
TMAO	N-tlenek trimetyloaminy (ang. <i>trimethylamine N-oxide</i>)
TMA	trimetyloamina (ang. <i>trimethylamine</i>)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. <i>tumor necrosis factor α</i>)
t-PA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>)
tPA-I	inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator inhibitor</i>)
TRAP	całkowita zdolność zmiatania wolnych rodników (ang. <i>total radical -trapping antioxidant parameter</i>)
TXA2	tromboksan A2 (ang. <i>thromboxane A2</i>)
WC	obwód talii (ang. <i>waist circumference</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

WHR	wskaźnik talia-biodro (ang. <i>waist to hip ratio</i>)
VCAM-1	naczyniowa cząsteczka adhezyjna (ang. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLDL	lipoproteina bardzo niskiej gęstości (ang. <i>very low density lipoprotein</i>)
vWF	czynnik von Willebranda (ang. <i>von Willebrand factor</i>)

1. WSTĘP

1.1. OTYŁOŚĆ

Otyłość to choroba będąca wyzwaniem XXI wieku. Jest ona efektem zmian cywilizacyjnych obserwowanych w drugiej połowie XX wieku i w obecnym stuleciu. W społeczeństwie dominuje siedzący tryb życia, niewielki lub całkowity brak aktywności fizycznej oraz nieprawidłowe nawyki żywieniowe. Kwestia ta dotyczy nie tylko osób dorosłych, narasta również odsetek otyłych dzieci. Otyłość to nie tylko problem medyczny będący źródłem licznych chorób i przyczyną co najmniej 2,8 mln zgonów rocznie na świecie [1], to także wyzwanie ekonomiczne zarówno dla bogatych krajów wysokorozwiniętych, jak i państw o średnim czy nawet niskim dochodzie. Koszty leczenia otyłości stanowią ogromne obciążenie dla gospodarki. Według danych przedstawionych na konferencji „Epidemia otyłości – wyzwania dla Europy Środkowo-Wschodniej. Pacjenci, lekarze, system”, zorganizowanej w ubiegłym roku przez Marszałka Senatu oraz Koalicję Na Rzecz Walki Z Otyłością w Polsce, około 20 – 30% wydatków na służbę zdrowia przeznaczają się na leczenie otyłości i jej powikłań. W Stanach Zjednoczonych są to kwoty rzędu 52 mld dolarów rocznie [2]. Koszty opieki zdrowotnej pacjentów cierpiących na otyłość i nadwagę są o 44% wyższe niż pacjentów o prawidłowej masie ciała. Inne skutki ekonomiczne to utrata lub ograniczenie zdolności do pracy, konieczność pobierania dodatkowych świadczeń (np. zwolnień lekarskich, świadczeń rehabilitacyjnych), spadek produktywności wynikający z pogorszenia stanu zdrowia oraz przedwczesne zgony [3]. Częstość występowania nadwagi i otyłości nieustannie rośnie. Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) liczba ludności otyłej uległa potrojeniu w latach 1975 – 2016 [4]. Szacuje się, że do 2025 roku problem otyłości i nadwagi dotyczyć będzie około 2,7 mld dorosłych, a prawdopodobne nakłady na leczenie powikłań otyłości wyniosą około 1,2 bln dolarów rocznie [5]. Otyłość jest ciężką chorobą przewlekłą, która wymaga interdyscyplinarnej i kompleksowej opieki zdrowotnej, dlatego priorytetem powinny być działania w zakresie jej profilaktyki i edukacji pacjentów.

1.1.1. Definicja i klasyfikacja otyłości

Według definicji zaproponowanej przez WHO otyłość i nadwaga charakteryzują się nieprawidłowym lub nadmiernym gromadzeniem tkanki tłuszczowej, która może wpływać niekorzystnie na stan zdrowia człowieka [6]. W celu rozpoznania nadwagi lub otyłości i oceny stopnia zaawansowania choroby posługujemy się najczęściej, w codziennej praktyce, wskaźnikiem masy ciała (ang. *body mass index*, BMI). Obliczamy go dzieląc masę ciała wyrażoną w kilogramach przez wzrost w metrach podniesiony do kwadratu (kg/m^2).

$$\text{BMI} = \frac{\text{masa ciała [kg]}}{\text{wzrost}^2 [\text{m}^2]}$$

Otyłość u dorosłych rozpoznajemy, gdy wartość BMI jest $\geq 30,0 \text{ kg}/\text{m}^2$, natomiast nadwagę, gdy BMI jest $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ i $< 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ [4]. Klasyfikację otyłości przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości w oparciu o wskaźnik BMI wg WHO [7]

BMI (kg/m^2)	KLASYFIKACJA OTYŁOŚCI
<18,50	Niedobór masy ciała
18,50 – 24,99	Prawidłowa masa ciała
25,00 – 29,99	Nadwaga
$\geq 30,00$	Otyłość
30,00 – 34,99	Otyłość I stopnia
35,00 – 39,99	Otyłość II stopnia
$\geq 40,00$	Otyłość III stopnia

BMI-wskaźnik masy ciała

Kolejnym parametrem antropometrycznym, który możemy wykorzystać do oceny rozmieszczenia tkanki tłuszczowej jest wskaźnik talia-biodro (ang. *waist to hip ratio*, WHR). W celu oznaczenia jego wartości należy dokonać pomiaru obwodu talii i obwodu bioder, a następnie obliczyć ich iloraz.

$$\text{WHR} = \frac{\text{obwód talii [cm]}}{\text{obwód bioder [cm]}}$$

Pomiaru obwodu talii (ang. *waist circumference*, WC) dokonujemy w połowie odległości pomiędzy dolnym brzegiem ostatniego, dostępnego w badaniu palpacyjnym żebra, a szczytem grzebienia kości biodrowej. Natomiast obwód bioder (ang. *hip circumference*, HC) powinniśmy ocenić na wysokości krętarzy większych kości udowej. Parametr WHR pozwala zróżnicować otyłość brzuszną od pośladkowo-udowej. Klasyfikację otyłości w oparciu o wskaźnik WHR przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Klasyfikacja otyłości brzusznej i pośladkowo-udowej w oparciu o wskaźnik WHR [8]

	WSKAŹNIK WHR	
	Kobiety	Mężczyźni
Otyłość brzuszna	$\geq 0,8$	$\geq 1,0$
Otyłość pośladkowo-udowa	$< 0,8$	$< 1,0$

WHR-wskaźnik talia-biodro

Otyłość pośladkowo-udowa (tzw. gynoidalna/obwodowa) częściej występuje u kobiet i predysponuje m.in. do choroby zwyrodnieniowej stawów, żylnej choroby zakrzepowozatorowej, nowotworów przewodu pokarmowego. Tkanka tłuszczowa lokalizuje się głównie w okolicy pośladków i bioder [9]. Otyłość brzuszna (tzw. otyłość centralna/trzewna) wiąże się przede wszystkim ze zwiększeniem ryzyka zaburzeń metabolicznych, takich jak upośledzona tolerancja glukozy, insulinooporność, zaburzenia profilu lipidowego oraz chorób układu sercowo-naczyniowego [9]. Zaobserwowano, że istnieje zależność pomiędzy wartością wskaźnika WHR oraz obwodu talii, a ryzykiem powikłań metabolicznych – Tabela 3 [10].

Tabela 3. Wartość wskaźnika WHR oraz obwodu talii, a ryzyko powikłań metabolicznych wg WHO [10]

	WARTOŚĆ		RYZIKO POWIKŁAŃ METABOLICZNYCH
	Kobiety	Mężczyźni	
Obwód talii (cm)	> 80	> 94	Zwiększone
Obwód talii (cm)	> 88	> 102	Znacząco zwiększone
Wskaźnik WHR	$\geq 0,85$	$\geq 0,90$	Znacząco zwiększone

WHR-wskaźnik talia-biodro

Otyłość można również klasyfikować w oparciu o jej etiopatogenezę. Pierwotna – stanowi około 90% przypadków i wywołana jest przewlekle dodatnim bilansem energetycznym wynikającym ze spożycia nadmiernej ilości pokarmów, w stosunku do zapotrzebowania organizmu. Nadmiar pozyskanej w ten sposób energii magazynowany jest w postaci tkanki tłuszczowej. Wtórna – występuje m.in. w przebiegu endokrynopatii, chorób organicznych podwzgórza, zespołów uwarunkowanych genetycznie, a także może być wywołana jatrogenie np. poprzez stosowane leki [11].

W oparciu o uwarunkowania genetyczne można wyróżnić trzy typy otyłości. Jednogenową – rozpoznawaną stosunkowo rzadko i wywołaną mutacją np. genu 4 receptora melanokortyny lub genu leptyny i receptora leptyny. Wielogenową, która jest wynikiem polimorfizmów licznych genów predysponujących do rozwoju otyłości oraz otyłość w przebiegu zespołów genetycznych, takich jak zespół Pradera-Willego lub zespół Laurence’a-Moona [12,13].

1.1.2. Epidemiologia i patogeneza otyłości

Zapobieganie i leczenie otyłości oraz jej powikłań stanowi kluczowe wyzwanie dla polityki zdrowotnej każdego państwa. Według ostatnich doniesień WHO na świecie żyje 1,9 mld ludzi z nadwagą, a osoby otyłe to ponad 650 mln. Można uznać, że choroba ta osiągnęła rozmiary epidemii. W roku 2016 pacjenci z nadwagą stanowili 39%, a osoby otyłe 13% populacji ludzi powyżej 18 r.ż. [4] W naszym kraju z raportu WHO z 2016 roku wynika, że 35,2% ludności ma nadwagę, a 23,1% otyłość [14]. Odsetek ten nieustannie wzrasta, co ilustruje Tabela 4.

Tabela 4. Odsetek ludności z nadwagą i otyłością w Polsce w latach 1996 – 2014 [3,15]

	NADWAGA		OTYŁOŚĆ	
	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni
1996 r.	14,2%	18,7%	12,4%	10,3%
2004 r.	14,2%	19,8%	12,5%	12,6%
2009 r.	29,4%	44,8%	15,2%	16,6%
2014 r.	30,1%	44,1%	15,6%	18,1%

Poważnym zagrożeniem jest również narastająca liczba dzieci z nadmierną masą ciała. Aktualne dane wskazują, że 41 mln dzieci na świecie poniżej 5 r.ż. ma nadwagę lub otyłość, a w grupie wiekowej 5 – 19 r.ż. problemy te diagnozuje się nawet u 340 mln dzieci i młodzieży [4]. Według WHO w Polsce 7,2% populacji w wieku od 10 do 19 lat cierpi na otyłość, a wśród nich dominuje płeć męska. Niepokojące dane dotyczą także grupy wiekowej 5 – 9 r.ż., gdzie odsetek otyłych dzieci wynosi aż 12,5% [16,17]. Występowanie otyłości wiąże się ze statusem społeczno-ekonomicznym (niski zwiększa odsetek pacjentów otyłych); miejscem zamieszkania (częściej obserwuje się otyłość na wsi); poziomem wykształcenia (niższy odsetek otyłości i nadwagi wśród ludności z wykształceniem wyższym); częściej na otyłość chorują osoby niepełnosprawne. Różnice społeczno-demograficzne w występowaniu otyłości i nadwagi obserwowano również w grupie najmłodszej. Zdecydowanie częściej nadmierną masę ciała stwierdzano u chłopców. Sytuacja rodzinna też ma istotne znaczenie. Mniejsze ryzyko rozwoju nadwagi lub otyłości mają dzieci wychowywane przez oboje rodziców. Najprawdopodobniej jest to związane z wyższym statusem ekonomicznym rodzin pełnych [3].

W patogenezie otyłości ważną rolę odgrywają czynniki genetyczne. Ich udział szacuje się na 40 – 70% [18]. Należy podkreślić, że w większości przypadków czynniki genetyczne mogą jedynie predysponować do wystąpienia nadmiernej masy ciała. Jeśli rodzice mają prawidłową masę ciała, ryzyko otyłości u dziecka wynosi 7%, a gdy obydwój z rodziców chorują na otyłość, ryzyko wzrasta nawet do 80% [12]. Przykładem znaczenia czynników genetycznych w złożonej patogenezie otyłości jest polimorfizm genu FTO (ang. *Fat Mass and Obesity Associated Gene*). Zaobserwowano, że nosiciele niekorzystnego wariantu tego genu – allelu A polimorfizmu *rs9939609*, mają znacznie większe łaknienie, przyswajają więcej energii i częściej obserwuje się u nich nadmierną masę ciała. Nie wykazano, aby obecność allelu ryzyka genu FTO determinowała masę urodzeniową noworodka, stwierdzono jednak, że zwiększa ona ryzyko otyłości w późniejszych latach [19-21]. Nie każdy pacjent, który jest nosicielem polimorfizmów genów predysponujących do nadmiernej masy ciała będzie otyły. Należy pamiętać, że kluczową rolę odgrywają czynniki środowiskowe.

Zasadniczą przyczyną otyłości i nadwagi jest nadmierne spożycie kalorii w stosunku do potrzeb organizmu i przewlekle dodatni bilans energetyczny. Według danych Europejskiego Towarzystwa Badań nad Otyłością (ang. *European Association for the Study of Obesity*, EASO) przeciętny Europejczyk spędza każdego dnia około 5 godzin siedząc, jako sposób przemieszczania się 60% z nich wybiera transport samochodowy, a 19% środki komunikacji miejskiej. Ilość przyjmowanych dziennie kalorii jest obecnie o 500 kcal większa,

niż 40 lat temu, a zapotrzebowanie jest znacznie mniejsze [22]. Dieta bogatotłuszczowa oraz otyłość wiążą się ze zwiększeniem stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi (ang. *free fatty acids*, FFA), a ich nadmiar odgrywa istotną rolę w patogenezie insulinooporności [23]. Nieprawidłowe nawyki żywieniowe, spożywanie wysoko przetworzonych i kalorycznych pokarmów oraz zmniejszenie konsumpcji warzyw i owoców ostatecznie przyczynia się do powstania nadmiernej masy ciała.

Problemem jest także brak wysiłku fizycznego. Według WHO 1 na 4 osoby dorosłe jest mało aktywna fizycznie, a aż 80% nastolatków nie podejmuje wystarczającego wysiłku. Zgodnie z zaleceniem WHO zdrowe osoby dorosłe (w wieku od 18 do 64 r.ż.) powinny wykonywać wysiłek fizyczny o umiarkowanym natężeniu, przez co najmniej 150 minut tygodniowo lub o intensywnym natężeniu przez co najmniej 75 minut tygodniowo. Mogą też stosować ekwiwalent tych kombinacji. W celu uzyskania dodatkowych korzyści zdrowotnych zaleca się stopniowe zwiększenie aktywności, o umiarkowanym natężeniu, do 300 minut tygodniowo. Co najmniej dwa razy w tygodniu rekomenduje się wykonywanie ćwiczeń wzmacniających główne grupy mięśniowe [24]. W oparciu o wyniki badania przeprowadzonego w 2017 roku na zlecenie Ministerstwa Sportu i Turystyki zalecenia WHO dotyczące poziomu aktywności fizycznej realizuje tylko 18,9% mężczyzn i 13,4% kobiet w wieku od 15 do 69 r.ż. [25]

Ryzyko nadwagi lub otyłości zwiększa też stosowana przez pacjenta farmakoterapia. Przyjmowanie takich leków jak: glikokortykosteroidy, pochodne sulfonilomocznika, trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, neuroleptyki (np. olanzapina), progestageny może przyczynić się do wzrostu masy ciała [12,26].

Do otyłości predysponują także endokrynopatie np. niedoczynność tarczycy, zespół/choroba Cushinga, zespół policystycznych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS), choroby organiczne podwzgórza, przysadki (np. zapalenia, guzy, wady rozwojowe) [12,26].

Występowanie zaburzeń odżywiania, takich jak syndrom jedzenia nocnego (ang. *night eating syndrome*, NES), zespół kompulsywnego jedzenia (ang. *binge-eating disorder*, BED), nasilają ryzyko otyłości. Przyrost masy ciała może być wynikiem nadmiernego przyjmowania pokarmów, jako metody radzenia sobie ze stresem [12,27]. Ponadto zaobserwowano, że skrócenie czasu snu również predysponuje do przyrostu masy ciała. Ograniczenie spoczynku nocnego prowadzi do rozwoju zaburzeń hormonalnych – wzrostu stężenia leptyny, greliny, powodując nasilenie łaknienia i przyswajanie większej ilości kalorii [28].

Etiopatogeneza otyłości jest bardzo złożona i właściwie nadal nie do końca poznana. Aby skutecznie przeciwdziałać otyłości konieczna jest szersza wiedza na temat czynników, które są odpowiedzialne za przyrost masy ciała. W celu zwrócenia uwagi społeczeństwa na otyłość, jako niezmiernie ważny problem zdrowotny, ustalono Europejski Dzień Otyłości przypadający w bieżącym roku w dniu 19 maja.

1.1.2.1. Otyłość u kobiet

Otyłość typu pośladkowo-udowego jest charakterystyczna dla kobiet. Nadmiar tkanki tłuszczowej lokalizuje się głównie w okolicy bioder oraz pośladków. Z wiekiem, a szczególnie po menopauzie, zwiększa się objętość trzewnej tkanki tłuszczowej gromadzonej w okolicy brzucha. Stwierdza się zmniejszenie wrażliwości na insulinę, zaburzenia profilu lipidowego oraz wzrost stężenia glukozy. Są to konsekwencje zmian w stężeniu hormonów płciowych. Po 50 r.ż. obserwuje się obniżenie syntezy estrogenów, zmniejszenie stężenia globuliny wiążącej hormony płciowe (ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG) i względny nadmiar androgenów. Uważa się, że u osób po 65 r.ż. ryzyko zaburzeń metabolicznych jest u kobiet pięć razy większe, niż u osób pomiędzy 20 – 34 r.ż. [29,30] Tkanka wisceralna wykazuje znaczny potencjał wydzielniczy, jest źródłem licznych, biologicznie czynnych substancji zwanych adipokinami. Ponadto charakteryzuje się dużą aktywnością lipolityczną. Dochodzi do przyspieszonej mobilizacji FFA, nasilenia procesu wątrobowej glukoneogenezy, zwiększenia syntezy frakcji lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoprotein*, VLDL), triglicerydów (ang. *triglyceride*, TG) oraz upośledzenia degradacji wątrobowej insuliny, co skutkuje zarówno hiperinsulinemią, jak i insulinoopornością. Otyłość brzuszna jest uznanym czynnikiem ryzyka zaburzeń metabolicznych i chorób układu sercowo-naczyniowego [31].

1.1.3. Powikłania otyłości

Otyłość i nadwaga mogą prowadzić do wystąpienia wielu schorzeń, które stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Istotne jest podejmowanie działań, które mają na celu poprawę świadomości społeczeństw, co do problemu jakim jest otyłość oraz poszukiwanie nowych metod jej profilaktyki i leczenia.

Tkanka tłuszczowa jest nie tylko magazynem energetycznym ustroju, ale wykazuje również potencjał wydzielniczy. Komórki tkanki tłuszczowej – adipocyty produkują substancje zwane adipokinami, które biorą czynny udział w procesach metabolicznych. Należą do nich m.in. leptyna, waspina, wisfatyna, rezystyna, omentyna. Zwiększone stężenie rezystyny nasila glukoneogenezę oraz insulinooporność. Leptyna indukuje wytwarzanie cytokin prozapalnych np. interleukiny 6 (ang. *interleukin 6*, Il-6), czynnika martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), redukuje apetyt oraz zwiększa wydatek energetyczny organizmu, a osoby otyłe wykazują zmniejszoną wrażliwość na jej działanie [32]. Adiponektyna jest również wydzielana przez komórki tkanki tłuszczowej, jednak jej stężenie jest znacznie niższe u osób otyłych. Odgrywa ona istotną rolę w regulacji apetytu, w metabolizmie glukozy, lipidów. Wykazuje działanie wazoprotekcyjne – zapobiega rozwojowi dysfunkcji śródbłonna, zmniejsza stężenie cytokin zapalnych np. TNF- α , zwiększa stężenie tlenu azotu (ang. *nitric oxide*, NO). Ponadto hamuje proliferację i migrację komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich naczyń oraz zmniejsza ryzyko rozwoju miażdżycy [33,34]. U pacjentów z nadmierną masą ciała obniża się także stężenie omentyny, która odpowiedzialna jest za nasilenie wychwytu glukozy, zwiększenie wrażliwości na insulinę i obniżenie aktywacji TNF- α [32]. Tkanka tłuszczowa ma bardzo duży potencjał endokryny, a wydzielane przez nią substancje mają istotne znaczenie w powstawaniu zaburzeń metabolicznych.

U pacjentów z nadmierną masą ciała częściej obserwuje się zaburzenia gospodarki węglowodanowej. Zmniejsza się wrażliwość na insulinę, wzrasta ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2. Otyłość jest przyczyną zaburzeń gospodarki lipidowej. Dochodzi do wzrostu stężenia małych, aterogennych cząsteczek frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL), wzrostu stężenia TG, a frakcja lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*, HDL) ulega obniżeniu [35]. Przewlekły stan zapalny, który towarzyszy otyłości, jest ważnym czynnikiem ryzyka zaburzeń metabolicznych i chorób układu sercowo-naczyniowego [36].

U pacjentów z nadmierną masą ciała częściej rozpoznaje się nadciśnienie tętnicze. Badania kliniczne dowodzą, że tkanka tłuszczowa jest źródłem angiotensynogenu, enzymu konwertującego angiotensynę oraz reniny. W tej populacji pacjentów obserwuje się także podwyższone stężenie aldosteronu w surowicy krwi. Konsekwencją kliniczną są podwyższone wartości ciśnienia tętniczego [37].

Otyłość predysponuje do rozwoju miażdżycy i jej powikłań np. choroby niedokrwiennej serca. Częściej występuje niewydolność serca, zaburzenia rytmu serca. Rośnie ryzyko żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej, udaru mózgu [36,38].

Ponadto do powikłań otyłości zaliczamy:

- choroby przewodu pokarmowego takie jak: kamica żółciowa, refluks żołądkowo-przełykowy, niealkoholowe stłuszczenie wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) [38,39],
- obturacyjny bezdech senny (ang. *obstructive sleep apnea*, OBS), który jest jednocześnie czynnikiem ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych [40],
- choroby układu kostno-stawowego np. chorobę zwyrodnieniową stawów i związane z nią dolegliwości bólowe, ograniczenie sprawności ruchowej, znaczne pogorszenie jakości życia [41],
- zaburzenia płodności – np. nieregularne cykle menstruacyjne, zaburzenia owulacji, zwiększone ryzyko poronień oraz powikłań u matki i płodu podczas ciąży [42],
- choroby nowotworowe – np. zwiększenie ryzyka raka endometrium, nerki, tarczycy, raka jelita grubego, trzustki, pęcherzyka żółciowego, gruczolakoraka przełyku [43].

Należy podkreślić, że otyłość i nadwaga nie tylko prowadzą do rozwoju poważnych powikłań somatycznych, ale również powodują zaburzenia emocjonalne. Pacjenci otyli często nie akceptują własnego wyglądu, mają niską samoocenę. Czują się izolowani przez środowisko albo sami ograniczają kontakty i unikają spotkań. Mają wysokie poczucie winy, bezsilności, osamotnienia. Częściej obserwuje się u nich lęki, wahania nastroju, depresję oraz zaburzenia odżywiania. Opieka nad pacjentem z nadmierną masą ciała powinna obejmować nie tylko takie aspekty jak zwiększenie aktywności fizycznej, leczenie dietetyczne, farmakologiczne, bariatryczne, ale także dotyczyć szerokiego wsparcia psychologicznego i psychoterapii, w celu zapewnienia jak najbardziej optymalnych warunków do poprawy stanu zdrowia i redukcji masy ciała [44,45].

1.2. ŚRÓDBŁONEK NACZYŃ TĘTNICZYCH

Otyłość jest zasadniczą przyczyną zwiększonej zachorowalności i śmiertelności z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego. Nadmierna masa ciała predysponuje do rozwoju nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, udarów mózgu, cukrzycy

typu 2, dyslipidemii, miażdżycy, jest także przyczyną problemów psychospołecznych i znacznie pogarsza jakość życia [46]. Według WHO choroby układu sercowo-naczyniowego są wiodącą przyczyną zgonów na świecie. W 2015 roku z ich powodu zmarło 17,7 mln ludzi. Szacuje się, że 7,4 mln zgonów spowodowane było chorobą wieńcową, a 6,7 mln udarem mózgu [47]. U podstaw rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego leży dysfunkcja śródbłonna naczyniowego.

1.2.1. Definicja i budowa śródbłonna

Śródbłonek naczyniowy zbudowany jest z pojedynczej warstwy komórek nabłonka pochodzenia mezenchymalnego. Wyściela on wnętrze naczyń krwionośnych i limfatycznych. Komórki śródbłonna połączone są za pomocą połączeń przylegających (ang. *adherens junction*), szczelinowych (ang. *gap junction*) oraz ścisłych – zamykających (ang. *tight junction*) [48]. Zlokalizowane są na błonie podstawnej, która utworzona jest najczęściej przez dwie blaszki. Blaszkę podstawną – zbudowaną przez kolagen typu IV, kolagen typu V, lamininę, fibronektynę i blaszkę siateczkową – zbudowaną z włókien siateczkowych [49]. Uważa się, że śródbłonek zbudowany jest z około 10^{13} komórek o masie około 1 kg, zajmując obszar o powierzchni do 7 m². Poszczególne komórki śródbłonna stanowią barierę pomiędzy światłem, a mięśniówką gładką naczyń kontrolując w ten sposób substancje i komórki, które migrują z krwi do okolicznych tkanek [50]. Komórki śródbłonna w całym układzie naczyniowym wykazują wiele wspólnych cech. Jednak w pewnych obszarach łożyska naczyniowego, w zależności od lokalnych warunków, śródbłonek wykazuje odrębności fenotypowe. Przykładem mogą być naczynia włosowate, gdzie można wyróżnić trzy typy histologiczne śródbłonna. Bezokienkowy tzw. ciągły, zlokalizowany w naczyniach siatkówki, ośrodkowym układzie nerwowym, grasicy. Typ okienkowy, który w komórkach zawiera otwarte okienka tzw. pory, występuje w kłębuszkach nerkowych oraz nieciągły np. w naczyniach zatokowych wątroby, szpiku i śledziony [49,51].

1.2.2. Rola śródbłonka

Śródbłonek uważany jest za narząd o niezwykle istotnym potencjale endokrynnym. Poprzez wydzielane substancje utrzymuje wewnętrzną homeostazę naczyniową. Bardzo ważną funkcją jest regulacja napięcia ścian naczyń krwionośnych. Czynniki wydzielane przez komórki śródbłonka mogą działać wazodylatacyjnie, należą do nich m.in. NO, prostaglandyna I₂ (ang. *prostaglandin I₂*, PGI₂), śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF). Wśród czynników zwężających naczynia należy wymienić: tromboksan A₂ (ang. *thromboxane A₂*, TXA₂), angiotensynę II (ang. *angiotensin II*, ANG II), czynnik aktywujący płytki (ang. *platelet activating factor*, PAF) i leukotrieny C₄/D₄. Najsilniejszym czynnikiem wazokonstrykcyjnym jest endotelina 1 (ang. *endothelin 1*, ET-1), która zwiększa napięcie ścian naczyń głównie poprzez wpływ na komórki mięśniówki gładkiej. W warunkach zdrowia utrzymana jest równowaga pomiędzy stężeniem czynników rozszerzających i zwężających naczynia [48,51].

Kluczową rolę mediatorów uwalnianych przez śródbłonek jest regulacja procesu krzepnięcia krwi i fibrynolizy, a także utrzymanie równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antykoagulacyjnymi. Do mediatorów hamujących procesy krzepnięcia zaliczamy m.in. antytrombinę III (ang. *antithrombin III*, AT III), trombomodulinę, PGI₂, białko C i S oraz cząsteczki heparynopodobne. Ponadto PGI₂ i NO hamują agregację płytek krwi. Śródbłonek reguluje również procesy fibrynolizy. Syntezuje tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*, t-PA) i proteazy, które przekształcają plazminogen w plazminę. Substancje produkowane przez śródbłonek w warunkach choroby mogą mieć działanie prozakrzepowe. Należą do nich m.in. czynnik von Willebranda (ang. *Von Willebrand Factor*, vWf), inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator inhibitor*, tPA-I), TXA₂ oraz czynnik tkankowy. W warunkach fizjologicznych śródbłonek, hamując agregację płytek krwi, reguluje procesy krzepnięcia i zapewnia prawidłowy przepływ krwi przez światło naczyń krwionośnych [48,50-52].

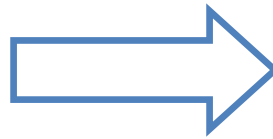
Śródbłonek odgrywa istotną funkcję w procesie angiogenezy. Wydziela szereg czynników stymulujących powstawanie nowych naczyń i przebudowę już istniejących. Możemy do nich zaliczyć naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor*, IGF) oraz płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF) [48,53].

Do funkcji komórek śródbłónka zaliczamy też regulację procesów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej. Czynniki wykazujące działanie prozapalne to cząsteczki adhezyjne (naczyniowa cząsteczka adhezyjna – ang. *vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1; międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna – ang. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), cytokiny takie jak interleukina 1 (ang. *interleukin 1*, Il-1), Il-6, interleukina 18 (ang. *interleukin 18*, Il-18), TNF- α , czynnik chemotaktyczny monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), natomiast działanie przeciwzapalne wykazuje wydzielany przez śródbłonek NO oraz PGI₂ [54,55].

1.2.3. Dysfunkcja śródbłónka i jej konsekwencje

Czynniki ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, takie jak otyłość i związane z nią przewlekły stan zapalny, upośledzają czynność śródbłónka naczyniowego. Jego dysfunkcja przyczynia się m.in. do powstania miażdżycy, jest podstawą rozwoju makro- i mikroangiopatii. Komórki śródbłónka aktywowane przez czynniki uszkodzające lub cytokiny zapalne uruchamiają kaskadę niekorzystnych zdarzeń. Dochodzi do zwiększonej ekspresji czynników o działaniu prozakrzepowym. Utrata ciągłości śródbłónka predysponuje do zwiększonej aktywacji, agregacji płytek krwi i powstania zakrzepu [52]. Ponadto obserwuje się zaburzenia w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych. Zwiększa się stężenie czynników o działaniu naczynioskurczowym, obniża się stężenie NO, nasila się stres oksydacyjny, produkcja wolnych rodników oraz miejscowy stan zapalny [54,56]. Dysfunkcja śródbłónka może prowadzić m.in. do rozwoju zakrzepicy, uszkodzenia naczyń obwodowych, choroby niedokrwiennej serca, podwyższonych wartości ciśnienia tętniczego, miażdżycy i jej powikłań [50]. Wybrane przyczyny dysfunkcji śródbłónka naczyniowego przedstawiono na Rycinie 1.

- Otyłość
- Cukrzyca
- Hiperglikemia
- Hiperlipidemia
- Nadciśnienie tętnicze
- Miażdżyca
- Czynniki zapalne
- Hiperhomocysteinemia
- Nikotynizm



**DYSFUNKCJA
ŚRÓDBŁONKA**

Rycina 1. Wybrane przyczyny dysfunkcji śródbłónka naczyniowego [54]

Otyłość i związany z nią przewlekły stan zapalny indukują stres oksydacyjny. Jest to zaburzenie równowagi pomiędzy nadmierną aktywnością reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), a zdolnością mechanizmów antyoksydacyjnych do ich usuwania. Zwiększony stres oksydacyjny jest kluczowym czynnikiem prowadzącym do uszkodzenia tkanek i zaburzenia funkcji śródbłónka naczyniowego [57]. Nadmiar FFA prowadzi do zwiększonej syntezy ROS. Zaliczamy do nich m.in. nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($O^{2\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($OH\cdot$) [58]. Adipokiny, wydzielane przez komórki tkanki tłuszczowej, również nasilają powstawanie ROS. Wolne rodniki tlenowe odpowiadają za szereg reakcji patologicznych, takich jak peroksydacja lipidów, degradacja białek, aktywacja genów prozapalnych, uszkodzenie kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA), redukcja biodostępności NO, zaburzenia sekrecji insuliny oraz indukcja insulinooporności. U pacjentów otyłych obserwuje się wzrost parametrów stresu oksydacyjnego, m.in. dialdehydu malonowego (ang. *malondialdehyde*, MDA), którego podwyższone stężenie świadczy o intensywności procesu peroksydacji lipidów [58,59]. Potencjał oksydacyjny możemy także ocenić za pomocą wskaźników, takich jak całkowita zdolność zmiatania wolnych rodników (ang. *total radical-trapping antioxidant parameter*, TRAP), całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (ang. *total antioxidant status*, TAS).

Hiperhomocysteinemia jest także czynnikiem ryzyka dysfunkcji śródbłónka naczyniowego. Homocysteina to aminokwas siarkowy, który powstaje w wyniku demetylacji pochodzącej z pożywienia metioniny, następnie ulega dalszej przemianie metabolicznej do

cysteiny lub ponownej remetylacji do metioniny. Wartości referencyjne wynoszą od 4 do 12,3 $\mu\text{mol/l}$ [60]. Do hiperhomocysteinemii może prowadzić nadmiar metioniny w diecie, niedobór witamin, np. kwasu foliowego, witaminy B6, witaminy B12 oraz mutacje genów kodujących enzymy, które pełnią kluczową rolę w jej metabolizmie. Podwyższone stężenie obserwujemy u pacjentów z chorobą Alzheimera, łuszczycą, przewlekłą chorobą nerek, a także pod wpływem stosowanych leków np. metotreksatu, tiazydów. Spożywanie alkoholu, kawy, nikotynizm też mogą wywołać umiarkowany wzrost jej stężenia. Poziom homocysteiny zwiększa się również z wiekiem [55,61]. Podwyższone stężenie homocysteiny zmniejsza biodostępność NO, upośledza jego syntezę, nasila proliferację miocytów, wpływając niekorzystnie na napięcie ścian naczyń krwionośnych i przyczyniając się do ich przebudowy oraz usztywnienia. Podwyższone stężenie homocysteiny indukuje stres oksydacyjny m.in. poprzez uleganie homocysteiny procesowi autooksydacji, w wyniku którego powstają rodniki ponadtlenkowe; obniżenie potencjału antyoksydacyjnego (zmniejszenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej – ang. *superoxide dismutase*, SOD i peroksydazy glutationowej – ang. *glutathione peroxidase*, GPx); aktywacja oksydazy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH); wzrost stężenia anionorodnika nadtlenkowego [62]. Hiperhomocysteinemia hamuje wzrost komórek śródbłonna, upośledza ich regenerację, indukuje apoptozę. Dochodzi do rozwoju stanu zapalnego w obrębie ścian naczyń krwionośnych, a w surowicy krwi możemy stwierdzić zwiększone stężenie TNF- α , cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1). Wszystkie powyższe mechanizmy przyczyniają się do uszkodzenia komórek śródbłonna naczyniowego w przebiegu hiperhomocysteinemii [55,63].

Ocenę funkcji śródbłonna naczyniowego możemy dokonać poprzez oznaczenie stężenia substancji wydzielanych przez śródbłonek. Jego uszkodzenie prowadzi m.in. do zwiększonej ekspresji cytokin zapalnych np. Il-6, TNF- α . Możemy zaobserwować wzrost stężenia cząsteczek adhezyjnych oraz markerów aktywacji prozakrzepowej śródbłonna [64]. Funkcję śródbłonna badamy także za pomocą metod fizycznych. Wśród nich wyróżniamy metody inwazyjne, za pomocą których ocenia się średnicę tętnicy i przepływ po podaniu dotętnicznym substancji naczyniorozkurczowych (np. acetylocholino). Do badań nieinwazyjnych możemy natomiast zaliczyć: ocenę sztywności naczyń tętnicznych (prędkość fali tętna – ang. *pulse wave velocity*, PWV; wskaźnik sztywności naczyń – ang. *stiffness index*, SI), pomiar grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej w tętnicach szyjnych (ang. *intima media thickness*, IMT), czy też zmiany objętości palca wynikającego z

pulsacyjnego przepływu tętniczego (ang. *reactive hyperemia peripheral arterial tonometry*, RH-PAT) [64,65].

Wyzwaniem współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych metod zapobiegania i leczenia zaburzeń metabolicznych oraz ich powikłań. Podkreśla się rolę diety i zdrowego stylu życia, które wpływają korzystnie na czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego. Diagnozowanie dysfunkcji śródbłonka naczyniowego przed wystąpieniem objawów i powikłań klinicznych, a także znajomość czynników, które mogą zmniejszyć ryzyko jego uszkodzenia dałoby możliwość stosowania szerokiej profilaktyki. Szczególną uwagę, również w kontekście śródbłonka naczyniowego, poświęca się w ostatnim czasie mikroorganizmom stanowiącym florę jelitową.

1.3. MIKROFLORA PRZEWODU POKARMOWEGO

W 2001 roku Joshua Lederberg wprowadził termin mikrobiom, który obejmuje zarówno drobnoustroje, które bytując w ciele człowieka wpływają pozytywnie na nasz organizm, jak i potencjalnie chorobotwórcze. W 2007 roku został zainicjowany projekt badawczy: „Human Microbiome Project”, którego celem było poznanie składu oraz funkcji flory fizjologicznej człowieka [66]. Jest to ogólnosiwiatowe przedsięwzięcie, które przy wykorzystaniu najnowocześniejszych metod badawczych, w tym biologii molekularnej, pozwoliło ocenić zależność pomiędzy składem endogennej flory bakteryjnej człowieka, a stanem ludzkiego zdrowia i potencjalnym udziałem dysbiozy w patogenezie wielu chorób [67,68].

1.3.1. Skład mikroflory przewodu pokarmowego

W przewodzie pokarmowym bytuje około 10^{14} komórek bakterii, a liczba genów mikroorganizmów kolonizujących organizm człowieka wynosi około 3,3 mln [69]. Z uwagi na ograniczenia hodowli w warunkach *in vitro* nadal nie jesteśmy pewni dokładnej liczby gatunków, aczkolwiek nowoczesne metody biologii molekularnej pozwalają nam oszacować, że w przewodzie pokarmowym występuje około 1500 gatunków bakterii [70-72]. Gromady, które dominują we florze człowieka to: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*,

Proteobacteria i *Verrucomicrobia*. Do gromady *Firmicutes* należą m.in. *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminiococcus*. *Bacteroidetes*, które stanowią 20 – 30% flory jelitowej, reprezentowane są przez bakterie z rodzaju: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Xylanibacter*, a *Actinobacteria* przez *Bifidobacterium*. Najmniej liczną gromadą, stanowiącą mniej niż 1% populacji mikroflory, są *Proteobacteria*, a ich przedstawicielami są *Enterobacteriaceae* i *Escherichia* [73,74]. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego charakteryzują się odmiennymi warunkami środowiskowymi. Stosunkowo niewielka ilość bakterii bytuje w kwaśnym środowisku żołądka. Ich liczba wynosi $10^3 - 10^4$ jednostek tworzących kolonie (ang. *colony-forming unit*, CFU)/1 g treści pokarmowej. Nieco większa ilość kolonizuje jelito cienkie $10^5 - 10^6$ CFU/g. Najwięcej szczepów znajduje się w jelicie grubym – 10^{11} CFU/g [75]. Należy pamiętać, że florę bakteryjną przewodu pokarmowego tworzą nie tylko bakterie symbiotyczne, które korzystnie wpływają na stan zdrowia, ale również różne gatunki grzybów, wirusów i bakterii należących do rodzaju *Pseudomonas*, *Clostridium*, które mogą być źródłem chorób. W warunkach prawidłowych populacje te pozostają w stanie wzajemnej równowagi.

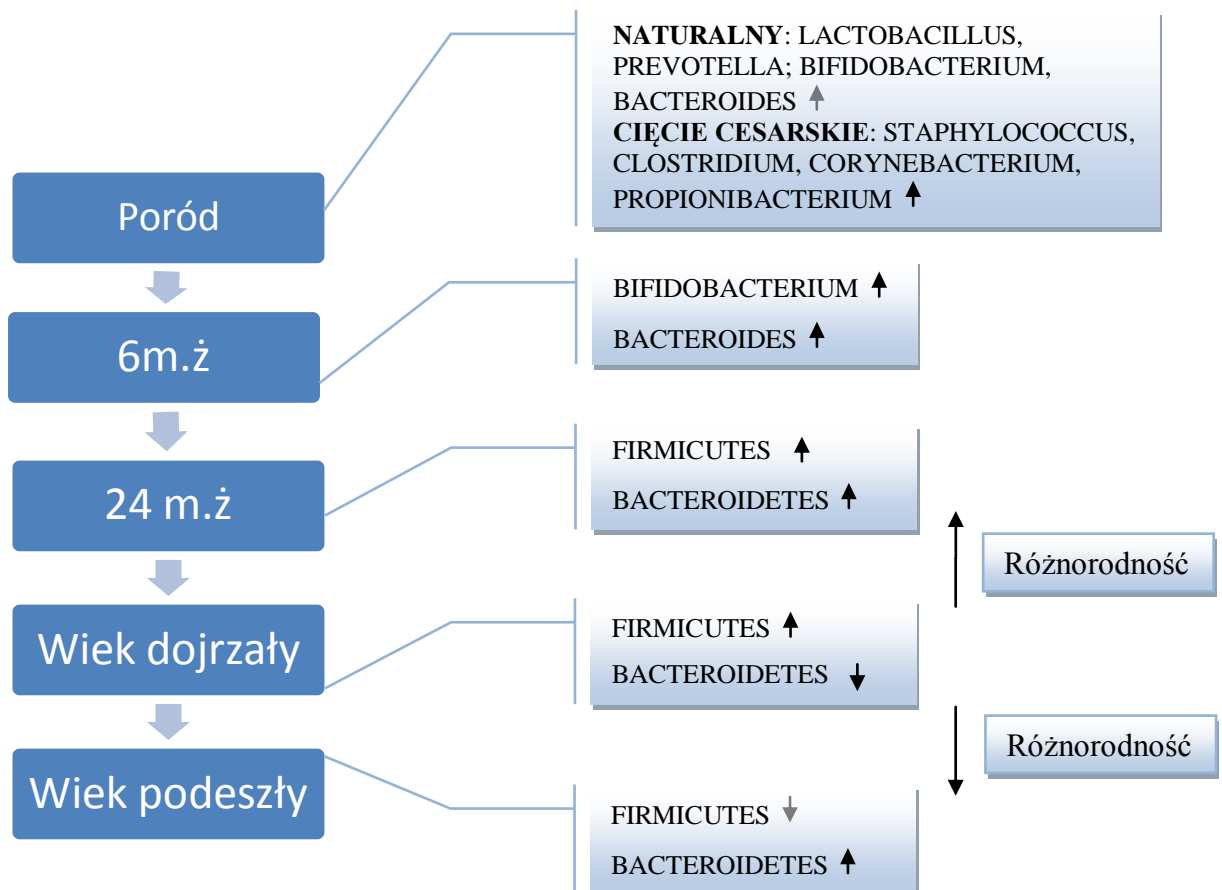
Skład flory jelitowej jest unikatowy dla każdego z nas i podlega modyfikacji w ciągu naszego życia. Najważniejsze czynniki, które decydują o ukształtowaniu mikroflory człowieka to uwarunkowania genetyczne oraz warunki środowiskowe, w których żyjemy. Proces kolonizacji przewodu pokarmowego rozpoczyna się już w trakcie życia płodowego. Jest on niezwykle istotny, ponieważ warunkuje prawidłowe funkcjonowanie organizmu i zmniejsza ryzyko infekcji szczególnie w okresie noworodkowym. W trakcie życia wewnątrzmacicznego antygeny bakterii, które pochodzą od matki, stymulują układ immunologiczny płodu. Bakterie obecne są m.in. w płynie owodniowym, łożysku, błonach płodowych [76-79]. Można je także zidentyfikować w smółce noworodka, co świadczy o tym, że środowisko wewnątrzmaciczne nie jest jałowe [80].

Kolejnym etapem zasiedlania przewodu pokarmowego noworodka jest poród. To, czy odbywa się drogą naturalną, czy przez cięcie cesarskie warunkuje skład flory jelitowej we wczesnym okresie życia dziecka. Jeśli poród odbywa się naturalnie przewód pokarmowy noworodka zasiedlany jest m.in. fizjologiczną florą bytującą w drogach rodnych kobiety. Natomiast, gdy poród odbywa się w warunkach sali operacyjnej dominuje flora skóry matki i bakterie z najbliższego otoczenia niemowlęcia, takie jak *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*. Zasiedlanie przewodu pokarmowego bakteriami z rodzaju *Bifidobacterium* odbywa się wówczas z około 6 miesięcznym opóźnieniem [81-85]. Zaobserwowano, że

zwiększa to ryzyko infekcji, biegunek oraz występowania chorób na tle immunologicznym, takich jak alergia czy astma oskrzelowa [86-89].

Do innych ważnych czynników determinujących skład flory jelitowej u niemowląt należą również: wiek ciążowy płodu w chwili porodu, konieczność dłuższej hospitalizacji dziecka w okresie poporodowym, antybiotykoterapia w okresie noworodkowym. Dzieci urodzone przed planowanym terminem mają odmienny skład flory jelitowej. Obserwuje się u nich zwiększenie kolonizacji bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*, *Enterococcus*, a obniżenie *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. wcześniaki narażone są na większe ryzyko martwiczego zapalenia jelit (ang. *necrotizing enterocolitis*, NEC), co stanowi czynnik ryzyka zgonu w okresie noworodkowym [90,91]. Należy podkreślić, że sposób karmienia też wpływa na skład flory jelitowej. Uważa się, że najbardziej wartościowym pokarmem jest mleko matki. W jego składzie można zidentyfikować liczne oligosacharydy, które pełnią funkcję naturalnych prebiotyków pobudzając wzrost fizjologicznej flory bakteryjnej. Poza tym mleko kobiece zawiera bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, które zasiedlając przewód pokarmowy dziecka, stanowią podstawową florę bakteryjną jelit. Zaobserwowano, że mikroflora dzieci karmionych sztucznie jest niejednorodna i zawiera bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterobacter* [79,92-96]. Istotne jest, aby proces kolonizacji odbywał się prawidłowo, ponieważ bardzo intensywne zmiany w składzie mikrobioty zachodzą w ciągu pierwszych 24 miesięcy życia dziecka. Po tym okresie flora jelit zaczyna się stabilizować, a jej profil przypomina ten występujący u osób dorosłych [97,98].

Kolejnym etapem naszego życia, w którym dochodzi do zmian w składzie flory jelitowej jest okres starzenia się organizmu. Wraz z upływem lat obserwuje się systematyczny wzrost bakterii z gromady *Firmicutes*, natomiast u starszych osób ich liczba obniża się na korzyść *Bacteroidetes*. Mikroflora staje się mniej zróżnicowana. W wieku podeszłym zmniejsza się liczba bakterii z rodzaju: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, natomiast można zaobserwować wzrost ilości bakterii, takich jak *Escherichia coli*, czy *Enterococcus*. [97,99-101]. Zmiany w składzie flory jelitowej człowieka w zależności od wieku przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Zmiany w składzie flory jelitowej człowieka w zależności od wieku [101]

1.3.2. Czynniki modulujące mikroflorę przewodu pokarmowego

Flora jelitowa zaczyna kształtować się już w trakcie życia wewnątrzmacicznego. Istotną rolę odgrywa dieta matki, czynniki stresogenne, stan zdrowia kobiety podczas ciąży [92,102]. Kolejne decydujące etapy, które wpływają na skład flory jelitowej dziecka to poród oraz wybór rodzaju karmienia: naturalne lub sztuczne. Profil mikroflory przewodu pokarmowego i różnorodność bakterii zmienia się także z wiekiem człowieka.

Środowisko, w którym żyjemy i panujące w nim warunki wpływają na skład mikrobioty. Większa ilość bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* obserwowana jest w przewodzie pokarmowym dzieci, które posiadają rodzeństwo, niż u jedynaków [92]. Miejsce zamieszkania (miasto/wieś), szerokość geograficzna i nasze pochodzenie również pełnią rolę w kształtowaniu mikroflory. De Filippo i wsp. zaobserwowali, że w przewodzie pokarmowym dzieci, które zamieszkują tereny Afryki dominują bakterie należące do

gromady *Bacteroidetes*, reprezentowane głównie przez rodzaj *Prevotella* oraz *Xylanibacter*. Bakterie te mają zdolność rozkładu składników pochodzenia roślinnego, takich jak celuloza i ksylany. Natomiast dzieci żyjące na terenie Europy mają znacznie więcej bakterii z gromady *Firmicutes* i *Proteobacteria* [92,103].

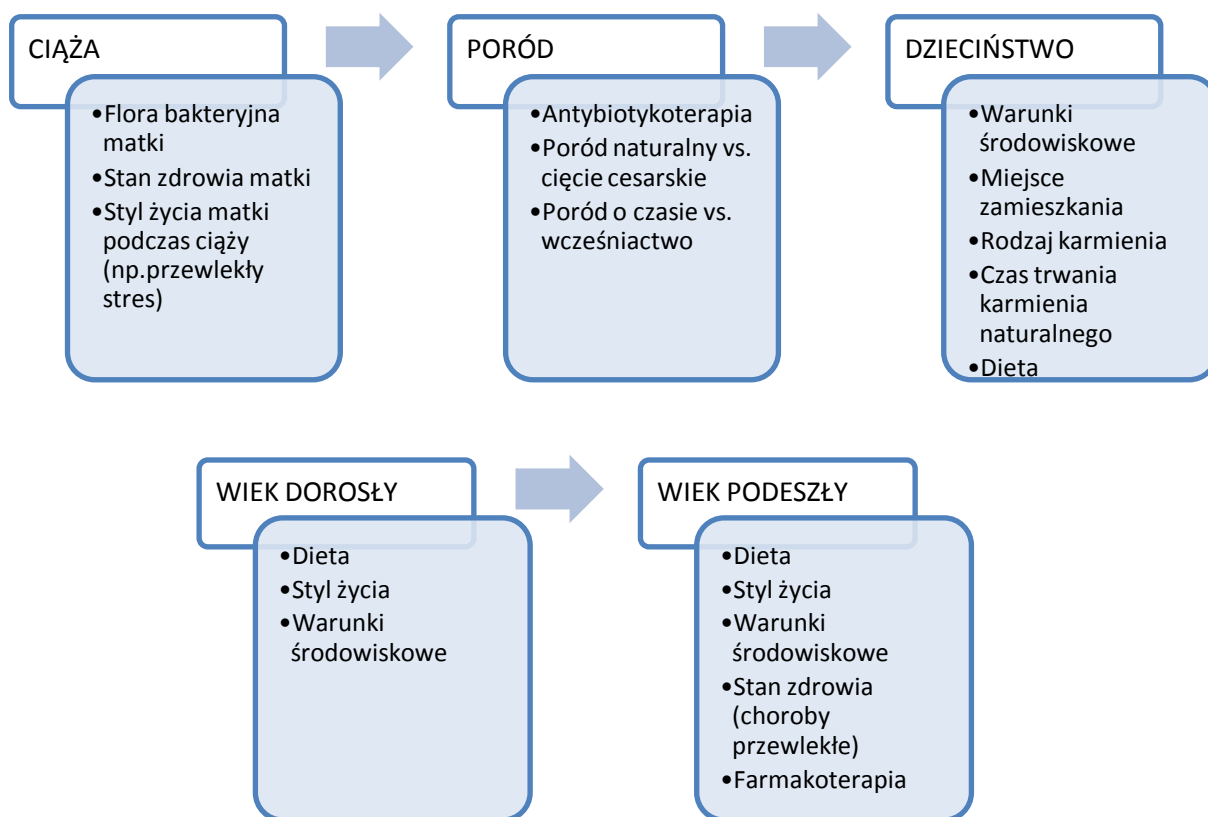
Kluczową rolę w modyfikacji mikroflory odgrywa dieta. Prowadzone są liczne badania, które mają na celu identyfikację różnic w składzie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego w zależności od spożywanych pokarmów oraz rodzaju stosowanej diety [104,105]. Zimmer i wsp. przebadali próbki stolca pobranego od 295 ochotników: 105 wegan, 144 wegetarian. Porównali je z 46 osobową grupą kontrolną, którą stanowili pacjenci spożywający zarówno produkty mięsne jak i roślinne. Zaobserwowano, że stolec pochodzący od osób stosujących dietę wegańską zawierał mniejszą ilość bakterii z rodzaju: *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Enterobacteriaceae* [106]. Zmiany w profilu mikroflory jelitowej wywołuje również dieta wysokotłuszczowa. W oparciu o wyniki badań naukowych uważa się, że zwiększa ona populację bakterii z gromady *Firmicutes*, obniża *Bacteroidetes* [107,108]. Istnieje więc ścisły związek pomiędzy rodzajem spożywanych produktów, a składem mikroflory przewodu pokarmowego.

Pomimo, że profil mikroflory jest indywidualny dla każdego z nas może on ulec znacznej modyfikacji przez czynniki związane z prowadzonym stylem życia. Uważa się, że aktywność fizyczna zwiększa różnorodność bakterii kolonizujących przewód pokarmowy człowieka. Nikotynizm także moduluje skład flory jelitowej, gdyż po zaprzestaniu palenia tytoniu zaobserwowano wzrost różnorodności bakterii z gromady *Firmicutes* i *Actinobacteria*, a niższy odsetek *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* [109,110].

Ważnym czynnikiem, który może wpłynąć na profil mikrobioty jest antybiotykoterapia. Wywołuje ona nie tylko krótkotrwałe zaburzenia składu flory jelit. Po 7 dniowej kuracji klindamycyną zaburzenia składu mikroflory mogą utrzymywać się nawet do 2 lat po zakończonym leczeniu [111]. Istotnym problemem jest stosowanie antybiotyków w okresie ciąży oraz u noworodków i niemowląt, ponieważ może mieć to niekorzystny wpływ na kształtowanie flory jelitowej już od najmłodszych lat życia. Obserwuje się wówczas zubożenie różnorodności, obniżenie bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Bacteroides*, a wzrost liczby *Proteobacteria* [85,112-114]. Czynniki modulujące skład flory jelitowej człowieka przedstawiono na Rycinie 3.

Flora jelitowa przewodu pokarmowego jest dynamicznym ekosystemem, który podlega nieustannej ewolucji. Znajomość czynników, które wpływają na skład mikroflory

pozwała uniknąć tych, które niekorzystnie zmieniają jej profil, a prowadząc zdrowy tryb życia i stosując odpowiednią dietę kształtować jej najbardziej optymalny i prozdrowotny skład.



Rycina 3. Czynniki modulujące skład flory jelitowej człowieka [85]

1.3.3. Funkcje mikroflory

Bakterie jelitowe, które tworzą mikroflorę przewodu pokarmowego mają istotne znaczenie w utrzymaniu wewnętrznej równowagi oraz prawidłowego stanu zdrowia człowieka. Poprzez udział w procesie trawienia i pozyskiwania energii pełnią ważną funkcję metaboliczną. Bytując w przewodzie pokarmowym metabolizują związki, takie jak celuloza, skrobia, pektyny, które nie są rozkładane przez enzymy trawienne. Przekształcając je do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *short chain fatty acids*, SCFA) i cukrów prostych mikroflora dostarcza około 10% energii [69,71,105]. Pozyskane SCFA stanowią substancję odżywczą dla komórek nabłonka jelit, wspomagają regenerację i utrzymanie szczelnej bariery jelitowej. Stymulują również wytwarzanie glukagonopodobnego peptydu 1 (ang. *glucagon-like peptide 1*, GLP-1) oraz peptydu YY (ang. *peptide YY*, PYY). PYY hamuje

pasaż jelitowy, nasila uczucie sytości zmniejszając ilość przyswajanych pokarmów, a GLP-1 zwiększa sekrecję insuliny po posiłkach, redukuje apetyt, spowalnia opróżnianie żołądka [115,116]. Wykazano, że stosowanie preparatów probiotycznych zawierających bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wiązało się z nasileniem sekrecji PYY i GLP-1 przez komórki jelit [74]. Mikroflora blokuje jelitową ekspresję czynnika adipocytów indukowanego głodem (ang. *fasting-induced adipocyte factor*, FIAF), który odpowiedzialny jest za hamowanie działania lipazy lipoproteinowej, sprzyjając magazynowaniu tkanki tłuszczowej. Hamuje także aktywność kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (ang. *AMP-activated protein kinase*, AMPK), zmniejszając utlenianie kwasów tłuszczowych, wychwyt glukozy i uwalnianie insuliny [117].

Fizjologiczna flora bakteryjna chroni przewód pokarmowy przed kolonizacją flory patogennej. *Lactobacillus spp.*, który wydziela kwas mlekowy, obniża pH środowiska w którym bytuje, stwarzając w ten sposób niekorzystne warunki do rozwoju bakterii potencjalnie chorobotwórczych. Prawidłowa flora utrzymuje również równowagę w układzie immunologicznym błony śluzowej jelit. Moduluje różnicowanie limfocytów T, reguluje odpowiedź zapalną, stymuluje plazmocyty do produkcji przeciwciał np. immunoglobuliny klasy A. Bakterie jelitowe biorą czynny udział w utrzymaniu integralności bariery jelitowej zmniejszając translokację flory patogennej do światła przewodu pokarmowego. Indukują wzrost i różnicowanie enterocytów, stymulują procesy naprawcze nabłonka jelit oraz procesy angiogenezy [118,119].

Mikroorganizmy biorą także udział w syntezie witamin z grupy B, witaminy K, kwasu foliowego, we wchłanianiu składników mineralnych oraz elektrolitów. Rozkładają zawarte w pożywieniu toksyny, kancerogeny, biorą udział w metabolizmie leków [72,104,118]. Wpływają na syntezę i przemianę kwasów żółciowych przekształcając je do wtórnych kwasów żółciowych, takich jak kwas deoksycholowy czy lithocholowy [74]. Poprzez aktywację receptorów jądrowych np. farnesoidowego receptora X (ang. *farnesoid X receptor*, FXR) i receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled bile acid receptor*, TGR5) kwasy żółciowe biorą udział w metabolizmie glukozy, lipidów i poprawie wrażliwości tkanek na insulinę [74].

1.3.4. Dysbioza – definicja i znaczenie

Dysbioza, czyli zaburzenia ilości i jakości fizjologicznej mikroflory, może być wywołana przez wiele czynników. Wśród nich należy wymienić: nieprawidłową dietę – z dużą zawartością tłuszczu i węglowodanów, brak aktywności fizycznej, stosowane leki np. antybiotykoterapię, niesteroidowe leki przeciwzapalne, inhibitory pompy protonowej i używki, takie jak alkohol, nikotynizm. Zakażenia przewodu pokarmowego oraz przewlekły stres również mogą być przyczyną dysbiozy. Zmiany w składzie flory przewodu pokarmowego przyczyniają się do wystąpienia wielu chorób. Obserwuje się zwiększone ryzyko chorób autoimmunologicznych, alergii, atopii. Dysbioza jelitowa może być przyczyną nawracających infekcji, chorób zapalnych jelit, biegunek [85,119].

Zaburzenia w składzie fizjologicznej mikroflory upośledzają syntezę elementów strukturalnych ściany jelita tzw. połączeń ścisłych (ang. *tight junction*), prowadząc do ich rozluźnienia i powstania tzw. jelita przesiąkliwego. Obserwuje się zmniejszenie syntezy okludyny i zonuliny-1, które to białka stanowią istotny element strukturalny połączeń ścisłych. Następstwem tego procesu jest przenikanie antygenów bakteryjnych przez ścianę jelita i rozwój subklinicznego stanu zapalnego, który jest istotnym elementem zaburzeń metabolicznych, otyłości oraz chorób układu sercowo-naczyniowego [104,120]. Dowody z badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują na potencjalne znaczenie zaburzeń w składzie mikroflory jelitowej w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Stosowanie diety o dużej zawartości tłuszczu skutkuje zwiększeniem liczebności bakterii Gram-ujemnych we florze przewodu pokarmowego człowieka. Błona komórkowa tych bakterii zawiera w swoim składzie lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS), który aktywuje receptor Toll-podobny 4 (ang. *toll-like receptor 4*, TLR4), indukując endotoksemię. Przewlekły stan zapalny przyczynia się do narastania insulinooporności, wzrostu stężenia glukozy, TG oraz zwiększenia produkcji cytokin prozapalnych takich jak: Il-1, Il-6, TNF- α , a także ROS. Skutkuje to uszkodzeniem i pogorszeniem funkcji śródbłonna naczyniowego, a tym samym wzrostem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego [73,115,121,122].

Aktywność mikroflory przyczynia się również do wzrostu stężenia tlenu N-trimetyloaminy (ang. *trimethylamine N-oxide*, TMAO). Pochodzącą z diety cholinę bakterie jelitowe metabolizują do trimetyloaminy (ang. *trimethylamine*, TMA), która następnie za pomocą enzymu monoooksygenazy flawinowej typu 3 (ang. *flavin containing monooxygenase 3*, FMO3) podlega utlenieniu w wątrobie do TMAO. Podwyższone stężenie TMAO sprzyja

powstawaniu blaszki miazdźycowej i zwiększa ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych [123].

Wyniki licznych badań potwierdzają związek mikroflory z otyłością. Kolonizacja przewodu pokarmowego myszy *germ-free* bakteriami pozyskanymi od myszy otyłych doprowadziła do przyrostu masy ciała. Natomiast u zwierząt, które otrzymały florę od myszy z prawidłową masą ciała nie zaobserwowano jej zwiększenia – przy stosowaniu w obu przypadkach jednakowej diety. Doświadczenia wykazały, że u zwierząt otyłych obserwuje się 50% spadek liczebności bakterii *Bacteroidetes* i wzrost bakterii z gromady *Firmicutes*. Wprowadzenie diety niskokalorycznej oraz redukcja masy ciała prowadzi natomiast do zwiększenia ilości *Bacteroidetes* [67,121].

Mikroflora przewodu pokarmowego jest nieustannie przedmiotem wielu badań klinicznych, które dostarczają nam coraz nowszych informacji o pełnionych przez nią funkcjach. Zaburzenia w jej składzie mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie wielu chorób. Poszukiwane są metody wspomagania oraz modulowania składu flory jelitowej. Obiecującym rozwiązaniem w profilaktyce i leczeniu różnych schorzeń jest suplementacja probiotyków, których skuteczność i bezpieczeństwo zostało udowodnione w próbach klinicznych.

1.4. PROBIOTYKI

1.4.1. Definicja

W piśmiennictwie odnajdujemy liczne informacje o właściwościach leczniczych i zastosowaniu fermentowanych produktów mlecznych, a ich prozdrowotny wpływ znany jest od wielu tysięcy lat. Pierwsze wzmianki pojawiają się już w treści Starego Testamentu. W 76 r. p.n.e. rzymski historyk Pliniusz zalecił stosowanie fermentowanych produktów mlecznych w celu złagodzenia dolegliwości związanych z zapaleniem żołądka i jelit. Nie znano jeszcze, w tamtym okresie, źródła tych dobroczynnych właściwości. Wraz z rozwojem mikrobiologii szczególną uwagę poświęcano poszukiwaniu związku pomiędzy florą bakteryjną człowieka, a jego stanem zdrowia [124]. Na początku XX wieku Ilia Miecznikow – naukowiec pochodzący z Rosji, na podstawie przeprowadzonych obserwacji, zalecił spożywanie produktów bogatych w bakterie kwasu mlekowego jako źródła zdrowia i gwarancji prawidłowego,

długowiecznego funkcjonowania organizmu człowieka. Ważną rolę w poznawaniu prozdrowotnych właściwości bakterii odegrał Henry Tissier, który po raz pierwszy wyizolował bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Zaobserwował, że dzieci które cierpią na biegunki mają ich znacznie mniej, w porównaniu do dzieci zdrowych. Zasugerował suplementację tych bakterii w celach leczniczych. W Polsce naukowcem, który zajmował się pałeczkami kwasu mlekowego był Józef Brudziński. Potwierdził celowość suplementacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w leczeniu biegunek u niemowląt [125,126].

Słowo probiotyk wywodzi się z języka greckiego „*pro bios*” i oznacza „dla życia”. Definicja probiotyków zmieniała się wielokrotnie na przestrzeni lat. Ostatecznie w 2002 roku WHO oraz Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) zdefiniowała probiotyki jako mikroorganizmy, które podawane w odpowiednich dawkach wywierają korzystne skutki zdrowotne [126,127]. Wspomaganie mikroflory organizmu człowieka to nie tylko dostarczanie drobnoustrojów w postaci preparatów probiotycznych, ale również stymulacja ich wzrostu za pomocą prebiotyków. Fruktooligosacharydy (ang. *fructooligosaccharides*, FOS), galaktooligosacharydy (ang. *galactooligosaccharides*, GOS) czy inulina to składniki żywności, które nie ulegają trawieniu w przewodzie pokarmowym, natomiast stanowią materiał odżywczy dla mikroorganizmów kolonizujących przewód pokarmowy człowieka [128].

1.4.2. Charakterystyka probiotyków

Obecnie na rynku znajduje się wiele produktów zawierających bakterie probiotyczne. Probiotyki dostępne są w preparatach farmaceutycznych, suplementach diety, jako dodatki do żywności. Występują w postaci kropli, płynów doustnych, tabletek i proszku do sporządzania zawiesiny. Każdy preparat powinien posiadać informację o liczbie żywych bakterii, nazwę rodzaju, gatunku i szczepu, a także dane o dawce minimalnej, czasie zalecanej suplementacji oraz schemacie podawania. Do mikroorganizmów, które najczęściej są składnikiem preparatów probiotycznych należą bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*. Metabolizują one węglowodany i na drodze beztlenowej fermentacji produkują kwas mlekowy. Inne przykłady drobnoustrojów probiotycznych to drożdżaki *Saccharomyces boulardii*, szczep bakterii *Escherichia coli* Nissle 1917, *Enterococcus faecium* SF68 czy bakterie z gatunku *Streptococcus thermophilus* [118,129]. W badaniach klinicznych ocenia

się skuteczność i bezpieczeństwo probiotyków. Mikroorganizmy, które zostały uznane za probiotyczne charakteryzują się zdolnością adhezji do komórek nabłonka i zachowania żywotności w środowisku, w którym bytują. Nie są patogenne, ani toksyczne, pochodzą z mikroflory człowieka i posiadają szereg prozdrowotnych właściwości dla organizmu gospodarza. Muszą również spełniać wymagania technologiczne, takie jak zachowanie żywotności w gotowych produktach spożywczych, nawet po długim okresie przechowywania, odporność na zamrażanie czy liofilizację, a także możliwość produkcji dużej ilości biomasy [130]. Jeśli probiotyki stosowane są w formie preparatów przyjmowanych doustnie nie powinny być wrażliwe na kwaśne środowisko żołądka oraz enzymy trawienne obecne w przewodzie pokarmowym człowieka [125,131,132].

W badaniach klinicznych ustala się dawkę terapeutyczną probiotyków. Należy pamiętać, że prozdrowotne właściwości zależą głównie od ilości spożytych mikroorganizmów i rodzaju szczepu bakterii, który wchodzi w skład preparatu. W celu uzyskania efektów zdrowotnych uważa się, że minimalna dzienna ilość bakterii probiotycznych powinna wynosić $10^6 - 10^9$ CFU [130]. Preparaty farmaceutyczne zawierają liofilizowane szczepy bakterii zwykle w ilości $10^{10} - 10^{11}$ CFU/g produktu, w przetworach mlecznych liczba szczepów waha się od $2 - 5 \times 10^{10}$ CFU/g, a w mleku modyfikowanym przeznaczonym dla dzieci znajduje się około 10^7 CFU/g produktu. Należy pamiętać, że mikroorganizmy probiotyczne mają zdolność namnażania się w świetle jelita, co zwiększa ich ilość wielokrotnie – dawka podana w postaci preparatu nie jest identyczna, jak realna dawka skuteczna. Prowadzone randomizowane badania kliniczne mają na celu ustalenie najbardziej efektywnej, terapeutycznej dawki poszczególnych szczepów bakterii [126].

1.4.3. Zastosowanie lecznicze probiotyków

Wyniki licznych badań wskazują, że suplementacja probiotyków poprawia jakość prawidłowej flory bakteryjnej człowieka i przyczynia się do eliminacji drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych. Mikroorganizmy probiotyczne konkurują z florą patogenną o składniki odżywcze. Poprzez zdolność adhezji do komórek nabłonka jelit lub pochwy uniemożliwiają kolonizację ścian tych organów przez patogeny. Bakterie kwasu mlekowego, takie jak *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* stymulują namnażanie i aktywność limfocytów, makrofagów, komórek NK (ang. *natural killer*) [133]. Zaobserwowano, że

Lactobacillus rhamnosus i *Bifidobacterium lactis* pobudzają wydzielanie immunoglobuliny A oraz produkcję γ -interferonu (ang. *interferon- γ* , IFN- γ) przez limfocyty [133].

Wiele badań klinicznych poświęconych jest działaniu przeciwnowotworowemu probiotyków. Oprócz stymulacji układu immunologicznego gospodarza, bakterie te rozkładają substancje o potencjale mutagennym np. nitrozoaminy. Eliminują z mikroflory przewodu pokarmowego drobnoustroje chorobotwórcze, które wytwarzają enzymy fekalne, takie jak nitroreduktazy, azoreduktazy i β -glukuronidazy mające znaczenie w patogenezie raka jelita grubego [134,135]. Poprzez ograniczenie rozwoju flory patogennej w świetle jelita mikroorganizmy probiotyczne są skuteczne w profilaktyce i leczeniu biegunek podróźnych, związanych z antybiotykoterapią, zakażeniem rotawirusami lub *Clostridium difficile*. Szczep probiotyczny *Lactobacillus acidophilus* La1 hamuje w warunkach *in vitro* wzrost bakterii *Helicobacter pylori* [136]. Natomiast suplementacja *Streptococcus thermophilus* może przynieść korzystne efekty zdrowotne u pacjentów nietolerujących laktozy. Gatunek ten syntezuje enzymy β -galaktozydazy, które w procesie hydrolizy rozkładają laktozę do cukrów prostych – glukozy i galaktozy [133,137]. Przykłady bakterii probiotycznych i ich zastosowanie kliniczne przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Wybrane bakterie probiotyczne i ich udowodniona skuteczność w badaniach klinicznych

BAKTERIE PROBIOTYCZNE	ZASTOSOWANIE KLINICZNE
<i>L. rhamnosus</i> GG	wrzodziejące zapalenie jelita grubego [138] zmniejszenie nasilenia objawów atopowego zapalenia skóry [139] zapobieganie biegunce związanej z antybiotykoterapią [140,141];
<i>L. rhamnosus</i> Lcr35	leczenie zaparć czynnościowych [129]
<i>L. acidophilus</i>	wrzodziejące zapalenie jelita grubego; leczenie zaburzeń motorycznych jelit [140]
<i>L. reuteri</i>	leczenie biegunek rotawirusowych [129], kolki niemowlęcej [142]
<i>L. lactis</i> DN-173 010	leczenie zaparć czynnościowych [129]
<i>L. acidophilus</i> & <i>B. longum</i>	zapobieganie biegunce związanej z antybiotykoterapią [140]
<i>L. acidophilus</i> & <i>L. bulgaricus</i>	zapobieganie biegunce związanej z antybiotykoterapią [140]
<i>B. lactis</i> Bb12& <i>Str. thermophilus</i>	zmniejszenie objawów atopowego zapalenia skóry [139] zapobieganie biegunce związanej z antybiotykoterapią [131]
<i>E. coli</i> Nissle 1917	wrzodziejące zapalenie jelita grubego [138,140] leczenie zaparć czynnościowych [131]
<i>S. boulardii</i>	leczenie biegunki ostrej i poantybiotykowej [141] zapobieganie biegunce podróźnych [129] zmniejszenie ryzyka nawrotu biegunki wywołanej <i>C. difficile</i> [140]

Wyniki licznych badań wskazują na skuteczne zastosowanie probiotyków w leczeniu zaburzeń metabolicznych. Modulacja flory jelitowej za pomocą probiotyków i zwiększenie ilości bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* poprawia szczelność bariery jelitowej, zmniejsza migrację flory patogennej do światła jelita, ogranicza toksemię (obniża stężenie LPS w osoczu) i związany z nią stan zapalny. Probiotyki działają również antyoksydacyjnie. W konsekwencji poprawiają wrażliwość na insulinę, wpływają korzystnie na metabolizm glukozy, lipidów – obniżają cholesterol całkowity (ang. *total cholesterol*, TCH) oraz cholesterol frakcji LDL [143].

W randomizowanym badaniu z podwójnie ślełą próbą opublikowanym przez Andreasen i wsp. badano wpływ szczepu *Lactobacillus acidophilus* NCFM na insulinowrażliwość. Do badania włączono 45 mężczyzn z cukrzycą typu 2, upośledzoną lub prawidłową tolerancją glukozy. Grupa badana (n=21) otrzymała kapsułki zawierające bakterie probiotyczne w ilości 10^{10} CFU/g, grupa kontrolna (n=24) placebo. Wykazano, że 4 tygodniowa suplementacja szczepu *Lactobacillus acidophilus* NCFM poprawia wrażliwość na insulinę [144].

Obiektem szczególnego zainteresowania jest także zastosowanie probiotyków w leczeniu otyłości. Lee i wsp. badali znaczenie szczepu *Lactobacillus rhamnosus* PL60, bakterii bytującej w jelicie człowieka, na otyłe myszy. Po 8 tygodniowej terapii u zwierząt zaobserwowano redukcję masy ciała przy utrzymaniu dotychczasowej diety. Uzyskany efekt prawdopodobnie wynikał z wytwarzania przez ten szczep sprzężonego kwasu linolowego, który przyczynia się do zmniejszenia ilości tkanki tłuszczowej w organizmie [145]. Natomiast w badaniu przeprowadzonym przez Kadooka i wsp. oceniono wpływ suplementacji szczepu *Lactobacillus gasseri* SBT2055 na tkankę tłuszczową trzewną u pacjentów otyłych. Po 12 tygodniach interwencji stwierdzono redukcję masy ciała, obniżenie wskaźnika BMI, obwodu talii i bioder, zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej [146]. Do potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw korzystnego wpływu probiotyków w leczeniu i profilaktyce otyłości należy wymienić: redukcję przewlekłego stanu zapalnego poprzez uszczelnienie bariery jelitowej, zmniejszenie przepuszczalności ściany jelit oraz hamowanie produkcji cytokin prozapalnych. Probiotyki mogą także zmniejszyć liczbę kalorii uzyskanych z trawienia pożywienia poprzez modyfikowanie składu flory jelitowej, co wpływa na ilość magazynowanej energii w postaci tkanki tłuszczowej [104,122].

Bez wątpienia mikroflora jelitowa odgrywa istotną rolę w regulacji równowagi energetycznej organizmu człowieka. Istnieje potrzeba dalszych badań nad wykorzystaniem zmiany składu flory jelitowej w leczeniu otyłości i związanych z nią powikłań. Należy jednak

pamiętać, że stosowanie probiotyków może mieć pewne ograniczenia. WHO uważa je za bezpieczne, aczkolwiek znajdujemy w piśmiennictwie informacje o infekcjach spowodowanych suplementacją drobnoustrojów probiotycznych. Przypadki niekorzystnego wpływu bakterii kwasu mlekowego na organizm człowieka są niezwykle rzadkie. Dotyczą one głównie ciężko i przewlekle chorych pacjentów, u których obserwuje się obniżenie odporności immunologicznej w przebiegu choroby podstawowej. Zakażenia wywołane przez bakterie *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* stanowią niewielki procent przypadków bakteriemii oraz zapaleń wsierdza (0,05 – 0,4%). W celu zapewnienia bezpieczeństwa podczas suplementacji probiotyków nie zaleca się ich stosowania u pacjentów z niedoborami odporności, w trakcie immunosupresji lub inwazyjnej terapii np. chemioterapii [125,147,148].

W procesie pozyskiwania bakterii probiotycznych coraz większą rolę odgrywają nowoczesne metody biologii molekularnej. Poszczególne szczepy bakterii można poddawać modyfikacji genetycznej, tak aby uzyskać szczepy bardziej odporne na warunki panujące w przewodzie pokarmowym gospodarza, a także wykazujące się lepszą skutecznością kliniczną tzw. farmabiotyki. Stosowanie ich w profilaktyce i leczeniu chorób wydaje się być bardzo obiecujące, niezbędne są jednak dalsze prace badawcze [131].

2. UZASADNIENIE PODJĘCIA PROBLEMU BADAWCZEGO

Otyłość jest uznaną przyczyną zwiększonej zachorowalności i śmiertelności z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz jest jednym z głównych czynników prowadzących do zaburzenia funkcji śródbłonka naczyniowego. W złożonej patogenezie dysfunkcji śródbłonka naczyniowego u otyłych chorych rozpatrywany jest udział klasycznych czynników ryzyka, a zarazem typowych powikłań otyłości, tj. nadciśnienia tętniczego, zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej. Analizowana jest także rola tzw. nowych czynników ryzyka m.in. przewlekłego wewnątrznaczyniowego procesu zapalnego, stresu oksydacyjnego, hiperhomocysteinemii. Uszkodzenie śródbłonka naczyniowego przyczynia się do przyspieszonej progresji miażdżycy i jej klinicznych konsekwencji.

Wiele prac badawczych poświęconych jest roli mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości, cukrzycy oraz w zaburzeniach metabolicznych. Dowody z badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują również na potencjalne znaczenie zaburzeń w składzie mikroflory jelitowej w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego.

Modyfikacja składu flory jelitowej może odbywać się za pomocą preparatów probiotycznych. Prowadzone badania kliniczne potwierdzają ich prozdrowotne właściwości. Udokumentowano skuteczność kliniczną w leczeniu zaparć, biegunek, infekcji układu moczowo-płciowego. Szczególną uwagę poświęca się możliwościom korzystnego oddziaływania probiotyków w zapobieganiu, leczeniu otyłości i związanych z nią powikłań. W dostępnym piśmiennictwie pojawia się coraz więcej prac oceniających efekt suplementacji wybranym szczepem bakterii na śródbłonek naczyń krwionośnych. Wyniki badań na modelach zwierzęcych są obiecujące i zachęcają do prowadzenia badań klinicznych u ludzi. Należy pamiętać, że prozdrowotne właściwości probiotyku zależą nie tylko od ilości bakterii wchodzących w skład przyjmowanego suplementu. Stosowanie preparatów wieloszczepowych może przynieść dodatkowe efekty i korzyści kliniczne wynikające ze wzajemnego oddziaływania poszczególnych szczepów bakterii – zarówno synergicznego, jak i antagonistycznego.

W związku z tym, w niniejszym projekcie zaplanowano ocenę wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatu wieloskładnikowego, który zawiera 8 szczepów bakterii

probiotycznych na profil lipidowy, stężenie glukozy, wybrane parametry biochemiczne (IL-6, TNF- α , TAS, homocysteinę) i czynnościowe (sztywność naczyń tętniczych) dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u otyłych kobiet.

3. CELE PRACY

- Ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej i stężenie glukozy w surowicy krwi u otyłych kobiet.
- Ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym na wybrane parametry biochemiczne dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u otyłych kobiet.
- Ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym na wskaźnik sztywności naczyń u otyłych kobiet.

4. MATERIAŁ

4.1. *Populacja badana*

Badaniem objęto pacjentki rekrutowane z Poradni Zaburzeń Metabolicznych w Szpitalu Klinicznym Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na podstawie uchwały nr 659/16. Wszystkie pacjentki uzyskały informację o celu i zasadach badania, a także wyraziły pisemną, świadomą zgodę na udział w projekcie.

4.2. *Kryteria kwalifikacyjne*

Kryteria włączenia do badania:

- Pisemne udzielenie świadomej zgody na udział w badaniu,
- Wiek od 45 do 65 lat,
- Płeć żeńska,
- BMI 30 – 45 kg/m²,
- Obwód talii >80 cm,
- Stabilna masa ciała (± 1 kg w ostatnim miesiącu).

Kryteria wykluczenia z badania:

- Wtórna postać otyłości,
- Choroby przewodu pokarmowego,
- Cukrzyca,
- Przewlekła choroba nerek (wskaźnik filtracji kłębuszkowej <60 ml/min/1,73m²; ang. *glomerular filtration rate*, GFR),
- Klinicznie istotne zaburzenie funkcji wątroby,

- Dyslipidemia lub nadciśnienie tętnicze wymagające wdrożenia leczenia farmakologicznego w ostatnich 3 miesiącach przed rozpoczęciem obserwacji lub w trakcie obserwacji,
- Stosowanie suplementów diety w okresie ostatniego miesiąca od rozpoczęcia badania,
- Klinicznie istotny ostry lub przewlekły proces zapalny,
- Palenie papierosów,
- Nadużywanie alkoholu,
- Równoczesny udział w badaniu mającym wpływ na zmianę masy ciała lub stosowanie leków/zachowania żywieniowe mające wpływ na zmianę masy ciała,
- Przyjmowanie antybiotyków w ciągu 1 miesiąca przed rozpoczęciem badania,
- Istotna zmiana aktywności fizycznej w trakcie trwania badania,
- Stosowanie diety wegetariańskiej,
- Spożywanie produktów wzbogaconych w pre- i probiotyki oraz produktów z wysoką zawartością błonnika pokarmowego lub dużych ilości żywności fermentowanej (>400 g/dobę),
- Hormonalna terapia zastępcza,
- I/lub inne zaburzenia mogące w jakikolwiek sposób stanowić ryzyko dla zdrowia pacjenta podczas przeprowadzania badania i/lub utrudnić, ograniczyć skuteczność badania.

4.3. Przebieg rekrutacji i charakterystyka badanych grup

Projekt prowadzono w okresie od sierpnia 2016 roku do lipca 2017 roku. Procesowi rekrutacji poddano 123 pacjentki – 54 uczestniczki spełniły kryteria włączenia i zostały zaproszone do udziału w badaniu. Ostatecznie w projekcie wzięło udział 50 osób (rezygnacja po wstępnej rekrutacji – 3 osoby; wyjazd poza granice kraju – 1 osoba). Uczestniczki poddano randomizacji z podwójnie ślepą próbą, w stosunku 1:1 do grupy kontrolnej oraz grupy badanej. Do każdej z grup przydzielono 25 pacjentek. Codziennie, przez okres 12 tygodni, pacjentki przyjmowały doustnie preparat probiotyczny lub placebo. Analiza porównawcza pomiędzy grupami na początku badania nie wykazała różnic istotnych statystycznie w zakresie badanych parametrów. Szczegółową charakterystykę populacji włączonej do badania przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka grupy suplementującej preparat probiotyczny (n=25) i grupy placebo (n=25)

Badany parametr	PROBIOTYK Średnia ± SD	PLACEBO Średnia ± SD	<i>P</i>
Wiek (lata)	55,2 ± 6,9	58,7 ± 7,3	NS
Masa ciała (kg)	94,5 ± 16,6	92,8 ± 11,9	NS
Wzrost (cm)	160,8 ± 6,2	160,4 ± 6,4	NS
BMI (kg/m ²)	36,6 ± 6,0	36,1 ± 4,4	NS
Obwód talii (cm)	109,8 ± 11,7	109,9 ± 8,3	NS
SBP (mmHg)	134,8 ± 10,1	133,6 ± 12,2	NS
DPB (mmHg)	79,9 ± 8,1	83,8 ± 7,3	NS

BMI - wskaźnik masy ciała; SBP - skurczowe ciśnienie tętnicze; DBP- rozkurczowe ciśnienie tętnicze; SD – odchylenie standardowe; NS - wartość nieistotna statystycznie

5. METODYKA BADANIA

5.1. *Schemat badania*

Po uzyskaniu pisemnej, świadomej zgody na udział w projekcie u każdej kwalifikowanej osoby przeprowadzono badanie podmiotowe, przedmiotowe, pomiary antropometryczne, pomiar ciśnienia tętniczego. Uczestniczki kwalifikowano do badania na podstawie kryteriów włączenia i wykluczenia.

U uczestniczek zakwalifikowanych do projektu wykonano ocenę sztywności naczyń tętniczych i pobrano krew żylną celem oznaczenia wybranych parametrów biochemicznych. Podczas wizyty pacjentki otrzymały także probiotyk/placebo oraz dokładne instrukcje odnośnie jego dawkowania i sposobu przygotowania.

Badanie przeprowadzono metodą podwójnej ślepej próby – osoba wydająca preparat i uczestniczki badania nie wiedziały czy otrzymały probiotyk, czy placebo. Pacjentki przyjmowały suplement przez okres 12 tygodni, dwa razy dziennie – jedną saszetkę rano na czczo, a drugą wieczorem przed snem. Uczestniczki badania poinformowano o konieczności regularnego przyjmowania preparatu, utrzymaniu diety i aktywności fizycznej na dotychczasowym poziomie. Zalecono również, aby w trakcie trwania badania pacjentki nie stosowały dodatkowych suplementów diety, probiotyków, antybiotyków – a jeśli będzie kliniczne wskazanie do antybiotykoterapii lub zmiany dotychczasowego leczenia poinformowanie osoby prowadzącej badanie.

Po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji, na wizycie kontrolnej, pobrano krew żylną celem ponownej oceny parametrów biochemicznych oraz wykonano ocenę sztywności naczyń tętniczych. Schemat badania przedstawiono na Rycinie 4.

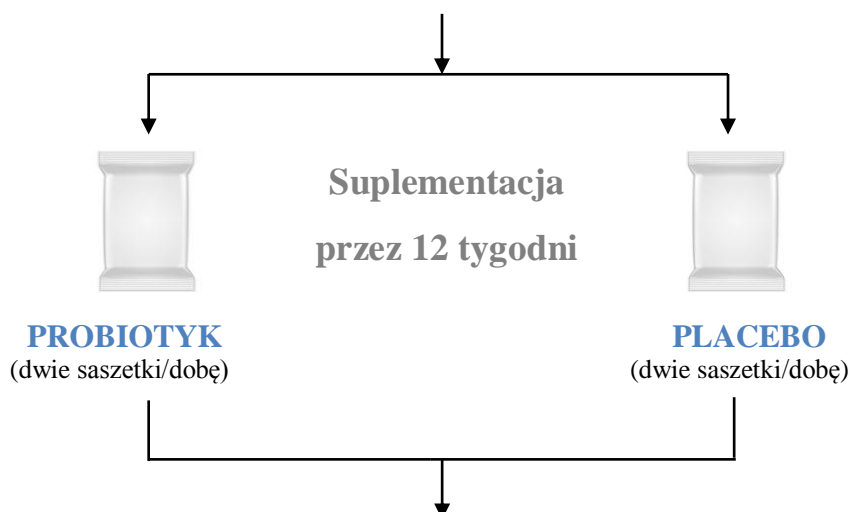
WIZYTA POCZĄTKOWA - KWALIFIKACJA DO BADANIA

- ✓ Świadoma, pisemna zgoda
 - ✓ Kryteria włączenia i wykluczenia
- Badanie podmiotowe
- Badanie przedmiotowe:
- Pomiar ciśnienia tętniczego
 - Pomiary antropometryczne (masa ciała, wzrost, wskaźnik BMI, obwód talii)

RANDOMIZACJA (podwójnie ślepa próba)

ROZPOCZĘCIE BADANIA

- ✓ Ocena sztywności naczyń
- ✓ Pobranie krwi żyłnej celem oceny stężenia:
 - TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL i TG
 - Glukozy
 - Il-6
 - TNF- α
 - TAS
 - Homocysteiny



WIZYTA KOŃCOWA - ZAKOŃCZENIE BADANIA

- ✓ Ocena sztywności naczyń
- ✓ Pobranie krwi żyłnej celem oceny stężenia:
 - TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL i TG
 - Glukozy
 - Il-6
 - TNF- α
 - TAS
 - Homocysteiny

Rycina 4. Schemat badania prowadzonego w ramach projektu

5.2. *Badania wykonane podczas kwalifikacji do projektu*

5.2.1. Badanie podmiotowe

Z każdą uczestniczką badania zebrano dokładny wywiad dotyczący aktualnych dolegliwości, chorób przewlekłych, alergii, stosowanych używek, leków i suplementów diety. Przeprowadzono sondaż dotyczący nawyków żywieniowych i stosowanej diety. Przeanalizowano dostarczoną przez pacjentki dokumentację medyczną oraz ostatnie wyniki badań biochemicznych.

5.2.2. Badanie przedmiotowe

5.2.2.1. *Pomiary antropometryczne*

Podczas wizyty oceniono następujące parametry antropometryczne:

- Masę ciała – pomiaru dokonano przy użyciu atestowanej, elektronicznej wagi firmy Radwag (*Radom, Polska*) (Rycina 5) z dokładnością pomiaru do 0,1 kg. Badanie przeprowadzono rano na czczo, bez obuwia, w białym.
- Wzrost – pomiaru dokonano przy użyciu wzrostomierza zainstalowanego na wadze elektronicznej firmy Radwag (*Radom, Polska*) z dokładnością do 0,5 cm. Badanie przeprowadzono bez obuwia, w pozycji stojącej.



Rycina 5. Waga elektroniczna firmy Radwag (Radom, Polska) [149]

- Wskaźnik BMI obliczono wg wzoru: $BMI = \text{masa ciała [kg]} / \text{wzrost [m]}^2$. Otyłość rozpoznano, gdy wskaźnik BMI wynosił $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.
- Obwód talii – pomiaru dokonano przy pomocy elastycznej, miękkiej taśmy centymetrowej z dokładnością do 0,5 cm. Obwód talii oceniano w połowie odległości pomiędzy dolnym brzegiem ostatniego, dostępnego w badaniu palpacyjnym żebra, a szczytem grzebienia kości biodrowej.

5.2.2.2. Pomiary ciśnienia tętniczego

Do badania wykorzystano ciśnieniomierz automatyczny naramienny z walidacją Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ang. *European Society of Hypertension*, ESH) firmy Tech-Med (*Model TMA 875B*) (Rycina 6).



Rycina 6. Ciśnieniomierz automatyczny naramienny firmy Tech-Med (model TMA 875) [150]

Przed wykonaniem pomiaru ciśnienia tętniczego pacjentki odpoczywały przez kilka minut w pozycji siedzącej w cichym pomieszczeniu. Dobrano odpowiedniej wielkości mankiet (standardowy: 12 cm szerokości i 35 cm długości, w przypadku węższego lub szerszego obwodu ramienia dobrano odpowiednio mniejszy lub większy mankiet). Mankiet umieszczono na wysokości serca. Pierwszego pomiaru dokonano na obu ramionach. W przypadku różnic w wartościach ciśnienia tętniczego jako wartość referencyjną przyjmowano tą wyższą i kolejne pomiary wykonano na kończynie górnej, na której stwierdzono wyższe wartości ciśnienia tętniczego. Oceny wartości ciśnienia tętniczego dokonano trzykrotnie, co dwie minuty każdy. Na podstawie uzyskanych wartości obliczono średnie ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe. Pomiary wykonano zgodnie z zaleceniami ESH oraz Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ang. *European Society of Cardiology*, ESC).

5.3. Badania wykonane u osób zakwalifikowanych do projektu

5.3.1. Ocena sztywności naczyń tętniczych

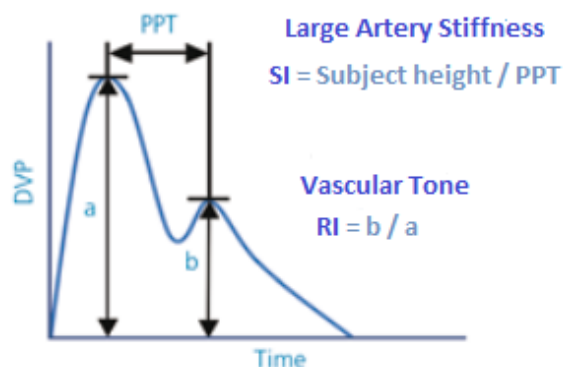
Ocenę sztywności naczyń tętniczych wykonano przy użyciu aparatu Pulse Trace PCA 2 (*Micro Medical, Rochester, UK*) (Rycina 7). Badanie wykonano dwukrotnie – przed rozpoczęciem suplementacji i po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji.



Rycina 7. Aparat Pulse Trace PCA 2 (Micro Medical, Rochester, UK) [151]

Aparat Pulse Trace PCA 2 to przenośne urządzenie, które pozwala w sposób nieinwazyjny ocenić cyfrową objętość tętna (ang. *digital volume pulse*, DVP) z wykorzystaniem przetwornika fotopletyzmo graficznego zakładanego na dystalną część palca. Czujnik ten dokonuje pomiaru światła transmitowanego przez tkanki i analizuje stopień jego absorpcji przez hem zawarty w hemoglobinie krwi, która przepływa przez opuszkę palca, na którym umieszczony jest czujnik. Kształt krzywej DVP zależy od sztywności dużych naczyń krwionośnych oraz napięcia małych tętnic mięśniowych. Na objętość fali tętna składają się dwa elementy: komponenta skurczowa, która jest rezultatem przenoszenia ciśnienia od tętnicy głównej do naczyń w obrębie palców ręki oraz składowa rozkurczowa, która jest utworzona przez odbitą falę powstającą w dolnej części ciała, która przemieszcza się z powrotem do aorty, a następnie wzdłuż ramienia do palca tworząc drugą część krzywej DVP.

W oparciu o wykres fali tętna można obliczyć wskaźnik SI oraz wskaźnik odbicia (ang. *reflection index*, RI). Wskaźnik RI wyrażony w procentach, jest zdefiniowany jako wysokość szczytu fali odbitej (drugi pik) podzielona przez wysokość szczytu fali padającej (pierwszy pik). Jego wartość określa napięcie małych naczyń tętniczych i używany jest do oceny funkcji śródbłonna naczyniowego. Natomiast wskaźnik SI, wyrażony w m/s, jest ilorazem wzrostu (ang. *subject height*) i parametru PPT (ang. *peak-to-peak time*), czyli różnicy czasu pomiędzy szczytem fali skurczowej, a szczytem fali rozkurczowej. Zakres normy SI dla pacjentów w średnim wieku mieści się w granicy 5 – 8 m/s, a dla osób po 60 r.ż. między 6 – 10 m/s. Wysokie wartości parametrów SI i RI oraz niska wartość PPT świadczą o znacznej sztywności naczyń tętniczych (Rycina 8). Wyznaczenie wskaźnika SI jest uznaną w piśmiennictwie metodą, która pomaga ocenić ryzyko sercowo-naczyniowe [152,153].



Rycina 8. Krzywa cyfrowej objętości tętna (DVP) [154]

Każda z uczestniczek projektu została odpowiednio przygotowana do oceny sztywności naczyń tętniczych. Zalecono, aby przez okres 24 godzin poprzedzających badanie uczestniczki unikały napojów zawierających kofeinę oraz intensywnych wysiłków fizycznych, a także nie stosowały ciemnych lakierów do paznokci. W celu uniknięcia przemieszczenia się artefaktów w trakcie obsługi aparatu urządzenie zlokalizowano tuż obok pacjentki, na oddzielnym stole. Badanie wykonano w pozycji leżącej, po wcześniejszym odpoczynku trwającym co najmniej 15 minut. Czujnik zakładano na palec wskazujący, dłonie uczestniczki badanej były ciepłe, ułożone swobodnie wzdłuż ciała. Pomiaru dokonano, gdy zapis na ekranie był regularny i wypełniał 2/3 wyświetlacza. Badanie wykonywano trzykrotnie w odstępach 30 – 45 sekundowych, a następnie uzyskiwano wynik ostateczny, który był wartością średnią z dokonanych wcześniej pomiarów.

5.3.2. Badania biochemiczne

Od każdej uczestniczki na początku badania i po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji pobrano 15 ml krwi żyłnej. Badanie wykonano rano, na czczo, co najmniej 12 godzin od ostatniego posiłku. Krew została odwirowana, a uzyskaną surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania analiz. W zabezpieczonych próbkach krwi oznaczono następujące parametry biochemiczne:

- TNF- α

Stężenia TNF- α oznaczono w próbkach surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Do badania użyto zestaw odczynników EIA-4641, TNF- α ELISA Kit (*DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany*). Oznaczenia wykonano ściśle według instrukcji producenta. Czulość testu wynosiła 0,7 ng/l.

- Il-6

Il-6 oznaczono w próbkach surowicy krwi metodą ELISA. Do tego celu użyto zestawu EIA-4640, INTERLEUKIN 6 Human ELISA Kit (*DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany*). Oznaczenia wykonano ściśle według instrukcji producenta. Czulość testu wynosiła 2,0 pg/ml.

- TAS

TAS w próbkach surowicy krwi oznaczono metodą kalorymetryczną. Do tego celu użyto zestawu NX2332 TAS Randox Kit (*Randox Laboratories, Ltd, Crumlin, UK*) oraz spektrofotometru (SPECORD M40; *Carl Zeiss Jena, Germany*). Oznaczenia wykonano ściśle według instrukcji producenta. Czulość testu wynosiła 0,21 mmol/l.

- Homocysteina

Stężenie homocysteiny oznaczono w próbkach surowicy krwi metodą ELISA. Do tego celu użyto zestawu FHCY100, Axis®Homocysteine EIA (*Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK*). Oznaczenia wykonano ściśle według instrukcji producentów. Czulość testu wynosiła 1,0 μ mol/l.

- Profil lipidowy oraz stężenie glukozy

Stężenie TCH, cholesterolu frakcji HDL, TG i glukozy na czczo oznaczono za pomocą zintegrowanego systemu chemii klinicznej i immunochemii Dimension® (ang. *Dimension* ®)

EXL™ with LM Integrated Chemistry System) firmy Siemens, Newark, NJ, USA. Stężenie cholesterolu frakcji LDL wyliczono ze wzoru Friedewalda:

$$\text{Cholesterol LDL (mg/dl)} = \text{TCH (mg/dl)} - \text{HDL (mg/dl)} - \text{TG (mg/dl)}/5$$

Wzór ten był wykorzystywany, gdy wartość TG wynosiła <400 mg/dl

Wartości referencyjne:

- TCH 115 – 190 mg/dl
- Cholesterol LDL <70 mg/dl (bardzo duże ryzyko sercowo-naczyniowe)
<100 mg/dl (duże ryzyko sercowo-naczyniowe)
<115 mg/dl (umiarkowane ryzyko sercowo-naczyniowe)
- Cholesterol HDL >45 mg/dl (dla kobiet)
- TG <150 mg/dl

Wartości referencyjne:

- Glukoza 70 – 99 mg/dl

5.4. Charakterystyka stosowanego suplementu

Preparat probiotyków wielogatunkowych i placebo, zastosowane w projekcie badawczym, zostały przygotowane przez firmę Winclove – preparat Ecologic® BARRIER (Rycina 9). Probiotyk zawierał następujące szczepy bakterii [155]:

- *Bifidobacterium bifidum* W23,
- *Bifidobacterium lactis* W52,
- *Lactobacillus acidophilus* W37,
- *Lactobacillus brevis* W63,
- *Lactobacillus casei* W56,
- *Lactobacillus salivarius* W24,
- *Lactococcus lactis* W19,
- *Lactococcus lactis* W58.

Bakterie probiotyczne, w ilości $2,5 \times 10^9$ CFU/g, zawieszono w materiale nośnym – skrobi kukurydzianej i maltodekstrynie. Placebo nie różniło się od probiotyków kolorem, smakiem ani zapachem, lecz nie zawierało bakterii probiotycznych. Każda uczestniczka badania otrzymała suplementowany preparat, dokładne instrukcje dotyczące jego spożywania oraz przygotowania. Pacjentki nie wiedziały, czy przyjmują probiotyk, czy placebo. W trakcie trwania projektu pacjentki suplementowały dwie saszetki proszku dziennie: jedną rano, drugą wieczorem przez sen – łącznie 4 g/dobę. Proszek należało rozpuścić w wodzie o temperaturze pokojowej, pozostawić na jedną minutę i przez spożyciem wymieszać. Preparat należało przyjmować na czczo – rano przed jedzeniem, wieczorem co najmniej dwie godziny po posiłku, a następnie po jego przyjęciu nie zalecano spożywania pokarmów.



Rycina 9. Stosowany suplement [156]

6. KRYTYKA METODY

Istotnym elementem niniejszej pracy, który może zostać poddany krytyce jest liczebność badanej populacji. Z uwagi na liczne kryteria wykluczenia, które miały na celu uzyskanie jak najbardziej homogennej populacji, wstępnej rekrutacji poddano 123 pacjentki, jednak tylko 54 z nich spełniły warunki i zostały zaproszone do udziału w badaniu. Ponadto, z uwagi na zaplanowany schemat badania i konieczność wizyty w Klinice na początku badania oraz ponownie po 12 tygodniach, trzy uczestniczki badania zrezygnowały po wstępnej rekrutacji, a jedna pacjentka zrezygnowała z uwagi na planowany wyjazd poza granice kraju i brak możliwości stawienia się na wizytę kontrolną po zakończeniu projektu. Dodatkowym czynnikiem, który utrudnił pozyskanie ochotniczek była konieczność zakwalifikowania części pacjentek do grupy kontrolnej – otrzymującej placebo. Ostatecznie wzięło w nim udział 50 pacjentek: 25 uczestniczek suplementowało preparat probiotyczny, 25 osób przyjmowało placebo. Skrupulatny etap kwalifikacji pacjentek do badania i udzielenie szczegółowych informacji o czynnikach, które mogą rzutować na uzyskane wyniki, schemacie projektu, planowanych badaniach, konieczności przestrzegania zaleceń pozwolił jednak wyłonić grupę pacjentek, które ukończyły badanie po 12 tygodniach suplementacji. W celu uzyskania jak najbardziej homogennej grupy do badania włączono wyłącznie kobiety, starannie dobrane pod względem wieku (od 45 do 65 r.ż.), które nie stosowały hormonalnej terapii zastępczej. W celu zminimalizowania negatywnego wpływu na wiarygodność wyników wykluczono z udziału w badaniu pacjentki z następującymi chorobami przewlekłymi: wtórną postacią otyłości; z chorobami przewodu pokarmowego; cukrzycą; przewlekłą chorobą nerek ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$); z istotnie klinicznym zaburzeniem funkcji wątroby; dyslipidemią lub nadciśnieniem tętniczym, które wymagały wdrożenia leczenia farmakologicznego ciągu ostatnich 3 miesięcy przed rozpoczęciem obserwacji lub w trakcie obserwacji. Pomimo obszernych i szczegółowych informacji udzielanych pacjentkom na początku badania wymienione czynniki, takie jak dieta, stopień aktywności fizycznej, leki stosowane przez pacjentki lub przyjmowanie dodatkowych preparatów podczas trwania projektu mogły niewątpliwie wpłynąć na uzyskane wyniki badań. Na podstawie szczegółowego wywiadu oraz badania przedmiotowego starano się również wyłączyć z badania pacjentki z ostrym lub przewlekłym procesem zapalnym, które mogły rzutować na wartość oznaczanych parametrów – aczkolwiek nie można z całą pewnością wykluczyć ich obecności.

Flora jelitowa przewodu pokarmowego jest bardzo dynamicznym ekosystemem. Pomimo, iż profil mikroflory jest indywidualny dla każdego z nas, może on ulec znacznej modyfikacji przez czynniki związane z naszym stylem życia. W związku z powyższym nie kwalifikowano do badania pacjentek, które palą papierosy lub nadużywają alkoholu. Kluczową rolę w modyfikacji składu flory jelitowej odgrywa stosowana dieta. Z każdą uczestniczką badania, podczas wizyty wstępnej, przeprowadzono sondaż dotyczący nawyków żywieniowych oraz stosowanej diety. Panie, które zgodziły się na udział w badaniu poinformowano o konieczności utrzymania dotychczasowych zachowań żywieniowych. Wykluczono Panie, które brały udział w innych badaniach mających wpływ na zmianę masy ciała lub stosowały leki, diety, które wpływały na masę ciała, a także ochotniczki stosujące dietę wegetariańską. W celu pozyskania homogenicznej grupy wykluczono uczestniczki, które spożywały produkty wzbogacone w prebiotyki i probiotyki oraz produkty z wysoką zawartością błonnika pokarmowego lub dużych ilości żywności fermentowanej (>400 g/dobę). Ważnym czynnikiem, który może wpłynąć na profil mikroflory jest antybiotykoterapia. Z badania wykluczono pacjentki, które stosowały antybiotyki w ciągu ostatniego miesiąca poprzedzającego rozpoczęcie badania. Zalecono uczestniczkom, aby w trakcie trwania projektu nie stosowały dodatkowych suplementów diety oraz antybiotyków – a jeśli będzie kliniczne wskazanie do antybiotykoterapii (np. z powodu infekcji) lub zmiany dotychczasowego leczenia przewlekłego poinformowanie osoby prowadzącej badanie.

Elementem niniejszej pracy, który może zostać poddany krytyce to czas trwania badania. W oparciu o dotychczasowe dane z piśmiennictwa –12-tygodniowa suplementacja wydaje się jednak być optymalnym czasem do zaobserwowania potencjalnych efektów. Jakkolwiek wydłużenie czasu suplementacji pozwoliłoby uzyskać bardziej obiektywne wyniki.

Należy również pamiętać, że efekty kliniczne suplementacji zależą od ilości bakterii wchodzących w skład stosowanego preparatu. Według danych z piśmiennictwa minimalna dzienna dawka powinna wynosić od 10^6 – 10^9 CFU [130]. W niniejszym badaniu zastosowano preparat, który zawierał bakterie probiotyczne w ilości $2,5 \times 10^9$ CFU/g. Ocena funkcji śródbłonka naczyniowego, w niniejszym projekcie, dokonano poprzez oznaczenie parametrów biochemicznych, tj. IL-6, TNF- α , homocysteiny oraz TAS, a także za pomocą metod fizycznych. Oznaczenie większej ilości markerów biochemicznych dysfunkcji śródbłonka naczyniowego z pewnością umożliwiłoby dokładniejszą ocenę wpływu zastosowanego preparatu probiotycznego na stopień jego uszkodzenia. Jako metodę fizyczną wybrano ocenę sztywności naczyń tętniczych za pomocą aparatu Pulse Trace PCA 2 (*Micro*

Medical, Rochester, UK). Według rekomendacji ESH i ESC złotym standardem do pomiaru sztywności naczyń tętniczych jest ocena PWV. W niniejszym projekcie wybrano urządzenie, które pozwala wyznaczyć SI przy wykorzystaniu przetwornika fotopletyzmo graficznego do pomiaru DVP – jest to metoda nieinwazyjna, szeroko wykorzystywana i także uznana w piśmiennictwie do stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego [153].

7. ANALIZA STATYSTYCZNA

Badane parametry przed suplementacją i na końcu badania w grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny oraz w grupie placebo przedstawiono za pomocą wartości średniej i odchylenia standardowego (SD). Zmiany wartości badanych parametrów wywołane suplementacją preparatu probiotycznego lub placebo przedstawiono w postaci wartości delta (Δ). Wskaźnik ten obliczono w oparciu o różnicę wartości badanych parametrów przed i po zakończeniu suplementacji. Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka.

Analizę porównawczą parametrów pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny i grupą placebo, które wykazały zgodność z rozkładem normalnym wykonano za pomocą testu t-Studenta. Dla zmiennych niepowiązanych, które nie wykazały zgodności z rozkładem normalnym, wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitney'a. Porównanie wyników przed suplementacją, z wynikami uzyskanymi po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji w obu grupach badanych wykonano za pomocą testu Wilcoxon, gdy parametry nie wykazywały zgodności z rozkładem normalnym oraz za pomocą testu t-Studenta, gdy taką zgodność wykazano.

Ocenę korelacji parametrów (Δ) w grupie pacjentów suplementujących preparat probiotyczny dla zmiennych, które nie wykazują zgodności z rozkładem normalnym wykonano za pomocą testu korelacji Spearmana. Dla zmiennych zgodnych z rozkładem normalnym stosowano test liniowej korelacji Pearsona.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica 13.1 (*StatSoft® Polska*). Wyniki uznano za istotne przy wartości $p < 0,05$.

8. WYNIKI

Analizie statystycznej poddano wyniki uzyskane podczas badania 50 osobowej grupy otyłych kobiet: 25 uczestniczek przyjmowało preparat probiotyczny, 25 uczestniczek placebo.

8.1. *Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej u otyłych kobiet*

Po 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym stwierdzono istotny statystycznie spadek stężenia TCH, cholesterolu frakcji LDL oraz TG. Stężenie cholesterolu frakcji HDL było wyższe po zakończeniu interwencji, jednak nie był to wzrost znamieny statystycznie (Tabela 7). Stężenie TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL i TG na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 8).

Tabela 7. Porównanie parametrów profilu lipidowego w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TCH (mg/dl)	25	218,56 ± 32,75	25	202,56 ± 30,76	0,0019
HDL (mg/dl)	25	52,48 ± 10,70	25	54,68 ± 8,63	NS
LDL (mg/dl)	25	119,40 ± 31,86	25	114,64 ± 37,16	0,0149
TG (mg/dl)	25	165,04 ± 78,15	25	153,40 ± 55,63	0,0140

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; TCH - cholesterol całkowity; HDL - lipoproteiny wysokiej gęstości; LDL - lipoproteiny niskiej gęstości; TG - triglicerydy

Tabela 8. Porównanie parametrów profilu lipidowego w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TCH (mg/dl)	25	203,60 ± 35,21	25	198,08 ± 37,86	NS
HDL (mg/dl)	25	52,32 ± 9,93	25	55,48 ± 10,76	NS
LDL (mg/dl)	25	115,92 ± 33,47	25	113,28 ± 35,25	NS
TG (mg/dl)	25	141,76 ± 62,88	25	135,72 ± 69,01	NS

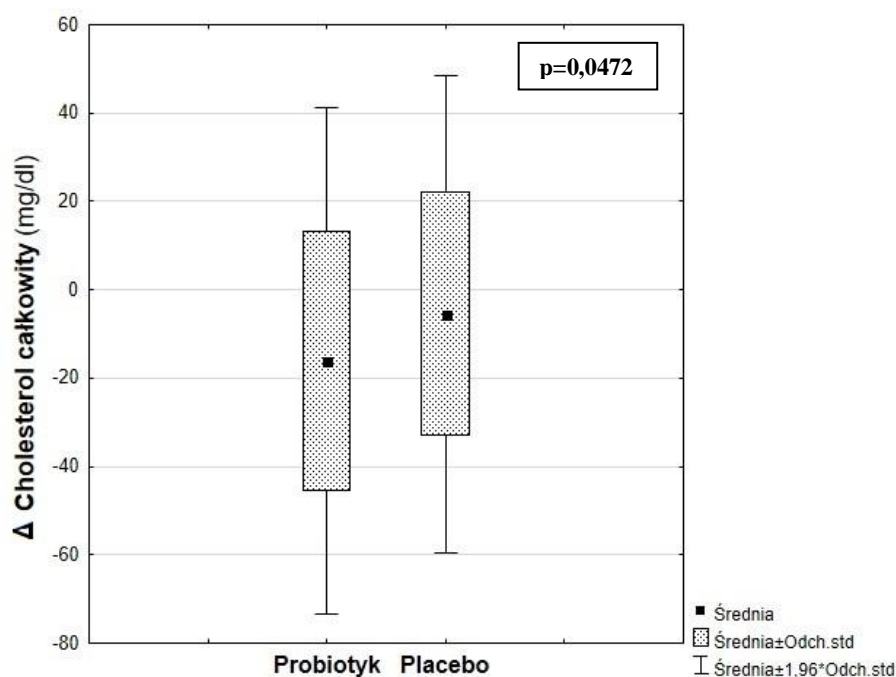
SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; TCH - cholesterol całkowity; HDL - lipoproteiny wysokiej gęstości; LDL - lipoproteiny niskiej gęstości; TG - triglicerydy

Porównując zmiany (Δ) w zakresie badanych parametrów gospodarki lipidowej pomiędzy grupami stwierdzono istotne statystycznie różnice w zakresie zmiany (Δ) stężenia TCH (Tabela 9, Rycina 10).

Tabela 9. Analiza porównawcza parametrów profilu lipidowego pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TCH przed (mg/dl)	25	218,56 ± 32,75	25	203,60 ± 35,21	NS
TCH po (mg/dl)	25	202,56 ± 30,76	25	198,08 ± 37,86	NS
TCH Δ (mg/dl)	25	Wyniki przedstawiono na Rycinie 10			
HDL przed (mg/dl)	25	52,48 ± 10,70	25	52,32 ± 9,93	NS
HDL po (mg/dl)	25	54,68 ± 8,63	25	55,48 ± 10,76	NS
HDL Δ (mg/dl)	25	2,20 ± 7,01	25	3,16 ± 7,70	NS
LDL przed (mg/dl)	25	119,40 ± 31,86	25	115,92 ± 33,47	NS
LDL po (mg/dl)	25	114,64 ± 37,16	25	113,28 ± 35,25	NS
LDL Δ (mg/dl)	25	-4,76 ± 12,21	25	-2,64 ± 14,55	NS
TG przed (mg/dl)	25	165,04 ± 78,15	25	141,76 ± 62,88	NS
TG po (mg/dl)	25	153,40 ± 55,63	25	135,72 ± 69,01	NS
TG Δ (mg/dl)	25	-11,64 ± 39,43	25	-6,04 ± 31,46	NS

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; TCH - cholesterol całkowity; HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości, LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości; TG - triglicerydy; Δ - zmiana



Rycina 10. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia TCH pomiędzy grupami

8.2. *Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na stężenie glukozy u otyłych kobiet*

W grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji zaobserwowano istotnie niższe stężenie glukozy w surowicy krwi w porównaniu do stężenia wyjściowego (Tabela 10). Stężenia glukozy na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 11).

Tabela 10. Porównanie stężenia glukozy w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia \pm SD		Średnia \pm SD	
Glukoza (mg/dl)	25	98,60 \pm 5,97	25	90,79 \pm 8,82	<0,0001

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność

Tabela 11. Porównanie stężenia glukozy w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Głukoza (mg/dl)	25	96,32 ± 14,35	25	94,92 ± 8,24	NS

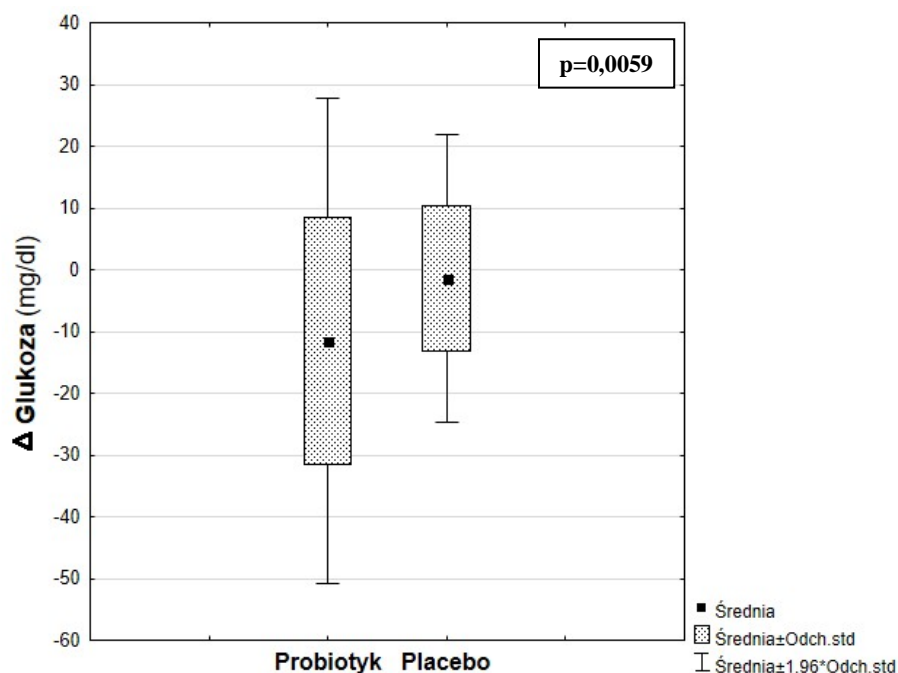
SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie

Analiza porównawcza stężenia glukozy pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed i po interwencji nie wykazała różnic znamienych statystycznie. Stwierdzono istotną statystycznie zmianę (Δ) stężenia glukozy w grupie suplementującej preparat probiotyczny w stosunku do uzyskanej zmiany (Δ) stężenia glukozy w grupie, która otrzymywała placebo (Tabela 12, Rycina 11).

Tabela 12. Analiza porównawcza stężenia glukozy pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Głukoza przed (mg/dl)	25	98,60 ± 5,97	25	96,32 ± 14,35	NS
Głukoza po (mg/dl)	25	90,79 ± 8,82	25	94,92 ± 8,24	NS
Głukoza Δ (mg/dl)	25	wyniki przedstawiono na Rycinie 11			

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; Δ - zmiana



Rycina 11. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia glukozy pomiędzy grupami

8.3. *Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry dysfunkcji śródbłonna naczyniowego u otyłych kobiet*

8.3.1. Markery stanu zapalnego (IL-6, TNF- α)

W grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji zaobserwowano istotnie niższe stężenie TNF- α w porównaniu do stężenia TNF- α na początku badania. Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu IL-6 po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji preparatu probiotycznego (Tabela 13). Stężenie IL-6 oraz TNF- α na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 14).

Tabela 13. Porównanie parametrów stanu zapalnego w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Il-6 (pg/ml)	25	450,21 ± 51,49	25	441,12 ± 59,07	NS
TNF-α (ng/l)	25	1,04 ± 0,34	25	0,85 ± 0,23	0,0001

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; Il-6 - interleukina 6; TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α

Tabela 14. Porównanie parametrów stanu zapalnego w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Il-6 (pg/ml)	25	446,69 ± 56,20	25	445,78 ± 55,39	NS
TNF-α (ng/l)	25	1,05 ± 0,34	25	1,04 ± 0,31	NS

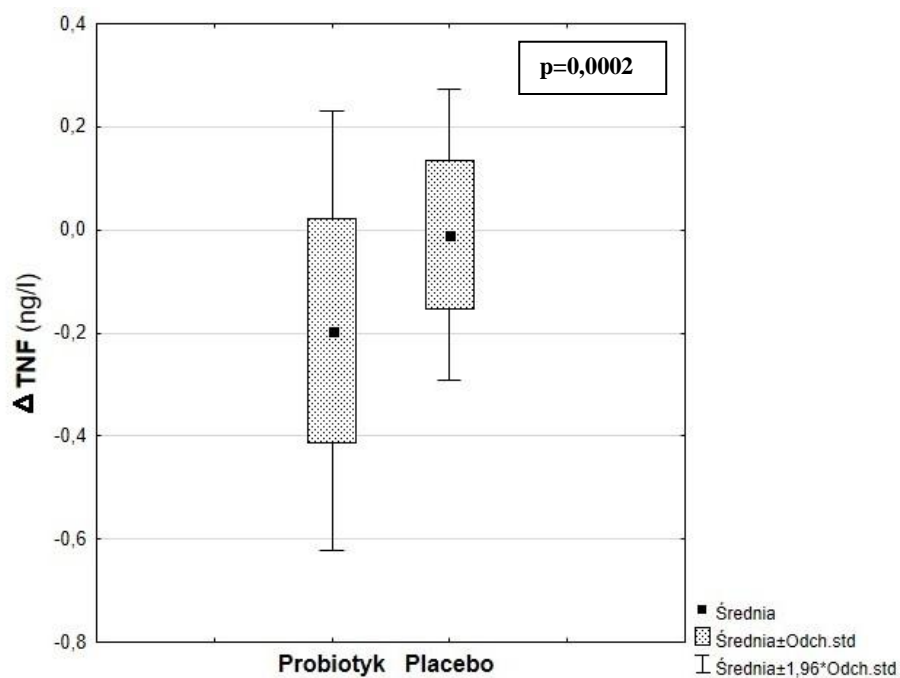
SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; Il-6 - interleukina 6; TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α

Analiza porównawcza stężenia Il-6 pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed i po interwencji nie wykazała różnic znamienych statystycznie. Analiza porównawcza stężenia TNF-α pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed zastosowaną interwencją nie wykazała różnic istotnych statystycznie, natomiast analiza porównawcza pomiędzy grupami po zakończeniu interwencji osiągnęła istotność statystyczną. Istotna statystycznie była również uzyskana zmiana (Δ) stężenia TNF-α w grupie suplementującej preparat probiotyczny w stosunku do zmiany (Δ) stężenia TNF-α w grupie, która otrzymywała placebo (Tabela 15, Rycina 12).

Tabela 15. Analiza porównawcza stężenia parametrów stanu zapalnego pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Il-6 przed (pg/ml)	25	450,21 ± 51,49	25	446,69 ± 56,20	NS
Il-6 po (pg/ml)	25	441,12 ± 59,07	25	445,78 ± 55,39	NS
Il-6 Δ (pg/ml)	25	-9,09 ± 29,88	25	-0,91 ± 8,37	NS
TNF-α przed (ng/l)	25	1,04 ± 0,34	25	1,05 ± 0,34	NS
TNF-α po (ng/l)	25	0,85 ± 0,23	25	1,04 ± 0,31	0,0070
TNF-α Δ (ng/l)	25	wyniki przedstawiono na Rycinie 12			

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; Il-6 - interleukina 6; TNF-α - czynnik martwicy nowotworów α; Δ-zmiana



Rycina 12. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia TNF-α pomiędzy grupami

8.3.2. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS)

W grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny po 12 tygodniach suplementacji stwierdzono istotny wzrost poziomu TAS w porównaniu do poziomu TAS na początku badania (Tabela 16). Poziomy TAS na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 17).

Tabela 16. Porównanie poziomu TAS w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TAS (mmol/l)	25	1,65 ± 0,20	25	1,76 ± 0,14	0,0076

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza

Tabela 17. Porównanie poziomu TAS w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TAS (mmol/l)	25	1,65 ± 0,20	25	1,64 ± 0,12	NS

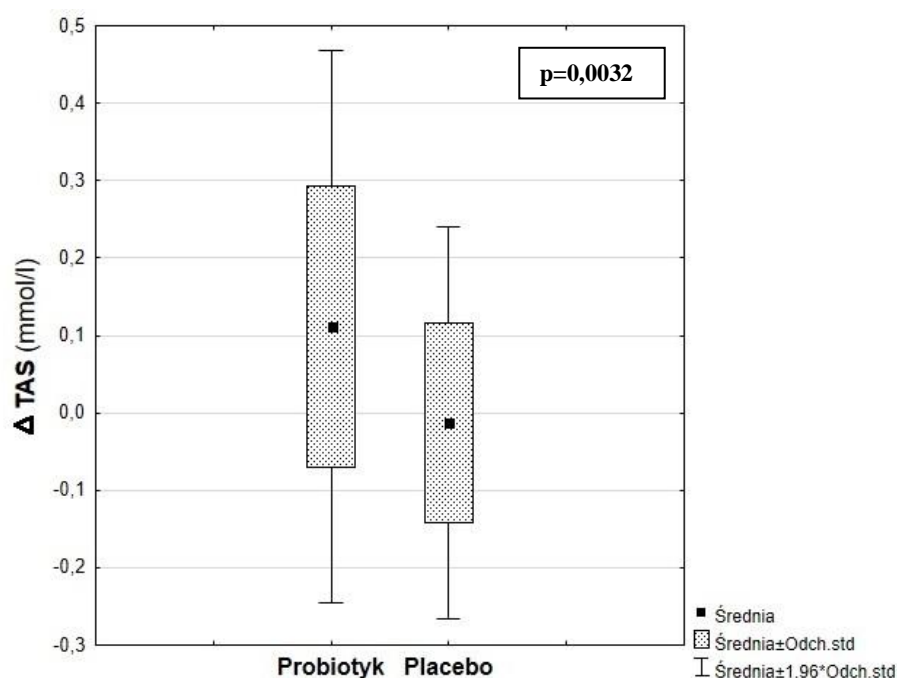
SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza

Analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed zastosowaną interwencją nie wykazała istotnych różnic, natomiast analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupami po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji osiągnęła istotność statystyczną. Istotna statystycznie była również uzyskana zmiana (Δ) poziomu TAS w grupie suplementującej preparat probiotyczny w stosunku do zmiany (Δ) poziomu TAS w grupie, która otrzymywała placebo (Tabela 18, Rycina 13).

Tabela 18. Analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
TAS przed (mmol/l)	25	1,65 ± 0,20	25	1,65 ± 0,20	NS
TAS po (mmol/l)	25	1,76 ± 0,14	25	1,64 ± 0,12	0,0017
TAS Δ (mmol/l)	25	wyniki przedstawiono na Rycinie 13			

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS -wartość nieistotna statystycznie; TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza; Δ- zmiana



Rycina 13. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) poziomu TAS pomiędzy grupami

8.3.3. Homocysteina

W grupie pacjentek otrzymujących preparat probiotyczny stwierdzono istotny statystycznie spadek stężenia homocysteiny po okresie 12-tygodniowej suplementacji (Tabela 19). Stężenie homocysteiny na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 20).

Tabela 19. Porównanie stężenia homocysteiny w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Homocysteina (μmol/l)	25	11,32 ± 2,23	25	10,11 ± 1,57	<0,0001

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie

Tabela 20. Porównanie stężenia homocysteiny w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Homocysteina (μmol/l)	25	11,63 ± 2,08	25	11,13 ± 2,13	NS

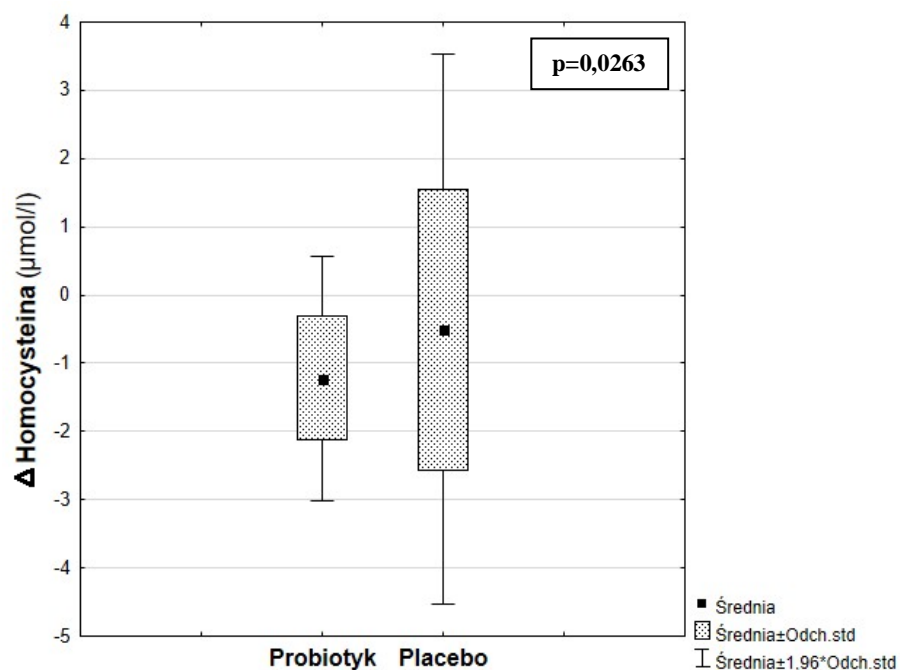
SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie

Analiza porównawcza stężenia homocysteiny pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed i po zastosowanej interwencji nie wykazała istotnych różnic. Wykazano istotną statystycznie zmianę (Δ) stężenia homocysteiny w trakcie 12-tygodniowej suplementacji preparatu probiotycznego w stosunku do zmiany (Δ) stężenia homocysteiny w grupie, która otrzymywała placebo (Tabela 21, Rycina 14).

Tabela 21. Analiza porównawcza stężenia homocysteiny pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
Homocysteina przed (μmol/l)	25	11,32 ± 2,23	25	11,63 ± 2,08	NS
Homocysteina po (μmol/l)	25	10,11 ± 1,57	25	11,13 ± 2,13	NS
Homocysteina Δ (μmol/l)	25	wyniki przedstawiono na Rycinie 14			

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; Δ - zmiana



Rycina 14. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia homocysteiny pomiędzy grupami

8.3.4. Wskaźnik sztywności naczyń tętniczych (SI)

W grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny stwierdzono istotny spadek wartości wskaźnika SI po okresie 12-tygodniowej suplementacji (Tabela 22). Wskaźnik SI na początku i na końcu interwencji w grupie otrzymującej placebo nie różnił się istotnie statystycznie (Tabela 23).

Tabela 22. Porównanie wartości wskaźnika SI w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK przed	N	PROBIOTYK po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
SI (m/s)	25	7,22 ± 0,89	25	7,06 ± 0,81	0,0214

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS -wartość nieistotna statystycznie; SI - wskaźnik sztywności naczyń tętniczych

Tabela 23. Porównanie wartości wskaźnika SI w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji

BADANY PARAMETR	N	PLACEBO przed	N	PLACEBO po	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
SI (m/s)	25	7,24 ± 0,91	25	7,23 ± 0,93	NS

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; SI - wskaźnik sztywności naczyń tętniczych

Analiza porównawcza wartości wskaźnika SI pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo przed i po interwencji nie wykazała zmian istotnych statystycznie (Tabela 24).

Tabela 24. Analiza porównawcza wskaźnika SI pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo

BADANY PARAMETR	N	PROBIOTYK	N	PLACEBO	P
		Średnia ± SD		Średnia ± SD	
SI przed (m/s)	25	7,22 ± 0,89	25	7,24 ± 0,91	NS
SI po (m/s)	25	7,06 ± 0,81	25	7,23 ± 0,93	NS
SI Δ (m/s)	25	-0,16 ± 0,21	25	-0,01 ± 0,65	NS

SD - odchylenie standardowe; N - liczebność; NS - wartość nieistotna statystycznie; SI - wskaźnik sztywności naczyń tętniczych; Δ-zmiana

8.4. Analiza korelacyjna

Analizę korelacyjną przeprowadzono w grupie suplementującej preparat probiotyczny i dotyczyła ona oceny zależności pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL i TG, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia II-6, TNF-α i TAS. Przeprowadzona analiza nie wykazała korelacji istotnych statystycznie (Tabela 25).

Tabela 25. Analiza korelacyjna w grupie badanej pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji HDL, LDL i TG, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia Il-6, TNF- α i TAS

	DELTA (Δ)					
	Il-6 (pg/ml)		TNF- α (ng/l)		TAS (mmol/l)	
	R	P	R	P	R	P
TCH (mg/dl)	0,040	NS	-0,247	NS	0,092	NS
HDL (mg/dl)	-0,137	NS	0,351	NS	-0,027	NS
LDL (mg/dl)	0,160	NS	-0,292	NS	-0,080	NS
TG (mg/dl)	0,211	NS	-0,096	NS	0,094	NS

TCH - cholesterol całkowity; HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości; LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości; TG - triglicerydy; Il-6 interleukina 6; TNF- α czynnik martwicy nowotworów α ; TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza; R- współczynnik korelacji; NS -nieistotna statystycznie; Δ -zmiana

Analiza korelacyjna w grupie badanej nie wykazała także istotnych statystycznie zależności pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) wskaźnika SI, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL, TG, Il-6, TNF- α , homocysteiny oraz TAS po zastosowaniu 12-tygodniowej interwencji (Tabela 26).

Tabela 26. Analiza korelacyjna w grupie badanej pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) wskaźnika SI, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji HDL, LDL, TG, Il-6, TNF- α , TAS oraz homocysteiny

	DELTA (Δ)	
	SI (m/s)	
	R	P
TCH (mg/dl)	0,099	NS
HDL (mg/dl)	-0,312	NS
LDL (mg/dl)	-0,189	NS
TG (mg/dl)	0,176	NS
Il-6 (pg/ml)	0,193	NS
TNF-α (ng/l)	-0,249	NS
TAS (mmol/l)	0,172	NS
Homocysteina (μ mol/l)	-0,120	NS

TCH - cholesterol całkowity; HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości; LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości; TG - triglicerydy; Il-6 interleukina 6; TNF- α czynnik martwicy nowotworów; TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza; SI - wskaźnik sztywności naczyń, R- współczynnik korelacji; NS- nieistotna statystycznie; Δ -zmiana

9. DYSKUSJA

9.1. *Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej u otyłych kobiet*

W niniejszej pracy wykazano, że 12-tygodniowa suplementacja preparatem probiotycznym w grupie otyłych kobiet przyczyniła się do istotnego obniżenia stężenia TCH, cholesterolu frakcji LDL oraz TG w stosunku do parametrów wyjściowych. Ponadto wykazano, że uzyskana zmiana (Δ) stężenia TCH w grupie otrzymującej preparat probiotyczny była istotna, w stosunku zmiany (Δ) stężenia TCH w grupie otrzymującej placebo.

Podobne wyniki uzyskał Tofighiyan i wsp. Autorzy przeprowadzili randomizowane badanie kliniczne z podwójnie ślepą próbą, w którym ocenili wpływ suplementacji preparatu probiotycznego na poziom profilu lipidowego w surowicy krwi pacjentów z cukrzycą typu 2. Przez okres 8 tygodni suplementowano preparat probiotyczny, który zawierał bakterie *Lactobacillus coagulans* oraz fruktooligosacharydy. Analizie podano próbki pozyskane od 44 pacjentów, 22 z nich suplementowało preparat probiotyczny, pozostali placebo. Wykazano, że w obrębie grupy suplementującej przez 8 tygodni probiotyk uzyskano znaczącą redukcję stężenia TCH, cholesterolu frakcji LDL i zwiększenie stężenia cholesterolu frakcji HDL, natomiast nie zaobserwowano istotnych zmian po zakończeniu suplementacji w grupie otrzymującej placebo. Analiza porównawcza pomiędzy grupą suplementującą probiotyk, a grupą placebo wykazała, że obserwowana zmiana stężenia cholesterolu frakcji LDL i HDL pomiędzy grupami nie była znacząca statystycznie, natomiast zmiana stężenia TCH po zakończeniu projektu osiągnęła istotność statystyczną [157].

Ejtahed i wsp. wykazali, że spożywanie przez okres 6 tygodni 300 g dziennie jogurtu zawierającego szczepy bakterii probiotycznych: *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* skutkowało istotnym obniżeniem stężenia TCH o 4,54% oraz cholesterolu frakcji LDL o 7,45%, w porównaniu do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej (współczynnik p wyniósł odpowiednio $p=0,008$ i $p=0,004$). Stężenie TG i cholesterolu frakcji HDL na początku i na końcu badania w grupie interwencyjnej nie różniły się istotnie. Na podstawie

przeprowadzonego badania Ejtahed i wsp. podsumowali, że spożywanie jogurtu wzbogaconego o bakterie probiotyczne może zmniejszyć stężenie TCH oraz cholesterolu frakcji LDL u pacjentów z cukrzycą typu 2, co skutkuje redukcją ryzyka sercowo-naczyniowego [158].

Korzystne efekty suplementacji bakterii probiotycznych na profil lipidowy wykazał również Rajkumar i wsp. Do badania zrekrutowano kobiety oraz mężczyzn z nadwagą (BMI>25 kg/m²) w wieku od 40 do 60 lat. Grupa 15 osobowa suplementowała preparat probiotyczny zawierający następujące szczepy bakterii w ilości 112,5x10⁹ CFU/kaps.: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* i szczep *Streptococcus salivarius spp. thermophilus*. Grupa placebo (n=15) stosowała kapsułki zawierające 40 mg celulozy. Po 6 tygodniach interwencji wykazano, że w grupie pacjentów przyjmujących preparat probiotyczny uzyskano znamienne wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL o 18,5% oraz istotną redukcję stężenia cholesterolu frakcji LDL o 7,04%, TG o 5,8% i cholesterolu frakcji VLDL o 12,98% [159].

Nie wszyscy badacze wykazali korzystny wpływ suplementacji preparatów probiotycznych na profil lipidowy. Greany i wsp. zrekrutowali do badania zdrowych ochotników, obu płci, w wieku od 18 do 36 lat. Badanie trwało 2 miesiące – w przypadku mężczyzn i dwa cykle owulacyjne – w przypadku kobiet. Kapsułka suplementowanego probiotyku zawierała szczepy bakterii: *Lactobacillus acidophilus* DDS1, *Bifidobacterium longum* UABL14, każdy szczep w ilości 1,25x10⁹ CFU oraz prebiotyk fruktooligosacharydy. Stężenie TCH, cholesterolu frakcji LDL, HDL i TG nie uległo zmianie w wyniku spożycia preparatu probiotycznego, ani kapsułek placebo, nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami po zakończeniu interwencji [160].

Korzystnych efektów nie wykazał także Ivey i wsp. Celem przeprowadzonego badania była ocena wpływu szczepów bakterii *Lactobacillus acidophilus* La5 i *Bifidobacterium animalis spp. lactis* Bb12 na profil lipidowy oraz wartości ciśnienia tętniczego u pacjentów z nadwagą powyżej 55 r.ż. Uczestników zakwalifikowano do czterech grup: pierwsza grupa (n=40) otrzymywała jogurt probiotyczny i kapsułkę zawierającą szczepy bakterii probiotycznych, druga (n=37) spożywała jogurt probiotyczny i kapsułkę placebo, trzecia (n=39) mleko i kapsułkę z bakteriami probiotycznymi, natomiast czwarta grupa (n=40) spożywała mleko i kapsułkę placebo. Zarówno jogurt probiotyczny i kapsułka z bakteriami probiotycznymi zawierały bakterie: *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium animalis spp. lactis* Bb12 w ilości 3,0x10⁹CFU. Po 6 tygodniach interwencji spożywanie jogurtu

probiotycznego nie wpłynęło istotnie statystycznie na parametry profilu lipidowego ($p>0,05$) oraz wartości ciśnienia tętniczego ($p>0,05$) w porównaniu do grupy, która spożywała mleko. Podobnie, suplementacja kapsułek z probiotykami nie wpłynęła istotnie na wartości profilu lipidowego i wartości ciśnienia tętniczego w stosunku do grupy, która spożywała kapsułki placebo [161].

W wielu pracach badawczych oceniono wpływ suplementacji probiotyków na gospodarkę lipidową krwi. Badania te wykazały, że spożywanie probiotyków może poprawić profil kardiometaboliczny i w konsekwencji obniżyć ryzyko sercowo-naczyniowe. Postuluje się kilka mechanizmów, za pomocą których mikroflora wpływa na profil lipidowy, są to m.in. udział bakterii: w syntezie i przemianie kwasów żółciowych do wtórnych kwasów żółciowych, redukcja cholesterolu do koprosterolu w przewodzie pokarmowym, a także wykorzystanie cholesterolu i kwasów żółciowych jako elementów budowy własnej błony komórkowej [161]. Pomimo licznych opublikowanych badań wpływ suplementacji bakterii probiotycznych na parametry profilu lipidowego pozostaje jednak nadal niejednoznaczny. Istnieje wiele czynników, które mogą przyczynić się do rozbieżności uzyskanych wyników. Ivey i wsp. na podstawie analizy opublikowanych badań uznali, że efekt hipocholesterolemiczny suplementacji preparatów probiotycznych zależy od stężenia wyjściowego TCH. Jest on widoczny, jeśli początkowe średnie stężenie TCH wynosi powyżej 5,7 mmol/l, natomiast gdy jest ono niższe niż 5,4 mmol/l korzystnych efektów hipocholesterolemicznych nie obserwowano [161]. W niniejszym projekcie średnie stężenie wyjściowe TCH w grupie suplementującej preparat probiotyczny wynosiło 218,56 mg/dl (5,65 mmol/l). Efekt końcowy zastosowanej suplementacji może również zależeć od czasu trwania interwencji, rodzaju i ilości bakterii wchodzących w skład preparatów probiotycznych. Nie bez znaczenia jest fakt, czy suplementujemy preparat jednoszczepowy, czy wieloszczepowy, ponieważ wzajemne oddziaływanie poszczególnych szczepów bakterii – zarówno synergiczne, jak i antagonistyczne może wpłynąć na końcowe efekty kliniczne. Należy pamiętać, że profil mikroflory przewodu pokarmowego jest indywidualny dla każdego z nas i podlega nieustannej modyfikacji. Stosowana dieta, prowadzony styl życia, choroby przewlekłe, przyjmowane leki modulują skład mikroflory przewodu pokarmowego, a to także może rzutować na ostatecznie uzyskane wyniki.

9.2. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na stężenie glukozy u otyłych kobiet

W niniejszym projekcie, po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji, uzyskano istotny statystycznie spadek stężenia glukozy w surowicy krwi w grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny. Ponadto wykazano, że uzyskana zmiana (Δ) stężenia glukozy w grupie otrzymującej preparat probiotyczny była istotna, w stosunku zmiany (Δ) stężenia glukozy w grupie placebo.

Korzystny wpływ suplementacji bakterii probiotycznych na gospodarkę węglowodanową wykazał Razaei i wsp. Do badania włączono 90 pacjentów z cukrzycą typu 2. Grupa badana ($n=45$) spożywała przez 4 tygodnie 300 g dziennie jogurtu naturalnego, który oprócz bakterii probiotycznych, które naturalnie występują w jogurtach, wzbogacony był o *Lactobacillus acidophilus* La5 i *Bifidobacterium lactis* Bb12. Grupa kontrolna ($n=45$) spożywała 300 g jogurtu naturalnego dziennie bez dodatkowych kultur bakterii. Badanie wykazało, że w grupie otrzymującej jogurt wzbogacony o szczepy bakterii probiotycznych po 4 tygodniach uzyskano znamienne statystycznie obniżenie stężenia glukozy na czczo ($p=0,01$) i stężenia glikowanej hemoglobiny ($p<0,001$). W grupie kontrolnej nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie. Analiza porównawcza wykazała istotną różnicę pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną pod względem średnich stężeń glukozy na czczo ($p=0,004$) oraz glikowanej hemoglobiny ($p=0,01$). Ponadto Razaei i wsp. wykazali, że spożywanie jogurtu wzbogaconego o szczepy bakterii probiotycznych skutkuje istotnym obniżeniem stężenia cholesterolu frakcji LDL ($p=0,04$) i TG ($p=0,02$) w porównaniu do grupy kontrolnej [162].

Korzystne efekty suplementacji preparatów probiotycznych na stężenie glukozy uzyskał również Ahmadi i wsp. Do badania włączono 60 pacjentek z zespołem policystycznych jajników. Przez okres 12 tygodni 30 uczestniczek otrzymywało probiotyk, 30 osób placebo. Preparat probiotyczny zawierał następujące szczepy bakterii: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium bifidum*. Każdy szczep występował w ilości 2×10^9 CFU/g. Zaobserwowano, że przyjmowanie bakterii probiotycznych wiązało się z istotnym obniżeniem stężenia glukozy na czczo ($p=0,02$), insuliny w surowicy krwi ($p=0,01$), a także obniżeniem stężenia TG ($p=0,02$) i cholesterolu frakcji VLDL ($p=0,02$) w porównaniu do grupy otrzymującej placebo [163].

Hipoglikemiczny efekt preparatów probiotycznych może być następstwem obniżenia stresu oksydacyjnego. Ejtahed i wsp. przeprowadzili badanie kliniczne, w którym wykazano, że spożywanie jogurtu probiotycznego poprawia potencjał antyoksydacyjny u pacjentów z cukrzycą typu 2. Analizie statystycznej poddano 60 pacjentów. Grupa badana (n=30) otrzymywała przez 6 tygodni 300 g jogurtu dziennie wzbogaconego o szczepy bakterii: *Lactobacillus acidophilus* La5 oraz *Bifidobacterium lactis* Bb12. Grupa kontrolna (n=30) otrzymywała 300 g jogurtu dziennie bez dodatkowych kultur bakterii probiotycznych. Wykazano, że spożywanie jogurtu probiotycznego znacząco obniża stężenie glukozy na czczo ($p<0,01$), poziom glikowanej hemoglobiny ($p<0,05$), a także zwiększa aktywność SOD, GPx oraz TAS ($p<0,05$), w stosunku do grupy kontrolnej. Autorzy badania uznali, że suplementacja bakterii probiotycznych poprawia parametry stresu oksydacyjnego i w efekcie przyczynia się do poprawy kontroli cukrzycy [164].

Mechanizm, w wyniku którego bakterie probiotyczne mogą wpłynąć korzystnie na parametry gospodarki węglowodanowej to zmniejszenie stanu zapalnego. Przewlekła endotoksemia przyczynia się do nasilenia insulinooporności oraz niewydolności wysp beta trzustki. Poprawa jakości i ilości flory przewodu pokarmowego przez probiotyki uszczelnia barierę jelitową, zmniejsza ryzyko przenikania toksyn bakteryjnych, co skutkuje redukcją poziomu cytokin prozapalnych w surowicy krwi [162,165]. Sepideh i wsp. przeprowadzili randomizowane badanie kliniczne, w którym wykazano korzystny wpływ suplementacji wieloszczepowego preparatu probiotycznego na parametry gospodarki węglowodanowej i parametry stanu zapalnego u pacjentów z NAFLD. Do badania zakwalifikowano 42 uczestników, których przydzielono do dwóch grup: grupy placebo i grupy interwencyjnej, która otrzymała probiotyk. Badanie trwało 8 tygodni. W skład preparatu probiotycznego wchodziły następujące szczepy bakterii: *Lactobacillus casei* (3×10^9 CFU/g), *Lactobacillus acidophilus* (3×10^{10} CFU/g), *Lactobacillus rhamnosus* (7×10^9 CFU/g), *Lactobacillus bulgaricus* (5×10^8 CFU/g), *Bifidobacterium breve* (2×10^{10} CFU/g), *Bifidobacterium longum* (1×10^9 CFU/g) i *Streptococcus thermophilus* (3×10^8 CFU/g). Autorzy badania wykazali, że po 8 tygodniach suplementacji średnie stężenie glukozy na czczo, insuliny, wskaźnik insulinooporności (ang. *homeostasis model assessment insulin resistance*, HOMA-IR) oraz stężenie Il-6 znacząco obniżyły się ($p<0,05$) w grupie otrzymującej probiotyk, w porównaniu do grupy otrzymującej placebo. Zastosowana suplementacja nie wpłynęła jednak na stężenie TNF- α [166].

Nie wszystkie wyniki randomizowanych badań klinicznych dotyczących hipoglikemicznego działania bakterii probiotycznych są obiecujące. Ivey i wsp.

przeprowadzili projekt, którego celem było ustalenie, czy bakterie probiotyczne *Lactobacillus acidophilus* La5 i *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 w ilości $3,0 \times 10^9$ CFU, suplementowane w postaci jogurtu probiotycznego lub kapsułki, mogą wpłynąć korzystnie na parametry kontroli glikemii u kobiet i mężczyzn z nadwagą. Badanie trwało 6 tygodni. Włączono do niego 156 uczestników, którzy zostali przydzieleni do czterech grup: pierwsza z nich otrzymywała jogurt probiotyczny i probiotyczne kapsułki, druga – jogurt probiotyczny i kapsułki placebo, trzecia – mleko i probiotyczne kapsułki oraz czwarta – mleko i kapsułki placebo. Na podstawie przeprowadzonej analizy uzyskanych wyników zaobserwowano, że spożywanie jogurtu probiotycznego przyczyniło się do istotnego zwiększenia wskaźnika HOMA-IR ($p=0,038$) w stosunku do grupy spożywającej mleko, nie zaobserwowano istotnego wpływu na stężenie glukozy, insuliny i glikowanej hemoglobiny. W porównaniu do grupy otrzymującej przez okres 6 tygodni kapsułki placebo, spożywanie w tym okresie kapsułek zawierających bakterie probiotyczne skutkowało istotnym wzrostem stężenia glikemii ($p=0,037$), natomiast nie zaobserwowano wpływu na stężenie insuliny, glikowanej hemoglobiny oraz wskaźnik HOMA-IR ($p>0,05$) [167].

W dostępnym piśmiennictwie możemy odnaleźć liczne dane o korzystnym wpływie preparatów probiotycznych na parametry gospodarki węglowodanowej. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że probiotyki poprawiają metabolizm glukozy, obniżają jej stężenie w surowicy krwi i zmniejszają insulinooporność. Natomiast wyniki randomizowanych badań klinicznych są niejednoznaczne. Niektóre z nich wskazują na znaczące obniżenie glikemii po zastosowanej suplementacji, inne z kolei nie potwierdzają korzystnego wpływu różnych szczepów bakterii probiotycznych na parametry gospodarki węglowodanowej [162,165,168]. Analizując powyższe badania kliniczne można wnioskować, że różnice w uzyskanych wynikach mogą być związane z długością prowadzonej interwencji. Ponadto w omawianych badaniach wykorzystano różne preparaty probiotyczne, które charakteryzowały się nie tylko odmiennym składem, ale również ilością zawartych w nich szczepów bakteryjnych, co także może rzutować na końcowe efekty kliniczne. Podobne wnioski wyciągnęli Zhang i wsp., którzy przeprowadzili meta-analizę 7 opublikowanych randomizowanych badań klinicznych. Ich głównym celem była ocena wpływu suplementowanych preparatów probiotycznych na parametry gospodarki węglowodanowej u pacjentów z rozpoznaną cukrzycą typu 2. Autorzy uznali, że spożywanie preparatów probiotycznych może wpłynąć korzystnie na metabolizm glukozy z potencjalnie większym efektem końcowym, gdy okres suplementacji jest dłuższy niż 8 tygodni lub spożywamy preparaty wielogatunkowe [165]. W niniejszym projekcie badawczym okres suplementacji wynosił 12 tygodni, a stosowany preparat zawierał 8

szczepów bakterii probiotycznych. Prozdrowotne właściwości probiotyku zależą nie tylko od ilości bakterii wchodzących w skład przyjmowanego suplementu, ale także od tego, czy jest to preparat jedno lub wieloszczepowy. Niezbędne są dalsze badania kliniczne, które ustalą skład i ilość bakterii probiotycznych, a także optymalny czas trwania interwencji. Dopiero tak przygotowana suplementacja preparatu probiotycznego przyczyni się skutecznie do poprawy parametrów gospodarki węglowodanowej u pacjentów.

9.3. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na parametry biochemiczne dysfunkcji śródbłonka naczyniowego u otyłych kobiet

Przewlekły proces zapalny, stres oksydacyjny oraz hiperhomocysteinemia to kluczowe czynniki biorące udział w patogenezie dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. Zaburzenia w składzie fizjologicznej mikroflory przewodu pokarmowego prowadzą do nieszczelności bariery jelitowej, a konsekwencją jej uszkodzenia jest przenikanie antygenów oraz toksyn bakteryjnych do światła jelita i rozwój subklinicznego stanu zapalnego. W surowicy krwi możemy wówczas zaobserwować zwiększone stężenie cytokin zapalnych, np: Il-6, TNF- α , wzrastają też parametry stresu oksydacyjnego. Zwiększenie ilości bakterii kwasu mlekowego w świetle przewodu pokarmowego uzyskane za pomocą preparatów probiotycznych ogranicza migrację flory patogennej i zmniejsza toksemię poprzez eliminację bakterii Gram-ujemnych. Uważa się, że bakterie probiotyczne działają przeciwzapalnie nie tylko poprzez modulowanie wydzielania cytokin prozapalnych, ale również poprzez hamowanie aktywacji szlaku sygnałowego jądrowego czynnika transkrypcyjnego κ B (ang. *nuclear factor κ B*, NF- κ B) w makrofagach [169,170].

Przeprowadzona analiza w niniejszym projekcie wykazała, że w grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny po zakończeniu 12-tygodniowej suplementacji zaobserwowano istotnie niższe stężenie TNF- α w stosunku do wartości wyjściowych. Analiza porównawcza stężenia TNF- α pomiędzy grupami po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji wykazała istotność statystyczną. Ponadto wykazano, że uzyskana zmiana (Δ) stężenia TNF- α w grupie suplementującej preparat probiotyczny była istotna, w stosunku do zmiany (Δ) stężenia TNF- α w grupie otrzymującej placebo.

Uważa się, że zdolność modulowania stanu zapalnego zależy od rodzaju i szczepu bakterii wchodzących w skład preparatów probiotycznych. Taki potencjał mogą wykazywać niektóre bakterie kwasu mlekowego [169]. Jafarnejad i wsp. przeprowadzili badanie, którego celem była ocena wpływu suplementacji preparatów probiotycznych na parametry gospodarki węglowodanowej oraz markery stanu zapalnego u kobiet z rozpoznaną cukrzycą ciążową. Preparat probiotyczny zawierał szczepy bakterii kwasu mlekowego: *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* i *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* w ilości $112,5 \times 10^9$ CFU/kaps. Ostatecznej analizie statystycznej poddano wyniki 37 kobiet suplementujących preparat probiotyczny i 35 uczestniczek suplementujących placebo. Po 8 tygodniach w grupie suplementującej bakterie probiotyczne uzyskano znamienne statystycznie spadki stężenia IL-6 ($p=0,04$), TNF- α ($p=0,04$) oraz białka C-reaktywnego (ang. *C-reactive protein*, CRP) ($p=0,03$) w stosunku do grupy otrzymującej placebo [169].

Mohamadshahi i wsp. również przeprowadzili badanie, które miało na celu ocenę wpływu bakterii probiotycznych na parametry stanu zapalnego. Do badania włączono pacjentów z cukrzycą typu 2, których zakwalifikowano do dwóch grup. Grupa badana ($n=22$) otrzymała jogurt (300g/dziennie) zawierający szczepy bakterii: *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis spp. lactis* Bb12 (DSM 10140) oraz *Lactobacillus acidophilus* La5. Grupa kontrolna ($n=22$) otrzymała jogurt (300g/dziennie) zawierający wyłącznie *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*. Zaobserwowano, że stężenie TNF- α w grupie spożywającej jogurt wzbogacony o dodatkowe szczepy bakterii probiotycznych obniżyło się istotnie po 8 tygodniach zastosowanej suplementacji ($p=0,040$). Analiza porównawcza pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną wykazała, że stężenie TNF- α było istotnie niższe po zakończeniu interwencji ($p=0,047$). Zastosowana suplementacja nie wpłynęła natomiast na poziom IL-6 oraz białka CRP ($p>0,05$) [171].

Oceną wpływu bakterii probiotycznych na stan zapalny interesował się także Vagher-Mahrabany i wsp. Do badania zakwalifikowano kobiety z rozpoznaniem reumatoidalnym zapaleniem stawów. Grupa badana ($n=22$) przez 8 tygodni otrzymywała kapsułkę dziennie z szczepem bakterii *Lactobacillus casei* 01 w ilości 10^8 CFU, grupa kontrolna ($n=24$) placebo. Po zakończeniu interwencji analiza porównawcza pomiędzy grupami wykazała istotne obniżenie stężenia IL-6, interleukiny 12 (ang. *interleukin* 12, IL-12) oraz TNF- α w grupie suplementującej preparat probiotyczny. W oparciu o uzyskane wyniki autorzy uznali, że

suplementacja *Lactobacillus casei* 01 korzystnie wpływa na parametry stanu zapalnego w badanej populacji pacjentów [172].

Hatakka i wsp. także zrekrutowali do badania pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Jednak w swoim projekcie suplementowali szczep bakterii *Lactobacillus rhamnosus* LC70536 (5×10^9 CFU/kaps.), a badanie trwało 12 tygodni. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała, że w grupie suplementującej bakterie probiotyczne stężenie interleukiny 1 β (ang. *interleukin1 β* , IL-1 β) nieznacznie wzrosło po zakończeniu interwencji ($p=0,066$) w stosunku do grupy przyjmującej placebo, natomiast nie zaobserwowano zmian w stężeniu Il-6, interleukiny 10 (ang. *interleukin 10*, Il-10), Il-12, mieloperoksydazy i TNF- α pomiędzy grupami po zakończeniu interwencji [173].

W kręgu zainteresowań naukowców znajduje się także aspekt dotyczący potencjału antyoksydacyjnego probiotyków. Dowody z analiz przeprowadzonych w ostatnich latach sugerują, że zdolność tę posiadają przede wszystkim bakterie kwasu mlekowego [164]. Uważa się, że różne szczepy bakterii charakteryzują się odmienną tolerancją na działanie wolnych rodników tlenowych. Suplementacja bakterii probiotycznych skutkuje zwiększeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD, GPx oraz katalazy (ang. *catalase*, CAT), a także zwiększeniem poziomu glutationu (ang. *gluthione*, GSH) przyczyniając się do redukcji stresu oksydacyjnego. Oprócz eliminacji wolnych rodników tlenowych bakterie probiotyczne odbudowują fizjologiczną mikroflorę przewodu pokarmowego czyniąc ją bardziej odporną na działanie czynników toksycznych i chorobotwórczych [174]. Z uwagi na posiadane właściwości immunomodulujące bakterie probiotyczne biorą także czynny udział w odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Hamując stan zapalny i redukując ekspresję cytokin prozapalnych zmniejszają stres oksydacyjny [175].

W niniejszej pracy stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu TAS w grupie pacjentek otrzymujących preparat probiotyczny, w stosunku do wartości wyjściowych. Analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupami po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji również wykazała występowanie różnicy istotnej statystycznie. Ponadto wykazano, że uzyskana zmiana (Δ) poziomu TAS w grupie suplementującej preparat probiotyczny była istotna, w stosunku do zmiany (Δ) poziomu TAS w grupie placebo.

Asemi i wsp. także analizowali właściwości antyoksydacyjne probiotyków. W przeprowadzonym projekcie badawczym ocenili wpływ suplementacji wieloszczepowego preparatu probiotycznego na parametry stresu oksydacyjnego. Do badania włączono 54 pacjentów z cukrzycą typu 2 w wieku od 35 do 70 lat. Grupa 27 pacjentów suplementowała preparat probiotyczny, który zawierał 7 szczepów bakterii: *Lactobacillus acidophilus* (2×10^9

CFU), *Lactobacillus casei* (7×10^9 CFU), *Lactobacillus rhamnosus* ($1,5 \times 10^9$ CFU), *Lactobacillus bulgaricus* (2×10^8 CFU), *Bifidobacterium breve* (2×10^{10} CFU), *Bifidobacterium longum* (7×10^9 CFU), *Streptococcus thermophilus* ($1,5 \times 10^9$ CFU) i fruktooligosacharydy. Pozostali uczestnicy ($n=27$) suplementowali placebo. Zaobserwowano, że spożywanie wieloszczepowego preparatu probiotycznego przyczyniło się do istotnego zwiększenia poziomu GSH po 8 tygodniach interwencji ($p=0,02$). Analiza porównawcza wykazała, że uzyskany wzrost GSH w grupie suplementującej probiotyk był istotny statystycznie w stosunku do grupy spożywającej placebo ($p=0,03$). Po 8 tygodniach interwencji zaobserwowano także zwiększenie poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (ang. *total antioxidant capacity*, TAC) w grupie suplementującej probiotyk, jednak nie był to wzrost istotny statystycznie. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami w poziomie TAC [176].

Badehnoosh i wsp. w przeprowadzonym badaniu klinicznym ocenili wpływ suplementacji bakterii probiotycznych na parametry stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego u pacjentek z cukrzycą ciążową. Uczestniczki badania poddano losowej randomizacji do grupy suplementującej probiotyk ($n=30$) oraz placebo ($n=30$) przez okres 6 tygodni. Kapsułka probiotyku zawierała szczepy bakterii: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium bifidum*, każdy szczep w ilości 2×10^9 CFU/g. Po zastosowanej interwencji wykazano, że spożywanie bakterii probiotycznych istotnie obniżyło stężenie białka CRP ($p<0,001$), glukozy na czczo ($p=0,01$), MDA ($p=0,03$), a znacząco zwiększyło poziom TAC ($p=0,002$) w porównaniu do grupy placebo. Stosunek MDA do TAC również uległ zmniejszeniu ($p=0,004$). Zastosowana suplementacja nie wpłynęła natomiast na stężenie NO oraz poziom GSH po zakończeniu interwencji [177].

Doniesienia świadczące o pozytywnym wpływie bakterii probiotycznych na parametry stresu oksydacyjnego nie zostały potwierdzone przez Tonucci i wsp. Do randomizowanego badania klinicznego włączono pacjentów z cukrzycą typu 2 i zakwalifikowano ich do dwóch grup – grupy badanej, która spożywała 120 g dziennie fermentowanego mleka zawierającego bakterie *Lactobacillus acidophilus* La5 (10^9 CFU) i *Bifidobacterium animalis spp. lactis* Bb12 (10^9 CFU) oraz grupy kontrolnej, która spożywała tradycyjne mleko fermentowane, które zawierało *Streptococcus thermophilus* TA-40. Po 6 tygodniach zastosowanej interwencji nie wykazano zmian poziomu TAS w grupie suplementującej bakterie probiotyczne. Przeprowadzona analiza porównawcza pomiędzy grupami także nie wykazała istotnych różnic poziomu TAS [178].

Podobne wnioski wyciągnął Vaghef-Mehrabany i wsp. Do badania włączono kobiety z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Grupę badaną stanowiły 22 pacjentki, które suplementowały przez 8 tygodni kapsułki zawierające 10^8 CFU bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* 01. Do grupy kontrolnej przyjmującej placebo włączono 24 uczestniczki. Po zakończeniu interwencji nie wykazano różnic pomiędzy grupami w zakresie badanych parametrów: MDA, TAC i CAT. Aktywność SOD obniżyła się istotnie ($p < 0,05$) po zakończeniu interwencji w grupie suplementującej probiotyk, a aktywność GPx obniżyła się zarówno w grupie suplementującej probiotyk, jak i placebo ($p < 0,05$). Analiza porównawcza aktywności tych enzymów pomiędzy grupami nie wykazała różnic istotnych statystycznie [179].

Podwyższone stężenie homocysteiny jest niezależnym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Przyczyn hiperhomocysteinemii jest wiele, m.in. niedobór witamin np. kwasu foliowego, witaminy B12, witaminy B6, nadmiar metioniny w diecie. Spożywanie alkoholu, kawy, palenie papierosów także mogą przyczynić się do wzrostu jej stężenia. Nieustannie poszukuje się nowych metod, które pozwolą obniżyć stężenie homocysteiny w surowicy krwi. Obiecującym rozwiązaniem może okazać się suplementacja bakterii probiotycznych. Wiemy, że mikroorganizmy biorą udział w syntezie witamin. Zwiększają stężenie witaminy B12 i kwasu foliowego, które skutecznie redukują poziom homocysteiny w surowicy krwi. Naturalnym źródłem kwasu foliowego jest mleko, jeśli poddamy je procesowi fermentacji bakterie kwasu mlekowego zwiększają zawartość kwasu foliowego nawet do około $110\mu\text{g/l}$ [180].

W niniejszym projekcie wykazano, że 12-tygodniowa suplementacja preparatem probiotycznym w grupie otyłych kobiet przyczyniła się do istotnego spadku stężenia homocysteiny. Istotna była również uzyskana zmiana (Δ) stężenia homocysteiny po 12 tygodniach w grupie suplementującej preparat probiotyczny, w stosunku do zmiany (Δ) stężenia homocysteiny w grupie placebo. Wpływ suplementacji bakterii probiotycznych na stężenie homocysteiny badał także Barreto i wsp. W przeprowadzonym badaniu klinicznym ocenił efekt spożycia mleka fermentowanego zawierającego bakterie *Lactobacillus plantarum* na stężenie glukozy oraz poziom homocysteiny u kobiet w wieku pomenopauzalnym z rozpoznaniem zespołem metabolicznym. Ilość suplementowanych bakterii wynosiła $1,25 \times 10^7$ CFU/g. Grupa kontrolna otrzymała mleko nie poddane procesowi fermentacji. Po 90 dniach badania wykazały znaczącą redukcję stężenia glukozy ($p = 0,037$) i homocysteiny ($p = 0,019$) w grupie spożywającej mleko fermentowane z *Lactobacillus plantarum* w porównaniu do grupy kontrolnej [180].

Valentini i wsp. również ocenili wpływ diety oraz suplementacji preparatu probiotycznego na parametry stanu zapalnego, profil mikroflory jelitowej i parametry stanu odżywienia, w tym stężenie homocysteiny. Do badania włączono 56 pacjentów, których zakwalifikowano do grupy (n=34), która stosowała jedynie spersonalizowaną dietę oraz grupy interwencyjnej (n=35), która oprócz zaleceń dietetycznych suplementowała bakterie probiotyczne. Kapsułki zawierały $1,12 \times 10^{11}$ CFU liofilizowanych szczepów bakterii: *Bifidobacterium infantis* DSM24737, *Bifidobacterium longum* DSM24736, *Bifidobacterium breve* DSM24732, *Lactobacillus acidophilus* DSM24735, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM24734, *Lactobacillus paracasei* DSM24733, *Lactobacillus plantarum* DSM24730 i *Streptococcus thermophilus* DSM24731. Kontrolne badania biochemiczne przeprowadzone po zakończeniu projektu wykazały, że stężenie homocysteiny obniżyło się ($p < 0,001$), a stężenie witaminy B12 ($p = 0,001$) oraz kwasu foliowego ($p = 0,007$) zwiększyło się znacząco w grupie suplementującej bakterie probiotyczne [181].

Należy pamiętać, że zdolność bakterii do produkcji kwasu foliowego jest uwarunkowana gatunkowo. Uważa się, że taki potencjał wykazują bakterie kwasu mlekowego takie jak *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* i *Leuconostoc spp.*, a także bakterie należące do gatunku *Bifidobacterium*. Natomiast większość bakterii *Lactobacillus spp.* takich właściwości nie posiada, z wyjątkiem omawianego wcześniej *Lactobacillus plantarum* [182,183]. Wpływ bakterii probiotycznych na parametry stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego jest także związany z rodzajem oraz ilością bakterii wchodzących w skład suplementowanego preparatu. Wykazano, że bakterie *Lactobacillus spp.* są bardziej odporne na wolne rodniki tlenowe w porównaniu do innych gatunków [174]. Podsumowując wyniki powyżej przedstawionych badań klinicznych nasuwa się ponownie wniosek, że rozbieżności te mogą być związane długością stosowanej suplementacji, indywidualnym składem flory jelitowej badanych uczestników, a także wpływem omawianych we wstępie niniejszej pracy czynników, które mogą modulować skład mikroflory i ostatecznie rzutować na uzyskane wyniki badań. Istnieje potrzeba dalszych obserwacji w celu identyfikacji szczepów bakterii, które charakteryzują się największym potencjałem antyoksydacyjnym i immunomodulującym. Ważne jest również określenie minimalnego czasu suplementacji niezbędnego do uzyskania optymalnych terapeutycznych efektów.

9.4. Wpływ suplementacji preparatem probiotycznym na wskaźnik sztywności naczyń tętnicznych u otyłych kobiet

W obecnej pracy, po okresie 12-tygodniowej suplementacji, obserwowano istotny statystycznie spadek wskaźnika SI w grupie pacjentek, które otrzymywały preparat probiotyczny. Analiza porównawcza pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo nie wykazała istotnych zmian przed i po interwencji.

Uważa się, że mikroflora poprzez posiadane właściwości immunomodulujące i przeciwzapalne może odgrywać istotną rolę w patogenezie zmian w ścianie naczyń krwionośnych i procesie aterosklerozy. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć dowody na istnienie różnic w składzie flory jelitowej osób zdrowych oraz pacjentów z objawową miażdżycą. Karlsson i wsp. wykazali, że bakterie z rodzaju *Collinsella* obfitują u pacjentów z miażdżycą, natomiast zdrowi ochotnicy posiadali większą ilość bakterii z rodzaju: *Eubacterium*, *Roseburia* oraz *Bacteroides* [184]. Kashtanova i wsp. przeprowadzili badanie, którego celem była ocena związku pomiędzy składem mikroflory jelitowej, a właściwościami naczyń tętnicznych u pacjentów bez rozpoznanej choroby układu sercowo-naczyniowego. Do badania zakwalifikowano 92 pacjentów w wieku 25 do 76 lat. W badaniu oceniono IMT, PWV i stężenie białka CRP w surowicy krwi. Zaobserwowano, że większa ilość bakterii z rodzaju *Bacteroides* w pobranych próbkach była charakterystyczna dla pacjentów bez rozpoznanej cukrzycy, u których stwierdzono $PWV \geq 10 \text{ m/s}$. Próbkę stolca pobrane od pacjentów, u których rozpoznano $IMT \geq 0,9 \text{ mm}$ zawierały natomiast większą ilość bakterii z rodzaju *Blautia*, a w szczególności *Blautia coccooides*. Bakterie te aktywują wydzielanie cytokin prozapalnych, TNF- α , interleukiny 8 (ang. *interleukin 8*, IL-8) przyczyniając się do powstania przewlekłego stanu zapalnego, co skutkuje dysfunkcją śródbłonna naczyniowego i uszkodzeniem ścian naczyń krwionośnych. U pacjentów z podwyższonym stężeniem białka CRP w surowicy krwi, a także u pacjentów z $IMT \geq 0,9 \text{ mm}$ stwierdzono liczne bakterie z rodzaju *Serratia*. Bakterie te należą do bakterii Gram-ujemnych. Ich błona komórkowa zawiera LPS, który aktywując receptor TLR4 indukuje endotoksemię [185].

Sztywność naczyń tętnicznych ściśle zależy od prawidłowej funkcji śródbłonna naczyniowego. Kliniką konsekwencją utraty elastyczności naczyń jest zwiększone ryzyko chorób i śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych. Nieustannie poszukuje się nowych metod, które poprawią lub spowolnią proces sztywnienia naczyń. Aktywność fizyczna,

odpowiednia dieta oraz leki, takie jak antagoniści wapnia, inhibitory konwertazy angiotensyny i sartany mogą wpłynąć korzystnie na elastyczność naczyń [153]. Miażdżyca jest złożonym procesem chorobowym, którego podstawę stanowi przewlekły stan zapalny. Analizując powyższe badania kliniczne można uznać, że istnieje związek pomiędzy florą jelitową, a stanem naczyń krwionośnych. Modyfikacja profilu mikroflory za pomocą preparatów probiotycznych i wykorzystanie ich potencjału immunomodulującego, może okazać się naturalną opcją terapeutyczną zmniejszającą ryzyko i następstwa uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych.

9.5. Podsumowanie

Probiotyki są powszechnie znane i stosowane od wielu lat. Lista naturalnych produktów, które zawierają bakterie probiotyczne jest bardzo długa. Spożywanie ich zwiększa ilość i poprawia jakość mikroflory w przewodzie pokarmowym. Z uwagi na ich wielokierunkowe działanie na funkcje organizmu człowieka dużym zainteresowaniem cieszą się również suplementy i preparaty zawierające bakterie probiotyczne. Wykorzystywane są w profilaktyce i leczeniu zaparć, biegunek, uzupełniają fizjologiczną mikroflorę po zastosowanej antybiotykoterapii, łagodzą objawy alergii, stymulują układ odpornościowy. W dalszym ciągu poszukuje się nowych farmakoterapeutycznych zastosowań bakterii probiotycznych.

Dowody z badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują na ich znaczenie w leczeniu i profilaktyce zaburzeń metabolicznych, otyłości, cukrzycy oraz chorób układu sercowo-naczyniowego. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na potencjalnie korzystny wpływ zastosowanej suplementacji na parametry dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Spożywanie bakterii probiotycznych przyczyniło się do obniżenia stężenia glukozy, homocysteiny, zmniejszenia stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego, a także poprawy parametrów profilu lipidowego i obniżenia wskaźnika SI. Wszystkie te czynniki pełnią istotną rolę w patogenezie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Należy pamiętać, że właściwości prozdrowotne probiotyków zależą od ilości, rodzaju, gatunku bakterii wchodzących w skład preparatu, a także długości trwania suplementacji. Istnieje potrzeba dalszych badań celem ustalenia najbardziej optymalnego składu preparatu probiotycznego, który charakteryzowałby się największą skutecznością w redukcji ryzyka kardiometabolicznego.

10. WNIOSKI

- Profil lipidowy oraz stężenie glukozy u otyłych kobiet ulegają korzystnej modyfikacji po 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym.
- Suplementacja preparatem probiotycznym przez okres 12 tygodni pozytywnie moduluje wskaźniki dysfunkcji śródbłonna u otyłych kobiet, co świadczy o potencjale naczynioprotekcyjnym zastosowanego probiotyku.

11. STRESZCZENIE

Wstęp

Rozpowszechnienie otyłości przyjęło już rozmiar epidemii i stanowi poważne wyzwanie XXI wieku. Nadmierna masa ciała jest uznaną przyczyną zwiększonej zachorowalności i śmiertelności z powodu incydentów sercowo-naczyniowych. U podstaw rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego leży nieprawidłowa funkcja śródbłonka naczyń tętniczych. W złożonej patogenezie dysfunkcji śródbłonka u otyłych pacjentów obok udziału klasycznych czynników ryzyka, stanowiących zarazem typowe powikłania otyłości, takich jak nadciśnienie tętnicze, zaburzenia gospodarki lipidowej i węglowodanowej, rozważa się także rolę nowych czynników m.in. przewlekłego wewnątrznaczyniowego procesu zapalnego, stresu oksydacyjnego oraz hiperhomocysteinemii.

Wiele prac badawczych poświęcono dotychczas analizie znaczenia mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości, cukrzycy. Badania w ostatnich latach wskazują na potencjalny udział zaburzeń w składzie mikroflory jelitowej w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Stosowanie diety o dużej zawartości tłuszczu skutkuje zwiększeniem liczebności bakterii Gram-ujemnych we florze przewodu pokarmowego człowieka. Błona komórkowa tych bakterii zawiera w swoim składzie lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS), który aktywuje receptor Toll-podobny 4 (ang. *toll-like receptor 4*, TLR4) oraz indukuje przewlekłą endotoksemię. Inicjacja procesu zapalnego przyczynia się do narastania insulinooporności, wzrostu stężenia glukozy oraz triglicerydów (ang. *triglycerides*, TG), a także zwiększenia produkcji cytokin prozapalnych takich jak: interleukiny 1 (ang. *interleukin 1*, Il-1), interleukiny 6 (ang. *interleukin 6*, Il-6), czynnika martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), a także reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Skutkuje to upośledzeniem funkcji śródbłonka naczyniowego, a tym samym wzrostem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Podstawową metodą modulacji składu mikroflory jelitowej jest suplementacja wybranych szczepów bakterii w postaci preparatów probiotycznych. W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej prac na temat korzyści klinicznych wynikających z suplementacji preparatów probiotycznych, jak również możliwości terapeutycznego zastosowania probiotyków jako naturalnej metody redukującej ryzyko sercowo-naczyniowe. W świetle powyższych doniesień uzyskanie odpowiedzi na

pytanie czy suplementacja wybranym preparatem probiotycznym może wywierać wpływ na parametry dysfunkcji śródbłonka naczyniowego u otyłych kobiet stanowi interesujące i warte zgłębienia zagadnienie badawcze.

Cele pracy

Celem pracy była ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym na parametry gospodarki lipidowej, stężenie glukozy, wybrane parametry biochemiczne dysfunkcji śródbłonka naczyniowego oraz wskaźnik sztywności naczyń u otyłych kobiet.

Material i metodyka

Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na podstawie uchwały nr 659/16.

Kryteria włączenia do badania stanowiły: pisemne udzielenie świadomej zgody na udział w badaniu, wiek od 45 do 65 lat, płeć żeńska, BMI 30 – 45 kg/m², obwód talii >80 cm, stabilna masa ciała (± 1 kg w ostatnim miesiącu). Kryteria wykluczenia z badania stanowiły: wtórna postać otyłości, choroby przewodu pokarmowego, cukrzyca, przewlekła choroba nerek (GFR<60 ml/min/1,73m²), klinicznie istotne zaburzenie funkcji wątroby, dyslipidemia lub nadciśnienie tętnicze wymagające wdrożenia leczenia farmakologicznego w ostatnich 3 miesiącach przed rozpoczęciem obserwacji lub w trakcie obserwacji, stosowanie suplementów diety w okresie ostatniego miesiąca od rozpoczęcia badania, klinicznie istotny ostry lub przewlekły proces zapalny, palenie papierosów, nadużywanie alkoholu, równoczesny udział w badaniu mającym wpływ na zmianę masy ciała lub stosowanie leków/zachowania żywieniowe mające wpływ na zmianę masy ciała, istotna zmiana aktywności fizycznej w trakcie trwania badania, przyjmowanie antybiotyków w ciągu 1 miesiąca przed rozpoczęciem badania, stosowanie diety wegetariańskiej, spożywanie produktów wzbogaconych w pre- lub probiotyki oraz produktów z wysoką zawartością błonnika pokarmowego lub dużych ilości żywności fermentowanej (>400g/dobę), hormonalna terapia zastępcza, i/lub inne zaburzenia mogące w jakikolwiek sposób stanowić ryzyko dla zdrowia pacjenta podczas przeprowadzania badania i/lub utrudnić, ograniczyć skuteczność badania. W ramach kwalifikacji przeprowadzono badanie podmiotowe,

przedmiotowe, w tym pomiary antropometryczne (masa ciała, wzrost, wskaźnik BMI, obwód talii) oraz pomiar ciśnienia tętniczego (Tech-Med, *Model TMA 875B*).

Do badania ostatecznie zakwalifikowano 50 kobiet, które losowo przydzielono do grupy otrzymującej preparat probiotyczny (n=25) lub placebo (n=25). Preparat probiotyczny i placebo zostały przygotowane przez firmę Winclove – preparat Ecologic® BARRIER. Probiotyk zawierał 8 szczepów bakterii w ilości $2,5 \times 10^9$ CFU/g. Pacjentki przyjmowały dwie saszetki proszku dziennie – łącznie 4 g/dobę przez okres 12 tygodni. Na początku i po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji oceniono sztywność naczyń tętniczych przy użyciu aparatu Pulse Trace PCA 2 (*Micro Medical, Rochester, UK*) oraz wykonano badania biochemiczne. Stężenie Il-6, TNF- α (*DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany*), homocysteiny (*Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK*) oznaczono metodą immunoenzymatyczną, całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (ang. *total antioxidant status, TAS*) (*Randox Laboratories, Ltd, Crumlin, UK*) metodą kalorymetryczną. Ponadto oznaczono stężenie parametrów gospodarki lipidowej oraz glukozy przy użyciu systemu biochemicznego Dimension® (*Siemens, Newark, NJ, USA*). Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica 13.1 (*StatSoft® Polska*).

Wyniki

Po 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym stwierdzono istotne statystycznie obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego (ang. *total cholesterol, TCH*) ($p=0,0019$), cholesterolu frakcji lipoprotein niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein, LDL*) ($p=0,0149$), TG ($p=0,0140$) oraz glukozy ($p<0,0001$). Analiza porównawcza pomiędzy grupami wykazała, że zmiana (Δ) stężenia TCH i glukozy po 12 tygodniach interwencji w grupie suplementującej preparat probiotyczny, w stosunku do zmiany (Δ) stężenia TCH i glukozy w grupie, która otrzymywała placebo osiągnęła istotność statystyczną (odpowiednio $p=0,0472$, $p=0,0059$).

Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu Il-6 po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji. Natomiast w grupie pacjentek otrzymujących preparat probiotyczny stwierdzono istotny statystycznie spadek stężenia TNF- α ($p=0,0001$) po okresie 12-tygodniowej suplementacji. Analiza porównawcza stężenia TNF- α pomiędzy grupami po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji wykazała występowanie istotności statystycznej ($p=0,0070$). Uzyskana zmiana (Δ) stężenia TNF- α po 12 tygodniach w grupie suplementującej preparat probiotyczny była istotna, w stosunku do zmiany (Δ) stężenia TNF- α w grupie placebo

($p=0,0002$). Po 12 tygodniach suplementacji preparatem probiotycznym stwierdzono istotny wzrost poziomu TAS ($p=0,0076$). Analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupami po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji wykazała występowanie istotności statystycznej ($p=0,0017$). Istotna statystycznie była również uzyskana zmiana (Δ) poziomu TAS po 12 tygodniach w grupie suplementującej preparat probiotyczny, w stosunku do zmiany (Δ) poziomu TAS w grupie placebo ($p=0,0032$). Stężenie homocysteiny było istotnie niższe po 12 tygodniach ($p<0,0001$) w grupie suplementującej probiotyk. Podobnie zmiana (Δ) stężenia homocysteiny po 12 tygodniach interwencji w grupie suplementującej preparat probiotyczny, w stosunku do zmiany (Δ) stężenia homocysteiny w grupie przyjmującej placebo wykazywała istotność statystyczną ($p=0,0263$).

W grupie pacjentek otrzymujących preparat probiotyczny po 12 tygodniach suplementacji stwierdzono istotnie statystycznie ($p=0,0214$) obniżenie wartości wskaźnika sztywności naczyń tętniczych (ang. *stiffness index*, SI). Analiza porównawcza pomiędzy grupami nie wykazała istotnych zmian przed i po interwencji.

Analiza zależności pomiędzy zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji lipoprotein wysokiej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*, HDL), cholesterolu frakcji LDL i TG, a zmianą (Δ) stężenia Il-6, TNF- α i TAS w grupie suplementującej preparat probiotyczny nie wykazała występowania istotnych statystycznie korelacji. Nie wykazano również istotnych statystycznie zależności pomiędzy zmianą (Δ) wskaźnika SI, a zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji HDL, LDL, TG, Il-6, TNF- α , TAS oraz homocysteiny po zastosowaniu 12-tygodniowej interwencji w grupie badanej.

Wnioski

- Profil lipidowy oraz stężenie glukozy u otyłych kobiet ulegają korzystnej modyfikacji po 12-tygodniowej suplementacji preparatem probiotycznym.
- Suplementacja preparatem probiotycznym przez okres 12 tygodni pozytywnie moduluje wskaźniki dysfunkcji śródbłonna u otyłych kobiet, co świadczy o potencjale naczynioprotekcyjnym zastosowanego probiotyku.

Słowa kluczowe: probiotyki, mikroflora jelitowa, śródbłonek, otyłość

12. SUMMARY

Evaluation of an influence of a 12-week supplementation of a probiotic preparation on selected parameters of vascular endothelial dysfunction in obese women

Introduction

The prevalence of obesity has become both an epidemic and a challenge of the 21st century. Excessive body weight is considered to be the cause of higher morbidity and mortality due to cardiovascular events. The development of cardiovascular diseases is based on the dysfunction of vascular endothelium. The complex pathogenesis of endothelial dysfunction involves the contribution of classic risk factors, commonly associated with obesity, such as arterial hypertension or carbohydrate and lipid profile alterations. Furthermore, the role of new risk factors is also considered, among them a chronic intravascular inflammatory state, oxidative stress, and hyperhomocysteinemia.

Growing body of evidence suggests the role of intestinal microflora in the pathogenesis of obesity and diabetes. The potential involvement of intestinal microbiota in the development of cardiovascular diseases has recently been considered. A diet rich in fat increases the number of Gram-negative bacteria in human intestinal flora. The cell membrane of these bacteria contains lipopolysaccharide (LPS) that activates toll-like receptor 4 (TLR4) and induces chronic endotoxemia. The development of inflammation contributes to growing insulin resistance, increasing the glucose level and triglycerides (TG) along with the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and reactive oxygen species (ROS). It results in the deterioration of endothelial function and increases the risk of cardiovascular diseases. The modulation of the content of intestinal microflora is achieved by the supplementation of particular bacterial strains in probiotic preparations. Several studies have been performed regarding the effects and clinical benefits of probiotics supplementation. It has been suggested that probiotics may serve as a natural therapeutic method for reducing cardiovascular risk. In the light of above data, obtaining the answer whether supplementation of multispecies probiotic influences the vascular endothelium dysfunction in obese women is worth exploring.

Aims

The study aimed to evaluate an influence of a 12-week multispecies probiotic supplementation on the lipid metabolism, glucose concentration, selected biochemical parameters of endothelial dysfunction and arterial stiffness in obese women.

Material and methods

The Bioethics Committee at Poznan University of Medical Science approved the study (No. 659/16).

The inclusion criteria involved: signed informed consent, age between 45 – 65, gender – female, BMI 30 – 45 kg/m², waist circumference >80 cm, stable body weight (± 1 kg) in the month prior to the trial. Exclusion criteria included: secondary form of obesity, gastrointestinal diseases, diabetes, chronic kidney disease (GFR<60ml/min/1,73m²), clinically significant impaired liver function, dyslipidemia and arterial hypertension that required pharmacological treatment in the 3 months before the trial, the use of dietary supplements in the month prior to the trial, clinically significant acute chronic inflammatory process, nicotine or alcohol abuse, significant changes of physical activity during the study, the use of antibiotics in the month prior to the trial, vegetarian dietary-habits, the use of probiotics or prebiotics and products with a high content of dietary fiber (>400g/daily) or a significant amount of fermented food, hormone replacement therapy, any other conditions that could be in the opinion of investigator unsafe for participants or influence the effectiveness of the trial. Medical examination were carried out in the recruiting step of the study, including anthropometric (body mass, height, BMI, waist circumference) and blood pressure measurement (Tech-Med, *TMA 875B*).

A total of 50 women were qualified to the study. They were randomly selected to the group that received probiotic (n=25) or a placebo-taking group (n=25). Probiotic Ecologic ® BARRIER and placebo were prepared by the Winclove company. Probiotic contained eight bacterial strains in an amount of $2,5 \times 10^9$ CFU/g. Participants consumed two sachets (4g) per day for 12 weeks. At the beginning, and after the end of an intervention, arterial stiffness was estimated by a Pulse Trace PCA 2 (*Micro Medical, Rochester, UK*) and biochemical parameters were evaluated. The concentration of Il-6, TNF- α (*DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany*) and homocysteine (*Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK*) were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay, total antioxidant status (TAS) (*Randox*

Laboratories, Ltd, Crumlin, UK) with a calorimetric method. A lipid profile and glucose concentration were measured by a biochemical system Dimension ® (*Siemens, Newark, NJ, USA*). The statistical analyses were performed with Statistica 13.1 (*StatSoft® Poland*).

Results

The 12-week probiotic supplementation resulted in statistically significant decrease of total cholesterol (TCH) ($p=0,0019$), low-density lipoprotein (LDL) ($p=0,0149$), TG ($p=0,0140$) and glucose ($p<0,0001$). Comparative analysis between studied groups demonstrated that after 12 weeks of intervention, the change (Δ) of TCH and glucose concentration revealed statistical significance ($p=0,0472$, $p=0,0059$) respectively, in the probiotic group compared to Δ values in the placebo group.

No significant difference in the concentration of Il-6 was found after the trial. However, participants receiving probiotic were characterized by a statistically significant decrease in TNF- α ($p=0,0001$) after a 12-week supplementation. Comparative analysis of TNF- α concentration at the end of the intervention period demonstrated a statistically significant ($p=0,0070$) difference between groups. The change (Δ) of TNF- α concentration after 12 weeks of supplementation was statistically significant in the probiotic group ($p=0,0002$) compared to the change (Δ) of TNF- α in the placebo group. After 12 weeks of probiotic supplementation, the TAS level was significantly increased ($p=0,0076$). Comparative analysis of the TAS level at the end of intervention period displayed a statistically significant ($p=0,0017$) difference between groups. The change (Δ) of TAS level in the probiotic group after the intervention period was statistically significant, compared to the change (Δ) of TAS level in the placebo group ($p=0,0032$). The level of homocysteine was significantly lower ($p<0,0001$) in the probiotic group after 12 weeks of intervention. The change (Δ) of homocysteine level was statistically significant in the probiotic group after the intervention, compared to those documented in the placebo group ($p=0,0263$).

In the probiotic receiving group, the arterial stiffness index (SI) was significantly reduced after 12 weeks of supplementation ($p=0,0214$). No statistically significant differences in SI level before and after the intervention were found between studied groups.

The analysis between the change of TCH, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, LDL cholesterol, TG concentration, and the change of Il-6, TNF- α , and TAS concentration in the probiotic group did not present any statistically significant correlation. No significant relationship was found between the change of SI, and the change of TCH, HDL cholesterol,

LDL cholesterol, TG, IL-6, TNF- α , TAS and homocysteine concentration after supplementation period in studied group.

Conclusions

- The lipid profile and glucose concentration in obese women undergo beneficial modification after 12 weeks of supplementation with probiotic.
- The 12-week probiotic supplementation positively modulates the parameters of endothelial dysfunction in obese women, that indicates a vascular protective potential of the probiotic used.

Key words: probiotics, intestinal microbiota, endothelium, obesity

13. SPIS RYCIN

Rycina 1. Wybrane przyczyny dysfunkcji śródbłonna naczyniowego	22
Rycina 2. Zmiany w składzie flory jelitowej człowieka w zależności od wieku	27
Rycina 3. Czynniki modulujące skład flory jelitowej człowieka	29
Rycina 4. Schemat badania prowadzonego w ramach projektu	45
Rycina 5. Waga elektroniczna firmy Radwag (<i>Radom, Polska</i>)	47
Rycina 6. Ciśnieniomierz automatyczny naramienny firmy Tech-Med (<i>model TMA 875</i>).....	48
Rycina 7. Aparat Pulse Trace PCA 2 (<i>Micro Medical, Rochester, UK</i>).....	49
Rycina 8. Krzywa cyfrowej objętości tętna (DVP)	50
Rycina 9. Stosowany suplement	53
Rycina 10. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia TCH pomiędzy grupami ..	60
Rycina 11. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia glukozy pomiędzy grupami	62
Rycina 12. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia TNF- α pomiędzy grupami	64
Rycina 13. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) poziomu TAS pomiędzy grupami	66
Rycina 14. Analiza porównawcza uzyskanej zmiany (Δ) stężenia homocysteiny pomiędzy grupami	68

14. SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości w oparciu o wskaźnik BMI wg WHO	11
Tabela 2. Klasyfikacja otyłości brzusznej i pośladkowo-udowej w oparciu o wskaźnik WHR	12
Tabela 3. Wartość wskaźnika WHR oraz obwodu talii, a ryzyko powikłań metabolicznych wg WHO	12
Tabela 4. Odsetek ludności z nadwagą i otyłością w Polsce w latach 1996 – 2014	13
Tabela 5. Wybrane bakterie probiotyczne i ich udowodniona skuteczność w badaniach klinicznych	35
Tabela 6. Charakterystyka grupy suplementującej preparat probiotyczny (n=25) i grupy placebo (n=25).....	43
Tabela 7. Porównanie parametrów profilu lipidowego w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji.....	58
Tabela 8. Porównanie parametrów profilu lipidowego w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji.....	59
Tabela 9. Analiza porównawcza parametrów profilu lipidowego pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	59
Tabela 10. Porównanie stężenia glukozy w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji	60
Tabela 11. Porównanie stężenia glukozy w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji.....	61
Tabela 12. Analiza porównawcza stężenia glukozy pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	61

Tabela 13. Porównanie parametrów stanu zapalnego w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji.....	63
Tabela 14. Porównanie parametrów stanu zapalnego w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji.....	63
Tabela 15. Analiza porównawcza stężenia parametrów stanu zapalnego pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	64
Tabela 16. Porównanie poziomu TAS w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji	65
Tabela 17. Porównanie poziomu TAS w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji.....	65
Tabela 18. Analiza porównawcza poziomu TAS pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	66
Tabela 19. Porównanie stężenia homocysteiny w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji	67
Tabela 20. Porównanie stężenia homocysteiny w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji	67
Tabela 21. Analiza porównawcza stężenia homocysteiny pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	67
Tabela 22. Porównanie wartości wskaźnika SI w obrębie grupy suplementującej preparat probiotyczny przed i po zakończeniu interwencji	68
Tabela 23. Porównanie wartości wskaźnika SI w obrębie grupy suplementującej placebo przed i po zakończeniu interwencji	69
Tabela 24. Analiza porównawcza wskaźnika SI pomiędzy grupą suplementującą preparat probiotyczny, a grupą placebo	69
Tabela 25. Analiza korelacyjna w grupie badanej pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji HDL, LDL i TG, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia Il-6, TNF- α i TAS	70

Tabela 26. Analiza korelacyjna w grupie badanej pomiędzy uzyskaną zmianą (Δ) wskaźnika SI, a uzyskaną zmianą (Δ) stężenia TCH, cholesterolu frakcji HDL, LDL, TG, Il-6, TNF- α , TAS oraz homocysteiny	70
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

15. PIŚMIENNICTWO

1. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>
2. <http://gazetalekarska.pl/?p=32505>
3. Zgliczyński W.S. Nadwaga i otyłość w Polsce. *Infos*. 2017; 4: 1-4
4. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
5. <http://www.obesityday.worldobesity.org/6>
6. <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
7. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
8. <http://www.mp.pl/kalkulatory/show.html?id=166574>
9. Przybylska D., Kurowska M., Przybylski P.: Otyłość i nadwaga w populacji rozwojowej. *Hygeia Publ Health*. 2012; 47: 28-35
10. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation. GENEVA, 8–11 DECEMBER 2008.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44583/1/9789241501491_eng.pdf
11. Czerwińska E., Walicka M., Marcinowska-Suchowierska E.: Otyłość – czy zawsze prosta. *Post Nauk Med*. 2013; 26: 307-310
12. Białkowska M.: Etiopatogeneza otyłości. *Post Nauk Med*. 2011; 24: 765-769
13. Męczekalski B., Czyżyk A., Warenik-Szymankiewicz A.: Rola genów w powstawaniu otyłości. *Współczesne poglądy, patogeneza, aspekty kliniczne. Endokrynol Otył Zab Przem Mat*. 2008; 5: 27-37
14. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/
15. Zdrowie i zachowanie zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) 2014 r. GUS, Warszawa 2015 r.
<https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/zdrowie/zdrowie/zdrowie-i-zachowania-zdrowotne-mieszkancow-polski-w-swietle-badania-ehis-2014,10,1.html>
16. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.BMIPLUS2C10-19v?lang=en>
17. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.BMIPLUS2C05-09v?lang=en>
18. Comuzzie A.G., Allison D.B.: The search for human obesity genes. *Science*. 1998; 280: 1374-1377
19. Kolackov K., Łaczmański Ł., Bednarek-Tupikowska G.: Wpływ polimorfizmów genu FTO na ryzyko otyłości. *Endokrynol Otył Zab Przem Mat*. 2010; 6: 101-107

20. Fawcett K.A., Barroso I.: The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends Genet.* 2010; 26: 266–274
21. Okręglińska K., Wiśniewska K.: Genetyczne podłoże otyłości. *Współczesna dietetyka.* 2015;1:1-7
22. <https://www.europeanobesityday.eu/ia-tag/causes/>
23. Chacińska M., Zabielski P., Grycel S.: Udział kwasów tłuszczowych i tkanki tłuszczowej w indukowaniu insulinooporności mięśni szkieletowych. *Postępy Hig Med Dosw.* 2016; 70: 1142-1149
24. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs385/en/>
25. Ministerstwo Sportu i Turystyki. Badanie poziomu aktywności fizycznej społeczeństwa. Kantar Public (Kantar TNS S.A), 2017 r.
<https://www.msit.gov.pl/pl/sport/badania-i-analizy/aktywnosc-fizyczna-/575,Aktywnosc-fizyczna-spoleczenstwa.html>
26. Adamski W., Szulińska M., Bogdański P.: Wtórne przyczyny otyłości. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2012; 3: 6-13
27. Bąk-Sosnowska M.: Zaburzenia odżywiania towarzyszące otyłości. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2010; 1: 92-99
28. Bayon V., Leger D., Gomez-Merino D., Vecchierini M.F., Chennaoui M.: Sleep debt and obesity. *Ann Med.* 2014. 46: 264-272
29. Houston D.K., Nicklas B.J., Zizza C.A.: Weighty concerns: the growing prevalence of obesity among older adults. *J Am Diet Assoc.* 2009; 109: 1886-1895
30. Ostrowska Z.: Menopauza, otyłość a stan kośćca. *Postępy Hig Med Dosw.* 2009; 63: 39-46
31. Murawska-Ciałowicz E.: Tkanka tłuszczowa – charakterystyka morfologiczna i biochemiczna różnych depozytów. *Postępy Hig Med Dosw.* 2017; 71: 466-484
32. Korek E., Krauss H.: Nowe adipokiny o potencjalnym znaczeniu w patogenezie otyłości i zaburzeń metabolicznych. *Postępy Hig Med. Dosw.* 2015; 69: 799-810
33. Goldstein B.J., Scalia R.: Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 2563-2568
34. Baranowska B., Bik W.: Fizjologiczna rola adiponektyny. *Post Nauk Med.* 2010; 6: 503-508
35. Gawlik A., Zachurzok-Buczyńska A., Małecka-Tendera E.: Powikłania otyłości u dzieci i młodzieży. *Endokrynol Otył Zab Przem Mat.* 2009; 5: 19-27

36. Bogołowska-Stieblich A., Tałałaj M.: Otyłość a choroby układu sercowo-naczyniowego. *Post Nauk Med.* 2013; 26: 19-25
37. Nguyen T., Lau D.C.: The obesity epidemic and its impact on hypertension. *Can J Cardiol.* 2012; 28: 326-333
38. Segula D.: Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Med J.* 2014; 26: 20-24
39. Fabbrini E., Sullivan S., Klein S.: Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatology.* 2010; 51: 679–689
40. Jehan S., Zizi F., Pandi - Perumal S.R., Wall S., Auguste E., Myers A.K., Jean-Louis G., McFarlane S.I.: Obstructive Sleep Apnea and Obesity: Implications for Public Health. *Sleep Med Disord.* 2017; 1
41. King L.K., March L., Anandacoomarasamy A.: Obesity & osteoarthritis. *Indian J Med Res.* 2013; 138: 185-193
42. Dağ Z.Ö., Dilbaz B.: Impact of obesity on infertility in women. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2015; 16: 111-117
43. Basen-Enquist K., Chang M.: Obesity and Cancer Risk: Recent Review and Evidence. *Curr Oncol Rep.* 2011; 13: 71-76
44. Juruć A., Bogdański P.: Otyłość i co dalej? O psychologicznych konsekwencjach nadmiernej masy ciała. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2010; 1: 210-219
45. Pereira-Miranda E., Costa P.R.F., Queiroz V.A.O., Pereira-Santos M., Santana M.L.P.: Overweight and Obesity Associated with Higher Depression Prevalence in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Coll Nutr.* 2017; 36: 223-233
46. Akil L., Ahmad H.A.: Relationships between Obesity and Cardiovascular Diseases in Four Southern States and Colorado. *J Health Care Poor Underserved.* 2011; 22: 61-72
47. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
48. Michiels C.: Endothelial Cell Functions. *J Cell Physiol.* 2003; 196: 430-443
49. Maciej Zabel. *Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii.* Wydanie I. Wrocław. Urban & Partner; 2000: 121-123
50. Tomczyk M., Nowak W., Jaźwa A.: Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Post Bioch.* 2013; 59: 357-364
51. Trojan P., Janik M., Przybyło M.: Śródbłonek – niedoceniony organ. 1. Budowa i rola w procesach fizjologicznych. *Kosmos.* 2014; 63: 555-568
52. Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. *Robbins Patologia.* Olszewski W. Wydanie II. Wrocław. Urban & Partner; 2014: 86-87, 365-366

53. Dymkowska D.: Oksydacyjne uszkodzenie śródbłonka naczyniowego w cukrzycy typu 2 – udział mitochondriów i oksydazy NAD(P)H. *Post Bioch.* 2016; 62: 116-126
54. Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J., Kubica J.: Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonka – krótkie spojrzenie na złożony problem. *Folia Cardiol Excerpta.* 2011; 6: 109-116
55. Baszczuk A., Kopczyński Z., Thielemann A.: Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze z hiperhomocysteinemią. *Postępy Hig Med Dosw.* 2014; 68: 91-100
56. Sena C.M., Pereira A.M., Seica R.: Endothelial dysfunction – A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832: 2216-2231
57. Higashi Y., Maruhashi T., Noma K., Kihara Y.: Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med.* 2014; 24: 165-169
58. Nuskiewicz J., Kwiatkowska A., Majko K., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K.: Stres oksydacyjny i stan zapalny a rozwój otyłości: protekcyjne działanie melatoniny. *Probl Hig Epidemiol.* 2017; 98: 226-232
59. Górska M., Majewska-Szczepanik M., Szczepanik M.: Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu. *Postępy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1384-1404
60. Lai W.K., Kan M.Y.: Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab.* 2015; 67: 1-12
61. Ganguly P., Alam S.F.: Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015; 14: 6
62. Cheng Z., Yang X., Wang H.: Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rev.* 2009; 5: 158-165
63. Pushpakumar S., Kundu S., Sen U.: Endothelial Dysfunction: The Link Between Homocysteine and Hydrogen Sulfide. *Curr Med Chem.* 2014; 21: 3662-3672
64. Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J.: Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-1295
65. Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J.: Ocena czynności śródbłonka naczyniowego – gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiol Excerpta.* 2017; 5: 292-297
66. Peterson J., Garg S, Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss J.A., Bonazzi V., McEwen J.E., Wetterstrand K.A., Deal C., Baker C.C., Di Francesco V., Howcroft T.K., Karp R.W., Lunsford R.D., Wellington Ch.R., Belachew T., Wright M., Giblin Ch., David H., Mills M., Salomon R., Mullins Ch., Akolkar B., Begg L., Davis C.,

- Grandison L., Humble M., Khalsa J., Little A.R., Peavy H., Pontzer C., Portnoy M., Sayre M.H., Starke-Reed P., Zakhari S., Read J., Watson B, Guyer M.: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009; 19: 2317-2323
67. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Human Microbiome Project – Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol.* 2012; 51: 243-256
68. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M, Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project. *Nature.* 2017; 449: 804-810
69. Wołkowitz T., Januszkiewicz A., Szych J.: Mikrobiom przewodu pokarmowego i jego dysbiozy jako istotny czynnik wpływający na kondycję zdrowotną organizmu człowieka. *Med Dośw Mikrobiol.* 2014: 66: 223-235
70. Dave M., Higgins P.D., Middha S., Rioux K.P.: The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res.* 2012; 160: 246-257
71. Radawan P., Skrzydło-Radomańska B.: Rola mikroflory jelitowej w zdrowiu i chorobie. *Gastroenterol Prakt.* 2013; 5: 42-52
72. Krakowiak O., Nowak R.: Mikroflora przewodu pokarmowego człowieka – znaczenie, rozwój, modyfikacje. *Post Fitoter.* 2015; 3: 193-199
73. Miele L., Giorgio V., Alberelli M.A., De Candia E., Gasbarrini A., Grieco A.: Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep.* 2015; 17: 120-127
74. Muñoz-Garach A., Diaz-Perdigones C., Tinahones F.J.: Gut microbiota and type 2 diabetes melitus. *Endocrinol Nutr.* 2016; 63: 560-568
75. Baothman O.A., Zamzami M.A., Taher I., Abubaker J., Abu-Farha M.: The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 108
76. Jimenez E., Fernandez L., Marin M.L., Martín R., Odriozola J.M., Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J.M.: Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Curr Microbiol.* 2005; 51: 270-274
77. DiGiulio D.B, Romero R., Amogan H.P., Kusanovic J.P., Bik E.M., Gotsch F., Kim C.J., Erez O., Edwin S., Relman D.A.: Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *Plos One.* 2008; 3: 3056
78. Bartnicka A., Gałęcka M., Mazela J.: Wpływ czynników prenatalnych i postnatalnych na mikrobiotę jelitową noworodków. *Stand Med Pediatr.* 2016; 13: 165-172

79. Kotlińska A., Huras H. Źródła i rola mikrobioty mleka kobiecego.: Przegląd literatury przedmiotu. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie*. 2017; 15: 178-180
80. Jimenez E., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Is mesonium from healthy newborns actually sterile. *Res Microbiol*. 2008; 159: 187-193
81. Biasucci G., Benenati B., Morelli L., Bessi E., Boehm G.: Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria. *J Nutr*. 2008; 138: 1796-1800
82. Biasucci G, Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos C.: Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010; 86: 13-15
83. Domibiguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 11971-11975
84. Grönlund M.M., Lehtonen O.P., Eerola E., Kero P.: Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28: 19-25
85. Jańczewska I., Domżalska-Popadiuk I.: Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodków oraz wpływ czynników modyfikujących mikrobiotę jelitową na zachowanie zdrowia. *Forum Zakażeń*. 2016; 7: 443-448
86. Renz-Polster H., David M.R., Buist A.S., Vollmer W.M., O'Connor E.A., Frazier E.A., Wall M.A.: Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 1466-1472
87. Sevelsted A., Stokholm J., Bisgaard H.: Risk of Asthma from Cesarean Delivery Depends on Membrane Repture. *J Pediatr*. 2016; 171: 38-42
88. Thavagnanam S., Fleming J., Bromley A., Shields M.D., Cardwell C.R.: A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38, 629-633
89. Bager P., Simonsen J., Ethelberg S., Frisch M.: Cesarean Delivery and Risk of Intestinal Bacterial Infection. *J Infect Dis*. 2010; 201: 898-902
90. Smith B., Bodé S., Skov T.H., Mirsepasi H., Greisen G., Kroghfelt K.A.: Investigation of the early intestinal microflora in premature infants with/without necrotizing enterocolitis using two different methods. *Pediatr Res*. 2012; 71: 115-120

91. Elgin T.G., Kern S.L., McElroy S.J.: Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Its Association With Necrotizing Enterocolitis. *Clin Ther.* 2016; 38: 706-715
92. Rodriguez J.M., Murphy K., Stanton C., Ross R.P., Kober O.I., Juge N., Avershina E., Rudi K., Narbad A., Jenmalm M.C., Marchesi J.R., Collado M.C.: The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015; 26
93. Morelli L.: Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. *J Nutr.* 2008; 138: 1791-1795
94. Witkowska-Wirstlein R., Jurczyk M.U.: Czynniki determinujące kolonizację przewodu pokarmowego noworodka. *Pol Prz Nauk Zdr.* 2016; 3: 285-289
95. Soto A., Martín V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J.M., Fernández L.: Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotherapy and Other Host and Clinical Factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59: 78-88
96. Guaraldi F., Salvatori G.: Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 94
97. Odamaki T., Kato K., Sugahara H., Hashikura N., Takahashi S., Xiao J-Z., Abe F., Osawa R.: Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 2016; 16: 90
98. Bezirtzoğlu E.: The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe.* 1997; 3: 173-177
99. Strzępa A., Szczepanik M.: Wpływ naturalnej flory jelitowej na odpowiedź immunologiczną. *Postępy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 908-920
100. Munro N.: Gut microbiota: Its role in diabetes and obesity. *Diabetes & Primary Care.* 2016; 18: 1-6
101. Kumar M., Babaei P., Ji B., Nielsen J.: Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. *Nutr Healthy Aging.* 2016; 4: 3-16
102. Zijlmans M.A.C., Korpela K., Riksen-Walraven J.M., De Vos W.M., De Weerth C.: Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 53: 233-245
103. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P.: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 14691-14696

104. Stachowicz N., Kiersztan A.: Rola mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości i cukrzycy. *Postępy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 288-303
105. Power S.E., O'Toole P.W., Stanton C., Ross R.P, Fitzgerald G.F.: Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr.* 2014; 111: 387-402
106. Zimmer J., Lange B., Frick J.S., Sauer H., Zimmermann K., Schwartz A., Rusch K., Klosterhalfen S., Enck P.: A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr.* 2012; 66: 53-60
107. Kim K., Gu W., Lee I., Joh E., Kim D.: High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS One.* 2012; 7: 1-11
108. Murphy E.A., Velazquez K.T., Herbert K.M.: Influence of High-Fat-Diet on Gut Microbiota: A Driving Force for Chronic Disease Risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015; 18: 515- 520
109. Biedermann L., Zeitz J., Mwinyi J., Sutter-Minder E., Rehman A., Ott S.J., Steurer-Stey C., Frei A., Frei P., Scharl M., Loessner M.J., Vavricka S.R., Fried M., Schreiber S., Schuppler M., Rogler G.: Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS One.* 2013; 8
110. Clarke S.F., Murphy E.F., O'Sullivan O., Lucey A.J., Humphreys M., Hogan A., Hayes P., O'Reilly M., Jeffery I.B., Wood-Martin R., Kerins D.M., Quigley E., Ross R.P., O'Toole P.W., Molloy M.G., Falvey E., Shanahan F., Cotter P.D.: Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* 2014; 63: 1913-1920
111. Jernberg C., Löfmark S., Edlund C., Jansson J.K.: Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 2007; 1: 56-66
112. Faa G., Gerosa C., Fanni D., Nemolato S., van Eyken P., Fanos V.: Factors influencing the development of a personal tailored microbiota in the neonate, with particular emphasis on antibiotic therapy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26: 35-43
113. M. P. Francin.: Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1543
114. Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P.A., Stobberingh E.E.: Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006; 118: 511-521

115. Żak-Gołąb A., Olszanecka-Glinianowicz M., Kocelak P., Chudek J.: Rola flory jelitowej w patogenezie otyłości. *Postępy Hig Med. Dosw.* 2014; 68: 84-90
116. Zamparelli M.S., Compare D., Coccoli P., Rocco A., Nardone O.M., Marrone G., Gasbarrini A., Grieco A., Nardone G., Miele L.: The Metabolic Role of Gut Microbiota in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 1225-1236
117. Boulangé C.L., Neves A.L., Chilloux J., Nicholson J.K., Dumas M.E.: Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity and metabolic disease. *Genome Med.* 2016; 8: 42-54
118. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam Ch., Vuyyuru H., Sasikala M., Nageshwar D.R.: Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 8787-8803
119. Sharma R., Young Ch., Mshvildadze M. Neu J.: Mikroflora jelit: czy ma znaczenie w chorobach noworodków? *Pediatr Dypl.* 2010; 14: 70-87
120. Drąg J., Goździalska A., Knapik-Czajka M., Matuła A., Jaśkiewicz J.: Nieszczelność jelit w chorobach autoimmunologicznych. *Państwo i Społeczeństwo.* 2017; 4: 133-146
121. Lau E., Carvalho D., Vaz-Pina C., Barbosa J.A., Freitas P.: Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes. *Hormones.* 2015; 14: 358-369
122. Dibaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik-Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E.: Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83: 460-469
123. Yamashita T., Kasahara K., Emoto T., Matsumoto T., Mizoguchi T., Kitano N., Sasaki N., Hirata K.: Intestinal Immunity and Gut Microbiota as Therapeutic Targets for Preventing Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Circ J.* 2015; 79: 1882-1889
124. Schrezenmeir J., De Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 361-364
125. Kubiszewska I., Januszewska M., Rybka J., Gackowska L.: Bakterie kwasu mlekowego i zdrowie: czy probiotyki są bezpieczne dla człowieka? *Postępy Hig Med Dosw.* 2014; 68: 1325-1334
126. Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywn Nauka Technol Jakość.* 2010; 4: 5-19
127. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

- (Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002)
128. Roberfroid M.: Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr.* 2007; 137: 830-837
 129. Szajewska H.: Probiotyki w Polsce – kiedy, jakie i dlaczego? *Gastroenterol Klin.* 2010; 2: 1-9
 130. Zaremba A.: Dobrodziejstwa probiotyków i prebiotyków oraz ich naturalne źródła. *Świat Przemysłu Farm.* 2015; 2: 58-63
 131. Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post Mikrobiol.* 2013; 52: 161-170
 132. Chen S., Zhao Q., Ferguson L.R., Shu Q., Weir I., Garg S.: Development of a novel probiotic delivery system based on microencapsulation with protectants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93: 1447-1457
 133. Mojka K.: Probiotyki, prebiotyki i symbiotyki – charakterystyka i funkcje. *Probl Hig Epidemiol.* 2014; 95: 541-549
 134. Marteau P., Pochart P, Flourié B., Pellier P., Santos L., Desjeux J.F., Rambaud J.C.: Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in human. *Am J Clin Nutr.* 1990; 52: 685-688
 135. Wasilewska E., Złotowska D., Pijagin M.: Rola mikroflory i bakterii probiotycznych w profilaktyce i rozwoju raka jelita grubego. *Postepy Hig Med. Dosw.* 2013; 67: 837-847
 136. Michetti P., Dorta G., Wiesel P.H., Brassart D., Verdu E., Herranz M., Felley C., Porta N., Rouvet M., Blum A.L., Corthésy-Theulaz I.: Effect of Whey-Based Culture Supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* Infection in Humans. *Digestion.* 1999; 60: 203-209
 137. Sanders M.E.: Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr.* 2000; 130: 384-390
 138. Szajewska H., Horvath A., Dziechciarz P.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit – przegląd systematyczny. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żyw Dziec.* 2007; 9: 266-275
 139. Szajewska H., Mrukowicz J.Z.: Skuteczność probiotyków w leczeniu i zapobieganiu alergii pokarmowej – systematyczny przegląd piśmiennictwa. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żyw Dziec.* 2002; 4: 79-83

140. Szajewska H.: Rola probiotyków w zapobieganiu i leczeniu chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żyw Dziec.* 2005; 7: 53-60
141. Ruszczyński M., Szajewska H.: Probiotyki w zapobieganiu biegunce związanej ze stosowaniem antybiotyków – aktualizacja metaanalizy badań z randomizacją. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żyw Dziec.* 2008; 10: 96-104
142. Czerwionka-Szaflarska M., Łoś-Rycharska E.: Co należy wiedzieć o *Lactobacillus reuteri*. *Pediatr Pol.* 2011; 86: 410-420
143. Pokrzywnicka P., Gumprecht J.: Mikrobiota i jej związek z cukrzycą typu 2 i otyłością. *Diabetol Prakt.* 2016; 2: 190-199
144. Andreasen A.S., Larsen N., Pedersen-Skovsgaard T., Berg R.M., Møller K., Svendsen K.D., Jakobsen M., Pedersen B.K.: Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr.* 2010; 104: 1831-1838
145. Lee H.Y., Park J.H., Seok S.H., Baek M.W., Kim D.J., Lee K.E., Paek K.S., Lee Y., Park J.H.: Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761: 736-744
146. Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M., Tsuchida T.: Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J of Clin Nutr.* 2010; 64: 636-643
147. Borriello S.P., Hammes W.P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V.: Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis.* 2003. 36: 775-780
148. Saarela M., Matto J., Mattila-Sandholm T.: Safety Aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species Originating from Human Oro-gastrointestinal Tract or from Probiotic Products. *Microb Ecol Health Dis.* 2002; 14: 234-241
149. <http://radwag.com/pl/>
150. <https://www.techmed.pl/>
151. <http://www.mistrymedical.com/>
152. http://www.micromedical.co.uk/downloads/manuals/PulseTrace_PCA2.pdf
153. http://www.ptkd.pl/Ocena_sztynosci_naczyn/175/1/
154. https://www.angioscan.ru/attachments/PulseTrace_PCA_Brochure.pdf

155. Van Hemert S., Ormel G.: Influence of the Multispecies Probiotic Ecologic® BARRIER on Parameters of Intestinal Barrier Function. *Food and Nutrition Sciences*. 2014; 5: 1739-1745
156. Zdjęcie autorskie
157. Tofighian T., Kooshki A., Hoseini B.L., Mohammadi M.: The effects of Probiotic On Serum Lipid Profiles in Patients with type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Clinical Trial. *J Food Nutr Res*. 2016; 4: 795-798
158. Ejtahed H., Mohtadi Nia, J., Homayouni Rad A., Niafar M., Asghari Jafarabadi M., Mofid V.: The effects of probiotic yoghurt consumption on blood pressure and serum lipids in type 2 diabetic patients: Randomized clinical trial. *Iranian J Nutr Sci Food Tech*. 2012; 6: 1-12
159. Rajkumar H., Mahmood N., Kumar M., Varikuti S.R, Challa H.R, Myakala S.P.: Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators of Inflamm*. 2014; 2014: 1-8
160. Greany K.A., Bonorden M.J., Hamilton-Reeves J.M., McMullen M.H., Wangen K.E., Phipps W.R., Feirtag J., Thomas W., Kurzer MS.: Probiotic capsules do not lower plasma lipids in young women and men. *Eur J Clin Nutr*. 2008; 62: 232-237
161. Ivey K.L., Hodgson J.M., Kerr D.A., Thompson P.L., Stojceski B., Prince R.L.: The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015; 25: 46-51
162. Rezaei M., Sanagoo A., Jouybari L., Behnampoo N., Kavosi A.: The Effect of Probiotic Yogurt on Blood Glucose and cardiovascular Biomarkers in Patients with Type II Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Evidence Based Care Journal*; 2016; 64: 26-35
163. Ahmadi S., Jamilian M., Karamali M., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Taghizadeh M., Memarzadeh M.R., Asemi Z.: Probiotic supplementation and the effects on weight loss, glycemia and lipid profiles in woman with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Fertil*. 2017; 20: 254-261
164. Ejtahed H.S., Mohtadi-Nia J., Homayouni-Rad A., Niafar M., Asghari-Jafarabadi M., Mofid V.: Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2012; 28: 539-543

165. Zhang Q., Wu Y., Fei X.: Effect of probiotics on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicina (Kaunas)*. 2016; 52: 28-34
166. Sepideh A., Karim P., Hossein A., Leila R., Hamdollah M., Mohammad E G., Mojtaba S., Mohammad S., Ghader G., Seyed Moayed A.: Effects of Multistrain Probiotic Supplementation on Glycemic and Inflammatory Indices in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Nutr*. 2016; 35: 500-505
167. Ivey K.L., Hodgson J.M., Kerr D.A., Lewis J.R., Thompson P.L., Prince R.L.: The effects of probiotic bacteria on glycaemic control in overweight men and women: a randomised controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2014; 68: 447-452
168. Yadav H., Jain S., Sinha P.R.: Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*. 2007; 231: 62-68
169. Jafarnejad S., Saremi S., Jafarnejad F., Arab A.: Effects of a Multispecies Probiotic Mixture on Glycemic Control and Inflammatory Status in Women with Gestational Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Nutr Metab*. 2016; 2016
170. Kuśmierska A., Fol M.: Właściwości immunomodulacyjne i terapeutyczne drobnoustrojów probiotycznych. *Probl Hig Epidemiol*. 2014, 95: 529-540
171. Mohamadshahi M., Veissi M., Haidari F., Shahbazian H., Kaydani G.A., Mohammadi F.: Effects of probiotic yogurt consumption on inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes. *BioImpacts*. 2014; 4: 83-88
172. Vaghef-Mehrabany E., Alipour B., Homayouni-Rad A., Sharif S.K., Asghari-Jafarabadi M., Zavvari S.: Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*. 2014; 30: 430-435
173. Hatakka K., Martio J., Korpela M., Herranen M., Poussa T., Laasanen T., Saxelin M., Vapaatalo H., Moilanen E., Korpela R.: Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis – a pilot study. *Scand J Rheumatol*. 2003; 32: 211-215
174. Trojan N., Satora P.: Probiotyki i ich potencjalne właściwości antyoksydacyjne. *Post Mikrobiol*. 2017; 56: 18-27
175. Kleniewska P., Hoffmann A., Pniewska E., Pawliczak R.: The influence of Probiotic *Lactobacillus casei* in Combination with Prebiotic Inulin on the Antioxidant Capacity of Human Plasma. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016

176. Asemi Z., Zare Z., Shakeri H., Sabihi S.S., Esmailzadeh A.: Effect of Multispecies Probiotic Supplements on Metabolic Profiles, hs-CRP, and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes. *Ann Nutr Metab.* 2013; 63: 1-9
177. Badehnoosh B., Karamali M., Zarrati M., Jamilian M., Bahmani F., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Rahmani E., Asemi Z.: The effects of probiotic supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *J Mater Fetal Neonatal Med.* 2018; 31: 1128-1136
178. Tonucci L.B., Olbrich dos Santos K.M., Licursi de Oliveira L., Rocha Ribeiro S.M., Duarte Martino H.S.: Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr.* 2017; 36: 85-92
179. Vaghef-Mehrabany E., Homayouni-Rad A., Alipour B., Sharif S.K., Vaghef-Mehrabany L., Alipour-Ajiry S.: Effects of Probiotic Supplementation on Oxidative Stress Indices in Woman with Rheumatoid Arthritis: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *J Am Coll Nutr.* 2016; 35: 291-299
180. Barreto F.M., Colado Simão A.N., Morimoto H.K., Batisti Lozovoy M.A., Dichi I., Helena da Silva Miglioranza L.: Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition.* 2014; 30: 939-942
181. Valentini L., Pinto A., Bourdel-Marchasson I., Ostan R., Brigidi P., Turrone S., Hrelia S., Hrelia P., Bereswill S., Fischer A., Leoncini E., Malaguti M., Blanc-Bisson C., Durrieu J., Spazzafumo L., Buccolini F., Pryen F., Donini LM., Franceschi C., Lochs H.: Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota – The "RISTOMED project": Randomized controlled trial in healthy older people. *Clin Nutr.* 2015; 34: 593-602
182. Sybesma W., Starrenburg M., Tijsseling L., Hoefnagel M.H.N., Hugenholtz J.: Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 4542-4548
183. Rossi M., Amaretti A., Raimondi S.: Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients.* 2011; 3: 118-134
184. Karlsson F.H., Fak F., Nookaew I., Tremaroli V., Fagerberg B., Petranovic D., Bäckhed F., Nielsen J.: Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012; 3: 1245

185. Kashtanova D., Tkacheva O., Popenko A., Egshatyan L., Tyakht A., Alexeev D., Kotovskaya Y., Plokhova E., Boytsov S.: Gut microbiota and vascular biomarkers in patients without clinical cardiovascular diseases. *Artery Res.* 2017; 18: 41-48