



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023 r.



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Monika Prylińska-Jaśkowiak

**Analiza mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem
przewlekłego zmęczenia (ang. *myalgic encephalomyelitis/ chronic
fatigue syndrome, ME/CFS*)**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor:

Prof. dr hab. Paweł Zalewski

Promotor pomocniczy:

Dr Sławomir Kujawski

Bydgoszcz 2023r.

*Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi,
Panu prof. dr hab. Pawłowi Zalewskiemu,
za umożliwienie rozwoju naukowego
i pomoc na każdym etapie pracy oraz za poświęcony czas i życzliwość.*

*Dziękuję również mojemu Promotorowi pomocniczemu,
Panu dr Sławomirowi Kujawskiemu,
za poświęcony czas i cenne uwagi merytoryczne.*

*Z całego serca dziękuję Mojemu Mężowi i Rodzinie
za nieocenione wsparcie i okazaną pomoc.*

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	7
I.1. Wprowadzenie	7
I.2. Zespół przewlekłego zmęczenia	8
I.2.1. Definicja i terminologia	8
I.2.2. Rys historyczny	9
I.2.3. Epidemiologia	11
I.2.4. Przebieg naturalny i czynniki etiologiczne	12
I.2.4.1. Faza przedkliniczna	15
I.2.4.2. Faza objawów zwiastunowych	18
I.2.4.3. Wczesna faza choroby	19
I.2.4.4. Utrwalona faza choroby	20
I.2.4.5. Zmiany narządowe w utrwalonej fazie choroby	20
I.2.4.6. Zaawansowana faza choroby	29
I.2.5. Symptomatologia zespołu przewlekłego zmęczenia	29
I.2.5.1. Zmęczenie	30
I.2.5.2. Powysiłkowe nasilenie zmęczenia	31
I.2.5.3. Dysautonomia	32
I.2.5.4. Zaburzenia funkcji poznawczych	32
I.2.5.5. Zaburzenia snu	33
I.2.5.6. Ból	34
I.2.5.7. Inne objawy	35
I.2.6. Diagnostyka ME/CFS	36
I.3. Strategie leczenia zespołu przewlekłego zmęczenia	46
I.3.1. Leczenie nefarmakologiczne	46
I.3.2. Leczenie farmakologiczne	47
I.4. Mikrobiota	49
I.4.1. Wprowadzenie	49
I.4.2. Definicje	50
I.4.3. Metody sekwencjonowania mikrobioty	52
I.4.4. Mikrobiota – charakterystyka ogólna	53
I.4.5. Zróżnicowanie mikrobioty na różnych piętrach przewodu pokarmowego	56
I.4.6. Znaczenie mikrobioty przewodu pokarmowego dla organizmu człowieka	60
I.4.7. Potencjalny związek między zaburzeniami składu mikrobiomu jelitowego a funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego i rozwojem ME/CFS	63
I.4.8. Dysbioza jelitowa w zespole przewlekłego zmęczenia	73

I.5. Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego.....	75
II. CELE PRACY, HIPOTEZY BADAWCZE	77
III. MATERIAŁ I METODY	78
III.1. Materiał.....	78
III.1.1. Schemat badania.....	78
III.1.2. Kwalifikacja do grupy badanej.....	79
III.1.3. Kwalifikacja do grupy kontrolnej.....	79
III.1.4. Protokół pobrania próbek do badania	80
III.2. Metody	81
III.2.1. Metody oceny nasilenia zmęczenia	81
III.2.2. Metody oceny autonomicznego układu nerwowego	81
III.2.3. Metody oceny funkcji poznawczych	82
III.2.4. Metody oceny mikrobiomu jelitowego.....	83
III.2.4.1. Ocena różnorodności mikrobiomu jelitowego.....	83
III.2.4.2. Ocena liczebności mikrobiomu jelitowego	84
III.2.5. Analiza statystyczna	84
IV. WYNIKI.....	89
IV.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej.....	89
IV.2 Analiza jakościowa objawów ME/CFS na podstawie kryteriów Fukudy	89
IV.3. Wyniki dotyczące składu ilościowego mikrobiomu jelit	93
IV.3.1. Wskaźniki różnorodności i równomierności Shannona	93
IV.3.2. Liczba jednostek OTU.....	94
IV.3.3. Liczba wariantów sekwencji ASV	96
IV.4. Wyniki dotyczące składu jakościowego mikrobiomu jelit.....	96
IV.4.1. Charakterystyka taksonomiczna mikrobiomu	96
IV.4.2. Analiza porównawcza składu jakościowego mikrobiomu stolca u pacjentów z ME/CFS i u zdrowych osób z grupy kontrolnej.....	98
IV.4.3. Porównanie obfitości wybranych wariantów sekwencji ASV wśród pacjentów z CFS w porównaniu do grupy kontrolnej	100
IV.4.4. Porównanie ważności wybranych wariantów sekwencji ASV wśród pacjentów z CFS w porównaniu do grupy kontrolnej	101
IV.5. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, ze względu na płeć i wiek.	102
IV.5.1. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej.....	102
IV.5.2. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć.....	103

IV.5.3. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wiek	104
IV.6. Porównanie skuteczności modeli uczenia się maszynowego w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej	105
IV. 6.1. Porównanie wydajności modelu losowego drzewa klasyfikacyjnego w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej	106
IV. 6.2. Porównanie wydajności modelu maszyny wektorów nośnych w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.....	107
IV. 6.3. Porównanie wydajności modelu sieci neuronowej w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej	107
IV.7. Porównanie wyników analizy sieciowej dla sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.....	108
IV.8. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego i poziomu zmęczenia.....	113
IV.8.1. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego.....	113
IV.8.2. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania poznawczego.....	114
IV.8.3. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od poziomu zmęczenia mierzonego przy użyciu skali FIS.....	116
IV.8.4. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od poziomu zmęczenia mierzonego przy użyciu skali FSS	117
V. DYKUSJA	119
VI. WNIOSKI	158
VII. PODSUMOWANIE I OGRANICZENIA PRACY	159
VIII. STRESZCZENIE	162
VIII.1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	162
VIII.2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	165
IX. PIŚMIENNICTWO	168
XI. SPIS RYCIN	196
XII. ANEKS	198
XII.1. Wykaz skrótów	198
XII.2. Skale zmęczenia	204
XII.2.1. Skala Oceny Wpływu Zmęczenia.....	204
XII.2.2. Skala Oceny Nasilenia Zmęczenia	206
XII.3. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	207

I. WSTĘP

I.1. Wprowadzenie

Zmęczenie jest częstym przedmiotem skarg pacjentów. Występuje ono zazwyczaj jako jeden z objawów w różnych jednostkach chorobowych, jednak czasem nasila się do tego stopnia, że dominuje w obrazie klinicznym. Zespół przewlekłego zmęczenia (ZPZ; ang. *myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome*, ME/CFS) charakteryzuje się nieuzasadnionym poczuciem stałego lub nawracającego zmęczenia, nieadekwatnego do wykonanego wysiłku, któremu towarzyszą dodatkowe objawy. ME/CFS występuje niezależnie od wieku, częściej u kobiet niż mężczyzn, a objawy fizycznej niepełnosprawności prowadzą do zmniejszenia dotychczasowej aktywności społecznej i zawodowej i powodują znaczne obniżenie jakości życia pacjentów i ich rodzin [1–4].

W ciągu ostatnich kilku dekad zainteresowanie klinicystów i badaczy tą jednostką chorobową znacznie się zwiększyło, co skutkuje wzrostem ilości badań naukowych na temat ME/CFS. Jednak mimo to, etiologia choroby nadal nie jest w pełni wyjaśniona, nie opracowano też swoistego markera biologicznego użytecznego w wczesnym etapie diagnostyki ME/CFS, ani skutecznego leczenia przyczynowego tej choroby [4]. Wśród potencjalnych przyczyn zespołu przewlekłego zmęczenia wymienia się między innymi czynniki infekcyjne, immunologiczne, predyspozycje genetyczne, czy uszkodzenie mitochondriów [5,6], a także zaburzenia homeostazy mikrobiomu przewodu pokarmowego [1].

Spośród różnych przedziałów ludzkiego mikrobiomu najlepiej dotychczas poznany został mikrobiom jelitowy. Umożliwił to rozwój metod badawczych opierających się na rozpoznawaniu sekwencji genu 16S rRNA. Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań dotyczących składu mikrobiomu jelitowego u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia i nie udało się jak dotąd jednoznacznie potwierdzić związku między zaburzeniami homeostazy mikrobiomu, a rozwojem ME/CFS.

W swojej pracy podjęłam się analizy mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia, co ma duże znaczenie w uzupełnieniu wiedzy na temat etiologii i patogenez tej choroby, a także może przyczynić się do poprawy jej diagnostyki oraz stać się potencjalnym punktem uchwytu w terapii tego schorzenia. Przeprowadzone badanie może przyczynić się w przyszłości do opracowania nowych metod prewencji, diagnostyki i leczenia zespołu przewlekłego zmęczenia.

I.2. Zespół przewlekłego zmęczenia

I.2.1. Definicja i terminologia

Zespół przewlekłego zmęczenia (ZPZ; ang. *myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome*, ME/CFS) jest to ciężka, wieloukładowa choroba przewlekła, która charakteryzuje się występowaniem nieuzasadnionego, stałego lub nawracającego uczucia zmęczenia u osoby negującej podobne objawy w przeszłości. Poza zajęciem układu neurologicznego, dotyka także układy odpornościowy i hormonalny, prowadzi do zaburzenia komórkowego metabolizmu energetycznego i transportu jonów [3]. Do objawów ME/CFS należą: upośledzona tolerancja wysiłku, bóle głowy, bóle stawów, zaburzenia pamięci i koncentracji, objawy grypopodobne, nadmierna senność lub bezsenność [3,7].

Tę jednostkę chorobową można znaleźć w literaturze pod kilkoma nazwami, m. in. zespół przewlekłego zmęczenia (ZPZ; ang. *chronic fatigue syndrome*, CFS), encefalopatia bólowa (ang. *myalgic encephalomyelitis*, ME), powirusowy zespół zmęczenia (ang. *post-viral fatigue syndrome*, PVFS), czy ogólnoustrojowa nietolerancja wysiłku (ang. *systemic exertion intolerance disease*, SEID).

Początkowo do nazewnictwa wprowadzono termin encefalopatia bólowa (ang. *myalgic encephalomyelitis*, ME), aby podkreślić główne objawy, takie jak: nietolerancja wysiłku, objawy neurologiczne i dysfunkcja autonomiczna. Nazwa miała odzwierciedlać przypuszczenia dotyczące udziału układu nerwowego w patogenezie choroby. Nietolerancja wysiłku, nazywana również powysiłkowym nasileniem zmęczenia (ang. *post-exertional malaise*, PEM), rozumiana jest jako narastanie zmęczenia, z osłabieniem i tklivością mięśni, pojawiające się po wysiłku fizycznym lub umysłowym, który był wcześniej dobrze tolerowany przez pacjenta, trwające min. 24 godziny lub dłużej [8]. Zaburzenia neurologiczne obejmują osłabienie pamięci krótkotrwałej, pogorszenie koncentracji, zaburzenia funkcji poznawczych, zwiększoną drażliwość, dezorientację czy zaburzenia percepcji [8]. Natomiast do objawów dysfunkcji układu autonomicznego zaliczamy: hipotensję, tachykardię ortostatyczną, kołatanie serca, arytmie, zawroty głowy, zaburzenia równowagi, nietolerancję ciepła lub zimna, nadwrażliwość na zmiany temperatury, czy zespół Raynaud'a [8].

Z kolei nazwa zespół przewlekłego zmęczenia (ang. *chronic fatigue syndrome*, CFS), zyskała większą aprobatę, ponieważ nie sugeruje ona przypuszczeń co do przyczyny choroby. Do objawów CFS zalicza się: powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM), osłabienie koncentracji i/lub pamięci krótkotrwałej, nazywane „mgłą mózgową” (ang. *„brain fog”*), prowadzące do

redukcji dotychczasowej aktywności pacjenta, bóle gardła, bolesne powiększenie węzłów chłonnych, najczęściej szyjnych lub pachowych, bóle głowy o nowym charakterze, zaburzenia snu, dolegliwości bólowe obejmujące mięśnie lub stawy, bez ich obrzęku lub zaczerwienienia. [3,8]

Biorąc pod uwagę liczne kontrowersje dotyczące nazewnictwa, terminologii i kryteriów rozpoznania ME/CFS, dla celów naukowych konieczne jest dokładne sprecyzowanie użytej definicji i kryteriów diagnostycznych zespołu przewlekłego zmęczenia. W niniejszej pracy zastosowano termin ME/CFS, a kwalifikację do badania oparto na podstawie kryteriów Fukudy oraz kryteriów ME/ICC, co jest zgodne z aktualnymi publikacjami naukowymi dotyczącymi zespołu przewlekłego zmęczenia.

I.2.2. Rys historyczny

Pierwsze doniesienia w literaturze na temat ME/CFS pochodzą z 1930r. i dotyczą pacjentów z objawami neurastenii, leczonych w szpitalu w Los Angeles [9,10]. Objawy grypopodobne, poprzedzające występowanie przewlekłego zmęczenia, sprawiły, że jako etiologię podejrzewano wówczas przyczyny infekcyjne [9]. Kolejne opisy przypadków opisano w 1956r. w *The Lancet*. Dotyczyły one 55 pracowników ochrony zdrowia, hospitalizowanych w 1955r. w londyńskim *Royal Free Hospital* z powodu zmęczenia, znużenia, bólów i zawrotów głowy, bólów kostno-stawowych, bólów gardła, parestezji, zaburzeń neurosensorycznych. Zauważono wówczas, że u części tych pacjentów wystąpienie objawów poprzedzone było infekcją dróg oddechowych, a ponadto niektórym z nich towarzyszyły nasilone objawy gastroenterologiczne [11,12]. W 1959 roku zaczęto używać nazwy „*benign myalgic encephalomyelitis*” (łagodna encefalopatia bólowa), aby podkreślić możliwą etiologię zapalną choroby i zwrócić uwagę na objawy ze strony układu mięśniowego i nerwowego [12]. Ze względu na brak wyjaśnienia organicznej etiologii choroby oraz sprecyzowania kryteriów rozpoznawania ME/CFS, w latach 70. XX wieku postulowano podłoże psychologiczne lub psychiatryczne [12].

W 1986 roku dr Melvin Ramsay [11], konsultant chorób zakaźnych w *Royal Free Hospital*, przeprowadził dokładną analizę objawów zespołu przewlekłego zmęczenia, opublikował pierwsze kryteria diagnostyczne i zaproponował pierwszą definicję tej choroby, nazywaną potem definicją Ramsay'a. W swojej pracy podzielił on objawy ME/CFS na te występujące na początku choroby oraz w jej zaawansowanej fazie, a także wyróżnił objawy

osiowe (przewlekłe, głębokie uczucie zmęczenia) oraz towarzyszące (ból i zawroty głowy, ból gardła, parestezje, nadwrażliwość na dźwięki, szumy uszne). Objawy pojawiające się w przewlekłej fazie choroby podzielił dodatkowo na te dotyczące mięśni (ból mięśni, męczliwość, niesprawność), ośrodkowego układu nerwowego (osłabienie koncentracji oraz pamięci, chwiejność emocjonalna, nadwrażliwość na dźwięki), układu krążenia (oziębienie kończyn, bladość powłok skórnych) i objawy wynikające z zaburzeń autonomicznego układu nerwowego (takie jak zwiększenie częstości oddawania moczu, nadmierną potliwość, tachykardię ortostatyczną) [2,11–13].

W 1987 roku amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (ang. *Center for Disease Control and Prevention, CDC*) zwołało grupę roboczą celem osiągnięcia konsensusu dotyczącego nomenklatury i kryteriów rozpoznawania tej choroby. Uznano, że termin „*myalgic encephalomyelitis*” (ME) odnosi się do patofizjologii choroby, czyli stanu zapalnego w obrębie mózgowia i rdzenia kręgowego, który nie został jednak jednoznacznie potwierdzony. Stąd zdecydowano się na utworzenie nowej nazwy – zespół przewlekłego zmęczenia – *chronic fatigue syndrome* (CFS). Był to początek wprowadzenia wspólnego terminu ME/CFS, który w literaturze naukowej funkcjonuje do dzisiaj i jest akceptowany na całym świecie [2,12,14].

W 1994 roku w Wielkiej Brytanii wprowadzono po raz pierwszy ustrukturyzowane kryteria diagnostyczne dla ME/CFS, tzw. kryteria londyńskie, sformułowane w dużej mierze w oparciu o pracę dr Ramsey’ a [2,15]. W późniejszym okresie 1994 roku Fukuda i współpracownicy, zgromadzeni w ramach grupy roboczej przy Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób, zaproponowali nowy protokół kliniczno-badawczy, w celu ujednoczenia i zintegrowania kryteriów diagnostycznych ME/CFS, znany pod nazwą kryteriów Fukudy [12,16]. Kryteria Fukudy są do dzisiaj szeroko używane do rozpoznawania ME/CFS dla celów badawczych i klinicznych [3,12]. W kolejnych latach powstało jeszcze około 20 innych kryteriów diagnostycznych ME/CFS [3,17]. Najważniejsze z nich zostały omówione w rozdziale I.2.6., dotyczącym diagnostyki ME/CFS.

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization, WHO*) w 1969 roku uznała zespół przewlekłego zmęczenia za chorobę neurologiczną. W 2016 roku ME/CFS został uwzględniony w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10 (ang. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*), pod numerem G93.3 [3,12].

I.2.3. Epidemiologia

Częstość występowania ME/CFS różni się w zależności od użytej definicji, metodologii badania czy badanej populacji. Szacuje się, że ME/CFS występuje u 2-4 na 1000 osób dorosłych (0,2-0,4%), co oznacza, że w samej Wielkiej Brytanii żyje od 150 000 do 250 000 osób dorosłych z zespołem przewlekłego zmęczenia [2,3]. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych przez Nacula i wsp. w Wielkiej Brytanii w 2011 roku wśród pacjentów pomiędzy 18. a 64. rokiem życia, oszacowano, że wg kryteriów kanadyjskich (CDC) rozpoznanie ME/CFS można było postawić u 0,20% pacjentów, a roczna zapadalność została określona na 0,015% [18]. Szacuje się, że nawet około 90% chorych nie zostało jeszcze prawidłowo zdiagnozowanych. W związku z tym dokładna chorobowość ME/CFS pozostaje nieznana. Zakłada się, że może być nawet kilkukrotnie wyższa niż pokazują obecne statystyki [19].

Dotychczas nie zebrano dokładnych danych epidemiologicznych dotyczących częstości występowania ME/CFS w Polsce. Badania Słomko i wsp. z 2019 roku [20] sugerują, że w Polsce częstość występowania ME/CFS może być podobna do populacji innych krajów i stanowić istotny problem kliniczny. Warto podkreślić, że tylko około 5% pacjentów, zgłaszających przewlekłe zmęczenie jako swoją główną dolegliwość, spełniało kryteria rozpoznania zespołu przewlekłego zmęczenia. Należy pamiętać, że zmęczenie towarzyszy dużej liczbie chorób przewlekłych (m.in. niewydolności serca, nowotworom), a co więcej, może być istotnym objawem innych jednostek chorobowych (m.in. stwardnienia rozsianego, miastonii, niedoczynności tarczycy). Świadczy to o potrzebie przeprowadzenia dokładnej diagnostyki różnicowej i wykluczenia innych stanów chorobowych u pacjentów z podejrzeniem zespołu przewlekłego zmęczenia, co omówiono dokładnie w rozdziale I.2.5., dotyczącym diagnostyki ME/CFS [20].

ME/CFS stanowi chorobę występującą endemicznie, na całym świecie, dotykającą wszystkie grupy rasowe i etniczne, jest widoczne we wszystkich warstwach społeczno-gospodarczych [3]. Może dotyczyć wszystkich grup wiekowych, a szczyty zachorowalności obserwuje się u pacjentów w wieku pomiędzy trzynastym a piętnastym oraz dwudziestym a czterdziestym rokiem życia [3].

Większość badań dotyczących różnic występowania zespołu ME/CFS pomiędzy płciami wskazuje na częstsze występowanie u kobiet, nawet około 3 razy częściej [3]. Odnotowano częstsze występowanie zespołu przewlekłego zmęczenia u krewnych pierwszego stopnia,

m.in. u par bliźniąt heterozygotycznych prawdopodobieństwo wystąpienia ME/CFS u drugiego bliźniaka wzrasta o 11%, a w parach bliźniąt monozygotycznych o 38% [21,22].

Mediana czasu trwania choroby wynosi około siedem lat, a 25% chorych staje się z tego powodu osobami niepełnosprawnymi lub bezrobotnymi, szacuje się, że przeciętna rodzina, w której jeden z domowników zapada na ME/CFS traci z tego powodu około 20 000 USD z rocznych zarobków [2,23].

Rokowanie pacjentów z ME/CFS jest zmienne. Częściej obserwuje się okresy remisji lub zmniejszenia nasilenia objawów, niż pełnego wyzdrowienia [24]. Do czynników ryzyka ciężkiego przebiegu zespołu przewlekłego zmęczenia można zaliczyć: podeszły wiek, duże nasilenie objawów w momencie zachorowania, opóźnione rozpoznanie choroby, słabą odpowiedź na zastosowane leczenie objawowe, posiadanie krewnego pierwszego stopnia z rozpoznaniem zespołem i nakładanie się fibromialgii [25,26].

Jest bardzo mało doniesień naukowych na temat śmiertelności w zespole przewlekłego zmęczenia. Niektóre badania zwracają uwagę na zwiększone ryzyko samobójstw u pacjentów z ME/CFS [3], natomiast badania McManimen'a i wsp. potwierdziły możliwość wcześniejszego zgonu w ME/CFS, na który wpływ może mieć inna choroba współistniejąca, najczęściej nowotworowa lub sercowo-naczyniowa [27].

I.2.4. Przebieg naturalny i czynniki etiologiczne

Wiele przeprowadzonych badań nad możliwą patogenezą zespołu przewlekłego zmęczenia sugeruje, że jest to choroba kilkietapowa, obejmująca czynniki predysponujące (czynniki genetyczne, środowiskowe), wyzwalające (czynniki spustowe, m. in. infekcję najczęściej wirusową, ekspozycje na toksyny, zabieg operacyjny, sytuację stresową) oraz utrwalające objawy (czynniki immunologiczne, zaburzenia w pracy OUN, mięśni i mitochondriów) [4]. Tak jak każda choroba przewlekła, ME/CFS ma swoją naturalną historię – różne fazy choroby. Nacul i wsp. [28] wysunęli hipotezę na temat przebiegu ME/CFS. Autorzy wyodrębnili 5 stadiów zespołu przewlekłego zmęczenia, rozpoczynając od stadium przedklinicznego (predyspozycje do rozwinięcia choroby), przechodząc po kolei przez moment zainicjowania choroby, okres objawów zwiastunowych (prodromalnych), wczesną fazę choroby, aż do pełnoobjawowej manifestacji klinicznej (Tabela 1.) [28].

Tabela 1. Przebieg naturalny ME/CFS wg Nacula i wsp. [28] w modyfikacji własnej

Czas trwania	Brak choroby	Początek	0-4 miesiące	4-24 miesiące*	> 24 miesiące**
Stadium	Stadium przedkliniczne- (predyspozycja)	Czynnik inicjujący (spustowy)	Okres zwiastunowy (prodromalny)	Stadium wczesnej choroby	Stadium utrwalonej choroby
Obraz kliniczny	Brak objawów	Objawy nieswoiste	Zespół objawów związany ze zmęczeniem***	Zespół objawów związanych ze zmęczeniem o różnej symptomatologii, postępujący	Lekka, umiarkowana i ciężka, a także powikłana choroba
Możliwości profilaktyki	Prewencja pierwotna	Leczenie czynnika spustowego oraz prewencja wtórna	Prewencja wtórna	Leczenie i prewencja wtórna	Leczenie i prewencja trzeciorzędowa
Możliwości leczenia	-	-	Prawdopodobne	Możliwe	Mało prawdopodobne
Patomechanizm	Czynniki predysponujące	Niespecyficzna odpowiedź osobnicza i swoista dla czynnika sprawczego	Neuroimmunologiczna odpowiedź na czynnik sprawczy oraz walka o przywrócenie homeostazy	Proces zapalny w obrębie układu nerwowego i konsekwencje ogólnoustrojowe (zaburzenie homeostazy)	Choroba ogólnoustrojowa, zaburzenie homeostazy

* 3-6 miesięcy jest powszechnie uznawane za minimalny czas trwania objawów, po którym można postawić diagnozę (odpowiednio u dzieci i dorosłych, w zależności od przyjętych kryteriów diagnostycznych)

** 2 lata są uznawane za granicę pomiędzy chorobą o krótkim i długim czasie trwania, jednak jej stosowanie jako definicji choroby utrwalonej jest kontrowersyjne, gdyż zależy od wielu czynników osobniczych, w tym odpowiedzi organizmu na chorobę wczesną

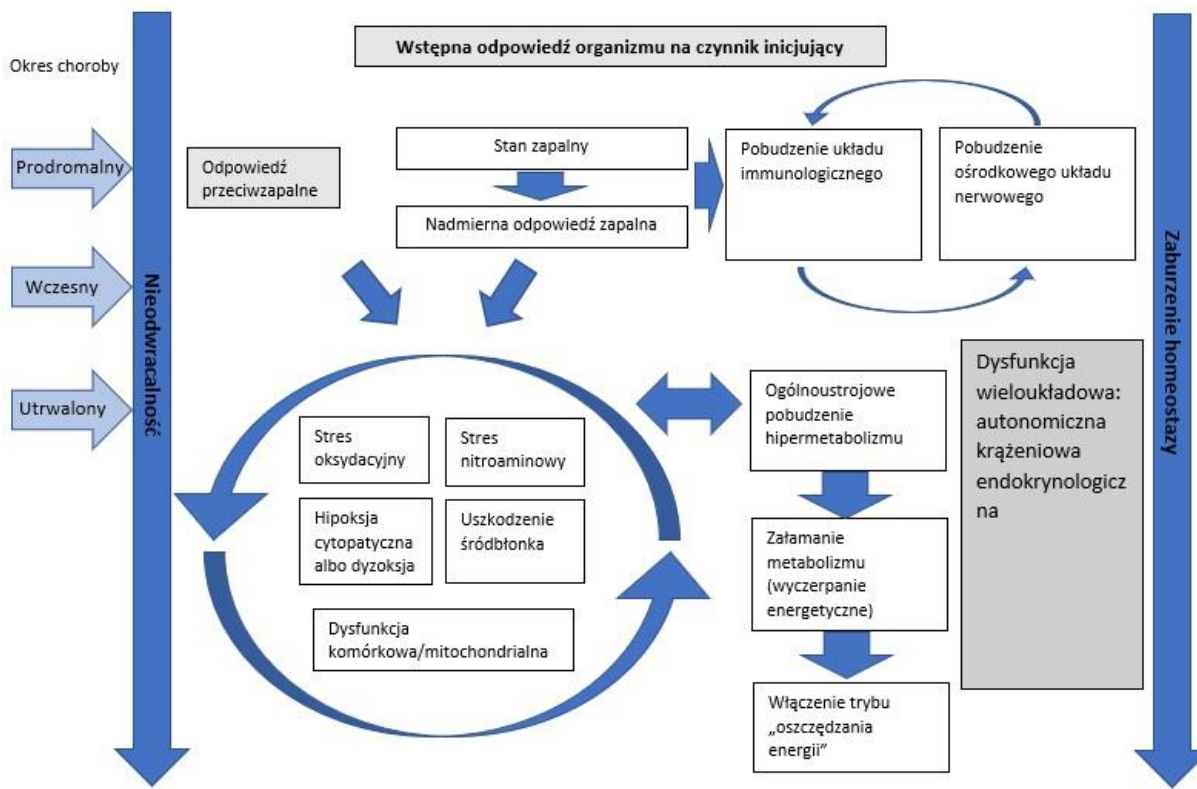
*** Zespół objawów związanych ze zmęczeniem – początkowo objawy neuroimmunologiczne oraz różne objawy ogólnoustrojowe w chorobie utrwalonej

Model powstania choroby zaproponowany przez Nacula i wsp. [28] zakłada, że u osoby predysponowanej, w odpowiedzi na czynnik inicjujący, dochodzi do powstania reakcji zapalnej, uwolnienia cytokin, polipeptydów, co z kolei aktywuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) i zwiększa napięcie układu współczulnego, przyczyniając się do zmian metabolicznych oraz do zwiększonego wydatku

energetycznego. Reakcja zapalna w organizmie wywołuje odpowiedź mechanizmów przeciwzapalnych za pomocą odpowiednich mediatorów. Wyleczenie i pomyślne rokowanie długoterminowe zależy najczęściej od odpowiedniej równowagi pomiędzy tymi dwoma mechanizmami [28].

Na skutek aktywacji komórek układu odpornościowego, nerwowego czy endokrynnego dochodzi do licznych zmian patofizjologicznych prowadzących m. in. do powstania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) oraz azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS). Skutkuje to m. in. zwiększeniem przepuszczalności śródbłonna, zwiększonym napływem komórek zapalnych, agregacją płytek krwi poprzez uwalnianie czynników wazodylatacyjnych m. in. tlenku azotu i prostacyklin. Prowadzi to do względnej hipowolemii, zmniejszonego przepływu krwi przez kapilary, powstawania mikrozakrzepów. W konsekwencji tego dochodzi do niedotlenienia komórek i zwiększonego wydatkowania ATP (adenozynotryfosforan). W warunkach fizjologicznych, u osób które nie rozwiną ME/CFS, początkowe zmiany w organizmie zachodzące w wyniku infekcji, urazu czy stresu zostają szybko przywrócone do stanu homeostazy, czyli równowagi pomiędzy fizjologicznymi procesami organizmu. U osób z ME/CFS dochodzi do nieprawidłowej odpowiedzi na bodziec i powstania stanu tzw. „allostazy” (proces adaptacyjny mający na celu przywrócenie homeostazy po zadziałaniu silnego czynnika stresowego na organizm, co może prowadzić do wyczerpania energetycznego i przeciążenia organizmu) i nieodwracalnych zmian narządowych. Koncepcję etiologiczną powstania ME/CFS przedstawiono na Rycinie 1. [28].

Na chwilę obecną nie udało się udowodnić jednoznacznej przyczyny rozwoju ME/CFS [3,29]. Brak wyjaśnienia etiologii i patogenezы tej choroby oraz brak markera biologicznego, prowadzi często do opóźnienia diagnozy ME/CFS o wiele miesięcy lub lat. Stwarza to problemy w odtworzeniu szczegółów na temat początku rozwoju choroby, a stwierdzone u pacjentów zmiany narządowe mogą być wtórne i powstać już w przebiegu trwania choroby [1,3]. Dodatkowo opisany poniżej przebieg naturalny ME/CFS, uwzględniający następujące po sobie zaburzenia i objawy kliniczne, stanowi pewnego rodzaju podział sztuczny. W rzeczywistości zjawiska te przebiegają w organizmie w sposób ciągły, często jednocześnie, a przewaga poszczególnych dysfunkcji może być różna w czasie i indywidualna dla każdego pacjenta [28]. Jednak taki podział ułatwia zrozumienie patomechanizmu i rozwoju choroby, umożliwia zakwalifikowanie danego pacjenta do określonego stadium rozwoju choroby i może przyczynić się do ułatwienia i ujednolicenia prowadzonych badań naukowych.



Rycina 1. Hipotetyczny model patogenezy ME/CFS zaproponowany przez Nacula i wsp. [28] w modyfikacji własnej

I.2.4.1. Faza przedkliniczna

Czynniki predysponujące do ME/CFS to między innymi predyspozycje genetyczne, środowiskowe oraz płeć żeńska. Istnieje wiele badań sugerujących, że czynniki genetyczne mogą odgrywać rolę w patogenezie ME/CFS [21,22]. Geny warunkują sposób odpowiedzi układu immunologicznego na czynnik stresowy, u niektórych osób możemy więc mówić o genetycznej podatności, czyli o predyspozycji do rozwoju takiej odpowiedzi zapalnej organizmu, która niejako wymyka się mechanizmom regulatorowym i poprzez kaskadę reakcji doprowadza do rozwoju objawów choroby. Niektóre badania sugerują, że w mechanizmie tym uczestniczą między innymi geny związane z HLA typu II (ang. *human leucocyte antigen class II*) [30].

Osoby, u których występuje połączenie specyficznych, predysponujących czynników genetycznych oraz środowiskowych mogą w odpowiedzi na określony czynnik inicjujący zareagować rozwojem zespołu przewlekłego zmęczenia. Jako najczęstszy czynnik spustowy, wyzwalający objawy ME/CFS, wymienia się infekcję wirusową [31,32]. U około 50-80%

pacjentów pierwsze objawy ME/CFS pojawiają się nagle i przypominają swoim przebiegiem grypę, co może potwierdzać tę hipotezę [33]. Potencjalne infekcyjne czynniki wyzwalające ME/CFS wymieniono w Tabeli 2. [3].

Tabela 2. Czynniki infekcyjne wyzwalające ME/CFS, za Shepherdą i wsp., w modyfikacji własnej [3]

Potencjalne czynniki infekcyjne wyzwalające ME/CFS
Mononukleoza zakaźna – wirus Epsteina-Barr (EBV)
Chlamydia pneumonia
Coxiella burnetii
Gorączka Denga
Wirus Ebola
Enterowirusy
Wirusy zapalenia wątroby – HAV, HBV, HCV, HDV, HEV
Wirusy opryszczki -HSV-1, HSV-2
Cytomegalowirus (CMV)
Wirus ospy (VZW)
Wirusy HHV-6, HHV-7, HHV-8
Parvovirus B19
SARS-Cov-2

Wiele opublikowanych badań naukowych sugeruje związek zakażenia wirusem EBV i przechorowania mononukleozy zakaźnej, jako infekcji będącej czynnikiem spustowym w patologii ME/CFS. W badaniach Katz i wsp. odnotowano rozwój ME/CFS u 13% nastolatków 6 miesięcy po przebytej mononukleozie [34].

W badaniach Kerr i wsp. rozwój ME/CFS po objawowym zakażeniu parvowirusem B19 stwierdzono u 4-13% badanych pacjentów [35]. W tej grupie pacjentów stwierdzono podwyższone stężenia czynnika martwicy nowotworów TNF-alfa oraz interferonu gamma, co może korelować z aktywacją układu immunologicznego [35,36]. Fremont i wsp. [37] badali obecność wirusów w bioptatach z błony śluzowej przewodu pokarmowego pacjentów z ME/CFS i zauważyli, że u części z nich wykryto obecność parvowirusa B19, a w 15-30% badanych próbek wykryto obecność wirusa EBV.

Nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna prowadząca do rozwoju ME/CFS może być spowodowana również reaktywacją latentnego wirusa EBV czy HHV6 [3]. W badaniach Chapenko i wsp. [38] udowodniono korelację pomiędzy zakażeniem HHV-6, HHV-7 i parwowirusem B19, a wzrostem poziomu cytokin prozapalnych, jak również korelację pomiędzy aktywną infekcją wirusową, a rozwojem odległych objawów klinicznych, takich jak stanów podgorączkowych, limfadenopatii, zmęczenia powysiłkowego, wędrujących bólów stawów).

Magnus i wsp. [39] opublikowali w 2015 roku badania, w których retrospektywnie ocenili ryzyko rozwoju ME/CFS po zakażeniu lub po szczepieniu przeciw wirusowi grypy, które przeprowadzili na podstawie danych z epidemii grypy typu A (H1N1) w 2009 roku w Norwegii. Wykazali oni, że zakażenie wirusem grypy wiązało się z ponad dwukrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia ME/CFS, podczas gdy nie znaleziono zwiększonego ryzyka ME/CFS po szczepieniu [39].

Sytuacja epidemiologiczna na świecie uległa diametralnej zmianie w 2020 roku. Pandemia wirusa SARS-Cov-2, powodującego chorobę COVID-19, zmieniła życie milionów ludzi na całym świecie. Jednym z najważniejszych problemów jest obecnie nieznaną częstość i charakter odległych powikłań choroby. Hipoteza, że zakażenie wirusem SARS-Cov-2 może mieć istotny wpływ na patogenezę ME/CFS, wymaga dalszych badań, jednak wyraźne jest, że istnieje spora grupa pacjentów, u których objawy COVID-19 przedłużają się lub u których dochodzi do rozwoju powikłań dotyczących układu nerwowego i/lub oddechowego [3]. Na chwilę obecną nie są dostępne dane co do częstości występowania PVFS (ang. *post-virus fatigue syndrome*) u osób, które przebyły COVID-19. Szacuje się, że u około 10% pacjentów, którzy przebyli zakażenie, objawy utrzymują się ponad 30 dni, a u 0,5 % powyżej 90 dni [3,40].

Shepherd i wsp. podzielili pacjentów, u których objawy po przebyciu COVID-19 utrzymywały się przez długi czas, na trzy główne kategorie [41]. W pierwszej grupie (ang. *Long COVID syndromes*) znalazły się osoby, które pomimo przechorowania COVID-19 nadal cierpią na objawy takie jak duszność, kaszel, utrata węchu i smaku, kołatanie serca oraz często na przewlekłe zmęczenie. W drugiej grupie znaleźli się pacjenci z tzw. zespołem zmęczenia po COVID-19 (ang. *Long COVID-19 Fatigue Syndrome*), który odpowiada spektrum objawów zbliżonych do powirusowego zespołu zmęczenia (PVFS). Mogą występować zaburzenia funkcji poznawczych, nietolerancja ortostatyczna, zaburzenia snu oraz powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM). Trzecia grupa to ozdrowieńcy, u których zmęczenie utrzymuje się powyżej

3-4 miesiące po wyleczeniu z COVID-19 i prawdopodobne jest u nich rozpoznanie ME/CFS. Objawy ME/CFS obserwowano również po zakażeniach innymi koronawirusami, np. podczas epidemii wirusa SARS (ang. *severe acute respiratory syndrome*), która miała miejsce w Toronto w 2002 roku. Ponadto COVID-19 może być czynnikiem spustowym ME/CFS, ze względu na produkcję w organizmie interleukiny 6 i 12 w odpowiedzi na zakażenie. Cytokiny te odgrywają ważną rolę w patogenezie ME/CFS [40]. Oddzielną grupę pacjentów stanowią osoby z rozpoznaniem wcześniej ME/CFS, u których dochodzi do zakażenia SARS-Cov-2. Do tej pory opisywano pojedyncze opisy przypadków chorych, u których dochodziło do zaostrzenia objawów zespołu przewlekłego zmęczenia [40]. Wyjaśnienie związku pomiędzy zakażeniem wirusem SARS-Cov-2, a rozwojem ME/CFS wymaga prowadzenia dalszych badań naukowych w tym zakresie.

Jako inne czynniki inicjujące pojawienie się objawów ME/CFS, wymienia się choroby psychiczne, stres, uraz fizyczny albo psychiczną traumę [41–44]. Chu i wsp. [41] dowodzą, że znacząca część badanej populacji pacjentów z ME/CFS uważa stres albo ważne wydarzenie życiowe, jako czynnik, który wyzwolił u nich początek objawów choroby. Zauważa jednak też, że stresujące doświadczenie rzadko występowało jako jedyny trigger, natomiast często towarzyszyło infekcji wirusowej lub innym czynnikom inicjującym [41]. Inne publikacje naukowe potwierdzają, że stres może odgrywać istotną rolę w rozwoju i podtrzymywaniu objawów ME/CFS m. in. poprzez wpływ na układ immunologiczny, zaburzenie funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) [45] czy poprzez zwiększenie podatności organizmu na rozwój lub reaktywację infekcji wirusowej [46]. U części pacjentów, z bardziej podstępny początkiem choroby, nie udaje się zidentyfikować żadnego czynnika inicjującego [3].

I.2.4.2. Faza objawów zwiastunowych

Faza ta trwa do czterech miesięcy od początku występowania objawów, choć granica czasowa może być zmienna i zależy od indywidualnej predyspozycji pacjenta. Większość kryteriów diagnostycznych wymaga minimum sześciu miesięcy trwania objawów zanim możliwe będzie postawienie rozpoznania [16,47], dlatego niemożliwym jest dokładnie opisać objawy, które mogą pojawiać się w fazie prodromalnej, gdyż najczęściej nie są one uwzględniane w publikacjach naukowych. Znając jednak przebieg innych chorób

przebiegających z ogólnoustrojową reakcją zapalną, można przypuszczać, że faza prodromalna jest obecna w rozwoju ME/CFS [28].

Manifestacja kliniczna w tym okresie jest najczęściej związana bezpośrednio z działaniem czynnika inicjującego i objawów przez niego wywołanych. W ostatnim czasie naukowcy zwrócili uwagę na aktywację struktur OUN przez czynniki spustowe (np. infekcję), za pomocą cytokin prozapalnych wytwarzanych przez pobudzony system odpornościowy. Z kolei ośrodkowy układ nerwowy, poprzez wydzielanie neurotransmitterów, neuropeptydów i neurohormonów, może oddziaływać na układ immunologiczny. Może to prowadzić do aktywacji osi HPA, wpływać na funkcjonowanie autonomicznego układu nerwowego i powodować rozwój zespołu objawów zwanych „*sickness behaviour*”, które to obejmują zmęczenie, gorączkę, bóle stawów, uczucie zimna, zaburzenia poznawcze. Wiele objawów ME/CFS jest podobnych do objawów „*sickness behaviour*”, jednak nie ustępuje po infekcji tylko przechodzi w fazę przewlekłą [3]. Objawy występujące w fazie prodromalnej mogą się znacznie różnić pomiędzy poszczególnymi pacjentami, co zależy m.in. od podatności organizmu gospodarza, rodzaju i trwałości dysfunkcji układu immunologicznego, indywidualnej zdolności organizmu do powrotu do homeostazy, funkcjonowania OUN, różnic w stężeniach neurotransmitterów, różnic w perfuzji mózgowej, integralności bariery krew-mózg [28].

I.2.4.3. Wczesna faza choroby

Wczesna faza choroby jest progresją procesów zapoczątkowanych w fazie prodromalnej, dochodzi do takiego zaburzenia procesów fizjologicznych, że niemożliwy jest powrót organizmu do stanu równowagi. Pojawiają się typowe objawy ME/CFS, takie jak m.in. zmęczenie, co można wytłumaczyć lokalnym i systemowym działaniem czynników prozapalnych, dysfunkcją OUN ze zwiększoną pobudliwością układu nerwowego, hipermetabolizmem oraz uogólnionym zwiększeniem zapotrzebowania energetycznego. Wiąże się to z wyczerpaniem energetycznym organizmu i „oszczędzaniem energii” poprzez zmniejszenie dostępności energii dla czynności nie priorytetowych, takich jak np. wzmożony wysiłek fizyczny czy umysłowy [28]. Zwiększona produkcja i działanie czynników prozapalnych i w odpowiedzi na nie czynników przeciwzapalnych, modulują reakcje fizjologiczne organizmu, wpływając na progresję i nieodwracalność choroby [36].

Uznaje się, że wczesna faza ME/CFS trwa do 24 miesięcy od początku choroby. Poszukiwanie markera biologicznego dla ME/CFS jest kluczowe zarówno dla szybszego rozpoznawania choroby, jak i dla dokładnego wyjaśnienia patomechanizmów toczących się w organizmie we wczesnych stadiach ME/CFS [48].

I.2.4.4. Utrwalona faza choroby

Za umowną granicę utrwalonej fazy choroby, uważa się dwa lata od początku objawów choroby, jednak granica ta może być indywidualna dla pacjenta. Stan hipermetabolizmu oraz zwiększona produkcja czynników prozapalnych i neurotoksycznych skutkuje rozwojem przewlekłego, uogólnionego stanu zapalnego o niskim lub umiarkowanym stopniu nasilenia. Zużycie większej ilości energii dla zapewnienia podstawowych procesów biologicznych, prowadzi do wyczerpania energetycznego i zmniejszenia poziomu energii dostępnej dla dodatkowych zadań dla organizmu [28]. Skutkuje to poczuciem zmęczenia przy próbach podejmowania wysiłku fizycznego lub umysłowego przez pacjenta. W utrwalonej fazie choroby dochodzi do rozwoju zmian narządowych zachodzących m. in. w układzie immunologicznym, OUN, w mięśniach oraz występowaniem pełnoobjawowego ME/CFS wraz z możliwymi jego powikłaniami [28]. W takim stadium znacznie mniej prawdopodobne jest wyleczenie czy całkowita remisja objawów [28].

I.2.4.5. Zmiany narządowe w utrwalonej fazie choroby

Dysfunkcja układu immunologicznego:

Do tej pory przeprowadzono liczne badania naukowe dotyczące dysfunkcji układu odpornościowego u pacjentów z ME/CFS. Zidentyfikowano wiele różnych rodzajów zaburzeń immunologicznych, które mogą mieć swój udział w patogenezie zespołu przewlekłego zmęczenia. Zaliczyć tu można m.in. przewlekłą aktywację limfocytów czy istotne podwyższenie poziomu cytokin prozapalnych występujące u pacjentów z ME/CFS [3,49].

Hipoteza immunologiczna zakłada, że aktywacja układu odpornościowego i masywna synteza cytokin prozapalnych (tzw. „burza cytokinowa”), powodują sensytyzację komórek mikrogleju układu nerwowego, które stają się niejako „nadwrażliwe” [3,49]. Zdziałanie w tym momencie czynnika wyzwalającego (infekcji, stresu, deprywacji snu) powoduje aktywację komórek mikrogleju, które przechodzą w stan zapalny i zaczynają produkować czynniki

neurotoksyczne, a co prowadzi do interakcji z komórkami układu nerwowego, które zaczynają funkcjonować w sposób nieprawidłowy i wywołują objawy takie jak ból czy zmęczenie [3,49].

Dotychczas przeprowadzono kilka badań porównujących stężenia cytokin w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób zdrowych. Hornig i wsp. [50] przeprowadzili analizę składu płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) u 32 pacjentów z klasyczną postacią ME/CFS i 27 z postacią atypową, stwierdzając istotne różnice w profilu cytokinowym w PMR pomiędzy badanymi grupami. Osoby z postacią atypową miały niższe poziomy cytokin prozapalnych, m.in. IL-17A, niż osoby z postacią klasyczną. Montoya i wsp. [51] zbadali czy poziom cytokin może być powiązany z ME/CFS i czy może korelować z ciężkością i długością zmęczenia. Porównano poziom cytokin u 192 pacjentów z ME/CFS vs. 392 osób zdrowych i stwierdzono, że poziom 17 cytokin, w tym 13 prozapalnych, m.in. INF alfa, IL4, IL5, IL7, IL13, leptyna, eotaksyna 1, był istotnie wyższy u pacjentów z ME/CFS i korelował z ciężkością objawów. Moneghetti i wsp. [52] porównali profil cytokin u 24 pacjentów z ME/CFS i 24 zdrowych osób z grupy kontrolnej, stwierdzając największe różnice pomiędzy badanymi grupami w poziomach cytokin: CD40L, inhibitor aktywatora plazminogenu, IL-1-beta, interferon-alfa i CXCL-1. Podobne wyniki otrzymała grupa Fletchera i wsp. [53]. Oznaczono poziom 16 cytokin u 40 pacjentek z ME/CFS, porównując je do zdrowych kobiet w grupy kontrolnej. Stwierdzono istotnie podniesione poziomy cytokin: $LT\alpha$, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12. Z kolei poziom IL-8, IL-13 and IL-15 był obniżony. Fletcher i wsp. zauważyli również, że poziom cytokin podnosił się po wysiłku fizycznym [53]. Inne dowody pochodzące z badania Stringera i wsp. [47] pokazały znaczącą korelację pomiędzy poziomem zmęczenia, a stężeniem leptyny (prozapalnej adipokiny). Russell i wsp. oznaczyli poziom 16 specyficznych cytokin [54]. Ich wyniki sugerują, że IL-1, IL-6 i IL-8, uwzględniając czas trwania objawów choroby, mogą stanowić biomarkery w screeningu ME/CFS, niezależnie od wieku pacjenta [54]. Dalsze badania w zakresie różnic w poziomach cytokin mogą pomóc w zróżnicowaniu pacjentów z ME/CFS od osób zdrowych.

Niektóre badania pokazują zaburzenia w zakresie odpowiedzi komórkowej u pacjentów z ME/CFS, co przejawia się obniżonym poziomem komórek NK, nieprawidłową odpowiedzią limfocytów m.in. na mitogeny czy niedoborami immunoglobulin subklas IgG3 i IgG4. Może to skutkować nieprawidłową odpowiedzią organizmu na czynniki wirusowe czy bakteryjne [3,55]. Zaburzenia funkcji komórek NK korelują z poziomem nasilenia choroby oraz zaburzeniami kognitywnymi u pacjentów. Zmniejszona cytotoksyczność komórek NK nie

zabezpiecza organizmu przed czynnikami infekcyjnymi i prowadzi do przewlekłej aktywacji układu immunologicznego [3,56]. Badania Mandarano i wsp. na grupie 53 pacjentów z ME/CFS i 45 zdrowych kontrolach wykazały, że pacjenci z ME/CFS mieli istotnie upośledzony metabolizm limfocytów T, który korelował ze znamienne wyższymi poziomami cytokin w tej grupie, w porównaniu do osób zdrowych [57].

Ciekawą hipotezę wysunęli Blomberg i wsp. [58], którzy sugerują, że za patogenezę ME/CFS mogą odpowiadać procesy autoimmunologiczne, wpływające na funkcjonowanie organizmu, w tym mózgu i upośledzające metabolizm energetyczny. Zgodnie z zaproponowanym przez tych badaczy modelem, u pacjentów z predyspozycjami genetycznymi, przeżytymi infekcjami wirusowymi, stresem czy dysbiozą jelitową, dochodzi do stopniowego rozwoju klonów limfocytów B skłonnych do autoreaktywności i upośledzenia funkcjonowania autoantygenów zaangażowanych w produkcję energii, procesy hormonalne, czy transport przez kanały jonowe, wpływając zarówno na mięśnie, jak i na mózg i powodując rozwój objawów ME/CF. Ta hipoteza wymaga potwierdzenia w kolejnych badaniach naukowych, jednak prezentuje ciekawe podejście do prób wyjaśnienia patogenezy ME/CFS [58].

Dysfunkcja ośrodkowego układu neurologicznego:

Istnieje wiele doniesień naukowych sugerujących kluczową rolę ośrodkowego układu nerwowego w patogenezie ME/CFS. Uważa się, że w patogenezie ME/CFS zmęczenie ośrodkowe może mieć znacznie bardziej istotne znaczenie niż zmęczenie obwodowe (mięśniowe) [3,59]. Mechanizmy ośrodkowe mogą dotyczyć szlaków w zwojach podstawnych, które są wrażliwe na zmiany stężeń cytokin prozapalnych i bezpośrednią infekcję wirusową [59,60].

Natelson i wsp. [61] przeprowadzili badania płynu mózgowo-rdzeniowego, szukając dowodów na dysregulację immunologiczną w ośrodkowym układzie nerwowym. U pacjentów z ME/CFS stwierdzono wyższy poziom białka i leukocytów w PMR w porównaniu do grupy kontrolnej [61]. Natelson rozszerzył swoje badania w 2017 roku, porównując tym razem poziom mleczanów w PMR u pacjentów z ME/CFS, pacjentów z fibromialgią oraz pacjentów, u których te dwie choroby współistnieją, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej [62]. Stwierdzono, że poziom mleczanów nie różnił się istotnie pomiędzy trzema badanymi

grupami, jednak różnica w stężeniu mleczanów pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną była istotna statystycznie [62].

Hornig i wsp. jako pierwsi przeanalizowali poziomy cytokin w płynie mózgowo rdzeniowym u 32 pacjentów z ME/CFS, 40 ze stwardnieniem rozsianym oraz u 19 zdrowych ochotników [63]. Wyniki analizy pokazały zakłócenia odpowiedzi immunologicznej w płynie mózgowo-rdzeniowym u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia, m. in. przesunięcie w stronę aktywacji limfocytów Th 2 [63]. Biorąc pod uwagę rozpoznaną aktywność prozapalną zasugerowano, że stan zapalny w obrębie układu nerwowego uczestniczy w patogenezie i progresji ME/CFS [63]. Neurozapalenie w ME/CFS stwierdza się poprzez aktywację komórek glejowych, w szczególności mikrogleju i astrocytów. Interakcja pomiędzy OUN a cytokinami prozapalnymi może wyjaśniać powstawanie symptomów choroby, takich jak złe samopoczucie, znużenie, zmęczenie, uczucie drętwienia, zmniejszony apetyt, zmniejszona aktywność społeczna, zmęczenie i utrata masy ciała [3]. Chociaż mechanizmy leżące u podstaw neurozapalenia w ME/CFS są jak na razie niejasne, wydaje się, że zachodzi dodatnie sprzężenie zwrotne pomiędzy stanem zapalnym a nadmierną aktywacją neuronów [12]. Pacjenci Ci muszą włożyć znacznie zwiększony wysiłek w wykonywanie codziennych czynności, co skutkuje nasiloną aktywacją neuronów, prowadzącą do zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych, co może być również nasilane przez pierwotny czynnik zakaźny [64]. Rozwijający się stan zapalny nie może przez to zostać stłumiony przez mechanizmy przeciwzapalne, prowadząc w ten sposób do rozwoju ME/CFS [65].

Ciekawą hipotezę przedstawił Nakatomi i wsp. [66]. W badaniach z wykorzystaniem pozytronowej emisyjnej tomografii (PET) wykazano hipoperfuzję i zmniejszenie biosyntezy neuroprzekaźników, takich jak glutaminian, asparaginian i kwas gamma-aminomasłowy w korze płatów czołowych, skroniowych, potylicznych, zakrętu obręczy oraz hipokampie u pacjentów z ME/CFS [66]. U pacjentów tych odnotowano również zmniejszenie gęstości transportera serotoniny w odcinku dziobowym przedniej części kory zakrętu obręczy, a gęstość transportera serotoniny w środkowym rejonie kory zakrętu obręczy była ujemnie skorelowana z poziomem bólu [67]. W kolejnym badaniu z obrazowaniem za pomocą PET z ligandem wiążącym się z komórkami mikrogleju, wykazano proces zapalny w wielu obszarach mózgowia (m. in. w hipokampie, ciele migdałowatym, wzgórze- szczególnie jądra śródblaszkowe po stronie lewej) u chorych na zespół przewlekłego zmęczenia w porównaniu z grupą kontrolną. Te struktury mózgowia odpowiadają m.in. za funkcję poznawczą,

odczuwanie bólu, patogenezę zaburzeń depresyjnych, a więc upośledzenie ich działania może powodować powstawanie objawów ME/CFS [68]. Dokładny mechanizm leżący u podstaw procesu zapalnego nie jest poznany. Hipoteza aktywacji komórek mikrogleju zakłada rolę czynnika spustowego np. infekcji wirusowej, stresu, zmęczenia, która to powoduje aktywację układu odpornościowego, produkcję cytokin prozapalnych, uwalnianie aktywnych form tlenu oraz neurotoksyn co prowadzi do reakcji zapalnej w obrębie OUN [68].

Shan i wsp. progresywnie poszukiwali zmian w ośrodkowym układzie nerwowym, wykonując RM mózgowia u 15 pacjentów z ME/CFS oraz u 10 osób zdrowych na początku trwania badania i po 6 latach [69]. U pacjentów z ME/CFS wykazano znaczący spadek objętości istoty białej lewego pęczka czołowo-potylicznego, należącego do włókien kojarzeniowych [69]. W grupie kontrolnej nie obserwowano takiego zjawiska [69]. Ten sam badacz przeprowadził również badania nad różnicami w strukturze mózgu związane z jakością snu pacjentów [70]. Badania przeprowadzono na 38 pacjentach z ME/CFS i 14 osobach zdrowych, jako narzędzia wykorzystano RM mózgowia, pensylwańską skalę jakości snu (ang. *Pennsylvania Sleep quality Index*, PSQI) oraz Skalę Chadlera (ang. *Chadler Fatigue Questionnaire*, CFQ) [70]. Stwierdzono niższą intensywność sygnału w przyśrodkowej części kory przedczołowej u pacjentów z ME/CFS, co korelowało z nasileniem zaburzeń snu w skalach PSQI oraz CFQ [70].

Dysfunkcja autonomicznego układu nerwowego:

Część objawów obserwowanych w zespole przewlekłego zmęczenia sugeruje, że w jego rozwoju może dochodzić do upośledzenia funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego. Autonomiczny układ nerwowy (AUN), zwany także wegetatywnym, jest odpowiedzialny za sterowanie czynnością narządów wewnętrznych w sposób niezależny od woli [71]. Powiązany jest on czynnościowo z układem hormonalnym oraz immunologicznym, zapewniając zachowanie homeostazy, obronę organizmu i adaptację do czynników zakłócających równowagę [71]. W kontrolowaniu czynności samego układu autonomicznego biorą udział ośrodki zlokalizowane w rdzeniu przedłużonym i moście, a także struktury układu limbicznego, w tym podwzgórze [71]. W przebiegu reakcji odruchowej dochodzi do zmiany relacji między współczulną i przywspółczulną częścią układu autonomicznego na korzyść jednej z nich [71].

Wyniki wielu badań naukowych wskazują, że zaburzenia autonomicznej regulacji odruchów sercowo-naczyniowych mogą występować w niektórych subgroupach pacjentów z

ME/CFS [3,72]. Badania wykonane z użyciem stołu pionizacyjnego wykazały nieprawidłowości autonomicznych mechanizmów regulacyjnych u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia, co objawia się poprzez m.in. zaburzenia ortostatyczne i obniżone ciśnienie tętnicze krwi [29]. W badaniach na grupach nastolatków z ME/CFS wykazano przewagę odpowiedzi współczulnej w regulacji układu krążenia, a także zaburzenia termoregulacji, przejawiające się w objawach takich jak pocenie się, dreszcze, nagła zmiana koloru skóry na bodziec termiczny w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej [73–75].

Metaanalizy dotyczące czynności autonomicznego układu nerwowego u pacjentów z ME/CFS sugerują, że nie ma istotnych statystycznie różnic w tętnie spoczynkowym pomiędzy pacjentami a osobami zdrowymi, jednakże w teście pochyleniowym dochodzi do istotnego przyspieszenia tętna u osób z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto mniejsza zmienność rytmu serca (ang. *heart rate variability*, HRV) u pacjentów z ME/CFS sugeruje zwiększoną toniczną aktywność współczulną. Dodatkowo obniżona zmienność HRV w ciągu nocy może negatywnie wpływać na jakość snu. U pacjentów z ME/CFS zaobserwowano również zwiększony poziom noradrenaliny w osoczu, który jest najbardziej widoczny podczas snu. Może to sugerować, że zwiększona aktywność współczulna generuje nieprawidłową aktywność neuroendokrynną. Wyższa aktywność układu adrenergicznego występowała we wszystkich fazach snu. W porównaniu do grupy kontrolnej ilość aktywności przywspółczulnej była mniejsza w głębokim śnie u pacjentów z ME/CFS. Warto podkreślić, że zła jakość snu wpływa nie tylko na zmęczenie i senność w ciągu dnia, ale także obniża poziom koncentracji, wywołuje zaburzenia funkcji poznawczych i powoduje nieprawidłową pracę układu immunologicznego [76–79].

Kemp i wsp. w swoich badaniach potwierdzili związek aktywacji współczulnego układu autonomicznego z objawami dysautonomii. Wzrost napięcia układu sympatycznego u pacjentów z ME/CFS korelował negatywnie z nasileniem zawrotów głowy, poczucia niestabilności, czy kołatania serca [80]. Wykazano również, że pobudzenie układu autonomicznego w teście pionizacyjnym (ang. *head-upright tilt table test*, HUT) może mieć negatywny wpływ także na funkcje poznawcze [80]. Podczas próby pionizacyjnej, może dochodzić do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi i zmniejszenia przepływu krwi przez naczynia mózgowie [80]. W badaniach van Campen i wsp. z 2020 roku zaobserwowano istotne pogorszenie sprawności operacyjnej u pacjentów z ME/CFS podczas próby pionizacyjnej w porównaniu do grupy kontrolnej, które utrzymywało się również po zakończeniu próby [81].

Obniżenie poziomu funkcji poznawczych nie korelowało z objawami tachykardii oraz hipotonii, co może oznaczać, że pogorszenie to miało związek ze „stresem” wynikającym z pionizacji [81].

Układ współczulny w warunkach fizjologicznych aktywowany jest w sytuacjach stresowych, podczas wysiłku fizycznego i psychicznego. U osób z ME/CFS aktywacja układu współczulnego ma miejsce przy znacznie mniejszym poziomie stresu lub aktywnościach o małym nasileniu w porównaniu do osób zdrowych. Dla osób z ME/CFS charakterystyczne jest patologiczne obniżenie progu pobudliwości na wiele czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Należą do nich przede wszystkim wysiłek fizyczny, infekcje oraz stres. Zjawiska te w połączeniu z zaburzonymi mechanizmami kompensacji mogą prowadzić do wzmożonej aktywności układu współczulnego [78,82].

Zaburzenia neurohormonalne:

Wiele kluczowych objawów ME/CFS, jak zmęczenie, zaburzenia snu, bóle stawów i mięśni, zaburzenia nastroju, czy zaburzenia termoregulacji, może być związanych z nieprawidłowym stężeniem substancji chemicznych wytwarzanych w obrębie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) [3,83]. Oś ta odpowiada za kontrolę wielu funkcji fizjologicznych, takich jak sen i czuwanie, reakcje organizmu na stres czy inne procesy biochemiczne zachodzące w żywym organizmie. Zauważono, że ME/CFS związany jest z niskim poziomem kortyzolu (tj. hormonu steroidowego wytwarzanego przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy) w osoczu i moczu [83].

Niedoczynność osi HPA wykazano mierząc poziom kortyzolu w ślinie pacjentów z ME/CFS tuż po przebudzeniu [84,85]. W porównaniu do grupy kontrolnej wykazano bardzo powtarzalne wyniki obniżonego poziomu kortyzolu w ślinie u pacjentów z ME/CFS [84,85]. Dodatkowo wykazano obniżone wyjściowe poziomy hormonów nadnerczowych, nieprawidłową dobową zmienność poziomów tych hormonów czy zmniejszoną reakcję osi HPA na stresory fizyczne i psychologiczne [86]. Jednak nie ma jak dotąd przekonujących dowodów na to, że dysfunkcja osi HPA jest specyficzna dla ME/CFS lub że jest to przyczyna ME/CFS, a nie jedynie zaburzenie wtórne do innych zmian narządowych [12].

Jedną z hipotez, która mogłaby wyjaśnić niski poziom kortyzolu u pacjentów z ME/CFS to dysregulacja spowodowana stresem. Istnieje hipoteza, zgodnie z którą uważa się, że stres może powodować podwyższenie poziomu hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH), co z kolei powoduje obniżenie ilości receptorów CRH (CRHR) na neuronach kortykotropowych

przysadki mózgowej. Ta regulacja w dół nie normalizuje się po złagodzeniu stresu lub późniejszej redukcji poziomu CRH, z powodu nieprawidłowej plastyczności receptora CRH. Tak więc niedoczynność osi HPA może być konsekwencją zjawiska „wyczerpania ze stresu”, w wyniku którego wywołana stresem nadczynność osi HPA przechodzi w niedoczynność osi HPA po dłuższym czasie trwania stresora. Długotrwały stres może spowodować wyczerpanie odpowiedzi stresowej, w wyniku czego oś HPA traci zdolności do radzenia sobie ze stresem środowiskowym, w połączeniu ze zmniejszonym wyjściowym stężeniem kortyzolu [12,87]. Ponieważ poziom kortyzolu w osoczu jest kontrolowany głównie przez ACTH, istnieje zależność liniowa między tymi dwoma hormonami u pacjentów z ME/CFS [87].

Ta nierównowaga neuroendokrynną wpływa na homeostazę całego organizmu, w tym na układ immunologiczny, również mocno zaangażowany w patogenezę ME/CFS. Hormony glikokortykosteroidowe oddziałują z komórkami układu odpornościowego, co ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza. Istnieje dwukierunkowa komunikacja między szlakami immunologicznymi a osią oś HPA. Hormony osi HPA wykazują ujemne sprzężenie zwrotne z układem odpornościowym, zmniejszając nasilenie reakcji zapalnej, podczas gdy cytokiny prozapalne stymulują oś HPA do produkcji większej ilości hormonów osi HPA [87]. Niedoczynność osi HPA może powodować osłabienie wpływu ujemnego sprzężenia zwrotnego hormonów nadnerczowych na układ odpornościowy, co umożliwiłoby aktywację szlaków immunologicznych i wzmożenie produkcji cytokin prozapalnych. Z drugiej strony przewlekła, długotrwała aktywacja szlaków immunologicznych, spowodowana przewlekłym stanem zapalnym, może zapoczątkowywać rozwój niedoczynności osi HPA [88].

Zaburzenia w pracy mięśni i mitochondriów:

Dotychczasowe badania naukowego potwierdziły liczne nieprawidłowości w pracy mięśni u pacjentów z ME/CFS, co mogłoby tłumaczyć część objawów klinicznych ME/CFS, takich jak osłabienie, bóle mięśni czy powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM).

Jones i wsp. znaleźli dowody na nieprawidłowy metabolizm mięśniowo-energetyczny na poziomie komórkowym, porównując pH w mięśniach podczas aktywności fizycznej, przy użyciu spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS) [89]. Wykazano znaczące różnice w przywróceniu śródmięśniowego pH po wysiłku do wartości spoczynkowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do grupy kontrolnej, co może być związane z upośledzoną regulacją

autonomiczną [89]. Ta sama grupa badaczy dwa lata później kontynuowała swoje badania, oceniając tym razem funkcjonowanie bioenergetyczne mięśni w odpowiedzi na 3 serie ćwiczeń [90]. W pracy tej wzięło udział 18 pacjentów z ME/CFS oraz 12 zdrowych osób prowadzących siedzący tryb życia [90]. Wykazano obniżony poziom częstości akcji serca przy progu przemian beztlenowych, obniżony maksymalny pobór tlenu (VO_2 max) oraz znacznie wydłużony (prawie 4-krotnie) czas potrzebny do powrotu pH w mięśniu sprzed wysiłku, w porównaniu do grupy kontrolnej [3,90]. Podobne wnioski na temat wydłużonego czasu regeneracji po wysiłku w swoich pracach uzyskali również Fluge i Lien [91,92]. Testy ergospirometryczne (ang. *cardiopulmonary exercise testing*, CPET), wykonywane u pacjentów z ME/CFS w ciągu 2 kolejnych dni pokazały osiągnięcie progu przemian beztlenowych przy znacznie niższym poborze tlenu (VO_2) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz znaczne pogorszenie wyniku w drugim dniu testów u pacjentów z ME/CFS. Skutkowało to zwiększeniem poziomu mleczanów w surowicy będących produktem glikolizy beztlenowej oraz spadkiem produkcji mitochondrialnego ATP [92]. Dane te sugerują zatem, że u pacjentów z ME/CFS dochodzi do przesunięcia produkcji energii podczas wysiłku w stronę przemian beztlenowych, co determinuje niższą i niewystarczającą produkcję ATP [3,92].

Przez wiele lat testowano hipotezę, że głównym podłożem objawów ME/CFS może być nieprawidłowe działanie mitochondriów, które są przecież głównym producentem energii w komórce. Występują one w prawie wszystkich komórkach ciała (za wyjątkiem komórek krwi) co tłumaczyłoby szerokie spektrum objawów klinicznych. Co więcej infekcje wirusowe, bakteryjne czy pasożytnicze mogą indukować zamiany w funkcjonowaniu mitochondriów [3]. Zaburzenia mitochondrialne w komórkach układu odpornościowego mogłyby tłumaczyć zwiększoną podatność na infekcje wirusowe, bakteryjne czy pasożytnicze [93]. Jednakże aktualne wyniki badań sugerują, że ME/CFS nie jest skutkiem izolowanej dysfunkcji tych organelli komórkowych, natomiast należy poszukiwać czynnika sprawczego, który zaburza pracę mitochondriów [3]. Lawson i wsp. nie stwierdzili istotnych różnic w ilości produkowanego ATP u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże wykryto wzrost produkcji ATP poza mitochondriami, co może sugerować nieprawidłowości w innych szlakach wytwarzających ATP i przyczyniać się do rozwoju ME/CFS [94].

I.2.4.6. Zaawansowana faza choroby

Utrzymująca się zwiększona produkcja czynników prozapalnych i neurotoksycznych, skutkująca przewlekłym stanem zapalnym niskiego stopnia i przedłużonym ogólnoustrojowym zapaleniem, doprowadza w zaawansowanej fazie choroby do trwałej dysfunkcji układu immunologicznego i ośrodkowego układu nerwowego [28].

Nasilone zmiany ogólnoustrojowe powodują dysfunkcję na poziomie komórkowym. Szereg czynników, m. in. przewlekły stres oksydacyjny, reaktywne formy azotu czy zaburzenia krążenia, wpływają na upośledzenie czynności śródbłonna, powodując w konsekwencji zaburzenia metaboliczne związane ze zmniejszeniem produkcji energii przez komórki, zwane „hipoksją cytopatyczną”. Na tym etapie prawdopodobnie wystąpią ciężkie objawy, z głębokim zmęczeniem, nietolerancją wysiłku i innymi objawami ogólnoustrojowymi, które są w dużej mierze wyjaśnione przez spowolnienie fizjologiczne [28].

I.2.5. Symptomatologia zespołu przewlekłego zmęczenia

Zespół przewlekłego zmęczenia, jest chorobą ogólnoustrojową, a jego obraz kliniczny może w znaczący sposób różnić się pomiędzy poszczególnymi pacjentami. Choroba ta może rozpoczynać się w sposób ostry lub stopniowo. Wystąpienie pierwszych objawów poprzedza często infekcja wirusowa lub sytuacja stresowa, np. zabieg operacyjny [2,3].

Charakterystyczną cechą ME/CFS jest zmieniający się stopień nasilenia objawów. ME/CFS przebiega z okresami remisji i zaostrzeń, objawy mogą znacznie się różnić z dnia na dzień, a także mieć burzliwy przebieg przez cały okres trwania choroby. W ciężkich przypadkach lub w okresach zaostrzeń, stan pacjentów może nie pozwolić im na dotarcie do lekarza. Zdarza się, że lekarz może nie widzieć swojego pacjenta w okresach największego nasilenia objawów chorobowych [2,3].

W ostatnim czasie pojawił się szereg doniesień naukowych proponujących podział ME/CFS ze względu na fenotyp objawów. Collin i wsp. w swojej pracy zaproponowali wyszczególnienie u pacjentów z ME/CFS 3 różnych fenotypów: wielobjawowy, skąpoobjawowy i objawiający się tylko bólem [95]. Wilson i wsp. podzielili jednostkę na dwa główne typy: pierwszy to pacjenci młodszy, z krótszym okresem choroby, mniejszą ilością chorób towarzyszących, mniejszą niesprawnością. Druga grupa to chorzy z większym spektrum objawów, dłuższym wywiadem chorobowym, większą przewagą płci żeńskiej, częściej obciążeni innymi jednostkami chorobowymi [96].

Bardzo ciekawe podejście do podtypów ME/CFS zaproponował zespół badaczy z Polski. Słomko i wsp. [97] w badaniu przeprowadzonym w 2020 roku podzielili 131 pacjentów spełniających kryteria Fukudy, na 4 grupy, uwzględniając obiektywne i subiektywne funkcje autonomicznego układu nerwowego. Do pierwszej grupy zaliczono pacjentów z przewagą współczulną i objawami dysautonomii, u których obserwowano nasiloną nietolerancję ortostatyczną, duże nasilenie objawów zmęczenia, nasilone objawy dysautonomii i najniższą jakością życia [97]. W drugiej grupie znajdowały się osoby z przewagą komponenty współczulnej, ale z mniej nasiloną dysautonomią, których cechował starszy wiek oraz niższy poziom odczuwanego zmęczenia. W trzeciej osoby z przewagą komponenty przywspółczulnej, u których poziom odczuwania zmęczenia był największy. I w końcu w czwartej grupie, znajdowały się osoby z zachowaną równowagą między układem sympatycznym i parasympatycznym. Pacjenci Ci byli najmłodsi, z najmniejszym poziomem odczuwanego zmęczenia i najwyższą ocenianą jakością życia. Takie nowatorskie podejście może mieć w przyszłości zastosowanie w ocenie skuteczności leczenia pacjentów z ME/CFS, a także wytypowaniu potencjalnego biomarkera choroby, może okazać się, że nie jest to jeden czynnik, a kilka w zależności od fenotypu choroby [97].

I.2.5.1. Zmęczenie

Zmęczenie stanowi główny objaw zespołu przewlekłego zmęczenia, dotyczący zarówno sfery fizycznej, jak i psychicznej pacjenta. Charakterystyczne dla zmęczenia w ME/CFS jest jego nasilenie się na skutek podejmowanego wysiłku fizycznego lub umysłowego. Zmęczenie to nie jest prowokowane nadmiernym wysiłkiem i nie ustępuje pomimo odpoczynku. W znaczący sposób obniża ono jakość życia. Pacjenci często zgłaszają falujące nasilenie zmęczenia, ze zmiennością zarówno w ciągu dnia, jak i w perspektywie tygodni czy miesięcy, mówiąc o tzw. „lepszych” czy „gorszych” dniach lub okresach. Objawy zmęczenia mogą nasilać się pod wpływem wysiłku fizycznego, sytuacji stresowych, infekcji, gorączki, spadku lub wzrostu temperatury [3].

Najważniejsze kryteria diagnostyczne (IOM, CDC) podkreślają konieczność występowania, nieuzasadnionego innymi chorobami, zmęczenia przez co najmniej 6 miesięcy. Mimo, że budzi to kontrowersje, m. in. dotyczące opóźnienia rozpoznania choroby, to większość autorów zgadza się, że niewyjaśnione zmęczenie trwające ponad 6 miesięcy było znacząco częściej związane z przypadkami ME/CFS, a większość innych powodów takiego

zmęczenia trwała krócej niż 6 miesięcy. Symptomatologia CFS jest wielowymiarowym zjawiskiem, pokrywającym się z innymi niewyjaśnionymi zespołami charakteryzującymi się męczliwością, co należy wziąć pod uwagę w badaniach nad ME/CFS [98].

I.2.5.2. Powysiłkowe nasilenie zmęczenia

Powysiłkowe nasilenie zmęczenia (ang. *post-exertional malaise*, PEM), znane również pod akronimem PENE (ang. *post-exertional neuroimmune exhaustion*), oznacza nasilenie objawów ME/CFS, przede wszystkim zmęczenia, po aktywności fizycznej lub psychicznej, która była wcześniej tolerowana przez pacjenta. Pacjent zgłasza takie dolegliwości jak ból mięśni, pogorszenie sprawności intelektualnej, koncentracji, ogólny niepokój, zawroty głowy, zaburzenia snu, objawy grypopodobne, spadek apetytu, nudności. Tak naprawdę nasilić mogą się wszystkie symptomy występujące w ME/CFS [3]. PEM może pojawić się kilka godzin lub nawet kilka dni po takiej aktywności i utrzymuje się minimum 24 godziny, ale regeneracja może przedłużyć się do kilku dni lub tygodni. Intensywność lub długość trwania wysiłku, który powoduje wystąpienie PEM jest indywidualna dla każdego pacjenta i jest uzależniona od stopnia ciężkości choroby. Ciężkość objawów jest niewspółmierna do wykonanego przez pacjenta wysiłku [3].

PEM jest bardzo ważnym objawem ME/CFS, przydatnym w diagnostyce i różnicowaniu względem innych jednostek chorobowych, którym towarzyszy zmęczenie. Stwierdzono, że PEM lepiej różnicuje zespół przewlekłego zmęczenia od idiopatycznego przewlekłego zmęczenia, ale również innych schorzeń, w których PEM pojawia się rzadziej, takich jak stwardnienie rozsiane, choroby autoimmunologiczne czy zaburzenia depresyjne [99]. Dowodem tego może być m. in. umieszczenie PEM w głównych kryteriach rozpoznania ME/CFS wg IOM. Dotychczas nie ustalono jednoznacznej definicji PEM, a także niewiele wiadomo na temat patofizjologii tego zjawiska. Istnieją nawet sugestie dotyczące dwóch różnych rodzajów PEM. Jeden z objawami uogólnionego zmęczenia, a drugi ze zmęczeniem specyficznym dla mięśni, podobnie jak pierwotnie opisał to dr Ramsay [100]. PEM jest 10.4 razy częstsze u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób zdrowych. Obecnie autorzy wielu prac sugerują, że PEM jest patognomicznym objawem ME/CFS [99,101].

I.2.5.3. Dysautonomia

Objawy zaburzeń funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, szacuje się, że występują u około 90% pacjentów z ME/CFS. Można podejrzewać, że zaburzenia AUN są kluczowe w patogenezie zespołu przewlekłego zmęczenia, jednak objawy dysautonomii występują również w innych, niewyjaśnionych, stanach chorobowych, takich jak np. fibromialgia czy zespół jelita drażliwego [102].

Dysautonomia przejawia się przede wszystkim pod postacią nietolerancji ortostatycznej (ang. *orthostatic intolerance*, OI). U pacjentów z OI przy nagłej pionizacji albo przedłużającym się pozostawaniu w pozycji stojącej mogą wystąpić zawroty głowy, dezorientacja, zaburzenia równowagi, omdlenia, pocenie, kołatanie serca, osłabienie. Objawy takie wymagają wnikliwego różnicowania z innymi chorobami neurologicznymi i/lub kardiologicznymi. Zespół posturalnej tachykardii ortostatycznej (ang. *postural orthostatic tachycardia syndrome*, PoTS) jest jedną z form dysfunkcji układu autonomicznego, która może występować u pacjentów z ME/CFS. PoTS definiuje się jako, występowanie objawów nietolerancji ortostatycznej połączonych z przyspieszeniem częstości pracy serca o ponad 30 uderzeń na minutę u dorosłych (lub o ponad 40 uderzeń na minutę w grupie wiekowej 12-19 lat) przy pionizacji albo częstość pracy serca szybsza niż 120 uderzeń na minutę w pozycji stojącej [3].

U pacjentów z podejrzanym lub rozpoznanym ME/CFS należy przeprowadzić ocenę autonomicznego układu nerwowego, obejmującą przynajmniej odpowiedź organizmu na pionizację (pomiar tętna i ciśnienia tętniczego). Lewis i wsp. opisali grupę pacjentów ME/CFS z oraz bez PoTS, i zauważyli, że pacjenci z zespołem przewlekłego zmęczenia, u których występuje PoTS są młodsi, prezentują mniej nasilone objawy zmęczenia, mniej objawów depresyjnych i mniejszą senność w ciągu dnia, za to bardziej nasilone są u nich objawy nietolerancji ortostatycznej i dysfunkcji układu autonomicznego, w porównaniu do grupy pacjentów bez tachykardii ortostatycznej [103].

I.2.5.4. Zaburzenia funkcji poznawczych

Należą one do najczęstszych objawów w ME/CFS. Pacjenci podają, że objawy te są dla nich tak samo ograniczające jak problemy fizyczne związane z chorobą. Objawy zaburzeń funkcji kognitywnych zwykle są na tyle silne, że prowadzą do zauważalnego ograniczenia dotychczasowej aktywności zawodowej, edukacyjnej, osobistej lub społecznej pacjenta [3].

Zaburzenia funkcji poznawczych, występujące głównie pod postacią zaburzeń pamięci krótkotrwałej i roboczej (osłabienie zdolności do szybkiego radzenia sobie z zadaniami), problemów z koncentracją i uwagą (pogorszenia zdolności do rozwiązywania zadań wizualno-przestrzennych), brak zdolności do zorganizowania myśli i zaplanowania działania, problemy z przypomnieniem sobie właściwego słowa, czasem anomia (utrata zdolności do nazywania przedmiotów) lub dysnomia (nieprawidłowe nazywanie przedmiotów). Pamięć długotrwała zwykle nie jest upośledzona. Zaburzenia te określa się mianem „mgły mózgowej” (ang. *brain fog*) [3]. Zaburzenia funkcji poznawczych nasilają się pod wpływem wysiłku fizycznego lub stresu. Badania sugerują, że u osób z ME/CFS długotrwały wysiłek fizyczny lub psychofizyczny wpływa na obniżenie funkcji poznawczych, np. na zdolność podtrzymania uwagi, czas reakcji w testach decyzji, szybkość psychomotoryczną [104,105].

W badaniu przeprowadzonym w Belgii na dużej grupie 1578 pacjentów z ME/CFS, 93% z nich zgłaszało zaburzenia koncentracji, 85,6% zaburzenia pamięci, 75,5% zaburzenia funkcji językowych [106]. W nowszym badaniu populacyjnym Jason i wsp. pokazali znacznie częstsze występowanie zaburzeń funkcji poznawczych u 236 pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Dominowały zaburzenia pamięci (80%), problemy z wypowiedaniem własnych myśli (73%), problemy na wykonywaniu na raz więcej niż jednej czynności (72%), trudności z koncentracją (69%). Objawy neurokognitywne były brane pod uwagę, jeśli występowały co najmniej w połowie czasu w ciągu ostatnich 6 miesięcy [107].

Problemem klinicznym pozostaje dokładna ocena sprawności psychomotorycznej u pacjentów z ME/CFS. O ile dokonuje się różnicowania w zakresie różnych obszarów poznania takich jak pamięć, uwaga i sprawność psychomotoryczna, to obecnie nie ma narzędzi pomiaru nasilenia zaburzeń pojedynczych funkcji poznawczych. Możliwa jest jedynie łączna ocena sprawności psychomotorycznej [104].

I.2.5.5. Zaburzenia snu

Zaburzenia snu występują często u pacjentów z ME/CFS. Typowa manifestacja tych dolegliwości to: sen niedający odpoczynku, bezsenność (często w początkowej fazie choroby) lub nadmierna senność, szczególnie w ciągu dnia, np. pod postacią drzemek, odwrócenie rytmu dobowego (często dotyczy dzieci), żywe sny lub koszmary nocne, sen nie dający odpoczynku, co rozumiemy jako uczucie wyczerpania, niezależnie od długości snu. Głównym

objawem w początkowej fazie ME/CFS częściej może być nadmierna senność, niż indukowane wysiłkiem nasilenie zmęczenia. [3]

Występowanie niektórych objawów chorobowych, jak np. ból, może przyczyniać się do zaburzeń snu. Z drugiej strony pierwotne zaburzenia snu mogą prowadzić do zmęczenia oraz objawów obecnych w symptomatologii ME/CFS, np. bólu, problemów z koncentracją, zmęczenia. Konieczne jest zatem wykluczenie pierwotnych zaburzeń snu oraz zaburzeń snu związanych z innymi schorzeniami. U pacjentów z czynnikami ryzyka, takimi jak otyłość, chrapanie, suchość śluzówek po śnie, epizody nocnych bezdechów, należy przede wszystkim wziąć pod uwagę w różnicowaniu obturacyjny bezdech senny. Należy wykluczyć również choroby obturacyjne dróg oddechowych i pierwotny zespół niespokojnych nóg. [3,108]

W badaniu Jason i wsp. pacjenci z ME/CFS zgłaszali najczęściej nieregenerujący sen (92%), problemy z zaśnięciem (68%), konieczność spania w ciągu dnia (65%) oraz wybudzenia się (58%) [107]. Badanie Reeves i wsp. potwierdziło, że w pierwszych miesiącach choroby pacjenci z ME/CFS skarżą się na nadmierną senność, ale w miarę postępu choroby zgłaszali problemy z zasypianiem. Objawy te w umiarkowanym lub ciężkim nasileniu występowały znacznie częściej niż w grupie kontrolnej [109].

Wszystkie ważniejsze kryteria diagnostyczne ME/CFS zawierają objawy związane ze snem. W kryteriach CDC, nieregenerujący sen występuje jako kryterium pomocnicze. Podobnie w kryteriach zaproponowanych przez IOM w 2015 roku, zaburzenia snu są objawem dodatkowym i ich obecność nie jest konieczna do spełnienia kryteriów. W kryteriach ICC zaburzenia snu są niezbędne do postawienia diagnozy. Obejmują szersze spektrum zaburzeń snu. Autorzy podkreślają, że charakterystyczne dla pacjentów z ME/CFS jest skrócenie snu głębokiego, częste wybudzenia oraz uczucie braku regeneracji po przebudzeniu się. Towarzyszyć tym zaburzeniom mogą zespół niespokojnych nóg i periodyczne ruchy kończyn podczas snu [3,104,110].

I.2.5.6. Ból

Ból w ME/CFS jest częstym objawem. Może on dotyczyć mięśni, stawów, głowy, węzłów chłonnych i gardła. Zwykle ma stały charakter, jest trudny do opanowania, może być wędrujący lub promieniujący. Ma inny charakter niż dolegliwości, które mogły pojawiać się u pacjenta w przeszłości i nie reaguje na dotychczas stosowane środki lecznicze. Bólom mięśni może towarzyszyć osłabienie siły mięśniowej, drżenie, skurcze mięśni, zespół niespokojnych

nóg, hipermobilność stawów, które zwykle nasilają się po okresie aktywności pacjenta. Objawy te zwykle wymagają różnicowania z chorobami reumatycznymi. [3]

Według badań klinicznych w populacji CFS około do 94% pacjentów odczuwa ból mięśni, 84% odczuwa bóle stawów, a ponad 80% odczuwa bóle głowy. Na fakt, że jest to bardzo istotny objaw w CFS wskazuje to, że kryteria CDC zawierają pięć objawów choroby związanych z bólem: ból mięśni, ból stawów, ból głowy, ból gardła, tkliwe węzły chłonne. Pacjenci ponadto skarżą się na bóle brzucha, bóle w klatce piersiowej, przeczulicę oraz sztywność. Wykazano, że ból spowodowany CFS jest związany z poziomem niepełnosprawności i zwolnieniami chorobowymi. [104,111,112]

Mechanizm powstawania bólu u pacjentów z ME/CFS nadal nie jest do końca poznany. Ciekawe jest, że u pacjentów dolegliwości bólowe nasilane są np. wysiłkiem fizycznym. W warunkach fizjologicznych próg bólu zwiększa się podczas aktywności fizycznej. Ćwiczeniom towarzyszą dynamiczne zmiany w układzie krążenia, które powodują zwiększony przepływ krwi i redystrybucję krwi w celu zaspokojenia zapotrzebowania energetycznego pracujących mięśni. Te zmiany hemodynamiczne są indukowane przez aktywację gałęzi współczulnej oraz hamowanie gałęzi przywspółczulnej AUN [113,114]. Uważa się, że wzrost HR oraz RR podczas wysiłku fizycznego aktywuje baroreceptory tętnicze, co wiąże się z uwolnieniem endogennych opioidów, czynników wzrostu i innych silnych mechanizmów hamujących ból, m. in. wpływu na nocyceptywne szlaki zstępujące rdzenia kręgowego i mózgowia [113]. Brak reakcji hamującej ból u pacjentów z ME/CFS może być związany jest ze zmniejszoną reaktywnością przywspółczulną podczas regeneracji po wysiłku oraz utrzymującym się po wysiłku wzrostem RR. Sugeruje to rolę baroreceptorów tętniczych w dysfunkcji analgezji powysiłkowej u pacjentów z ME/CFS [113,114].

I.2.5.7. Inne objawy

- **Zaburzenia odporności.** Wśród najczęstszych objawów związanych z zaburzeniami odporności u pacjentów z ME/CFS występują: nawracające objawy grypopodobne, zwiększona podatność na infekcje, wydłużony okres rekonwalescencji po infekcjach, bolesna limfadenopatia szyjna i/lub pachowa, niezwiązane z infekcją bóle gardła, stany podgorączkowe lub gorączka, poty, poczucie „bycia chorym”. Objawy te mogą występować z różnym nasileniem, a także nasilają się na skutek aktywności fizycznej lub psychicznej pacjenta, jako wyraz PEM [107]. Wśród przyczyn wymienionych

objawów upatruje się zaburzoną funkcję komórek NK, oraz poziomu niektórych cytokin. Istnieje wiele doniesień na temat zaburzonej cytotoksyczności komórek NK u osób z ME/CFS. W największym badaniu Fletcher i wsp. na grupie 176 pacjentów z ME/CFS, potwierdzono gorszą funkcję komórek NK, niż w grupie kontrolnej [104,107]. Niska cytotoksyczność komórek NK nie jest jednak specyficzna dla ME/CFS. Jest również obecna u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, chorobami nowotworowymi czy endometriozą, a także u osób starszych, palaczy tytoniu oraz u osób z deprywacją snu [104,115].

- **Objawy gastroenterologiczne.** U pacjentów z ME/CFS znamienne częściej występują dolegliwości z przewodu pokarmowego, takie jak: nudności, szybkie poposiłkowe uczucie sytości, wzdęcia, nieuzasadnione chudnięcie, objawy zespołu jelita drażliwego (ang. *irritable bowel syndrome*, IBS) - zaburzenia rytmu wypróżnień, biegunki lub zaparcia, bóle brzucha. Objawy te charakterystyczne są przede wszystkim dla nastolatków i młodych dorosłych z ME/CFS. Należy zawsze przeprowadzić dokładną diagnostykę różnicową, poszukując innych przyczyn tych dolegliwości, m.in. nowotwory przewodu pokarmowego. [3,116]
- **Inne.** Dużą część pacjentów z ME/CFS dotyka nietolerancja alkoholu, nadwrażliwość na leki, perfumy, dym tytoniowy czy substancje chemiczne [3]. Określamy to mianem Zespołu Chemicznej Nadwrażliwości (ang. *Multiple Chemical Sensitivities*, MCS). MCS może współistnieć z innymi schorzeniami, w tym chorobami alergicznymi [117].

I.2.6. Diagnostyka ME/CFS

Według danych MEA (ang. *Mialgic Encephalomyelitis Assosiation*) z lutego 2016 roku ponad 60% pacjentów z ME/CFS otrzymuje prawidłową diagnozę po więcej niż roku od początku objawów, a tylko 4% po mniej niż 3 miesiącach [3]. Pomimo licznych badań naukowych, dopracowywania kryteriów diagnostycznych i poszerzania wiedzy na temat przebiegu zespołu przewlekłego zmęczenia, postawienie precyzyjnego rozpoznania wciąż pozostaje wyzwaniem klinicznym.

Krótkie okresy osłabienia często następują po różnych ostrych stanach infekcyjnych. Jednak jeżeli objawy takie utrzymują się 3-4 tygodnie po infekcji, u osoby która wcześniej była zdrowa, należy rozważyć diagnozę powirusowego zespołu zmęczenia (ang. *post-viral fatigue syndrome*, PVFS), gdyż szybkie wdrożenie leczenia może zmniejszyć odległe powikłania oraz

złagodzić przebieg choroby [3]. Podejrzenie ME/CFS powinnyśmy wysunąć u pacjenta z czterema kluczowymi objawami (tj. zmęczenie indukowane wysiłkiem (PEM), sen nie dający odpoczynku, upośledzenie funkcji kognitywnych, objawy dysautonomii) utrzymującymi się przez minimum 6 tygodni u osoby dorosłej (4 tygodnie u dziecka), jeżeli objawy te istotnie upośledzają codzienną aktywność zawodową, edukacyjną, socjalną pacjenta i wykluczone zostały wszelkie inne choroby, mogące tłumaczyć te objawy [3].

Przydatne wytyczne co do leczenia i diagnostyki przedstawił brytyjski Instytut NICE (ang. *National Institute for Health and Clinical Excellence*) [4]. Dokument ten podkreśla, że w przypadku ME/CFS, najistotniejszym elementem procesu diagnostycznego pozostaje starannie zebrany wywiad medyczny. Należy zwrócić uwagę przede wszystkim na objawy osiowe choroby, takie jak zmęczenie indukowane wysiłkiem, zaburzenia funkcji poznawczych, „nieregenerujący” sen, nietolerancję ortostatyczną, objawy grypopodobne, czy ból. Ważny też jest moment zachorowania, czy poprzedziła go infekcja, silny stres, szczepienie, uraz [3,4,118]. Zauważone w badaniu podmiotowym objawy oraz opisywany przebieg choroby należy następnie ocenić wg kryteriów diagnostycznych dla ME/CFS.

Dotychczas opublikowano około 20 różnych kryteriów diagnostycznych dla ME, CFS, PVFS lub ME/CFS, większość z nich została utworzona w celach badawczych i tylko część z nich znalazła zastosowanie kliniczne. Do najbardziej rozpowszechnionych i najczęściej wykorzystywanych należą kryteria *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), znane również jako kryteria Fukudy, kryteria kanadyjskie (*Canadian Consensus Criteria, CCC*) oraz kryteria *International Consensus Criteria* dla ME (ME/ICC) [3].

Kryteria Fukudy (Tabela 3.) zostały opublikowane w 1994 i do dzisiaj są często wykorzystywane do celów naukowych i w praktyce klinicznej. W kryteriach tych wyodrębniono obligatoryjne kryteria większe, obejmujące występowanie przez minimum 6 miesięcy stałego lub nawracającego, niewyjaśnionego uczucia zmęczenia, u dotychczas zdrowej osoby, które istotnie upośledza dotychczasową społeczną, zawodową czy osobistą aktywność pacjenta, a także wykluczenie innych chorób przewlekłych, przede wszystkim psychiatrycznych, w których obrazie klinicznym może występować zmęczenie. Dodatkowo w celu postawienia rozpoznania muszą zostać spełnione przynajmniej 4 z 8 kryteriów mniejszych [16]. Istotnym ograniczeniem kryteriów Fukudy jest długość trwania objawów przed postawieniem rozpoznania, co znacznie ogranicza ich przydatność kliniczną u wielu pacjentów [2,3,14,16].

Tabela 3. Kryteria Fukudy 1994r. [16]

Kryteria główne	<ul style="list-style-type: none"> - Występowanie przez co najmniej 6 miesięcy stałego lub nawracającego uczucia zmęczenia u osoby negującej podobne objawy w przeszłości; uczucie zmęczenia nie ustępuje pomimo odpoczynku w łóżku i jest wystarczająco silne, aby znacząco wpłynąć na aktywność zawodową, społeczną i osobistą chorego; - Wykluczenie obecności innego schorzenia somatycznego lub psychicznego objawiającego się uczuciem zmęczenia.
Kryteria pomocnicze	<ul style="list-style-type: none"> - Przedłużone uczucie ogólnego zmęczenia po wcześniej tolerowanym wysiłku fizycznym lub mentalnym (trwające dłużej niż 24h). - Nadmierna senność lub bezsenność. - Znaczące pogorszenie pamięci i/lub koncentracji. - Bóle mięśniowe. - Wędrujące bóle stawowe bez obrzęku i zaczerwienienia. - Niezlokalizowane bóle głowy o charakterze innym niż bóle głowy przed chorobą. - Bolesne, powiększone węzły chłonne szyjne lub pachowe. - Częste lub nawracające bóle gardła.
Objawy występują lub nawracają w ciągu przynajmniej 6 kolejnych miesięcy i nie występowały przed początkiem choroby.	

W 2003 roku grupa badawcza pod nadzorem Carruthers zaproponowała nowe kryteria, nazwane kryteriami kanadyjskimi (ang. *Canadian Clinical Criteria, CCC*) Kryteria te zwracają uwagę na szerokie spektrum objawów i bardziej podkreślają wagę dysfunkcji układu neurologicznego i immunologicznego, pojawiające się u pacjentów z ME/CFS, jednak podobnie jak w innych kryteriach dolegliwości muszą mieć nagły początek i występować przez minimum 6 kolejnych miesięcy (3 miesiące dla dzieci) [3]. W 2015 roku Asprusten i wsp. przebadali 120 pacjentów z rozpoznaniem wcześniej ME/CFS na podstawie kryteriów Fukudy [119]. Oceniono, że 46 z nich spełniało kryteria kanadyjskie (kryteria dodatnie), 69 nie spełniało kryteriów (kryteria ujemne), a 5 nie mogło być sklasyfikowanych [119]. Okazało się, że w obydwu analizowanych grupach wykładniki przebiegu i zaawansowania ME/CFS były w większości porównywalne. Może świadczyć to o tym że kryteria kanadyjskie mają ograniczoną wartość diagnostyczną, a ich stosowanie budzi obecnie kontrowersje [119].

W 2011 roku zespół ekspertów zaproponował kryteria diagnostyczne wyłącznie dla ME - *International Consensus Criteria (ME/ICC)*, zalecając jednocześnie porzucenie nazwy CFS i zaprzestanie stosowania jego kryteriów [3,110,120]. Kryteria ME/ICC przedstawiono w Tabeli 4. [110]. Aby spełnić te kryteria u pacjenta muszą występować wszystkie cechy charakterystyczne dla nietolerancji wysiłku fizycznego (część A), przynajmniej po jednym

objawie z czterech grup objawów zaburzeń neurologicznych (część B) oraz co najmniej po jednym objawie z grup objawów w części C i D kryteriów [110].

Należy podkreślić, że do postawienia rozpoznania nie jest tutaj konieczne utrzymywanie objawów przez minimum 6 miesięcy. Podkreślono przez to rolę szybkiego postawienia rozpoznania zespołu przewlekłego zmęczenia, jako kluczową dla zahamowania narastania objawów i rozwoju ciężkich postaci choroby. Dodatkowo warto zauważyć, że w tych kryteriach samo zmęczenie nie jest objawem koniecznym do rozpoznania. Zaakcentowano znaczenie dokładnej oceny objawów klinicznych u pacjentów, przede wszystkim powysiłkowego uczucia zmęczenia, niskiej wytrzymałości fizycznej chorych (przy wykonywaniu wcześniej tolerowanych wysiłków), szybkiej męczliwości, narastającego charakteru objawów klinicznych oraz przedłużonego okresu regeneracji po wysiłku fizycznym lub mentalnym. Badania przeprowadzone przez Jasona i wsp. [121], które porównywały pacjentów z rozpoznaniem zespołu przewlekłego zmęczenia postawionym zgodnie z kryteriami ICC, z pacjentami spełniającymi Kryteria Fukudy, ujawniły, że kryteria ICC identyfikują tych pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia, którzy mają większe nasilenie objawów klinicznych.

Tabela 4. Kryteria ME/ICC 2011r. [110]

A.	Powysiłkowe nasilenie zmęczenia (ang. <i>post-exertional malaise/ post-exertional neuroimmune exhaustion, PEM/PENE</i>)
1.	Szybkie narastanie zmęczenia fizycznego, wyczerpania i/lub zaburzeń poznawczych w odpowiedzi na wysiłek, który może być niewielki (czynności życia codziennego, proste zadania umysłowe), objawy mogą nawracać.
2.	Nasilanie się objawów np. bólowych, grypopodobnych, w odpowiedzi na wcześniej tolerowany wysiłek.
3.	Powysiłkowe nasilenie zmęczenia może wystąpić od razu po wysiłku lub z kilkugodzinnym/kilkudniowym opóźnieniem.
4.	Okres regeneracji jest wydłużony zwykle ponad 24 godziny, nawet do kilku dni lub tygodni.
5.	Niski próg zmęczenia fizycznego i psychicznego (brak wytrzymałości) powoduje znaczne obniżenie poziomu aktywności pacjenta, w porównaniu do okresu przed chorobą.
B.	Zaburzenia neurologiczne
1.	Zaburzenia funkcji neurokognitywnych Utrudnione przetwarzanie informacji: spowolnienie myślenia, zaburzenia koncentracji, splątanie, dezorientacja, trudności w podejmowaniu decyzji, spowolniona mowa, nabyta lub wysiłkowa dysleksja Osłabienie pamięci krótkotrwałej: m.in. trudności z powtórzeniem co się mówiło, z przypominaniem sobie słów lub informacji, słaba pamięć robocza
2.	Ból Bóle głowy: przewlekłe, uogólnione, często z towarzyszącym bólem oczu, za oczami lub z tyłu głowy, migrena; napięciowe bóle głowy Bóle mięśni, ścięgien, stawów, brzucha, bóle w klatce piersiowej. Mają charakter niezapalny, mogą być wędrować lub promieniować. Np. uogólniona hiperalgeza, rozległy ból (może spełniać kryteria fibromialgii), ból mięśniowo-powięziowy.
3.	Zaburzenia snu Zaburzenia snu: m.in. bezsenność, nadmierna senność, również drzemki w ciągu dnia odwrócenie rytmu dobowego, częste wybudzanie, żywe sny/koszmary nocne Sen nie dający odpoczynku: m.in. uczucie wyczerpania niezależnie od długości snu, senność w ciągu dnia
4.	Zaburzenia neurosensoryczne, percepcyjne i motoryczne Zaburzenia neurosensoryczne i percepcyjne: m.in. niezdolność do skupienia wzroku, nadwrażliwość na światło, hałas, wibracje, zapach, smak i dotyk; zaburzona percepcja przestrzenna Zaburzenia motoryczne: m.in. osłabienie mięśni, drżenia mięśniowe, zaburzenia koordynacji, uczucie niestabilności w pozycji pionowej, ataksja
C.	Objawy z układu immunologicznego, pokarmowego i moczowo-płciowego
1.	Objawy grypopodobne, o charakterze nawracającym lub przewlekłym, uaktywniają się lub nasilają wraz z wysiłkiem np. ból gardła, zapalenie zatok nosowych, bolesna limfadenopatia szyjna lub pachowa
2.	Skłonność do infekcji wirusowych, wydłużony okres rekonwalescencji
3.	Przewód pokarmowy: m.in. nudności, ból brzucha, wzdęcia, zespół jelita drażliwego
4.	Układ moczowo-płciowy: m.in. parcie na mocz, częste oddawanie moczu, nokturia
5.	Nadwrażliwość na żywność, leki, zapachy lub środki chemiczne
D.	Objawy dysfunkcji układu autonomicznego i/lub metabolicznego
1.	Układ sercowo-naczyniowy: m.in. nietolerancja ortostatyczna (OI), hipotensja ortostatyczna, zespół tachykardii ortostatycznej (PoTS), kołatanie serca z lub bez zaburzeń rytmu serca, zawroty głowy
2.	Układ oddechowy: m.in. duszności, uczucie braku powietrza, osłabienie mięśni klatki piersiowej – wzmożony wysiłek oddechowy
3.	Upośledzenie termoregulacji m.in. obniżona temperatura ciała, znaczne wahania dobowe temperatury ciała; epizody pocenia się, nawracające uczucie gorąca z towarzyszącą gorączką lub bez, zimne kończyny
4.	Nietolerancja niskich lub wysokich temperatur

W 2015r. *the Institute of Medicine* (IOM) zaproponował zmianę nazwy zespołu przewlekłego zmęczenia na – ogólnoustrojową nietolerancję wysiłku (ang. *systemic exertion intolerance disease, SEID*), co miało na celu lepsze podkreślenie kluczowych objawów choroby. Dodatkowo zarekomendowano nową definicję kliniczną i nowe kryteria diagnostyczne, przedstawione w Tabeli 5. Kryteria te również zakładają występowanie objawów przez minimum 6 miesięcy, podkreślając jednocześnie, że objawy muszą występować co najmniej przez połowę tego czasu, a także mieć przynajmniej umiarkowane nasilenie. [3]

Tabela 5. Kryteria *the Institute of Medicine* dla SEID 2015r. [3]

Kryteria główne – wymagane do rozpoznania:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Utrzymujące minimum 6 kolejnych miesięcy, znaczne osłabienie lub niesprawność w zakresie aktywności naukowej, społecznej i osobistej, w porównaniu z okresem sprzed wystąpienia choroby, któremu towarzyszy przewlekłe, ciężkie zmęczenie, powstałe <i>de novo</i> (nie występujące całe życie), niebędące skutkiem intensywnego wysiłku fizycznego i nieustępujące po odpoczynku. 2. Powysiłkowe nasilenie zmęczenia. 3. Sen nie dający regeneracji.
Kryteria dodatkowe – minimum 1 z 2 kryteriów:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Zaburzenia funkcji poznawczych. 2. Nietolerancja ortostatyczna.

Następnym krokiem w diagnostyce jest przeprowadzenie badania fizykalnego, które u niektórych pacjentów może być prawidłowe. Z odchyłeń klinicznych w badaniu przedmiotowym u pacjentów z ME/CFS możemy stwierdzić m.in. spowolnienie mówienia, apatię, błądność powłok skórnych, limfadenopatię miejscową (najczęściej szyjną) lub uogólnioną, tachykardię spoczynkową, hipotonię, a po próbie pionizacji objawy nietolerancji ortostatycznej (np. PoTS). Podstawowe badanie neurologiczne nie ujawnia zwykle odchyłeń, a w zaawansowanych stadiach choroby można zaobserwować osłabienie siły mięśniowej wyrażone słabszym uściskiem dłoni, czy zaburzenia czucia, takie jak ból neuropatyczny, allodynia [122,123].

Przy podejrzeniu ME/CFS należy przeprowadzić badania laboratoryjne oraz badania dodatkowe. Wśród nich m.in. morfologię z rozmazem, CRP, OB, badanie ogólne moczu, poziom żelaza, ferrytyny, stężenie witaminy B12, elektrolity, białko całkowite, albuminy, glikemia na czczo, aktywność transaminaz, poziom kreatyniny, kinazy kreatyninowej oraz poziom hormonów: testosteronu, kortyzolu, tyreotropiny, tyroksyny, trójjodotyroniny, należy

również ocenić zapis EKG [3,4,123]. W wybranych przypadkach zaleca się wykonanie badań w kierunku chorób zakaźnych (m. in. przeciwciała przeciwko *Chlamydia pneumoniae*, wirusom zapalenia wątroby typu B i C, *Mycoplasma pneumoniae*, boreliozie). Dokładny wywiad chorobowy i badanie fizykalne pomaga ustalić zakres badań dodatkowych, m. in. wykonanie RM mózgowia (badanie może wskazywać na stwardnienie rozsiane), biopsję mięśnia (jeśli mamy podniesiony poziom kinazy kreatyninowej), przeciwciała w kierunku chorób układowych tkanki łącznej (przy podejrzeniu takiej choroby), polisomnografię (przy podejrzeniu obturacyjnego bezdechu sennego), elektroneurografię/elektromiografię (przy podejrzeniu chorób nerwowo-mięśniowych) [3,4,123]. Wskazane jest również wykonanie oceny AUN za pomocą testu pionizacyjnego, a także wykonanie ergospirometrii (CPET) w przypadkach wątpliwych [123]. Najczęściej wykonuje się dwukrotną próbę CPET, w odstępie 24 godzin, a pacjenci z ME/CFS uzyskują znacznie gorsze rezultaty drugiego dnia. Próba ta obiektywnie potwierdza PEM oraz wskazuje stopień niesprawności pacjenta [2,123].

Brak biochemicznego markera powoduje, że diagnoza ME/CFS w dużej mierze jest nadal diagnozą z wykluczenia, dlatego do rozpoznania ME/CFS niezbędna jest dokładna diagnostyka różnicowa z uwzględnieniem szeregu chorób z różnych dziedzin medycyny. Najważniejsze z nich zostały przedstawione w Tabeli 6. [3].

Tabela 6. Różnicowanie ME/CFS, na podstawie: *ME/CFS/PVFS An Exploration of the Key Clinical Issues, Charles Shepherd, 13th edition, 2022* [3]

Grupa schorzeń	Przykłady
Choroby układu sercowo naczyniowego	Nadciśnienie płucne, choroby zastawek
Choroby endokrynologiczne i metaboliczne	Choroba Addisona, hemochromatoza, nadczynność przytarczyc, niedoczynność i nadczynność tarczycy, guzy przysadki, zespół policystycznych jajników, cukrzyca
Choroby gastroenterologiczne	Celiakia, choroba Leśniowskiego-Crohna, zespół jelita drażliwego
Choroby hematologiczne	Niedokrwistość
Choroby zakaźne	Bruceloza, zapalenie wątroby typu B i C, HIV, borelioza, leptospiroza, zespół post polio, toksoplazmoza
Choroby nowotworowe	Guzy mózgu, chłoniak Hodgkina
Choroby nerwowo-mięśniowe	Stwardnienie rozsiane, miastenia, choroba Parkinsona, miopatie, Zespół Guillaína – Barre
Pierwotne zaburzenia snu	Narkolepsja, obturacyjny bezdech senny
Choroby psychiczne	Zaburzenia lękowe, depresja, schizofrenia
Choroby reumatologiczne	Fibromialgia, polimialgia reumatyczna, zespół Sjogrena, toczeń rumieniowaty układowy

Należy pamiętać, że szereg chorób przewlekłych, często również o niewyjaśnionej etiologii, występuje u pacjentów z ME/CFS znacznie częściej niż w populacji ogólnej. Należą do nich fibromialgia, zespół jelita drażliwego, migrenowe bóle głowy, bóle miednicy niezwiązane z miesiączką, endometrioza, niewyjaśnione zatrzymanie miesiączkowania, zespół hipermobilności stawów, śródmiąższowe zapalenie cewki moczowej i pęcherza moczowego, zespół aktywacji makrofagów (ang. *macrophage activation syndrome*, MAS) [3]. Współwystępowanie innych chorób przewlekłych opisuje się aż u 97% pacjentów z ME/CFS [41,118], mogą się one rozwijać przed, w trakcie, lub po wystąpieniu objawów ME/CFS [124]. Wówczas diagnoza ME/CFS nie jest wykluczona, jednak postawienie rozpoznania jest dużo bardziej utrudnione [3].

Szczególnie często ME/CFS współwystępuje z fibromialgią (FM), a objawy tych chorób częściowo pokrywają się. U pacjentów z tą chorobą ponad 90% odczuwa przewlekłe zmęczenie, a z kolei podobna liczba wśród pacjentów z ME/CFS doświadcza dolegliwości bólowych mięśni i stawów. W różnych opracowaniach od 20-70% pacjentów z fibromialgią spełniało kryteria ME/CFS, a fibromialgia występowała u 35-70% pacjentów z ME/CFS [2,3,41]. Badania dowodzą jednak, że choroby te różnią się między sobą profilem hormonalnym, molekularnym oraz autonomicznym [125], a kluczową cechą jest brak powysiłkowego nasilenia zmęczenia (PEM), które jest kluczowym objawem ME/CFS, a nie występuje w fibromialgii [126,127].

Również często współwystępują z ME/CFS objawy nietolerancji ortostatycznej (ang. *orthostatic intolerance*, IO). Objawy dysfunkcji układu autonomicznego, takie jak między innymi zespół posturalnej tachykardii ortostatycznej (PoTS), zmniejszona objętość krwi, czy nawet hipowolemia, są opisywane jako charakterystyczne dla ME/CFS i często są ujęte w kryteriach diagnostycznych ME/CFS [128]. Charakterystyczne jest jednak to, że nie u wszystkich pacjentów z IO można rozpoznać ME/CFS, a w większości innych chorób współwystępujących z zespołem przewlekłego zmęczenia, również obserwuje się niektóre objawy dysautonomii [128].

Inną chorobą często współwystępującą z ME/CFS, jak również z fibromialgią (FM), jest zespół jelita drażliwego (ang. *irritable bowel syndrome*, IBS). Może to sugerować potencjalny udział dysbiozy jelitowej i aktywacji osi mózgowo-jelitowej, leżący u podstaw patogenezy i rozwoju tych zaburzeń, co mogłoby tłumaczyć częste współwystępowanie ME/CFS, IBS i FM. Niektóre badania naukowe wykazały jednak, że profile mikrobiomu u pacjentów z samym

ME/CFS różnią się w porównaniu do pacjentów chorujących jednocześnie na ME/CFS i IBS [129]. Badania sugerują, że IBS może być początkowym objawem ME/CFS, jako że odnotowano rozwój ME/CFS u 65% pacjentów z rozpoznaniem IBS [130].

Aaron i wsp. w swoich badaniach na bliźniakach potwierdzili znacząco częstsze współwystępowanie ME/CFS, FM, IBS, przewlekłych bólów miednicy czy nadwrażliwości na substancje chemiczne. Po wykluczeniu m.in. chorób psychicznych u badanych pacjentów, wysunęli oni hipotezę, że te znamienne często współwystępujące choroby, z częściowo wspólnym obrazem klinicznym, mogą mieć częściowo wspólne podłoże poprzez udział podobnych lub takich samych czynników genetycznych, molekularnych i środowiskowych [131].

Po rozpoznaniu zespołu przewlekłego zmęczenia, niezbędna jest obiektywna ocena nasilenia objawów zgłaszanych przez pacjenta. Wykorzystuje się w tym celu sformalizowane skale oceny nasilenia zmęczenia, w których pacjent samodzielnie, w sposób subiektywny ocenia nasilenie swoich objawów, a także swój nastrój, ewentualne objawy depresji, ból, czy niepełnosprawność. Jest to również narzędzie do późniejszego monitorowania stanu pacjenta oraz oceny skuteczności podjętej terapii. Do najczęściej stosowanych skal należą:

- Skala oceny wpływu zmęczenia (ang. *Fatigue Impact Scale*, FIS) [132]
- Skala oceny nasilenie zmęczenia (ang. *Fatigue Severity Scale*, FSS) [133]
- Skala FibroFatigue (ang. *FibroFatigue Scale*, FFS) [134]
- Skala oceny zmęczenia Chadlera (ang. *Chalder Fatigue Scale*, CFQ) [135]
- Szpitalna Skala Lęku i Depresji (ang. *Hospital Anxiety and Depression Scale*, HADS) [136]
- Skala depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*, BDI) [137]
- Kwestionariusz DePaul'a (ang. *DePaul Symptom Questionnaire*, DSQ) [138]

Przy rozpoznawaniu zespołu przewlekłego zmęczenia należy wykonać również ocenę objawów, które pojawiają się w przebiegu ME/CFS, takich jak na przykład dysautonomia. Diagnostyka czynnościowa zaburzeń autonomicznego układu nerwowego opiera się na licznych badaniach uzupełniających, które dzielą się ze względu na układ lub narządy, których dotyczą. Szczególnie istotne z punktu widzenia diagnostyki są próby oceniające czynność układu sercowo-naczyniowego. Stosunkowo prostą i nieinwazyjną metodą jest analiza zmienności akcji serca (ang. *heart rate variability*, HRV) oraz analiza zmienności ciśnienia tętniczego (ang. *blood pressure variability*, BPV). Podłoże HRV stanowi fizjologiczna zmienność

rytmu zatokowego serca, której wyrazem jest występowanie różnic czasu trwania kolejnych cykli serca (odstępów RR). HRV to zjawisko naturalne, uwarunkowane rytmiczną aktywnością współczulnej i przywspółczulnej gałęzi nerwu błędnego, czy cyklem oddechowym. Autonomiczny układ nerwowy (AUN) jest kluczowym neurogennym czynnikiem regulującym częstotliwość pracy serca, odpowiedzialnym za dostosowanie rytmu serca do aktualnych potrzeb organizmu. Duża zmienność i złożoność HRV jest wyrazem znacznych zdolności adaptacyjnych organizmu i zwykle jest korzystna dla organizmu [139,140]. Oceny HRV najczęściej dokonuje się za pomocą analizy czasowej lub częstotliwościowej. Analiza czasowa powinna być stosowana do oceny EKG z długotrwałej rejestracji (optymalnie 24h). Do oceny krótszych odstępów czasowych wykorzystuje się najczęściej analizę częstotliwościową HRV i BPV, gdzie przedmiotem oceny są składowe określające gęstość widma mocy w zdefiniowanych przedziałach częstotliwościowych. Całkowita moc widma (ang. *total power*, TP) określa całościowy wpływ składowych harmonicznych na rytm zatokowy. Analizie podlegają też jego składowe, w zależności od zakresu częstotliwości. Aktywność nerwu błędnego (układ przywspółczulny) odzwierciedla widmo wysokich częstotliwości 0,15-0,4 Hz (ang. *high frequency*, HF). Zakres widma niskich częstotliwości 0,04-0,15 Hz (ang. *low frequency*, LF), odzwierciedla aktywność głównie gałęzi współczulnej AUN, pasmo bardzo niskich częstotliwości (ang. *very low frequency*, VLF) 0,003- 0,04 Hz) jest interpretowane jako ocena wpływu mechanizmów termoregulacyjnych oraz zmian aktywności układu RAA (renina-angiotensyna- aldosteron) [140]. Iloraz LF/HF, czyli stosunek mocy gęstości widma niskich do wysokich częstotliwości, jest powszechnie uznawanym wskaźnikiem czynnościowej równowagi współczulno-przywspółczulnej [140–142]. Do oceny HRV, BPV oraz wskaźnika LF/HF w badaniach naukowych, badacze w ostatnich latach najczęściej wykorzystują test pionizacyjny (HUT) w różnych sytuacjach klinicznych. Większość opracowań dotyczyła pacjentów z omdleniami w przebiegu zespołów wazowagalnych, ale także pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, przebytymi zespołami wieńcowymi. Fizjologicznie w chwili pionizacji wzrasta moc widma niskich częstotliwości, a maleje moc widma wysokich częstotliwości. Odpowiada to pobudzeniu składowej współczulnej AUN i zmniejszeniu napięcia składowej przywspółczulnej [141,142].

W fizjologicznym przebiegu starzenia, czy w chorobach, takich jak m. in. nadciśnienie tętnicze, niewydolność krążenia, cukrzyca, a także w przewlekłym stresie czy w przewlekłym zmęczeniu, może dochodzić do zredukowania efektywnych pętli regulacyjnych kontrolujących

rytm serca i do zmniejszenia wpływu czynników pozasercowych na cykliczną aktywność węzła zatokowo-przedsionkowego. W efekcie dochodzi do ograniczenia fizjologicznej niemiarowości rytmu serca i zmniejszenia zdolności odpowiedzi sercowej na zaburzenia środowiska wewnętrznego [139,143,144]. Wyniki dotychczasowych prac oceniających czynność AUN u pacjentów z ME/CFS są niejednoznaczne. Najnowsze opracowania sugerują jednak, że zaburzenia w pracy AUN mogą być kluczowym ogniwem w patogenezie ME/CFS i w przyszłości posłużyć jako cenny marker w diagnostyce tej jednostki [143,144].

I.3. Strategie leczenia zespołu przewlekłego zmęczenia

Nie istnieją żadne leki zatwierdzone przez FDA (Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*) do leczenia ME/CFS. Ze względu na zakres objawów ME/CFS podejścia do leczenia są bardzo zróżnicowane. Stosuje się różne, farmakologiczne i nefarmakologiczne metody terapii objawowej, w celu zmniejszenia nasilenia objawów choroby, jednak dowody na ich skuteczność są nadal ograniczone. Obecnie przyjmuje się, że zalecane strategie postępowania powinny obejmować zindywidualizowane programy stymulacji, mające na celu łagodzenie objawów i poprawę codziennej aktywności pacjenta. Nie ma wątpliwości, że dalsze wiarygodne badania naukowe w zakresie metod skutecznego leczenia ME/CFS oraz poszukiwanie metod leczenia przyczynowego, są niezbędne.

I.3.1. Leczenie nefarmakologiczne

Wśród metod leczenia nefarmakologicznego u pacjentów z ME/CFS zaleca się postępowanie objawowe, takie jak higiena snu, strategie relaksacyjne. W przypadku walki z bólem można stosować fizjoterapię, akupunkturę. Ponadto zalecana jest zdrowa, zbilansowana dieta z ograniczeniem tłuszczów zwierzęcych i cukrów prostych, a także stosowanie suplementów diety (takich jak karnityna, kurkumina, koenzym Q10, magnez, kwas foliowy, witaminy z grupy B, witamina D3, żelazo). Zaleca się też zwiększenie podaży sodu w diecie oraz spożywanie odpowiedniej ilości płynów w ciągu dnia, co ma przeciwdziałać hipotonii.

Istnieje możliwość leczenia objawów dysautonomii. Przykładem takiego postępowania jest trening pionizacyjny stosowany w przypadku nasilonych objawów nietolerancji ortostatycznej. Terapia ta obejmuje naukę prawidłowego wstawania z pozycji siedzącej lub

leżącej, manewry wykonywane przy konieczności dłuższego stania np. ściskanie rąk, krzyżowanie nóg, napinanie mięśni. Trening ortostatyczny był przez pacjentów z ME/CFS akceptowany i dobrze tolerowany [3,123,145].

Bardzo ważnym aspektem leczenia nefarmakologicznego w zespole przewlekłego zmęczenia jest wprowadzenie równowagi między wysiłkiem a odpoczynkiem, zarówno w sferze fizycznej, jak i umysłowej. W tym celu stosuje się m.in. terapię poznawczo-behawioralną (ang. *Cognitive Behavioural Therapy*, CBT), terapię adaptacyjną (ang. *Adaptive Pacing Therapy*, APT) oraz terapię stopniowanym wysiłkiem fizycznym (ang. *Graded Exercise Therapy*, GET) [3,145].

I.3.2. Leczenie farmakologiczne

Leczenie farmakologiczne, mimo wielu badań naukowych, dotyczących wykorzystania różnych substancji czynnych w farmakoterapii ME/CFS, nie przyniosło do tej pory oczekiwanych rezultatów. Żaden pojedynczy lek w badaniach klinicznych nie skutkował istotnym złagodzeniem procesu chorobowego [3,146]. Jednakże wybrane preparaty mogą być pomocne w łagodzeniu objawów chorobowych [3].

Leki przeciwdepresyjne:

Wśród leków poddanych badaniom klinicznym znalazły się leki antydepresyjne. Depresja często współistnieje z ME/CFS, jednakże nie jest objawem ME/CFS. Pacjenci często z różnym skutkiem przyjmują leki przeciwdepresyjne. W niektórych opracowaniach około 40% pacjentów z ME/CFS zażywało przewlekłe leki przeciwdepresyjne z różnych grup [147]. Obecnie nie ma przekonujących dowodów na skuteczność leków przeciwdepresyjnych w leczeniu przyczynowym [3,148]. W metaanalizie przeprowadzonej przez Kreijkamp-Kaspers i wsp. tylko jedno z pięciu randomizowanych badań klinicznych pokazało korzyści odnoszone ze stosowania leków przeciwdepresyjnych u pacjentów z ME/CFS i to tylko u osób u których leczenie było poprzedzone terapią CBT [147,149]. Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (ang. *tricyclic antidepressants*, TCA), a w szczególności amitryptylina stosowana w niskich dawkach, wpływała na poprawę jakości snu, redukcję dolegliwości bólowych oraz wpływała korzystnie na wzrost energii u pacjentów. Inne leki z tej grupy (doksepina, desipramina, nortryptylina, imipramina) również poprawiały jakość snu, ponadto zmniejszały odczuwanie bólu [149,150].

Dawki stosowane w ME/CFS były niższe niż w przypadku leczenia depresji, również z powodu słabej tolerancji leków w grupie pacjentów z ME/CFS [149,150].

Z kolei leki z grupy inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI), czyli m. in. fluoksetyna, sertralina, paroksetyna, stosowane przez ponad 3 lata u pacjentów z ME/CFS powodowały co prawda zmniejszenie nasilenia zmęczenia, jednakże pacjenci byli przydzielani do grupy w sposób losowy, co wpływa na brak obiektywnego wyniku badania i możliwego wpływu niekontrolowanych zmiennych na wyniki badania [151].

Leki przeciwwirusowe:

Infekcja wirusowa jest potencjalnym czynnikiem wyzwalającym, który może odgrywać istotną rolę w zapoczątkowaniu rozwoju ME/CFS [3,47,49–58,63,152]. Dowody naukowe sugerujące rolę przewlekłego zakażenia wirusowego jako czynnika wywołującego i utrwalającego objawy zespołu przewlekłego zmęczenia są jednak nieliczne i niespójne [3]. Podjęto jednak próby leczenia ME/CFS lekami przeciwwirusowymi [3]. W badaniach naukowych z acyklowirem nie uzyskano istotnych korzyści klinicznych [153]. Początkowe badania kliniczne nad pochodną acyklowiru – walgancyklowirem dały pozytywne rezultaty. Pacjenci z ME/CFS, którym towarzyszyło podniesione miano przeciwciał przeciwko wirusom HHV-6 oraz EBV, po zakończonym leczeniu walgancyklowirem odczuwali istotną poprawę w poziomie aktywności oraz w zakresie funkcji poznawczych [154]. Montoya i wsp. w 2013 roku opublikowali wyniki badań przeprowadzonych na 30 pacjentach z ME/CFS, u których stwierdzono podniesione miano przeciwciał przeciwko wirusom HHV-6 oraz EBV, leczonych walgancyklowirem lub placebo przez okres 6 miesięcy. W grupie leczonej lekiem przeciwwirusowym zauważono istotną redukcję zmęczenia psychicznego oraz poprawę funkcji poznawczych. Korzystny efekt utrzymywał się do 9 miesięcy od zakończenia leczenia [155]. Mimo obiecujących wstępnych wyników badań naukowych, jednak na małych grupach pacjentów, towarzystwa naukowe nie zalecają jak na razie stosowania leków przeciwwirusowych w leczeniu ME/CFS. Niezbędne są dalsze badania na większej populacji, które mogłyby potwierdzić bądź nie skuteczność tych preparatów [3].

Leki przeciwbólowe i przeciwzapalne:

Wysunięto podejrzenie, że pacjenci z CFS/ME mogą odnieść korzyści z leczenia lekami z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), które są powszechnie stosowane w celu złagodzenia bólu i zmniejszenia stanu zapalnego. Theoharides i wsp. opisali, że ibuprofen i naproksen mogą zostać wykorzystane w łagodzeniu bólów mięśni i stawów, bólów głowy oraz stanów podgorączkowych w początkowych okresach ME/CFS albo przy dużym nasileniu objawów [156]. Inne próby obejmowały leczenie gabapentyną i pregabaliną, których skuteczność zauważono w łagodzeniu bólów neuropatycznych oraz problemów ze snem [149]. Z kolei opioidowe leki przeciwbólowe, takie jak tramadol, kodeina czy morfina, mogą zmniejszać nasilenie bólu u pacjentów z dużym nasileniem objawów, na krótki czas [157]. Leki te mają głównie potencjał objawowy, ocena ich skuteczności i wskazań do stosowania w ME/CFS wymagają dalszych badań.

I.4. Mikrobiota

I.4.1. Wprowadzenie

Zdrowie organizmu człowieka warunkowane jest licznymi czynnikami zewnętrznymi i wewnętrznymi, a jednym z nich jest bogaty świat drobnoustrojów funkcjonujący w organizmie ludzkim. Ludzką mikrobiotę stanowi około 10 000 gatunków mikroorganizmów, których łączna liczba wynosi nawet 10^{13} , a jej najbogatszy gatunkowo przedział to mikrobiota jelitowa [158,159]. Znaczącą większość tych drobnoustrojów stanowią bakterie, jednak obecne są tutaj również wirusy, grzyby, pasożyty, archeony i niektóre jednokomórkowe eukariota. Drobnoustroje przewodu pokarmowego człowieka odgrywają ważną rolę w utrzymaniu zdrowia gospodarza poprzez dostarczanie energii, składników odżywczych i witamin oraz ochronę immunologiczną [160,161].

Szacuje się, że liczba genów w genomie bakteryjnym wynosi ok. 3,3 mln, czyli jest około 150 razy większa niż w genomie ludzkim. Zbiór genów mikroorganizmów określany jest mianem trzeciego, głównego genomu człowieka, po jądrowym i mitochondrialnym. Suma genów człowieka i mikroorganizmów tworzy wspólnie mieszankę cech metabolicznych, niemożliwych do uzyskania bez informacji genetycznej zawartej w drobnoustrojach. Np. niektóre z mikroorganizmów bytujących w jelitach kodują białka zaangażowane w funkcje ważne dla zdrowia gospodarza, takie jak enzymy wymagane do hydrolizy niestrawionych związków pokarmowych oraz syntezy witamin. Taki układ człowiek-mikroorganizmy można

nazwać superorganizmem. Jego funkcjonowanie wymaga przekazywania bardzo rozbudowanych i wydajnych sygnałów między komórkami gospodarza a poszczególnymi drobnoustrojami. W związku z tym pomiędzy gospodarzem a mikroorganizmami toczy się cały czas nieustanna interakcja na poziomie genetycznym, metabolicznym i immunologicznym. Jeżeli interakcja ta przebiega w niezakłócony sposób pomiędzy zdrowym organizmem gospodarza, a prawidłową mikrobiotą, powstaje unikalna, dynamiczna homeostaza, która jest warunkiem prawidłowego działania organizmu człowieka. Poznanie zasad decydujących o wzajemnych interakcjach organizmu człowieka z drobnoustrojami przewodu pokarmowego, ale też skóry, układu moczowo-płciowego, czy układu oddechowego, ma ogromny potencjał jeżeli chodzi o rozwój możliwości profilaktyki i leczenia wielu chorób. [160,162].

Od kilkunastu lat, wraz z rozwojem metod badawczych i pojawieniem się możliwości sekwencjonowania materiału genetycznego drobnoustrojów, bardzo wzrosło zainteresowanie naukowców mikrobiotą człowieka, co ma odzwierciedlenie w ilości publikacji naukowych, które ukazały się na ten temat w ostatnich dziesięcioleciach. Zainteresowanie badaczy szczególnie wzbudza skład mikrobioty jelitowej, a także wpływ, jaki odgrywają zaburzenia jej składu na możliwość rozwoju różnych jednostek chorobowych, w tym na patogenezę ME/CFS. Zdefiniowanie w jakim stopniu zaburzenia składu mikrobioty uczestniczą w rozwoju różnych chorób niesie może pozwolić na lepsze zrozumienie patogenezы chorób, udoskonalenie diagnostyki i poprawę leczenia.

I.4.2. Definicje

Termin „mikrobiota” oznacza wszystkie mikroorganizmy (przede wszystkim bakterie, ale również jednokomórkowce, grzyby oraz wirusy), które zasiedlają dane środowisko [160,163]. Jeżeli tym środowiskiem jest organizm ludzki, mówimy o mikrobiocie człowieka (ang. *human microbiota*), czyli o zbiorze mikroorganizmów, które zasiedlają zarówno wnętrze ciała ludzkiego, jak i jego powierzchnię [163]. Z terminem mikrobiota wiąże się pojęcie mikrobiomu, czyli zbioru genów mikroorganizmów tworzących mikrobiotę [163]. Autorem pojęcia mikrobiomu jest laureat Nagrody Nobla Joshua Lederberg [164]. W jednej ze swoich prac użył tego terminu do oznaczenia wspólnoty komensalnych, symbiotycznych oraz patogennych mikroorganizmów żyjących na powierzchni ciała [164]. Dodatkowo zaznaczył, że tak definiowany mikrobiom jest czymś, co może wskazywać na to, czy gospodarz jest zdrowy,

czy chory [164]. Metagenomika to dziedzina badań molekularnych zajmująca się badaniem złożoności mikrobiomów [163].

Eubioza to stan równowagi między organizmem gospodarza, a jego mikrobiotą oraz między poszczególnymi składnikami mikrobioty (nie tylko bakteriami), natomiast zaburzenie tej dynamicznej relacji określa się mianem dysbiozy [160]. Dysbioza oznacza więc zarówno zaburzenia składu i proporcji, jak i funkcji drobnoustrojów tworzących mikrobiotę.

Z uwagi na bardzo dużą różnorodność drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobioty, dosyć długo problemem była prawidłowa klasyfikacja taksonomiczna tych mikroorganizmów. Obecnie wykorzystuje się w tym celu zaawansowane metody bioinformatyczne, tworząc wskaźniki oparte na DNA i układając je według odpowiednich rang w taksony [165,166]. Łączenie składu społeczności i funkcji ekosystemu poprzez niezależną od uprawy analizę genów markerowych, np. genu 16S rRNA, jest podstawą współczesnej ekologii drobnoustrojów.

Najczęściej używanymi jednostkami miary do ilościowego określania bioróżnorodności drobnoustrojów są operacyjne jednostki taksonomiczne (ang. *Operational Taxonomic Unit*, OTU). OTU odnosi się do grupy mikroorganizmów, zgrupowanych razem na podstawie podobieństwa sekwencji DNA danego genu, który służy jako marker taksonomiczny [165]. Sekwencje te grupuje się według podziału danych (klastrowania) zgodnie z ich podobieństwem filogenetycznym, a OTU definiuje się na podstawie wybranego przez badacza progu podobieństwa (na ogół 97%) [165]. Można więc powiedzieć, że OTU to operacyjna („robocza”) definicja używana do grupowania jednostek, które są blisko filogenetycznie. W klasyfikacji drobnoustrojów, OTU jest często stosowane jako równoważnik pojęcia gatunków [166]. Mikrobiologicznie OTU wykazują spójną ekologię między różnymi siedliskami, nawet jeśli oblicza się je za pomocą różnych metod grupowania [166].

Druga metoda opiera się na algorytmach korekcji błędów sekwencjonowania i generuje dokładne warianty sekwencji amplikonu (ang. *amplicon sequence variant*, ASV), opisana po raz pierwszy przez Eren i wsp. w 2013 roku [167]. Warianty sekwencji amplikonu (ASV) są to dowolne z wynioskowanych pojedynczych sekwencji DNA odzyskanych z wysokoprzepustowej analizy genów markerowych [167]. Ponieważ analizy te, zwane również „odczytami amplikonów”, powstają po usunięciu błędnych sekwencji wygenerowanych podczas PCR i sekwencjonowania, użycie ASV umożliwia rozróżnienie zmienności sekwencji poprzez zmianę pojedynczego nukleotydu [167]. Zastosowania ASV obejmują klasyfikację grup

gatunków na podstawie sekwencji DNA, znajdowanie zmienności biologicznej i środowiskowej oraz określanie wzorców ekologicznych [167].

OTU jest generowana przez grupowanie sekwencji w oparciu o próg podobieństwa. W porównaniu z ASV, OTU odzwierciedlają grubsze pojęcie podobieństwa filogenetycznego [168]. ASV są w stanie rozwiązać różnice w sekwencji przez zaledwie jedną zmianę nukleotydu, unikając w ten sposób całkowicie operacyjnych jednostek grupujących opartych na podobieństwie. Dlatego ASV reprezentują dokładniejsze rozróżnienie między sekwencjami [168]. Obie jednostki dostarczają zasadniczo podobnych informacji, które pozwoliłyby na takie same interpretacje, jedyne różnice i zakłócenia mogą wynikać ze zmienności biologicznej próbek (skład mikrobioty nie jest stały w całej objętości próbki danego materiału, różni się bardzo w zależności od miejsca pobrania), a takie analizy przeprowadzane dla błędnie lub niezidentyfikowanych gatunków mogą prowadzić do nieprawidłowych wniosków [169].

I.4.3. Metody sekwencjonowania mikrobioty

Pierwsze badania mikrobiologiczne, mające na celu określenie składu mikrobioty człowieka, opierały się na tradycyjnej hodowli i izolacji drobnoustrojów. Metody te są nadal współcześnie stosowane, jednak ich wykorzystywanie jest ograniczone, gdyż warunki hodowli mogą faworyzować wzrost jednego lub kilku gatunków bakterii w stosunku do innych. Dodatkowo szacuje się, że około 99% drobnoustrojów mikrobioty człowieka należy do mikroorganizmów niehodowlanych [247]. Oznaczenie ilościowe metodą PCR lub rozdział elektroforetyczny w żelu, wykorzystują specyficzne sondy do wykrywania określonych bakterii, w związku z czym również nie używa się ich współcześnie do badania składu mikrobiomu [170].

W ostatnich kilkudziesięciu latach opracowywano i rozwijano technologię sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS), która znacznie zwiększa przepustowość sekwencjonowanych fragmentów materiału genetycznego i pozwala obniżyć koszty, co umożliwiło rozwój metagenomiki. Opierając się na metodach NGS, konkretny mikrobiom można bardzo dokładnie oznaczyć ilościowo i jakościowo bez błędów selekcji i bez ograniczeń związanych z metodami hodowli i izolacji. Technologie te są wykorzystywane również w projekcie Human Microbiome (ang. *Human Microbiome Project*, HMP), którego celem jest sklasyfikowanie wszystkich drobnoustrojów, tworzących różne mikrobioty ludzkiego ciała oraz dokładne poznanie ich funkcji [163,170,171]. Wśród metod

NGS, które wykorzystuje się obecnie do badania mikrobiomu, można wymienić sekwencjonowanie shotgun (ang. *shotgun sequencing*), wysokoprzepustowego sekwencjonowanie (ang. *targeting sequencing*) oraz nadal rozwijaną metatranskryptomikę. Najczęściej używaną obecnie metodą jest wysokoprzepustowego sekwencjonowanie 16S rRNA określonych genów, które umożliwia badanie mikrobiomu w całej jego złożoności w stosunkowo łatwy sposób.

Wszystkie bakterie zawierają gen 16S rRNA, który jest powszechnie używany do celów filogenetycznych. Gen 16S rRNA ma osobliwą strukturę charakteryzującą się regionami hiperzmiennymi, oddzielonymi od siebie regionami ultrakonserwatywnymi [172]. Poprzez amplifikację konserwatywnych regionów genu 16S rRNA, tworzy się uniwersalne startery, które mogą być następnie stosowane do amplifikacji w pojedynczej reakcji PCR praktycznie wszystkich bakterii obecnych w środowisku docelowym i do ich jednoznacznej identyfikacji na końcu sekwencjonowania [163,172]. Chociaż sekwencjonowanie 16S rRNA jest łatwe do wykonania, szybkie i stosunkowo niedrogi, to jednak ekstrakcja DNA może być stronicza, a metodologia i analiza danych, może dawać niejednoznaczne wyniki [163]. Również w tym przypadku przypisanie odczytów zależy od dokładności i aktualności użytych referencyjnych baz danych, a procedura nie daje danych o funkcjach bakterii [163].

W ostatnich latach opracowano różne narzędzia do analizy odczytów 16S rRNA. Większość z tych metod obejmuje zarówno identyfikację taksonomiczną, jak i analizę różnorodności [173–175]. Dokładność identyfikacji taksonomicznej jest zmienna i zależy nie tylko od użytej sekwencji liniowej, ale także od części zsekwencjonowanego 16S rRNA, błędów systematycznych PCR i dostępności zaktualizowanych baz danych. Na ogół przyporządkowanie taksonomiczne odbywa się od typu do rodzaju, podczas gdy identyfikacja gatunku jest trudniejsza [175]. Sekwencjonowanie 16S rRNA obrazuje skład jakościowy i ilościowy mikrobiomu, ale nie dostarcza informacji o funkcjach bakterii.

I.4.4. Mikrobiota – charakterystyka ogólna

Kolonizacja organizmu gospodarza mikroorganizmami rozpoczyna się już w momencie porodu i ulega licznym przemianom podczas życia człowieka [176–179]. Pomimo różnorodności bodźców zewnętrznych i wewnętrznych, którym poddawana jest mikrobiota człowieka, a mianowicie diety, aktywności fizycznej, podróży, chorób, cykli hormonalnych i innych, a także dużej między osobniczej zmienności mikrobioty, zidentyfikowano podstawowy

mikrobiom jelitowy, którego skład jest praktycznie stały u zdrowych osób dorosłych i nazwano go mikrobiomem rdzenia (ang. *core microbiome*) [180]. Skład mikrobiomu rdzenia w poszczególnych grupach wiekowych przedstawiona w Tabeli 7. [163]. W zdrowych warunkach różnorodność i bogactwo drobnoustrojów wzrasta wraz z wiekiem dziecka, osiągając największą złożoność w wieku dorosłym. Pomimo różnic między- i wewnątrzsobniczych mikrobiom jelitowy jest praktycznie stabilny u zdrowych osób dorosłych. U osób starszych, po 70. roku życia, podobnie jak u niemowląt, mikrobiom jelitowy jest bardziej niestabilny, a także ma mniejsze zróżnicowanie w stosunku do osób dorosłych.

Mikrobiota aktywnie uczestniczy w utrzymaniu zdrowego stanu organizmu w wieku dorosłym, a jej zmiany ilościowe i jakościowe mogą prowadzić do powstania dysbiozy i rozwoju chorób [163,180]. Do tej pory z mikrobiomem rdzenia powiązano szereg funkcji, w tym trawienie polisacharydów, rozwój układu odpornościowego, ochronę przed infekcjami, syntezę witamin, magazynowanie tłuszczu, regulację angiogenezy i rozwój behawioralny [181,182]. Co ciekawe, geny kodowane przez ludzki mikrobiom rdzenia kodują białka niezbędne do przeżycia gospodarza, ale będące nieobecne w genomie ludzkim [181].

Skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów zasiedlających poszczególne części ciała człowieka jest różny. Wyróżnia się mikrobiotę: jelitową, oka, skóry, dróg oddechowych, układu moczowo-płciowego [163]. W mikrobiocie jelitowej człowieka najliczniej reprezentowane są bakterie z typów *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*, natomiast słabiej reprezentowane są *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* i *Verrucomicrobia* [170].

Bakterie typu *Firmicutes* pełnią ważną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania bariery jelitowej oraz równowagi immunologicznej w przewodzie pokarmowym. Rodzaje bakterii typu *Firmicutes* to m.in. *Clostridium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* [170].

Drugim dominującym typem bakterii jelitowych są *Bacteroidetes*, które mogą stanowić nawet do 40-50% składu mikrobioty jelitowej. Są to bakterie fermentujące, czyli biorące udział w procesie metabolicznym, mającym na celu wytworzenie energii. Gatunki *Bacteroidetes* odgrywają również ważną rolę w metabolizmie białek. Rodzaje bakterii typu *Bacteroidetes* to *Bacterioides*, *Prevotella* czy *Parabacteroides* [170].

Tabela 7. Zmiany składu mikrobiomu jelitowego człowieka w ciągu życia, na podstawie D'Argenio i wsp. w modyfikacji własnej [163]

Wiek	Skład bakterii jelitowych na poziomie typu bakterii (od najbardziej do mniej reprezentowanej)	Czynniki modyfikujące
Małe dzieci (do 2-3. roku życia)	<i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Rodzaj porodu (poród siłami natury, cesarskie cięcie) • Wiek ciążowy w momencie narodzin • Hospitalizacja w okresie noworodkowym lub niemowlęcym • Rodzaj karmienia w okresie noworodkowym i niemowlęcym (karmienie piersią, karmienie mieszanką modyfikowaną) • Wiek dziecka, w którym rozpoczęto wprowadzanie pokarmów stałych do diety • Niedożywienie, niedobory żywieniowe • Antybiotykoterapie
Starsze dzieci, nastolatki i osoby dorosłe	<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Dieta • Cykle hormonalne • Podróże • Leki, antybiotykoterapie • Choroby • Przebyte hospitalizacje • Aktywność fizyczna • Styl życia
Osoby starsze (powyżej 70. roku życia)	<i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Proteobacteria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Styl życia • Dieta • Zwiększona podatność na infekcje i choroby zapalne • Polipragmazja

Nieco mniej liczną grupę bakterii jelitowych stanowią drobnoustroje z typu *Actinobacteria*. Odgrywają one kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy jelitowej. Drobnoustroje należące do tego typu, zwłaszcza *Bifidobacteria*, są szeroko stosowane jako probiotyki, które modyfikują skład mikrobioty jelitowej i wykazują korzystne działanie w wielu stanach patologicznych, chorobach przewodu pokarmowego i chorobach ogólnoustrojowych. Przykłady bakterii z typu *Actinobacteria* to między innymi *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Adlercreutzia* [170].

Bakterie typu *Proteobacteria* stanowią około 2% mikrobioty jelitowej. Ich przerost najczęściej obserwowany jest w chorobach metabolicznych, takich jak m.in. cukrzyca typu 2, otyłość, niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD) oraz niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby (NASH). Przerost bakterii z typu *Proteobacteria* wydaje się mieć udział również w chorobach sercowo-naczyniowych. Przerost *Proteobacteria* może być więc

traktowany jako marker dysbiozy i niestabilności mikrobioty i predysponować do rozwoju stanów chorobowych. Przykłady bakterii typu *Proteobacteria* to między innymi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bifidobacteria* [170].

Mało liczną grupą drobnoustrojów jelitowych są również bakterie typu *Fusobacteria*, które mogą stanowić do ok. 2-3% składu mikrobioty jelitowej. Istnieją doniesienia naukowe na związek przerostu bakterii typu *Fusobacterium* z rozwojem raka jelita grubego, zespołu jelita drażliwego, czy chorób autoimmunologicznych, m.in. nieswoistych zapaleń jelit [170].

I.4.5. Zróżnicowanie mikrobioty na różnych piętrach przewodu pokarmowego

Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego dosyć istotnie różnią się między sobą panującymi warunkami, m.in. motoryką, pH, rodzajem wydzielanych enzymów trawiennych, a także wydzielaniem i wchłanianiem różnych substancji, w tym żółci [160]. W świetle początkowych odcinków górnego odcinka przewodu pokarmowego (jama ustna, gardło, przełyk) brak jest mikrobioty. Wynika to z panujących w tych częściach przewodu pokarmowego warunków, a także tego, że spożywany pokarm krótko pozostaje w tych częściach przewodu pokarmowego, dlatego mikroorganizmy kolonizują głównie błony śluzowej jamy ustnej i przełyku. Bardzo bogata mikrobiotą występuje na zębach, dziąsłach, języku i migdałkach. Niskie pH soku żołądkowego sprawia, że jego mikrobiota jest nieliczna i mało różnorodna. Dwunastnica i początkowy odcinek jelita cienkiego charakteryzują się niskim pH, szybką perystaltyką oraz obecnością dużej ilości kwasów żółciowych, co również nie sprzyja różnorodności drobnoustrojów mikrobioty jelitowej. Wyższe pH oraz powolny pasaż treści pokarmowej w dalszych częściach przewodu pokarmowego umożliwia kolonizację bakteryjną zarówno błony śluzowej, jak i światła jelit. W końcowym odcinku jelita grubego bakterie mikrobioty jelitowej osiągają zagęszczenie do 100 miliardów bakterii w 1 gramie treści jelitowej, co czyni ten odcinek przewodu pokarmowego jednym z najgęściej skolonizowanych przez mikroorganizmy ekosystemów na świecie [160,162].

Jama ustna stanowi początkowy odcinek przewodu pokarmowego. Bakterie obecne w zdrowej jamie ustnej należą do 6 typów: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* oraz *Spirochaetes* [183]. Ślina, znajdująca się w jamie ustnej, jest buforem utrzymującym korzystne dla mikrobioty pH, usuwającym zbędne produkty fermentacji oraz bakterie niezwiązane ze strukturami jamy ustnej. Zawiera ona dodatkowo

substancje przeciwdrobnoustrojowe i rozprowadza po całej jamie ustnej substraty potrzebne bakteriom mikrobioty do wzrostu i rozwoju [184]. Uznaje się więc, że analiza składu śliny może pomóc w określeniu ogólnego składu jamy ustnej [184].

Kolejnym odcinkiem przewodu pokarmowego jest przełyk, łączący jamę ustną z żołądkiem, wyścielony od wewnątrz błoną śluzową pokrytą nabłonkiem jednowarstwowym płaskim. Kontakt treści pokarmowej ze ścianami przełyku jest krótki, a za nawilżenie błony śluzowej przełyku odpowiada ślina, stąd pH wewnątrz przełyku zbliżone jest do jamy ustnej (pH=7) [169]. Udowodniono, że bakterią dominującą w przełyku osób zdrowych jest *Streptococcus*, a inne bakterie które można tam zidentyfikować to m.in. *Prevotella*, czy *Veillonella* [185]. Identyfikowane w mikrobiocie przełyku bakterie świadczą o tym, że skład mikrobioty przełyku jest silnie determinowany przez bakterie jamy ustnej, które są odporne na warunki panujące w przełyku [185].

W żołądku, z uwagi na bardzo niskie pH i szybki pasaż treści pokarmowej, mikrobiota jest stosunkowo uboga, z dominacją bakterii opornych na działanie kwasu solnego, takich jak *Streptococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus*. Ilość bakterii w żołądku określa się na poziomie $<10^3$ CFU/ml [186]. W porównaniu z mikrobiotą przełyku w żołądku obserwuje się mniejszą ilość *Streptococcus* i większą *Rothia mucilaginosa*, *Porphyromonas* i bakterii z rodziny *Lachnospiraceae* (dotyczy to analizy próbek pobranych z biopsji). Natomiast w dwunastnicy, czyli pierwszym odcinku jelita cienkiego, stwierdza się dalsze zmniejszenie ilości *Streptococcus* i utrzymanie trendu dotyczącego zwiększania ilości bakterii *Rothia mucilaginosa*, *Porphyromonas* i bakterii z rodzaju *Lachnospiraceae*. Oznacza to, że aby określić wpływ środowiska, które panuje w żołądku, na jego mikrobiotę, należy rozpatrywać poszczególne bakterie indywidualnie [186]. Różnice w składzie mikrobioty przełyku, żołądka i dwunastnicy potwierdzają tezę, że rolą żołądka jest m.in. selekcjonowanie bakterii, które przedostają się do dolnego odcinka przewodu pokarmowego, co ma zmniejszać ryzyko infekcji i stanów zapalnych dalszych części przewodu pokarmowego, a także zapewniać odpowiednią pracę i spełnianie swoich funkcji [186].

Badania sugerują, że na skład mikrobioty żołądka silny wpływ ma bakteria *Helicobacter pylori*. U osób bez zakażenia *H. pylori* w mikrobiocie żołądka stwierdzono występowanie bakterii z 5 typów: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* i *Fusobacteria*, przy czym najliczniejsze były bakterie z typów *Actinobacteria* i *Firmicutes* [187]. U osób zakażonych *H. pylori* różnorodność mikrobioty żołądka jest znacząco mniejsza, a 75-99% wszystkich

bakterii budujących mikrobiotę tego odcinka stanowią bakterie z typu *Proteobacteria*. Skład tej mikrobioty jest porównywalny do mikrobioty przełyku Barreta [185]. Po zakażeniu *H. pylori* następuje kolonizacja bakteriami innymi niż *H. pylori*, które mogą wpływać na rozwój chorób żołądka. Może być to związane z tym, że ich elementy strukturalne i produkty metabolizmu mogą nasilać odpowiedź immunologiczną wywoływaną przez zakażenie *H. pylori* oraz powodować zapalenie żołądka w wyniku mechanizmów niezależnych od obecności bakterii *H. pylori* [187].

Najlichnieszy i najbardziej aktywny zespół mikroorganizmów znajduje się w jelicie grubym, szacuje się że jest to około 500-1000 gatunków bakterii, z gęstością 10^{11} - 10^{12} /g treści kałowej, co oznacza, że mikrobiota jelitowa stanowi jeden z najgęściej skolonizowanych przez mikroorganizmy ekosystemów na świecie [160]. Mikrobiom jelitowy styka się z ścianą jelit i barierą jelitową na powierzchni około 300m², co oznacza, że jest to największe miejsce komunikacji organizmu człowieka ze światem zewnętrznym [160]. Zdecydowaną większość mikrobioty jelitowej stanowią drobnoustroje bezwzględnie beztlenowe, w dalszej części względnie beztlenowe oraz tlenowe [160]. Spośród tych bakterii najwięcej należy do typów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (te 2 typy mogą stanowić nawet 90% składu mikrobioty jelitowej) i *Actinobacteria*, natomiast w mniejszej ilości występują bakterie z typów *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* i *Verrucomicrobiota* [160,163].

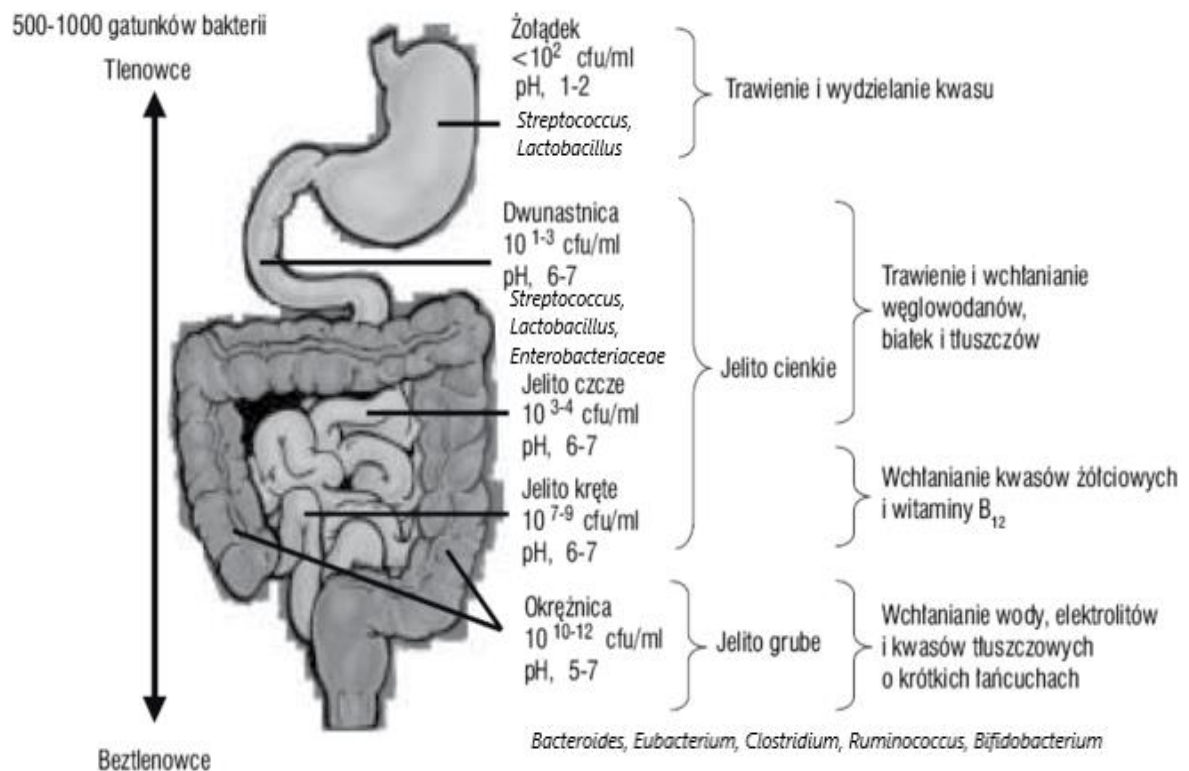
Bakterie z typu *Bacteroidetes* należą do Gram-ujemnych, bezwzględnie beztlenowych mikroorganizmów. Wytwarzają one lipopolisacharydy (LPS), proteazy, neuraminidazy, fibrylizyny, kolagenazy, które uczestniczą następnie w procesach trawienia pożywienia, przekazywania sygnałów, kontrolowania środowiska, hamowania wzrostu innych drobnoustrojów w jelicie. Bakterie te przeprowadzają ponadto proces fermentacji różnych wodorowęglanów i powodują powstawanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, m.in. kwasu masłowego) oraz biorą udział w metabolizmie kwasów żółciowych [160]. Typ *Firmicutes* zawiera kilka tysięcy gatunków bakterii Gram-dodatnich o dużej różnorodności. Są wśród nich gatunki bezwzględnie beztlenowe, tlenowe i wytwarzające spory [160].

W największej ilości występują bakterie z rodzajów *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus*. Zaobserwowano, że u osób z ubogą mikrobiotą bakterie *Bacteroides* są dominujące, a bakterie *Prevotella* i *Ruminococcus* występują w znikomych ilościach. Wraz ze zwiększeniem się różnorodności mikrobioty udział bakterii *Bacteroides* maleje, a udział bakterii typu *Prevotella*, a w szczególności *Ruminococcus*, rośnie [188].

W skład mikrobioty jelitowej wchodzi nie tylko bakterie. Szacuje się, że oprócz bakterii występuje ok. 2,5% innych mikroorganizmów: archeony (2,2%), wirusy (0,2%), grzyby (1%), organizmy eukariotyczne (<0,01%) [188].

Komórki nabłonka błony śluzowej jelit stanowią pierwszą linię kontaktu z mikrobiotą. Chronią też przed translokacją drobnoustrojów i ich metabolitów do wnętrza organizmu. Enterocyty stanowią również granicę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a najbardziej aktywną tkanką limfatyczną przewodu pokarmowego (ang. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT), będącą bogatym skupiskiem komórek tworzących wrodzoną i nabytą odporność człowieka [160].

Zróznicowanie mikrobioty na różnych piętrach przewodu pokarmowego przedstawiono schematycznie na Rycinie 2. [189].



Rycina 2. Warunki fizjologiczne i rozmieszczenie mikrobioty w przewodzie pokarmowym wg Dibaise i wsp. w modyfikacji własnej [189]

I.4.6. Znaczenie mikrobioty przewodu pokarmowego dla organizmu człowieka

Ludzka mikrobiota tworzy unikalny ekosystem, pełniący wiele funkcji istotnych dla utrzymania homeostazy organizmu gospodarza, takich jak utrzymanie równowagi energetycznej, udział w trawieniu i fermentacji składników pokarmowych oraz udział w złożonych przemianach związanych z magazynowaniem energii uzyskiwanej z pożywienia w formie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *short chain fatty acids*, SCFA) [160,190,191]. SCFA stanowią źródło energii dla enterocytów i wpływają na perystaltykę jelit, procesy zapalne w obrębie jelit, proces homeostazy glukozy. Dodatkowo wpływają na przyspieszenie regeneracji nabłonka błony śluzowej jelit oraz zachowanie jego szczelności. SCFA uczestniczą również w resorpcji sodu i wody.

Mikrobiota jelitowa odpowiada również za produkcję poliamin i witamin z grupy B i K oraz za gospodarkę mineralną [192]. Ponadto pełni ona istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego [190]. Wspomniana już wcześniej tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (ang. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT), przetwarza i przekazuje organizmowi gospodarza informacje pochodzące z kontaktu z bakteriami jelitowymi. Komunikacja ta jest możliwa dzięki komórkom dendrytycznym, receptorom TLRs oraz domenie NOD (domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotydy) [160,190]. Dodatkowo mikrobiota jelitowa może wpływać na uwalnianie niektórych neuroprzekaźników i modulowanie sygnałów nerwowych, które trafiają do układu nerwowego jelit, a przez to może wpływać na funkcjonowanie osi mózgowo-jelitowej [193–195].

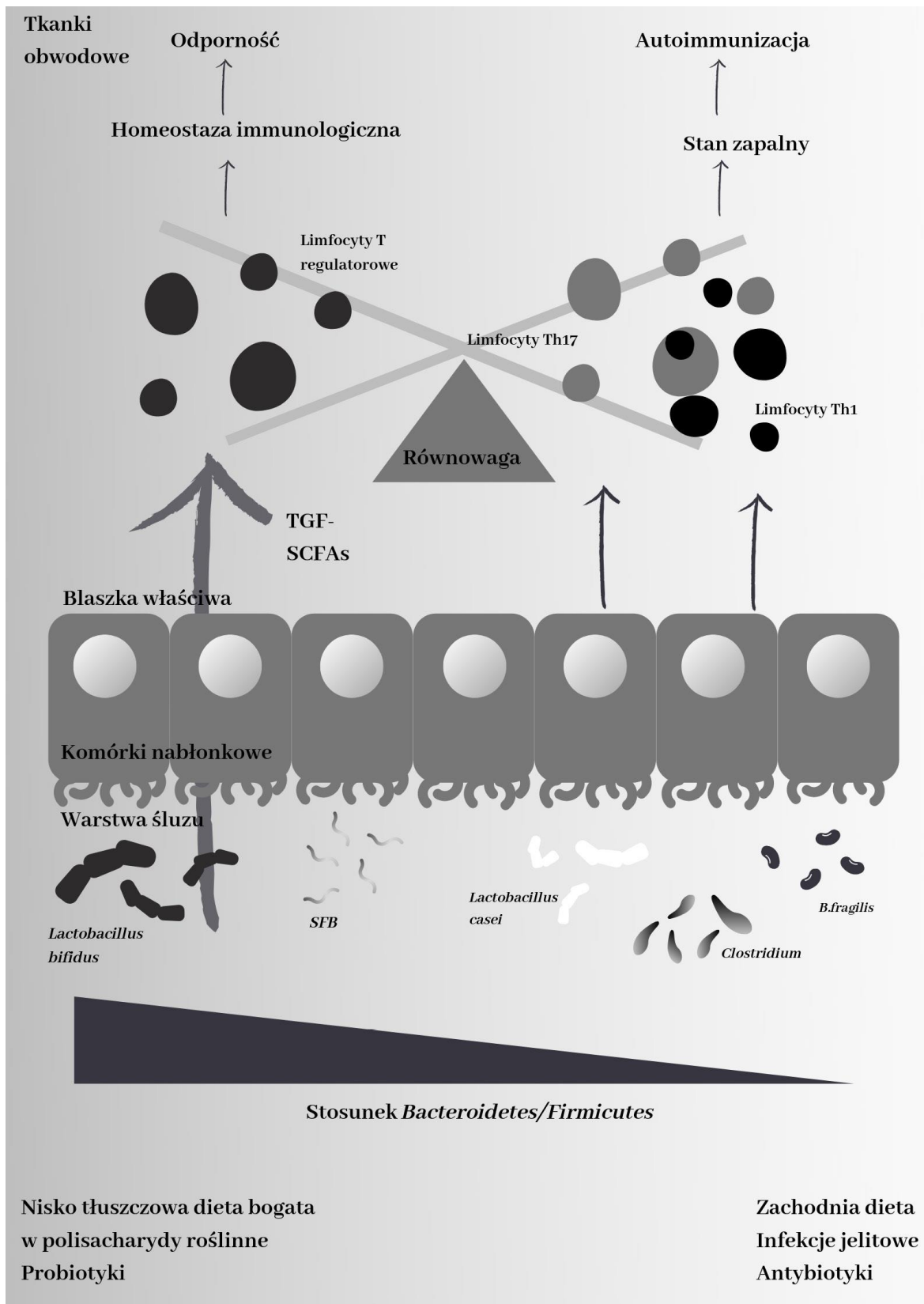
Zaobserwowano, że produkowany przez bakterie kwas octowy zwiększa tolerancję organizmu gospodarza na antygeny bakterii komensalnych, a kwas masłowy bierze udział w procesie prowadzącym do zmniejszenia stanu zapalnego. Dodatkowo uważa się, że mikrobiota może wpływać na syntezę chemokin i cytokin [160].

Mikrobiota jelitowa wpływa też na metabolizm kwasów żółciowych, poprzez uczestniczenie w procesie dekoniugacji i dehydroksylacji pierwotnych kwasów żółciowych (kwasu cholowego i chenodezoksycholowego), które nie zostały wchłonięte w jelicie krętym. Powstają wtórne kwasy żółciowe, takie jak kwas dezoksycholowy i lithocholowy. Dekoniugacja pierwotnych kwasów żółciowych w jelicie grubym odbywa się pod wpływem bakteryjnej 7 α -dehydroksylazy. Aktywność tego enzymu wykazano u *Clostridium leptum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, *Eubacterium* sp., *Escherichia coli* i *Bacteroides* sp. [195].

Wtórne kwasy żółciowe mogą wpływać na zmniejszenie motoryki jelit i dłuższe zaleganie treści pokarmowej w jelitach [195]. Dodatkowo te biokonwersje modulują właściwości sygnalizacyjne kwasów żółciowych, które regulują liczne szlaki metaboliczne u gospodarza (m.in. syntezę cholesterolu, metabolizm glukozy, produkcję witamin, syntezę aminokwasów) [196]. I odwrotnie, kwasy żółciowe mogą modulować skład drobnoustrojów jelitowych zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio poprzez aktywację wrodzonych genów odpornościowych w jelicie cienkim [196].

Poprzez konkurowanie o składniki pokarmowe, wytwarzanie substancji przeciwbakteryjnych, czy pobudzanie komórek gospodarza do wytwarzania śluzu, tworzącego warstwę ochronną między nabłonkiem jelitowym a warstwą mikrobioty, mikrobiota jelitowa przyczynia się do zapewnienia ochrony organizmu gospodarza przed patogenami obecnymi w świetle przewodu pokarmowego [160]. Ważną jej funkcją jest również wpływ na intensyfikację procesu podziału komórek nabłonka jelit, ich dojrzewanie oraz zwiększenie ekspresji genów kodujących białka tworzące połączenia ścisłe, co pozwala utrzymać lub przywrócić szczelność nabłonka jelitowego, a w następstwie zmniejszyć stopień translokacji mikroorganizmów z wnętrza jelit do krwi [160].

Można powiedzieć, że skład mikrobioty jelitowej determinuje odporność lub podatność organizmu na zakażenia patogennymi drobnoustrojami. Uznaje się, że stosunek ilości bakterii *Bifidobacterium* do *Enterobacteriaceae* (B/E) jest indykatorem tego, czy mikrobiotę danej osoby można uznać za taką typową dla osoby zdrowej. W przypadku osób uznawanych za zdrowe wartość tego wskaźnika będzie większa niż 1 [160]. Wpływ mikrobiomu na utrzymanie homeostazy organizmu człowieka został schematycznie przedstawiony na Rycinie 3. [197].



Rycina 3. Wpływ mikrobiomu na zachowanie homeostazy organizmu człowieka wg Wierchanowskiej i wsp. [197] w modyfikacji własnej

I.4.7. Potencjalny związek między zaburzeniami składu mikrobiomu jelitowego a funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego i rozwojem ME/CFS

Mikrobiom jelitowy odgrywa ogromną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Dlatego dysbioza jelitowa może wpływać na patogenezę i rozwój różnych stanów chorobowych organizmu, co jest przedmiotem wielu badań naukowych toczących się w ciągu ostatnich lat. Istnieją doniesienia naukowe, że interakcja pomiędzy specyficznym zmienionym mikrobiomem jelitowym a układem immunologicznym może odgrywać rolę w patogenezie różnych chorób [198–208], w tym także ME/CFS [1,129,209–220]. Interesująca jest jednak kwestia patomechanizmu w jaki dysbioza jelitowa może wpływać na rozwój ME/CFS. W zdrowym organizmie człowieka bakterie jelitowe pozostają ze sobą w dynamicznej równowadze i regulują szereg reakcji i procesów ustrojowych u swojego gospodarza. Skład mikrobioty jelitowej może jednak zostać zaburzony przez szereg czynników, takich jak m.in. infekcja wirusowa, leki czy dieta [195].

Istnieją dowody naukowe potwierdzające nieprawidłową odpowiedź immunologiczną w zespole przewlekłego zmęczenia [49]. Udział układu odpornościowego w rozwoju ME/CFS potwierdzają liczne przypadki infekcji wirusowych poprzedzających pojawienie się objawów przewlekłego zmęczenia, a także początkowy przebieg ME/CFS przypominający objawy grypopodobne [3,12,49]. Dysfunkcję układu immunologicznego sugeruje też podniesiony poziom cytokin prozapalnych u pacjentów z ME/CFS, zwiększona ekspresja markerów aktywacji limfocytów T, takich jak CD26 czy CD38 oraz zredukowana aktywność komórek NK [49,51]. Częste nakładanie się ME/CFS oraz zespołu jelita drażliwego (IBS), można tłumaczyć podwyższonym stężeniem cytokin prozapalnych IL-6 i IL-8, co można zaobserwować u tych pacjentów, ze znamienne wyższymi ich poziomami w przypadku współwystępowania obu chorób [221]. Dodatkowo u pacjentów, u których jednocześnie rozpoznano ME/CFS i IBS, stwierdza się podwyższone poziomy innych dwóch cytokin prozapalnych, a mianowicie IL-1 β i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) [221]. Sugeruje to, że w rozwoju tych chorób dochodzi do aktywacji układu immunologicznego, produkcji czynników prozapalnych oraz rozwoju w organizmie przewlekłego, rozlanego stanu zapalnego o niskim lub umiarkowanym stopniu nasilenia, który może dotyczyć także jelit [193,221].

U pacjentów z ME/CFS wykazano podwyższone poziomy przeciwciał IgA i IgM przeciwko bakteryjnemu lipopolisacharydowi (LPS), który wytwarzają bakterie należące do

mikrobioty jelitowej, takie jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Citrobacter koseri* czy *Klebsiella pneumoniae* [222]. Średnie stężenia przeciwciał IgA przeciw LPS były istotnie wyższe u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Co więcej, udowodniono korelację między stężeniem przeciwciał przeciwko LPS, a nasileniem objawów przewlekłego zmęczenia [222].

W prawidłowych warunkach ochronę przed patogenami i toksynami stanowi szczelna bariera jelitowa. Śluzówkowa bariera jelitowa jest strukturą, która przede wszystkim ma za zadanie regulowanie wchłaniania substancji odżywczych, elektrolitów i wody z przewodu pokarmowego, ale pełni też liczne funkcje dodatkowe, m.in. ogranicza nadmierny rozrost mikroflory jelitowej, hamuje bezpośredni kontakt ściany jelita z bakteriami oraz chroni przed rozsiewem bakterii i toksyn ze światła przewodu pokarmowego do sąsiadujących tkanek i przed rozwojem niekontrolowanego, przewlekłego stanu zapalnego. Bariera jelitowa zbudowana jest z pojedynczej warstwy ściśle połączonych (ang. *tight junctions*) komórek nabłonkowych, pokrytych grubą, szczelną warstwą mucynowego śluzu produkowanego przez komórki kubkowe [223]. Warstwa śluzu zawiera immunoglobulinę A i peptydy przeciwdrobnoustrojowe [223]. Bariera jelitowa oddziela wnętrze organizmu od „brudnego” środowiska zewnętrznego i przeciwdziała powstawaniu infekcji oraz reakcji zapalnych [193]. Stanowi ona jeden z najważniejszych mechanizmów odporności nieswoistej organizmu człowieka [193]. Regulacja wymiany cząsteczek między środowiskiem a gospodarzem przez barierę jelitową wpływa na zachowanie równowagi pomiędzy tolerancją a odpornością na własne i obce antygeny [223].

Wykazano, że na skutek zadziałania różnych czynników endogennych i egzogennych, u pacjentów z ME/CFS może dochodzić do rozluźnienia szczelnych połączeń w barierze jelitowej, naruszenia jej ciągłości i wzrostu przepuszczalności [222,223]. Patologiczna zmiana przepuszczalności jelit nazywana jest zespołem nieuszczelnego jelita (ang. *leaky gut syndrome*), nie została jednak jak dotąd zdefiniowana jako odrębna jednostka chorobowa [223–225]. Zwiększony, przewlekły stan przepuszczalności bariery jelitowej, wraz z indywidualnymi predyspozycjami genetycznymi, może wywoływać reakcję immunologiczną [223,226]. Aktywność modulatorów przepuszczalności jelit, takich jak zonulina i okludyny, zdaje się mieć kluczowy związek z tym zjawiskiem [227]. Ich aktywację i ekspresję modulują różne czynniki, takie jak antybiotyki, leki, gluten, czy bakterie. W wyniku ich działania zniszczone zostają ściśle połączenia między komórkami śluzówki, co zwiększa przepuszczalność ściany jelita, pozwala

na ekspozycję organizmu gospodarza na antygeny i powoduje odpowiedź ze strony układu immunologicznego [222,224]. Receptory zonuliny zostały odkryte również w mózgu człowieka, co sugeruje, że może ona też wpływać na przepuszczalność bariery krew-mózg i kształtować wrota dla stanów zapalnych i procesów autoimmunologicznych [227].

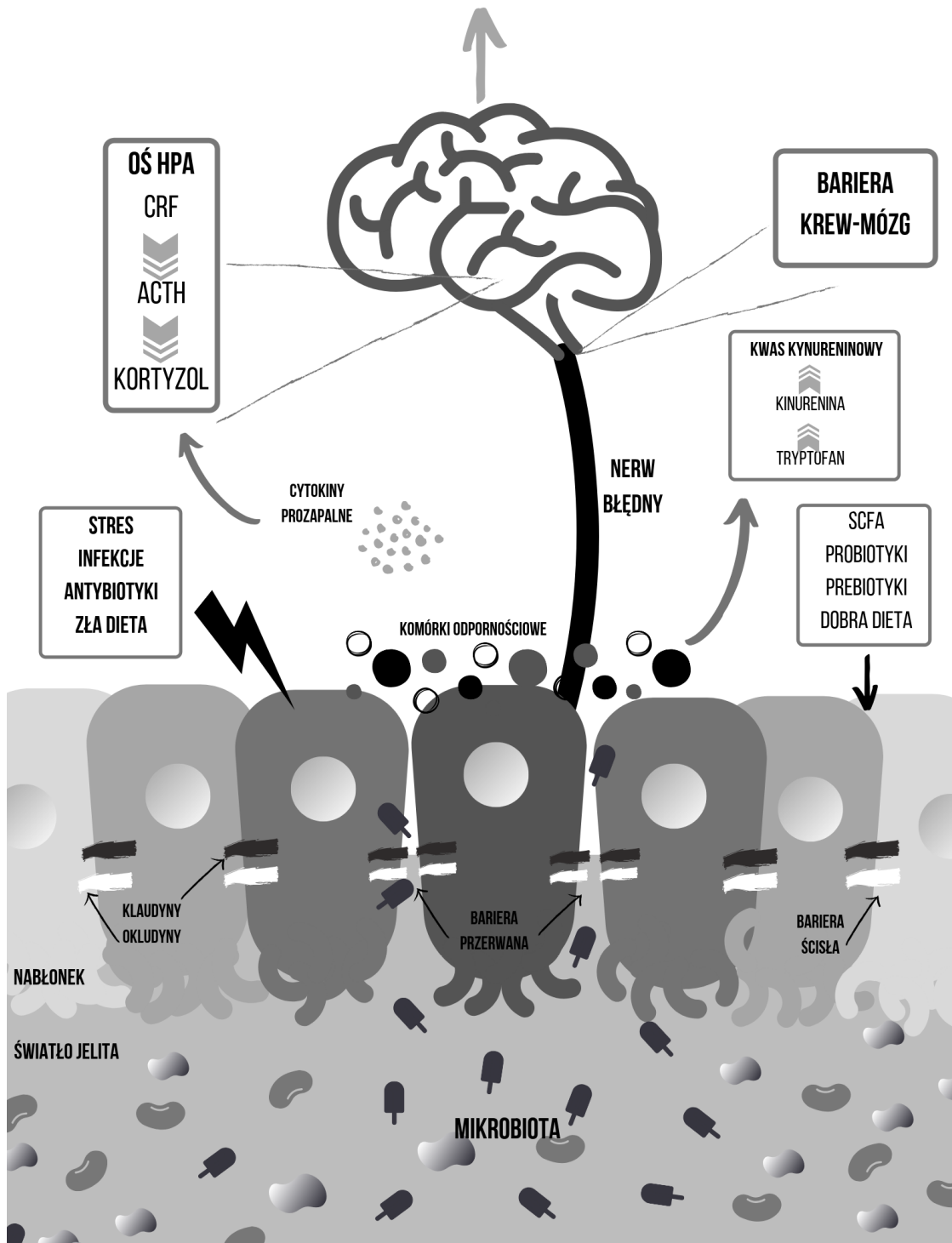
Dysfunkcja bariery jelitowej prowadzi do zmniejszenia motoryki przewodu pokarmowego, nieprawidłowej sekrecji jelit i zmniejszenia produkcji śluzu, co przyczynia się do rozwoju objawów dyspeptycznych. Nieprawidłowa mikrobiota jelitowa może nasilać produkcję endotoksyn bakteryjnych, w tym bakteryjnego LPS, a translokacja LPS przez rozszczelnione połączenia w uszkodzonej barierze jelitowej powoduje aktywację układu immunologicznego, zwiększa syntezę cytokin prozapalnych i wpływa na utrzymywanie przewlekłego stanu zapalnego w obrębie przewodu pokarmowego [193,222]. Dodatkowo wzrasta prawdopodobieństwo translokacji mikroorganizmów, rozwoju endotoksemii i przewlekłego stanu zapalnego o umiarkowanym stopniu nasilenia, co prowadzi do aktywacji osi mózgowo-jelitowej.

Jak zaznaczono już wcześniej, istnieją doniesienia naukowe na temat dysbiozy jelitowej w ME/CFS, które wskazują na zmniejszoną obfitość i różnorodność *Firmicutes* oraz większą obfitość i różnorodność *Bacteroidetes* w tej grupie pacjentów [211]. Niższy wskaźnik *Firmicutes/Bacteroides*, uważany za wykładnik nieprawidłowej mikrobioty jelitowej, może wiązać się z wzrostem ilości bakterii *Enterobacteriaceae* [1,209]. Niektóre badania wykazały, że przerost bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, może prowadzić do rozwoju stanu zapalnego jelit, wzrostu przepuszczalności bariery jelitowej i wzrostu produkcji LPS [222,228]. Maes i wsp. wykazali istotnie podwyższone poziomy przeciwciał klasy IgA przeciwko komensalnym bakteriom mikrobioty jelitowej oraz podniesione wykładniki stanu zapalnego, badając surowicę krwi 128 pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowych kontroli [228]. W metaanalizie z 2022 roku, podsumowującej udział dysbiozy jelitowej w rozwoju przewlekłego zmęczenia oraz niektórych chorób psychicznych, Safadi i wsp. potwierdzili istotnie podwyższony poziom lipopolisacharydu LPS, przeciwciał przeciwko LPS, białka wiążącego LPS (ang. *lipopolysaccharide binding protein*, LBP) oraz limfocytów sCD14 (wykładnik stanu zapalnego) w surowicy krwi pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia [229]. Niektóre publikacje naukowe sugerują, że LPS poprzez wiązanie z CD14 lub receptorem TLR-4 pobudza szlaki immunologiczne do produkcji cytokin prozapalnych, powodujących następnie aktywację komórek mikrogleju [230,231].

Ośrodkowy układ nerwowy jest ściśle związany z układem pokarmowym, pełni ważną funkcję w regulowaniu pracy jelit oraz utrzymaniu homeostazy [197]. Jednak regulacja ta jest dwukierunkowa, gdyż jednocześnie aktywność przewodu pokarmowego i funkcjonowanie bariery jelitowej są kontrolowane przez mikrobiotę jelitową, która może wpływać na komórki nerwowe i OUN oraz uczestniczyć w regulacji funkcji układu nerwowego [197]. Zależność między mikrobiotą jelitową a ludzkim organizmem jest tak złożona, że badacze zaproponowali koncepcję osi mózgowo-jelitowej (ang. *gut-brain axis*, GBA) [232]. Mózg i jelita są ze sobą połączone różnymi drogami, m.in. nerwem błędnym, układem odpornościowym, na drodze neuroendokrynej lub procesami metabolicznymi drobnoustrojów jelitowych. Jednak najważniejszym połączeniem pomiędzy jelitami a mózgiem wydaje się być wewnętrzny układ nerwowy jelit (ang. *enteric nervous system*, ENS), będący częścią przywspółczulnego autonomicznego układu nerwowego. Zwoje jelitowe jelitowego układu nerwowego tworzą dwa sploty nerwowe – splot mięśniówkowy Auerbacha (zewnątrzny) oraz splot podśluzówkowy Meissnera (wewnętrzny). Splot Auerbacha odpowiada głównie za motorykę jelit, natomiast splot Meissnera wraz z włóknami nerwowymi blaszki właściwej błony śluzowej jelit reguluje transport przez nabłonkowy [193]. Autonomiczny układ nerwowy przewodu pokarmowego łączy się z ośrodkowym układem nerwowym współtworząc oś mózgowo-jelitową. Szlaki komunikacji na drodze osi mózgowo-jelitowej zostały schematycznie przedstawione na Rycinie 4. [197].

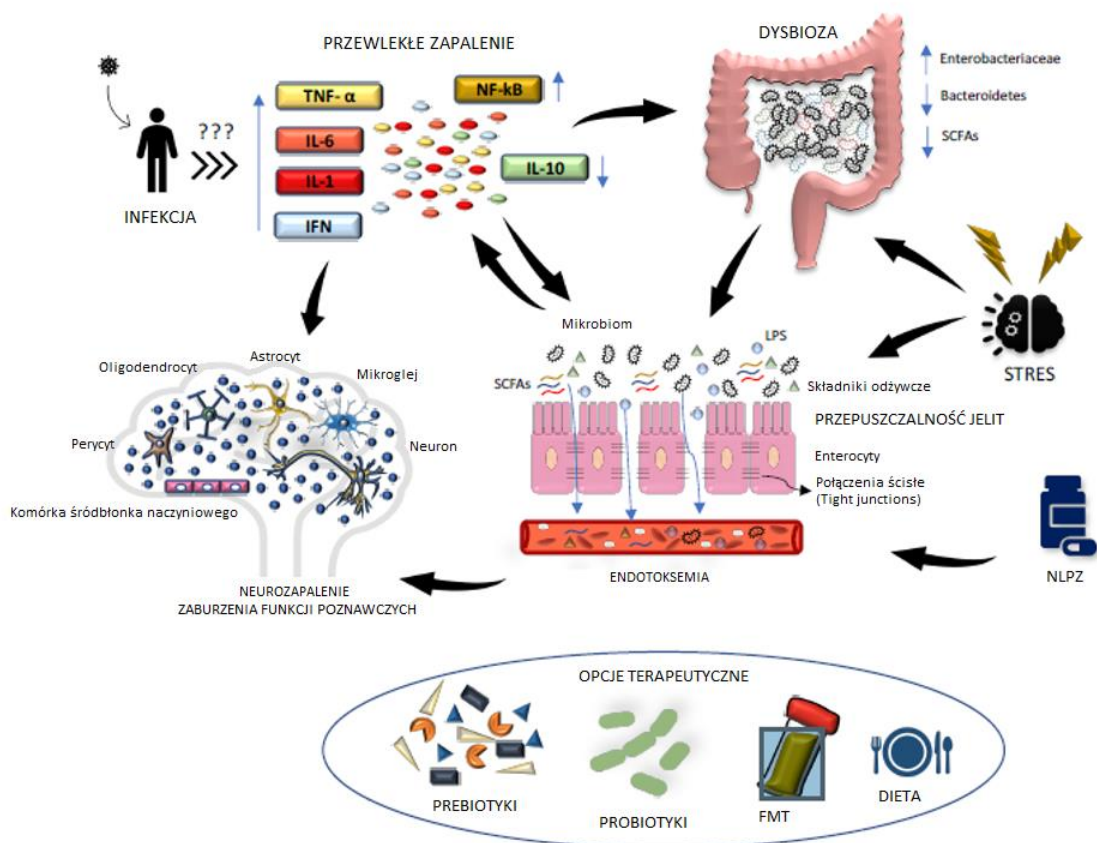
Utrzymywanie się przewlekłego stanu zapalnego jelit o niskim stopniu nasilenia oraz zwiększona produkcja cytokin prozapalnych, w odpowiedzi na stres i zwiększoną ilość endotoksyn bakteryjnych, powodują zmiany w splotach nerwowych przewodu pokarmowego, w tym m.in. zmiany w ilości i składzie syntetyzowanych i wydzielanych neurotransmiterów, zmiany w ilości zwojów nerwowych oraz stan zapalny w obrębie jelitowych zwojów nerwowych związany z przenikaniem limfocytów i mastocytów przez ścianę jelita [191,193,232]. Dodatkowo mikroorganizmy mogą pobudzać szlaki cholinergiczne bezpośrednio poprzez zdolność do syntezy neuroprzekazników. Wykazano, że bakterie *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* i *Candida* skutecznie zwiększają stężenie serotoniny, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* - kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), a *Bacillus*, *Escherichia* i *Saccharomyces* – norepinefryny [194,215,232,233].

NEUROZAPALENIE



Rycina 4. Szlaki komunikacji na drodze osi mózgowo-jelitowej wg Wierchanowskiej i wsp. [197] w modyfikacji własnej

Mikrobiota przewodu pokarmowego może pobudzać szlaki cholinergiczne również pośrednio poprzez syntezę metabolitów, takich jak SCFA (m.in. maślan), stymulujących uwalnianie serotoniny. Wykazano, iż za wytwarzanie maślanu, a przez to za zwiększenie produkcji serotoniny odpowiada *Faecalibacterium*, *Roseburia* i *Coprococcus* [195]. Sygnały te zmieniają funkcjonowanie układu nerwowego przewodu pokarmowego i są następnie przekazywane za pośrednictwem osi mózgowo-jelitowej do ośrodkowego układu nerwowego, gdzie mogą wpływać na zmiany w przewodnictwie nerwowym i przyczyniać się do występowania takich objawów, jak bóle i zawroty głowy, pogorszenie pamięci i koncentracji, obniżenie nastroju, czy zmęczenie, które wpisują się w obraz kliniczny ME/CFS [193]. Rola dysbiozy jelitowej i zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej w patogenezie ME/CFS przedstawiono schematycznie na Rycinie 5. [216].



Rycina 5. Rola dysbiozy jelitowej i zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej w patogenezie ME/CFS wg Varesi i wsp. [216]

Kluczową rolę w dwukierunkowej komunikacji między mózgiem a mikrobiotą odgrywa również nerw błędny, który stanowi główną drogę aferentną od jamy brzusznej do mózgu [233,234]. Istnieją doniesienia, że mikrobiota może aktywować tę ścieżkę, wpływając na działanie mózgu na poziomie fizjologicznym i behawioralnym [233,234]. Przykładem fizjologicznych procesów, na które wpływają interakcje nerwu błędnego i mikrobioty jest gojenie ran. Wykazano, że *Lactobacillus reuteri*, obecny w preparatach probiotycznych, zwiększa uwalnianie oksytocyny z podwzgórza, co wpływa na przyspieszenie procesu gojenia ran [235]. Podobnego efektu nie obserwowano po wagotomii [235]. Wykazano również, że przejściowa dezaktywacja grzbietowego kompleksu nerwu błędnego osłabia deficyty izolacji społecznej, wywołane obwodowym podaniem LPS [236]. W modelu zwierzęcym zaobserwowano, że przecięcie nerwu błędnego przyczynia się do obniżenia odczucia niepokoju, ponadto zachowania lękowe związane z przewlekłym zapaleniem jelit, wywołanym przy pomocy dekstranu siarczanu sodu (DSS), nie występowały u myszy poddanych wcześniej wagotomii [237]. Sugeruje to, że nerw błędny jest elementem pośredniczącym w wywieraniu negatywnych efektów przewlekłego zapalenia jelit na układ nerwowy. Wykazano również, że wagotomia blokowała anksjolityczne działanie *Bifidobacterium longum* i antydepresyjne działanie *Lactobacillus rhamnosus* [238,239]. Pozwala to przypuszczać, że nerw błędny odgrywa znaczącą rolę w mechanizmie korzystnego działania probiotyków.

Istnieją strukturalne podobieństwa między jelitem i barierą krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB). BBB jest złożoną jednostką, składającą się z komórek śródbłonki naczyń OUN. Oddzielają one światło naczyń krwionośnych od jego parenchymy [240,241]. Natomiast perycyty i astrocyty uszczelniają komórki śródbłonki kapilar BBB. Ponadto ścisłe połączenia białek transbłonowych ograniczają paracelularną dyfuzję rozpuszczalnych w wodzie substancji z krwi do mózgu [240,241].

Ostatnie badania myszy *germ-free* (pozbawionych mikrobioty jelitowej) wskazują na możliwość modulowania BBB przez mikrobiotę [242]. Ekspozycja dorosłych myszy na mikrobiotę kałową myszy *germ-free* obniżyła przepuszczalność BBB i zwiększyła ekspresję modulatorów przepuszczalności jelit [242]. Co więcej, kolonizacja jelit dorosłych myszy *germ-free* szczepami bakterii, które wytwarzają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe znormalizowała przepuszczalność BBB. Zaobserwowano również, że maślan sodu zwiększył ekspresję okludyny, która została powiązana ze zmniejszoną przepuszczalnością BBB [242]. Te

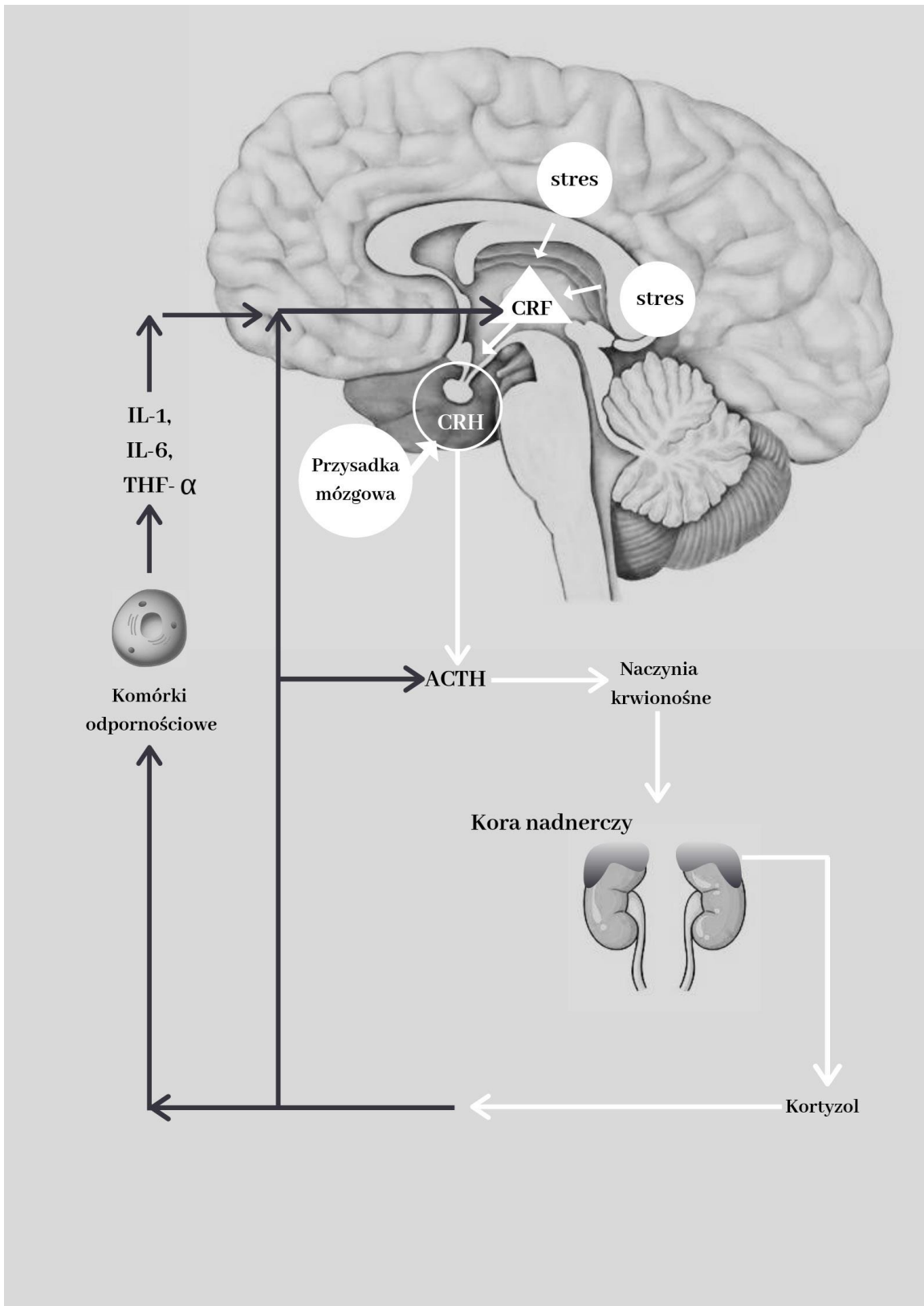
obserwacje sugerują, że ekspresja okludyny przez komórki śródbłonka mózgu jest wrażliwa na zmiany w mikrobiocie jelitowej [242].

Jednym z czynników regulujących oś mózgowo-jelitową na drodze endokrynej jest kortyzol. Jego wydzielanie regulowane jest przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA), a uwalniany jest pod wpływem stresu. Kortyzol może wpływać na odpowiedź immunologiczną poprzez modulowanie aktywności i składu mikrobioty oraz poprzez wydzielanie cytokin [243]. Badając modele zwierzęce wykazano zaburzenia w funkcjonowaniu osi HPA, zwiększoną reaktywność na stres oraz zaburzenia funkcji poznawczych u myszy *germ-free* [244] oraz odwrócenie przesadnej reakcji na stres u myszy *germ-free* po przeszczepieniu mikrobioty jelitowej od zdrowych myszy [245]. Zwiększona przepuszczalność bariery jelitowej prowadzi do translokacji bakterii, która powoduje odpowiedź osi HPA i aktywację immunologiczną [246]. Reakcja osi HPA na ostry stres może zostać złagodzona przez dietetyczne postępowanie probiotyczne [247]. Wykazano, że szczepy *Lactobacillus* i *Bifidobacterium infantis* mają zdolność normalizowania zachowań związanych ze stresem [244,248]. Odkryto, że leczenie probiotykami i substancjami modulującymi wzrost korzystnych bakterii, zmienia odpowiedź na wytwarzanie kortyzolu i reakcję emocjonalną zdrowych ludzi [249]. Te wyniki pokazują, że mikrobiota jelitowa jest ważnym modulatorem osi HPA [249]. Trzeba pamiętać jednak, że ten związek pomiędzy reakcjami neuroendokrynnymi a mikrobiotą jest dwukierunkowy [193,197]. Kortykoliberyna (CRH) jest początkowym neurohormonem osi HPA, pobudzającym przysadkę mózgową do wytwarzania hormonu adrenokortykotropowego (ACTH). Może to kształtować populację mikrobioty jelitowej, pośrednio modulując indukowaną stresem przepuszczalność jelit, ich motorykę oraz odpowiedź odpornościową i zapalną [250]. Mechanizmy oddziaływania na szlaku osi HPA przedstawiono schematycznie na Rycinie 6. [197].

Bardzo ważnym szlakiem komunikacji pomiędzy jelitami a mózgiem jest układ immunologiczny. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wskazują na obniżony poziom cytokin prozapalnych IL-6, INF- γ i TNF- α w grupie otrzymującej probiotyk w porównaniu do grupy placebo [197]. Co więcej probiotyk wpłynął na zwiększenie poziomu tryptofanu [197]. Na szlaku metabolicznym tryptofan może zostać przekształcony w kwas kynureninowy (ang. *kynurenin acid*, KYNA) lub kynureninę, które mają antagonistyczny wpływ na układ nerwowy. KYNA działa neuroprotekcynie przez antagonizm wobec receptorów NMDA [248]. Nieprawidłowości w szlaku kynureninowym mogą być spowodowane dysregulacją immunologiczną lub nadmiernym pobudzeniem osi HPA. Zasadniczą funkcją tego

szklaku jest metabolizm tryptofanu do hormonów odpowiedzialnych za regulację nastroju – serotoniny i melatoniny [251]. Czynniki zapalne mogą powodować zwiększoną aktywację znajdującego się w astrocytach, mikrogleju i neuronach enzymu – indoloamino-2,3,-dioksygenazy (ang. *indoleamine-2,3-dioxygenase*, IDO). IDO katabolizuje tryptofan w neurotoksyczną kynureninę, która zwiększa ryzyko wystąpienia procesów neurodegeneracyjnych i neurotoksycznych i prowadzi do rozwoju zaburzeń funkcji poznawczych [251].

Opisane mechanizmy stanowią jedynie hipotezy i nie zostały jak dotąd jednoznacznie wyjaśnione, dlatego wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach naukowych. Na podstawie dotychczasowych doniesień można jednak stwierdzić, że istnieją istotne dwukierunkowe powiązania pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym, a mikrobiotą jelitową. Określenie związku pomiędzy dysbiozą jelitową, dysfunkcją bariery jelitowej oraz nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną a rozwojem ME/CFS wydaje się niezbędne dla zrozumienia patogenezy tej choroby, a także może stać się punktem uchwytu dla opracowania nowych metod diagnostyki i leczenia przyczynowego tej choroby.



Rycina 6. Mechanizmy oddziaływania na szlaku osi HPA wg Wierzchanowskiej i wsp. [197] w modyfikacji własnej

I.4.8. Dysbioza jelitowa w zespole przewlekłego zmęczenia

Obecnie wiele badań naukowych skupia się wokół wpływu składu mikrobioty jelitowej na zdrowie organizmu gospodarza, a także wokół roli zaburzeń w jej składzie na rozwój stanów chorobowych. Zwraca uwagę duża częstość występowania u pacjentów z ME/CFS objawów z układu pokarmowego, takich jak m.in. bóle brzucha, zmiana rytmu wypróżnień, nudności, biegunki czy wzdęcia [3,193]. Dodatkowo u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia znacząco częściej współwystępuje zespół jelita drażliwego (ZDJ; ang. *irritable bowel syndrome*, IBS) [3]. Wzrost obfitości nieprawidłowych populacji bakterii w jelitach, czyli dysbioza jelitowa, została jak do tej pory opisana w wielu chorobach, m.in. metabolicznych [198,199], gastroenterologicznych [200,201], autoimmunologicznych [202,203], onkologicznych [204], neurologicznych [205–208], co wyraźnie pokazuje jak duży i wielokierunkowy wpływ na organizm gospodarza mogą mieć zaburzenia składu mikrobioty jelitowej.

W związku z tym wysunięto hipotezę, że dysbioza jelitowa może uczestniczyć również w patogenezie ME/CFS, co stało się tematem wielu aktualnych badań naukowych [1,129,209–219], jednak związek pomiędzy konkretnymi zaburzeniami w składzie mikrobioty jelitowej, a patogenезą zespołu przewlekłego zmęczenia nie został jak na razie jednoznacznie udowodniony. Również niewyjaśnioną kwestią pozostaje czy dysbioza jelitowa w ME/CFS jest zmianą pierwotną czy wtórną do rozwijających się objawów.

W badaniu opublikowanym w 2021 roku Lupo i wsp. porównali skład mikrobioty i profile metabolomiczne pacjentów z ME/CFS z osobami zdrowymi, wykorzystując metodę sekwencjonowania 16S rRNA [1]. Wykazali, że w mikrobiocie jelitowej pacjentów z ME/CFS jest znacząco niższa obfitość rodzajów *Lachnospiraceae* i *Anaerostipes*, natomiast wyższa jest obfitość bakterii z rodzajów *Bacteroides* i *Phascolarctobacterium* [1]. W profilach metabolomicznych oznaczanych z próbek kału pacjentów, wykazano podwyższone poziomy kwasu glutaminowego i argininobursztynowego oraz obniżony poziom alfa-tokoferolu [1].

Inne badania naukowe, w których oznaczano mikrobiotę jelitową w próbkach stolca pacjentów z ME/CFS, także wykazały pewne różnice w składzie bakterii jelitowych [129,209–212,214,215,220]. Podsumowanie dotychczasowych wyników badań naukowych, które wykazały zmiany w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS przedstawiono w Tabeli 8. [216].

Tabela 8. Podsumowanie publikacji naukowych potwierdzających zmiany składu mikrobioty jelitowej w ME/CFS na podstawie Varesi i wsp. [216] w modyfikacji własnej

Publikacja	Uczestnicy badania	Kryteria diagnostyczne	Metody analizy	Wyniki
Lupo i wsp., 2021 [1]	35 pacjentów z ME/CFS i 70 osób zdrowych (35 z nich miało krewnych z ME/CFS, a 35 nie)	Kryteria Fukudy	Sekwencjonowanie mikrobioty w próbek kału, metodą 16S rRNA Illumina sequencing	Mniejsza ilości <i>Anaerostipes</i> (<i>Lachnospitaceae</i>) oraz wzrost ilości <i>Bacteroides</i> i <i>Phascolarctobacterium</i>
Fremont i wsp., 2013 [209]	43 pacjentów z ME/CFS i 36 osób zdrowych	Kryteria Fukudy	Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie 16S rRNA mikrobioty z próbek stolca	Wzrost ilości <i>Lactonifactor</i> i <i>Alistipes</i> , zmniejszenie ilości kilku populacji <i>Firmicutes</i>
Shukla i wsp., 2015 [210]	10 pacjentów z ME/CFS i 10 osób zdrowych	Kryteria Fukudy	Próba maksymalnego wysiłku fizycznego, próbki kału pobrano przed oraz 15min, 48 godzin i 72 godziny po wysiłku fizycznym, sekwencjonowanie 16S rRNA	Wzrost obfitości głównych typów bakterii (po wysiłku fizycznym), zmniejszenie klirensu bakteryjnego (po wysiłku fizycznym)
Giloteaux i wsp., 2016 [211]	49 pacjentów z ME/CFS i 39 osób zdrowych	Kryteria Fukudy	Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie 16S rRNA mikrobioty z próbek stolca	Spadek różnorodności mikrobioty w ME/CFS, mniejsza ilość baterii z typu <i>Firmicutes</i> , wzrost ilości prozapalnych szczepów (<i>Proteobacteria</i>)
Giloteaux i wsp., 2016 [212]	Para 34-letnich monozygotycznych bliźniąt, 1 osoba z ME/CFS i 1 osoba zdrowa	Kryteria Fukudy	2 dniowa próba CPET, wysokoprzepustowe sekwencjonowanie 16S rRNA mikrobioty z próbek stolca	Spadek różnorodności mikrobioty jelitowej w ME/CFS, spadek ilości bakterii <i>Faecalibacterium</i> i <i>Bifidobacterium</i>
Nagy-Szakal i wsp., 2017 [129]	50 pacjentów z ME/CFS i 50 osób zdrowych	Kryteria Fukudy i kryteria kanadyjskie (CCC)	Sekwencjonowanie metodą <i>shotgun</i> mikrobioty z próbek stolca	Pacjenci z ME/CFS i IBS: wzrost ilości <i>Alistipes</i> i spadek ilości <i>Faecalibacterium</i> ; pacjenci tylko z ME/CFS: wzrost ilości <i>Bacteroides</i> i spadek ilości <i>Bacteroides vulgatus</i>
Sheedy i wsp., 2009 [220]	108 pacjentów z ME/CFS i 177 osób zdrowych	Kryteria londyńskie, Kryteria Fukudy i kryteria kanadyjskie (CCC)	Identyfikacja bakterii w próbkach stolca metodami standardowymi (hodowla)	Wzrost produkcji kwasu mlekowego, większa ilość bakterii <i>Enterococcus</i> i <i>Streptococcus</i> spp.
Mandarano i wsp., 2018 [214]	49 pacjentów z ME/CFS i 39 osób zdrowych	Kryteria Fukudy	Sekwencjonowanie 18S rRNA mikrobioty z próbek stolca	Spadek różnorodności eukariotów, wzrost <i>Basidiomycota/Ascomycota</i> ratio (wyniki nieistotne statystycznie)
Kitami i wsp., 2020 [215]	48 pacjentów z ME/CFS i 52 osób zdrowych	Kryteria Fukudy i kryteria ME/ICC	Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie 16S rRNA mikrobioty z próbek stolca	Wzrost ilości <i>Corpobacillus</i> , <i>Eggerhella</i> i <i>Blautia</i> u pacjentów z ME/CFS

I.5. Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Zespół przewlekłego zmęczenia (ME/CFS) jest istotnym problemem klinicznym, który znacznie upośledza codzienną aktywność pacjentów i obniża jakość ich życia, jednak pomimo wielu badań naukowych, jego patogenezę i etiologię nadal nie została w pełni wyjaśniona, a także nie opracowano markera biologicznego, który przyspieszyłby diagnostykę ME/CFS. Dlatego szacuje się, że nawet u ok. 90% pacjentów z tą chorobą nadal nie postawiono jeszcze prawidłowej diagnozy, a dokładna chorobowość ME/CFS pozostaje wciąż nieznana.

Trwająca od 2020 roku pandemia wirusa SARS-Cov-2 przyczyniła się do rozwoju objawów przewlekłego zmęczenia u części ozdowieńców choroby Covid-19, co sprawiło, że objawy przewlekłego zmęczenia stały się szerzej rozpoznawalne. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że objawy powirusowego zespołu przewlekłego zmęczenia oraz ME/CFS, mogą być ze sobą częściowo zbieżne. Sugeruje się, że w związku z pandemią nowego koronawirusa ilość pacjentów, u których rozwinię się ME/CFS może znacząco wzrosnąć. Obecnie utrzymywanie się objawów zmęczenia czy dysfunkcji autonomicznej przez cztery lub więcej tygodni po przebyciu infekcji COVID-19, definiowane jest przez CDC jako Long-COVID. Sytuacja ta pokazuje jak ważne jest wyjaśnienie etiologii ME/CFS oraz jego związku z zmęczeniem powirusowym, a także opracowanie skutecznego leczenia.

Dysbioza jelitowa i ogólnoustrojowa odpowiedź organizmu gospodarza na zaburzony skład i funkcjonowanie mikrobiomu jelitowego jest jedną z rozważanych możliwych przyczyn ME/CFS. Niektóre doniesienia naukowe sugerują istnienie zaburzeń homeostazy mikrobiomu jelitowego oraz zaburzeń metabolomicznych u pacjentów z ME/CFS. Jak dotąd przeprowadzono jednak stosunkowo niewiele badań dotyczących tych zaburzeń u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia, a istniejące badania były zwykle prowadzone na małych grupach pacjentów, obejmowały niespójne kryteria diagnostyczne, wykorzystywały różne metody badawcze, mogły być zakłócone poprzez kontrolowanie czynników środowiskowych wpływających na skład mikrobiomu przed pobraniem próbek, czy przedstawiały wykluczające się nawzajem wyniki. W związku z tym jak dotąd nie ma wystarczających dowodów naukowych na potwierdzenie związku między zaburzeniami homeostazy mikrobiomu jelitowego, a rozwojem ME/CFS. Dlatego niezbędne są dalsze badania naukowe w tym temacie, oparte na rygorystycznym podejściu do diagnozowania i rozpoznawania ME/CFS, na dobrze zaplanowanych projektach eksperymentalnych i w końcu na wyczerpujących analizach danych.

W swoim badaniu podjęłam się analizy mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia, co może mieć duże znaczenie w uzupełnieniu wiedzy na temat etiologii i patogenez tej choroby, a także może przyczynić się do poprawy jej diagnostyki. Udowodnienie związku dysbiozy jelitowej z rozwojem ME/CFS i precyzyjne określenie rodzaju zaburzeń jakościowych lub ilościowych mikrobioty jelitowej, może stać się potencjalnym punktem uchwytu w efektywnej terapii tego schorzenia. Przeprowadzone badanie może przyczynić się w przyszłości do lepszego zrozumienia roli mikrobiomu jelitowego w rozwoju zespołu przewlekłego zmęczenia, a także opracowania nowych metod prewencji, diagnostyki i leczenia ME/CFS.

II. CELE PRACY, HIPOTEZY BADAWCZE

Cele pracy:

1. Analiza składu ilościowego i jakościowego mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej.
2. Ocena różnic w składzie mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, ze względu na płeć i wiek.
3. Ocena zdolności do klasyfikacji mikrobiomu jelitowego pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, przy użyciu metod uczenia się maszynowego.
4. Porównanie mikrobiomu jelitowego pomiędzy grupą badaną i kontrolną na podstawie analizy sieciowej mikrobiomu jelitowego, dla sieci przeprowadzonej na podstawie ASV.
5. Ocena zależności między różnicami w składzie mikrobiomu jelitowego, a funkcjonowaniem autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowaniem poznawczym oraz wybranymi objawami zespołu przewlekłego zmęczenia.

Hipotezy badawcze:

- H1. Alfa-różnorodność mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia różni się w sposób istotny w porównaniu do osób zdrowych.
- H2. Beta-różnorodność mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia różni się w sposób istotny w porównaniu do osób zdrowych.
- H3. Czynniki wpływające na obraz kliniczny zespołu przewlekłego zmęczenia, takie jak płeć czy wiek pacjentów, są istotnie zależne od składu mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS.
- H4. Stopień nasilenia objawów zespołu przewlekłego zmęczenia, funkcjonowanie autonomicznego układu nerwowego oraz funkcjonowanie poznawcze są zależne od składu mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS.

III. MATERIAŁ I METODY

III.1. Materiał

III.1.1. Schemat badania

Badanie zostało przeprowadzone w okresie od stycznia 2018 roku do marca 2019 roku w Bydgoszczy. W projekcie badawczym wzięli udział pełnoletni ochotnicy w wieku między 25. a 65. rokiem życia. Rekrutacja do badania odbywała się za pomocą środków masowego przekazu (lokalne audycje radiowe, lokalne gazety oraz media społecznościowe). Przesyłane do obiorców treści zawierały informacje o prowadzonym przez zespół naukowy Katedry Higieny, Epidemiologii i Ergonomii programie badawczym na temat ME/CFS, który był następnie kontynuowany przez zespół naukowy Katedry Fizjologii Wysiłku Fizycznego i Anatomii Funkcjonalnej Collegium Medicum w Bydgoszczy. Następnie kontaktowano się z uczestnikami mailowo w celu przeprowadzenia krótkiego wywiadu przesiewowego i wyłonienia osób, które wstępnie kwalifikowały się do włączenia do projektu badawczego. Pacjenci podawali też informację na temat swoich chorób towarzyszących, stosowanej farmakoterapii, przebytych chorób i zabiegów operacyjnych.

Do badania początkowo zgłosiło się 250 pacjentów. Na podstawie przyjętych kryteriów, do badania zakwalifikowano 32 pacjentów z ME/CFS do grupy badanej oraz 18 osób zdrowych do grupy kontrolnej. Ostatecznie 27 pacjentów z grupy badanej i 15 z grupy kontrolnej wyraziło zgodę na wykonanie badania kału i dostarczyło próbki do badania.

U tych pacjentów przeprowadzono szczegółowy wywiad chorobowy dotyczący rodzaju oraz początku objawów, wcześniejszych chorób, przyjmowanych leków, innych dolegliwości. Przeanalizowano również dotychczasową dokumentację medyczną pacjentów, gdyż w przeważającej większości szukali oni wcześniej pomocy u różnych lekarzy specjalistów oraz wykonywali wiele badań dodatkowych, w celu poszukiwania powodu swoich dolegliwości, a także skutecznej metody leczenia. Następnie przeprowadzono u wyłonionych pacjentów badanie neurologiczne i psychiatryczne, celem wykluczenia chorób stanowiących kryteria wyłączenia z udziału w badaniu.

W kolejnym etapie badania wykonano ocenę nasilenia objawów zespołu przewlekłego zmęczenia, przy użyciu skal oceny wpływu zmęczenia (ang. *Fatigue Impact Scale*, FIS) i oceny nasilenia zmęczenia (ang. *Fatigue Severity Scale*, FSS), ocenę funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego przy użyciu Task Force Monitor (TFM, CNSystems, Medizintechnik, Graz, Austria) oraz ocenę funkcji kognitywnych przy użyciu testu łączenia punktów – TMT A i B.

Zakwalifikowani pacjenci dostarczyli do laboratorium próbki kału pobrane wg wskazanego protokołu.

Wszystkie badania zostały wykonane w Pracowni Chronomedycyny i Badań Czynnościowych Autonomicznego Układu Nerwowego, Katedry Higieny, Epidemiologii i Ergonomii, Collegium Medicum w Bydgoszczy. Wszyscy uczestnicy badania podpisali świadomą i dobrowolną zgodę na udział w badaniu. Zgoda na przeprowadzenie badania eksperymentalnego została zatwierdzona przez Komisję Bioetyczną, działającą przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (decyzja nr KB660/2017). Schemat badania przedstawiono na Rycinie 7.

III.1.2. Kwalifikacja do grupy badanej

Kryteria włączenia stanowiły:

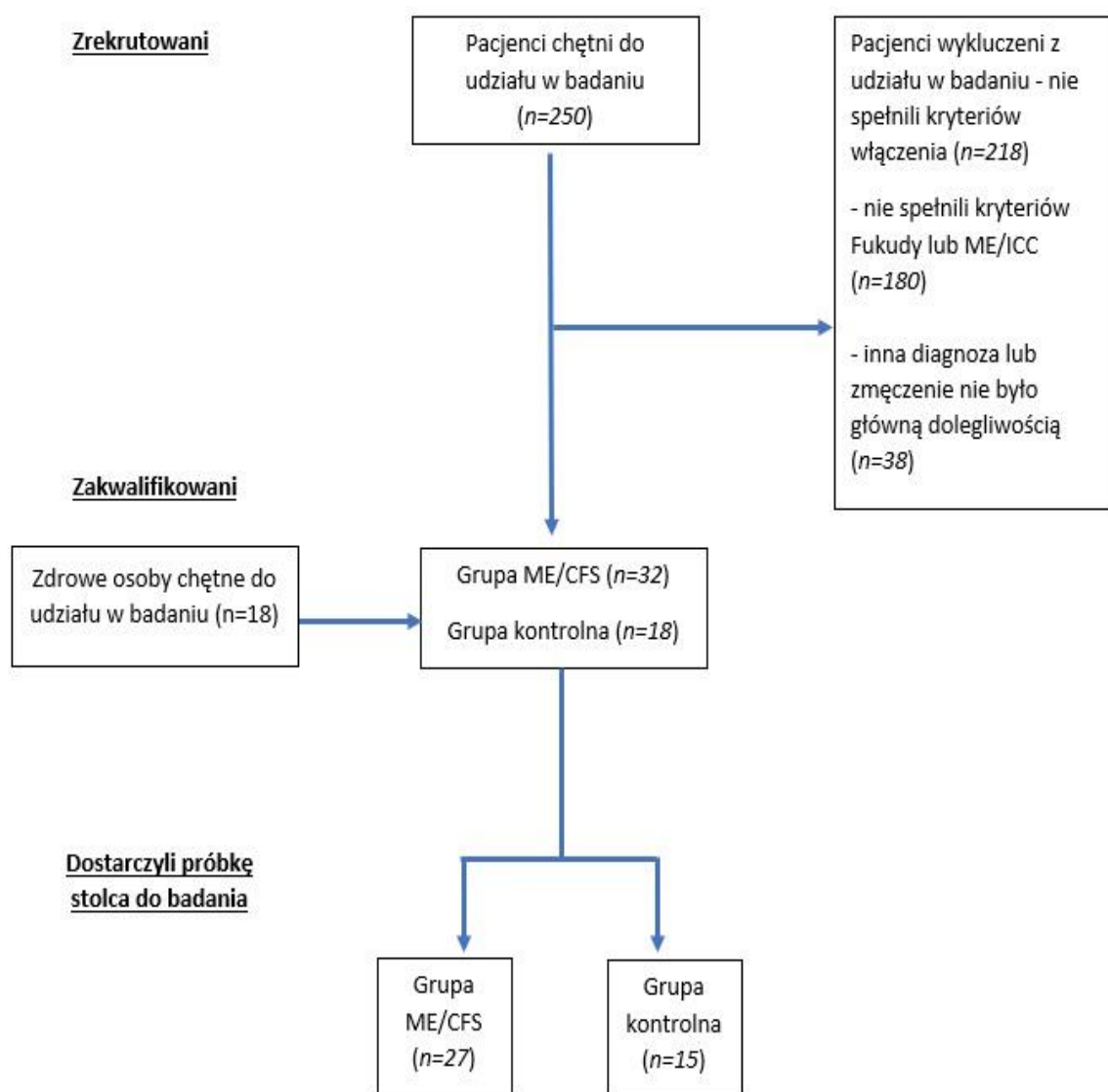
- wiek pacjentów od 25. do 65. roku życia, kobiety i mężczyźni
- rozpoznanie zespołu przewlekłego zmęczenia na podstawie kryteriów Fukudy (ocenionych prospektywnie) oraz kryteriów ME/ICC (ocenionych retrospektywnie)
- wyrażenie dobrowolnej zgody na udział w eksperymencie

Kryteria wyłączenia stanowiły:

- wiek pacjentów poniżej 25. lub powyżej 65. roku życia
- nie spełnienie kryteriów Fukudy i/lub kryteriów ME/ICC
- choroby towarzyszące takie jak: choroby psychiczne albo inne choroby przewlekłe, w których obrazie klinicznym może występować objaw zmęczenia (tj. choroby układu krążenia, choroby układu endokrynologicznego, choroby autoimmunologiczne)
- uznanie, że zmęczenie nie było główną dolegliwością zgłaszających się pacjentów

III.1.3. Kwalifikacja do grupy kontrolnej

- wiek pomiędzy 25. a 65. rokiem życia, kobiety i mężczyźni
- osoby zdrowe, nie chorujące na choroby przewlekłe
- nie spełnianie kryteriów Fukudy i/lub kryteriów ME/ICC



Rycina 7. Schemat badania

III.1.4. Protokół pobrania próbek do badania

Pacjenci z grupy badanej i grupy kontrolnej zostali poproszeni o pobranie próbek stolca do badania jeden raz, w warunkach domowych, zgodnie z poniższym protokołem. Próbki zostały pobrane ze świeżo wydalonego stolca, używając jałowego sprzętu jednorazowego użytku, do specjalnych pojemników i w tym samym dniu, jak najszybciej, dostarczone do Katedry Higieny, Epidemiologii i Ergonomii, gdzie zostały zamrożone i były przechowywane w temperaturze -80 stopni Celsjusza do czasu izolacji DNA i wykonania dalszych analiz.

III.2. Metody

III.2.1. Metody oceny nasilenia zmęczenia

Skala Oceny Wpływu Zmęczenia (ang. *Fatigue Impact Scale*, FIS)

Skala Oceny Wpływu Zmęczenia (FIS), powstała w 1994 roku, i do dzisiaj pozostaje jednym z najczęściej stosowanych narzędzi w ocenie funkcjonalnych ograniczeń spowodowanych zmęczeniem. Skala jest dość rozbudowana i szczegółowa - składa się z 40 stwierdzeń, z których każde jest oceniane przez pacjenta w skali od 0 punktów (bez problemu) do 4 punktów (bardzo istotny problem), stąd można otrzymać łącznie od 0 do 160 punktów, co pozwala subiektywnie określić stopień nasilenia objawów chronicznego zmęczenia. FIS składa się z trzech podskal, które opisują wpływ zmęczenia na trzy obszary życia codziennego: funkcjonowanie poznawcze (10 elementów), funkcjonowanie fizyczne (10 elementów) oraz funkcjonowanie psychospołeczne (20 elementów). Skala posiada wysoki współczynnik rzetelności alfa Cronbacha ($\geq 0,87$) oraz wysoką wiarygodność testu (0,72–0,83). Wyższe wyniki wskazują na większy wpływ zmęczenia na codzienną aktywność pacjenta. Skala jest często wykorzystywana w badaniach naukowych, w praktyce klinicznej jej użycie jest mało praktyczne, w związku z dużym rozbudowaniem skali, jednak pojawiają się różne skrócone modyfikacje skali FIS o podobnych współczynnikach rzetelności [132].

Skala Oceny Nasilenia Zmęczenia (ang. *Fatigue Severity Scale*, FSS)

Skala Nasilenia Zmęczenia (FSS) jest szeroko stosowanym kwestionariuszem, służącym do samodzielnego pomiaru zmęczenia u pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi. Pojęcie zmęczenia opiera się na postrzeganym przez pacjentów stanie energii lub braku energii. Subiektywny charakter zmęczenia utrudnia zarówno jego zdefiniowanie, jak i zmierzenie. Składa się z dziewięciu stwierdzeń, dotyczących objawów związanych z upośledzoną tolerancją wysiłku fizycznego i zaburzeniami neurokognitywnymi, które każdy pacjent ocenia w skali od 1 do 7 punktów (gdzie 1 oznacza, że pacjent całkowicie nie zgadza się z danym stwierdzeniem, a 7 - że całkowicie się zgadza). Jest to skala szeroko stosowana w praktyce klinicznej i naukowej w ME/CFS, ponieważ pomaga w ocenie zarówno zmęczenia fizycznego, jak i mentalnego [133].

III.2.2. Metody oceny autonomicznego układu nerwowego

U wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania wykonano ocenę czynnościową AUN. Podczas wykonywanych badań osoby przebywały w tzw. bunkrze chronobiologicznym,

tn. w pomieszczeniu wyciszonym z systemem klimatyzacji, utrzymującym stałe warunki temperatury i wilgotności powietrza (temperatura powietrza 22 stopnie Celsjusza, wilgotność powietrza 60%, oświetlenie <10 lx) a wszystkich pomiarów dokonywano w godzinach dopołudniowych. Pomiary były wykonywane w pozycji leżącej. Przez pierwsze 5 minut trwania testu nie rejestrowano pomiarów, był to czas na ustabilizowanie parametrów pacjentów. Pomiary wykonano w sposób nieinwazyjny przy pomocy systemu Task Force Monitor (TFM, CNSystems, Medizintechnik, Gratz, Austria). Metoda ta jest szeroko stosowana w ocenie parametrów czynnościowych autonomicznego układu nerwowego. W skład systemu TFM wchodzi elektrokardiograf (EKG), kardiograf impedancyjny (IKG), urządzenie do ciągłego pomiaru ciśnienia krwi (contBP) oraz urządzenie do oscylometrycznego pomiaru ciśnienia krwi (oscBP) [141].

Ocenianym parametrem układu autonomicznego był stosunek rozkurczowego ciśnienia krwi o niskiej częstotliwości (ang. *low frequency*, LF) do wysokiej częstotliwości (ang. *high frequency*, HF) odstępu R do R (LF/HF-RR). System TFM ma zaimplementowane algorytmy, które w oparciu o rejestrowane sygnały wyznaczają w czasie rzeczywistym parametry analizy widmowej HRV i BPV. Następnie obliczane są składowe widma mocy: zakres niskich częstotliwości (LF) i zakres wysokich częstotliwości (HF). System oblicza iloraz LF/HF, czyli stosunek mocy gęstości widma niskich do wysokich częstotliwości. Parametr LF/HF jest powszechnie uznawanym wskaźnikiem czynnościowej równowagi współczulno-przywspółczulnej [141].

III.2.3. Metody oceny funkcji poznawczych

Funkcjonowanie poznawcze oznacza zdolność danej osoby do przetwarzania myśli. Określenie funkcje poznawcze odnosi się głównie do takich obszarów związanych z myśleniem jak pamięć, zdolność do uczenia się nowych informacji, mowy, czytania ze zrozumieniem i komunikacji. Szlak przetwarzania informacji obejmuje: percepcję bodźca, selektywną uwagę, pamięć operacyjną oraz funkcje wykonawcze. Niektóre choroby, w tym ME/CFS, mogą przyczynić się do powstania objawów z zakresu dysfunkcji poznawczych, które znacząco pogarszają funkcjonowanie chorego. W ME/CFS najbardziej wyraźnymi objawami upośledzenia funkcji poznawczych są zaburzenia pamięci i koncentracji. Pomiarów deficytów poznawczych można dokonywać przy pomocy narzędzi testowych, metod neuroobrazowych czy badań dychotycznych.

W niniejszym badaniu do oceny funkcji poznawczych użyto testu łączenia punktów (ang. *Trail Making Test*, TMT). *Trail Making Test* jest narzędziem neuropsychologicznym oferującym szybką ocenę różnych umiejętności, w tym domeny funkcji wykonawczych: zdolności wzrokowo-przestrzenne, przełączanie zadań i pamięć operacyjną [252,253]. *Trail Making Test* część A (TMT A) wymaga połączenia kropek z liczbami od 1 do 25 w kolejności sekwencyjnej. Zadaniem w części B (TMT B) jest naprzemienne łączenie punktów, najpierw łączenie liczby z literą, a następnie ponownie z liczbą w kolejności rosnącej (np. 1-A-2-B itd.). TMT B zawiera cyfry od 1 do 13 oraz litery od A do L. Wynikiem TMT A i B jest czas potrzebny do prawidłowego wykonania zadania mierzony w sekundach. Wynik TMT A świadczy o umiejętności wyszukiwania wzrokowego i szybkości motorycznej [254], natomiast część B uważana jest również za test elastyczności poznawczej i kontroli wykonawczej [255,256].

III.2.4. Metody oceny mikrobiomu jelitowego

Analizy mikrobiomu dokonano wykonując badanie próbek stolca. Badaną mikrobiotą określono jako mikrobiotą przewodu pokarmowego. Porównań dokonywano między grupą badaną a grupą kontrolną.

III.2.4.1. Ocena różnorodności mikrobiomu jelitowego

Mikrobiom przewodu pokarmowego uczestników badania oznaczono za pomocą sekwencjonowania fragmentów genów 16S rRNA. W celu przeprowadzenia sekwencjonowania mikrobioty jelitowej, DNA wyizolowano z próbek kału za pomocą *bead-beating* (Powerlyzer, Mo-Bio) w połączeniu z kolumnami flokulacyjnymi i krzemionkowymi. Fragmenty bakteryjnego genu 16S rRNA zostały zamplifikowane i przekształcone w biblioteki sekwencjonowania Illumina. Biblioteki do sekwencjonowania na aparacie MiSeq (Illumina) zostały przygotowane w dwóch rundach PCR, pierwszej przy użyciu primerów specyficznych do genów 16S rRNA niosących na 5'końcach sekwencje M13 i M13R i drugiej, przy użyciu primerów M13 i M13R niosących sekwencje adapterów (P5 i P7) oraz MID (*molecular identifier*) umożliwiającymi odróżnienie sekwencji z poszczególnych próbek. Po sekwencjonowaniu odczyty były odszumiane (*BayesHammer*), składane (*Pandaseq*) i obrabiane w programie Mothur [174], tak jak opisał Thiem i wsp. [257].

Oceniono Alfa- i Beta-różnorodność analizowanego mikrobiomu jelitowego:

- Alfa-różnorodność – oznacza różnorodność prób reprezentujących dane zbiorowisko, siedlisko
- Beta-różnorodność – oznacza zróżnicowanie gatunkowe między różnymi zbiorowiskami.

III.2.4.2. Ocena liczebności mikrobiomu jelitowego

Liczebność bakterii we wszystkich próbkach została zbadana metodą qPCR (na aparacie LightCycler 480) przy użyciu pary primerów B969f i B1072r namnażających fragment genu 16S rRNA z ponad 90% znanych sekwencji (dane wg SILVA). Próbki zostały poddane hybrydyzacji ze znakowaną fluorescencyjnie (Rox) sondą B969f i przeanalizowane przy pomocy sortera komórek BD Aria III przy wzbudzaniu 488 nm i pomiarze fluorescencji przy 610-620 nm.

III.2.5. Analiza statystyczna

Wszystkich analiz dokonano w środowisku R [258]. W opisie zmiennych liczbowych w danych grupach użyto średnich wartości i odchyłeń standardowych od średniej lub medianę i rozstęp kwartyłowy. Wykresy pudełkowe ukazują wartość mediany (pozioma linia wewnątrz pudełka) i wartość rozstępu kwartyłowego (wysokość pudełka), wąsy ukazują wartości najwyższe i najniższe 1,5 raza wyższe niż, odpowiednio, górny i dolny kwartył. Wartości wystające poza ten zakres są ukazane jako odstające. W celu oceny istotności różnic międzygrupowych w zakresie zmiennych ilościowych opisujących charakterystykę badanych grup (pacjenci z ME/CFS w porównaniu do zdrowych ochotników z grupy kontrolnej) użyto testu T dla grup niezależnych w przypadku spełnienia założeń o normalności rozkładu i jednorodności wariancji, lub testu U Manna-Whitneya w przypadku gdy założenia te nie zostały spełnione. Do porównania częstości występowania cech jakościowych w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, użyto dokładnego testu Fishera. Jako graniczny poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

Odczyty sekwencjonowania zostały przetworzone w sposób opisany wcześniej [257]. W skrócie, odczyty sekwencjonowania zostały odsumione, scalone i sprawdzone pod kątem obecności chimer używając pakietu dada2 [259]; zostały one następnie sklasyfikowane przy użyciu bazy SILVA [260]. Następnie skonstruowano operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU) i określono wspólną tabelę OTU używając pakietu Mothur [174]. Analizy ekologiczne przeprowadzono w programie R z wykorzystaniem funkcji zaimplementowanych w pakietach

vegan [261] i GuniFrac [262]. Nieważona macierz odległości UniFrac została wygenerowana przy użyciu funkcji GuniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU. Wszystkie metody zostały przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami.

Pośrednią analizę gradientu, która tworzy porządek w oparciu o macierz niepodobieństwa lub odległości przeprowadzono przy użyciu niemetrycznego wielowymiarowego skalowania (ang. *Non-metric multidimensional scaling*, NMDS), zaimplementowanego w funkcji metaMDS pakietu vegan. Dla analizy NMDS wyliczono wartość naprężenia (ang. *stress*), która reprezentuje różnicę odległości w zredukowanym wymiarze w stosunku do pełnej przestrzeni wielowymiarowej. Naprężenie $>0,05$ zapewnia doskonałą reprezentację w zmniejszonych wymiarach, $>0,1$ świetną, $>0,2$ dobrą, a naprężenie $>0,3$ zapewnia słabą reprezentację [263].

Istotność różnic międzygrupowych testowano metodą PERMANOVA (funkcja adonis) przy użyciu 999 permutacji.

Do rozróżnienia mikrobiomu pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej zastosowano sPLS-DA (ang. *sparse version of the Partial Least Squares Regression-Discriminant Analysis*) [264]. Metoda sPLS może służyć do jednoczesnej redukcji wymiarów i wyboru zmiennych, które różnicują podgrupy pacjentów [265]. Przy użyciu sPLS-DA można wybrać cechy w danych do klasyfikacji próbek o najwyższej wartości predykcyjnej lub różnicującej cechy [264]. Wyniki analiz przedstawiono w formie wykresów słupkowych zawierających dwie osie współrzędnych jak i kolumny, których wysokość ilustruje wartość różnicującą grupę CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

Analizy klasyfikacji pacjentów ME/CFS w porównaniu do zdrowych ochotników, przy użyciu metod uczenia się maszynowego, dokonano stosując program Orange [266]. Do analizy wzięto pod uwagę 190 ASV bez brakujących danych. Porównano wydajność losowego drzewa klasyfikacyjnego, maszyny wektorów nośnych oraz sieci neuronowej. W losowym drzewie klasyfikacyjnym użyto 10 drzew przy zasadzie nie dzielenia podgrup mniejszych niż 5. W maszynie wektorów nośnych użyto jądra liniowego, $C=1$, $\text{epsilon}=0,1$, wartość tolerancji liczbowej= $0,0010$. W sieci neuronowej użyto Wielowarstwowy Perceptron. Składał on się z 5 warstw, złożonej ze 100 neuronów w każdej warstwie, za metodę aktywacji wybrano ReLu, metodę optymalizacji Adam, wartość regularyzacji $\alpha=0.0001$. W porównaniu wydajności modeli podano wartości AUC (ang. *Area Under The Curve*, skrót od obszaru pod krzywą ROC (ang. *Receiver Operating Character*)), CA (ang. *classification accuracy*, czyli dokładności

klasyfikacji pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej), F1, precyzji (ang. *precision*) i przywołania (ang. *recall*). AUC jest metryką modelu, która jest przydatna w wielu przypadkach. Im wyższa wartość AUC, tym model lepiej odróżnia pacjentów z chorobą w porównaniu do osób zdrowych. AUC 0,5 sugeruje brak zdolności modelu do dyskryminacji (tj. zdolność do diagnozowania pacjentów z chorobą lub stanem chorobowym i bez nich na podstawie testu), 0,7 do 0,8 jest uważane za dopuszczalne, 0,8 do 0,9 uważa się za doskonałe, a więcej niż 0,9 uważa się za wynik wybitny [267]. Dokładność klasyfikacji to metryka podsumowująca wydajność modelu klasyfikacji jako liczba prawdziwych przypadków podzielona przez całkowitą liczbę predykcji. Wskaźnik precyzji odpowiada określa dokładność rozpoznania klasy (pacjent lub kontrola), czyli jaką część stanowią poprawnie przewidziane elementy prawdziwych przypadków do wszystkich oznaczonych jako pacjent. Wskaźnik przywołania odpowiada na pytanie ile pacjentów zostało poprawnie rozpoznanych. Wynik F1 to średnia harmoniczna precyzji i przywołania. Wynik F1 uwzględnia zarówno precyzję, jak i przywołanie, co oznacza również, że uwzględnia zarówno przypadki fałszywie pozytywne, jak i fałszywie negatywne. Im wyższa precyzja i przypomnienie, tym wyższy wynik F1. Wynik F1 waha się od 0 do 1. Im bliżej jest 1, tym lepsza zdolność do klasyfikacji.

Analizy sieciowej dokonano przy użyciu pakietu NetCoMi [268]. Porównano sieć skonstruowaną na podstawie mikrobioty (ASV) z grupy CFS w porównaniu do kontroli. Do obliczenia związku pomiędzy wartościami poszczególnych ASV użyto metody korelacji Spearmana z progiem 0,3. Określony próg służył jako metoda stosowana do sparsyfikacji (wybierania krawędzi, które są połączone w sieci). Metodą normalizacji było clr, zera były zastępowane metodą zastąpienia multiplikatywnego. W globalnej ocenie sieci posłużono się porównaniem parametrów takich jak: stopień (ang. *degree*), centralność pomiędzy (ang. *betweenness centrality*), centralność bliskości (ang. *closeness centrality*), centralność wektora własnego (ang. *eigenvector centrality*), hub taxa (ang. *hub taxa*). Porównując sieć stworzoną na podstawie ASV w grupie ME/CFS z grupą kontrolną, użyto takich parametrów jak liczba elementów (ang. *number of components*), współczynnik klastrowania (ang. *clustering coefficient*), modularność (ang. *modularity*), procent dodatniej krawędzi (ang. *positive edge percentage*), gęstość krawędzi (ang. *edge density*), naturalna łączność (ang. *natural connectivity*), łączność wierzchołków (ang. *vertex connectivity*), łączność brzegowa (ang. *edge connectivity*), średnia odmienność (ang. *average dissimilarity*), średnia długość ścieżki (ang. *average path length*). Interpretacja tych parametrów znajduje się w Tabeli 9.

Do analizy statystycznej różnic pomiędzy sieciami wygenerowanymi na podstawie danych z mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do kontroli użyto następujących metod: wskaźnik Jaccard, którego wartość waha się od 0,00 (sieci zupełnie różne) do 1,00 (sieci są równe). Porównano następujące parametry sieci globalnej: stopień (ang. degree), centralność pomiędzy (ang. betweenness centrality), centralność bliskości (ang. closeness centrality), centralność wektora własnego (ang. eigenvector centrality), oraz hub taxa. Ponadto, użyto ARI którego wartość może wynieść $[-1,1]$. ARI=1: doskonała zgodność między grupowaniem, ARI=0: oczekiwana dla dwóch losowych grupowań. Wartość p dla ARI wyliczono przy użyciu test dwustronnego z hipotezą zerową ARI=0.

Tabela 9. Parametry użyte do porównania sieci stworzonej na podstawie zależności pomiędzy poszczególnymi ASV w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy ME/CFS

Nazwa polska	Nazwa ang.	Interpretacja wskaźnika	Odnosićnik
Liczba elementów	<i>Number of components</i>	Liczba elementów zawartych w sieci	[269]
Współczynnik klastrowania	<i>Clustering coefficient</i>	Współczynnik klastrowania ocenia łączność w sąsiedztwie węzła: węzeł ma wysoki współczynnik klastrowania, jeśli jego sąsiedzi mają tendencję do bezpośredniego połączenia ze sobą.	[270]
Modularność	<i>Modularity</i>	Modularność to liczba krawędzi mieszczących się w grupach minus oczekiwana liczba w równoważnej sieci z krawędziami umieszczonymi losowo.	[269]
Procent dodatniej krawędzi	<i>Positive edge percentage</i>	Procent krawędzi wskazujących na dodatnią zależność pomiędzy dwoma węzłami (wartość może wynosić od 0 do 100%)	[269]
Gęstość krawędzi	<i>Edge density</i>	gęstość krawędzi równa się liczbie krawędzi podzielonej przez maksymalną liczbę krawędzi	[271]
Naturalna łączność	<i>Natural connectivity</i>	Miara solidności złożonej sieci	[272]
łączność wierzchołków	<i>Vertex connectivity</i>	łączność wierzchołków k grafu to najmniejsza liczba wierzchołków, których usunięcie oddziela graf lub czyni go trywialnym. Równa zero dla odłączonej sieci.	[273]
łączność brzegowa	<i>Edge connectivity</i>	Niezawodność sieci połączeń międzysystemowych. Równa zero dla odłączonej sieci.	[274]
Średnia odmienność	<i>Average dissimilarity</i>	Obliczana jako średnia wartości niepodobieństwa. Średnia odmienność pustej sieci wynosi 1.	[275]
Średnia długość ścieżki	<i>Average path length</i>	Jest średnią ze wszystkich długości ścieżek w sieci, tj. dla wszystkich par węzłów (i, j).	[276]
Stopień	<i>Degree</i>	Liczebność całkowitej liczby połączeń połączonych z wierzchołkiem	[277]
Centralność pomiędzy	<i>Betweenness centrality</i>	mierzy ułamek najkrótszych ścieżek przechodzących przez wierzchołek.	[278]
Centralność bliskości	<i>Closeness centrality</i>	Bliskość jest zdefiniowana w taki sposób, że jeśli wierzchołek znajduje się blisko każdego innego wierzchołka, wówczas wartość jest większa niż w przypadku, gdy wierzchołek nie jest blisko wszystkiego innego. jeśli suma odległości jest duża, to bliskość jest mała i odwrotnie. Wierzchołek o wysokiej centralności bliskości oznaczałby, że ma bliskie relacje z wieloma wierzchołkami.	[279]
Centralność wektora własnego	<i>Eigenvector centrality</i>	Metryka sieci o centralności wektora własnego uwzględnia nie tylko liczbę połączeń wierzchołka (tj. jego stopień), ale także centralność wierzchołków, z którymi jest połączony.	[280]
Hub taxa	<i>Hub taxa</i>	niewielka liczba taksonów, które nazywamy „węzłami” mikrobiologicznymi, jest silnie ze sobą połączonych i ma poważny wpływ na społeczności	[281]

IV. WYNIKI

IV.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

Analizie poddano 27 pacjentów z ME/CFS i 15 zdrowych ochotników z grupy kontrolnej. W grupie CFS były 22 kobiety, co stanowiło 82%, zaś w grupie kontrolnej było 10 kobiet, co stanowiło 66,6% grupy. Częstość występowania kobiet w obu grupach nie różniła się istotnie statystycznie ($p=0,24$). Porównanie międzygrupowe zmiennych demograficznych ilustruje Tabela 10. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w wyszczególnionych zmiennych.

Tabela 10. Porównanie grupy badanej i grupy kontrolnej

Zmienna (jednostka)	ME/CFS	Kontrola	p
	Średnia (Odch.std)	Średnia (Odch.std)	
Wiek (lata)	36,81 (8,5)	38 (8,5)	0,67
BMI	24,82 (4,2)	25,3 (5,53)	0,75
Masa ciała (kg)	71,34 (14,5)	73,53 (16,2)	0,66
Podstawowa przemiana materii (kJ)	6348,56 (1043,9)	6644,40 (1229,5)	0,41
Tkanka tłuszczowa (%)	28,16 (7,6)	26,48 (7,9)	0,50
Beztłuszczowa masa ciała (kg)	50,63 (8,8)	53,35 (10,0)	0,36
Tłuszcz trzewny (jednostki)	4,67 (2,7)	6,50 (6,0)	0,49
Masa tkanki kostnej (kg)	2,57 (0,4)	2,88 (1,0)	0,40

IV.2 Analiza jakościowa objawów ME/CFS na podstawie kryteriów Fukudy

Stopień nasilenia poszczególnych symptomów klinicznych w grupie pacjentów z ME/CFS przedstawiono w Tabeli 11. Najczęściej zgłaszanym symptomem był ból, najrzadziej zaś zmiany skórne i nabyte wrażliwości na jedzenie, leki i substancje chemiczne.

Tabela 11. Charakterystyka kliniczna pacjentów z ME/CFS

Symptom	Intensywność symptomu	Liczba (Procent)
Zmęczenie powysiłkowe	0	9 (40,91%)
	1	3 (13,64%)
	2	9 (40,91%)
	3	1 (4,55%)
Długi okres rekonwalescencji po wysiłku	0	17 (77,27%)
	1	2 (9,09%)
	2	2 (9,09%)
	3	1 (4,55%)
Zaburzenia snu	0	4 (18,18%)
	1	1 (4,55%)
	2	11 (50,00%)
	3	6 (27,27%)
Ból	0	1 (4,55%)
	1	5 (22,73%)
	2	14 (63,64%)
	3	2 (9,09%)
Zaburzenie pamięci	0	3 (13,64%)
	1	10 (45,45%)
	2	9 (40,91%)
	3	0 (0,00%)
Splątanie i trudności z koncentracją	0	2 (9,09%)
	1	6 (27,27%)
	2	11 (50,00%)
	3	3 (13,64%)
Trudność w przypominaniu sobie słów lub poprawnej wymowie	0	2 (9,09%)
	1	12 (54,55%)
	2	6 (27,27%)
	3	2 (9,09%)
Zaburzenia żołądkowo-jelitowe, biegunka, IBS	0	13 (59,09%)
	1	3 (13,64%)
	2	5 (22,73%)
	3	1 (4,55%)
Nawracające ból gardła	0	11 (50,00%)
	1	5 (22,73%)
	2	4 (18,18%)
	3	2 (9,09%)
Nawracające objawy grypopodobne	0	8 (36,36%)
	1	9 (40,91%)
	2	4 (18,18%)
	3	1 (4,55%)
Zawroty głowy lub osłabienie podczas pionizacji	0	9 (40,91%)
	1	6 (27,27%)
	2	6 (27,27%)
	3	1 (4,55%)

Zmiana temperatury ciała, niestabilna temperatura ciała, zimne stopy	0	5 (22,73%)
	1	4 (18,18%)
	2	9 (40,91%)
	3	4 (18,18%)
Nietolerancja ciepła i zimna	0	12 (54,55%)
	1	1 (4,55%)
	2	6 (27,27%)
	3	3 (13,64%)
Uderzenia gorąca, pocenie się	0	11 (50,00%)
	1	6 (27,27%)
	2	3 (13,64%)
	3	2 (9,09%)
Znaczna zmiana masy ciała	0	11 (50,00%)
	1	4 (18,18%)
	2	7 (31,82%)
	3	0 (0,00%)
Uczucie braku tchu podczas wysiłku	0	12 (54,55%)
	1	3 (13,64%)
	2	3 (13,64%)
	3	4 (18,18%)
Tkliwe węzły chłonne	0	15 (68,18%)
	1	4 (18,18%)
	2	2 (9,09%)
	3	1 (4,55%)
Osłabienie mięśni	0	12 (54,55%)
	1	2 (9,09%)
	2	6 (27,27%)
	3	2 (9,09%)
Nabyta nadwrażliwość na leki, pokarm, środki chemiczne	0	16 (72,73%)
	1	1 (4,55%)
	2	4 (18,18%)
	3	1 (4,55%)
Drażliwość	0	6 (27,27%)
	1	6 (27,27%)
	2	9 (40,91%)
	3	1 (4,55%)
Zmiany skórne	0	16 (72,73%)
	1	3 (13,64%)
	2	3 (13,64%)
	3	0 (0,00%)
Suchość oczu, ust i nosa	0	9 (40,91%)
	1	3 (13,64%)
	2	9 (40,91%)
	3	1 (4,55%)

W Tabeli 12. zaprezentowano nasilenie symptomów ogółem i liczbę pacjentów, którzy cechowali się danym nasileniem. Maksymalnie można było uzyskać 69 punktów, minimalnie 1 (z racji tego, że wszyscy pacjenci wg kryteriów musieli posiadać zmęczenie, stąd też symptom ten został pominięty w Tabeli 11.). Najwięcej pacjentów prezentowało łagodne nasilenie objawów (18,18% uzyskało łącznie 10pkt, 13,64% 17pkt).

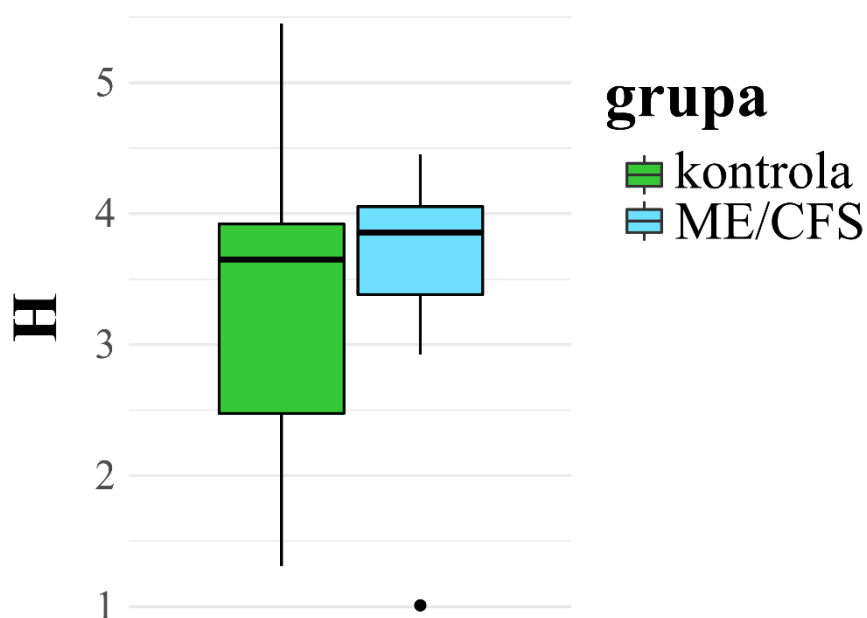
Tabela 12. Nasilenie symptomów ogółem w grupie CFS

Suma nasilenia symptomów ogółem [punkty]	Procent pacjentów [%]
10	18,18%
11	4,55%
17	13,64%
18	9,09%
22	4,55%
24	4,55%
25	4,55%
28	4,55%
30	4,55%
31	9,09%
32	4,55%
41	4,55%
42	4,55%
44	4,55%
52	4,55%

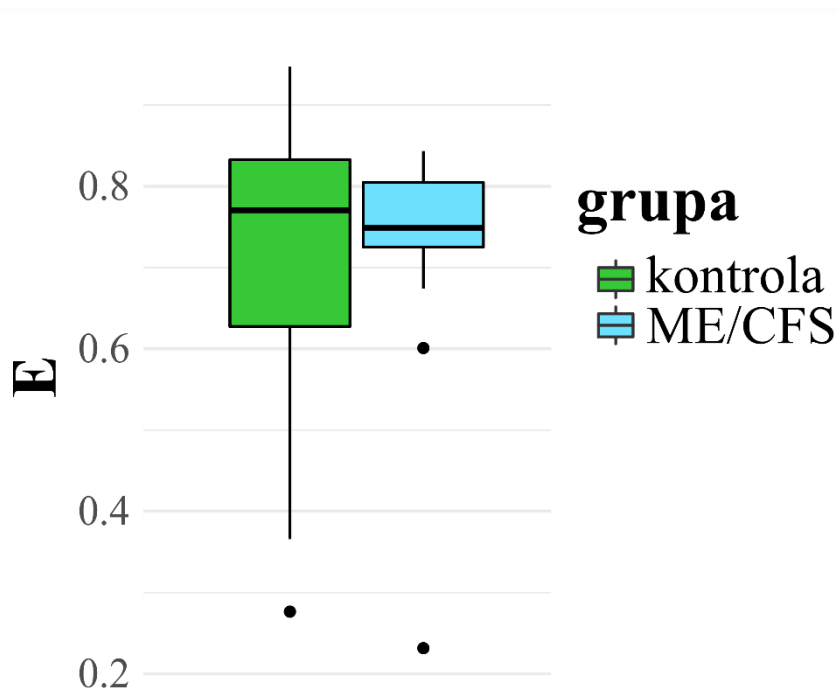
IV.3. Wyniki dotyczące składu ilościowego mikrobiomu jelit

IV.3.1. Wskaźniki różnorodności i równomierności Shannona

Porównując ilościowy skład mikrobiomu jelitowego między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie różnorodności (wskaźnik H Shannona) ($W=158$, $p=0,25$) i równomierności (wskaźnik E Shannona) ($W=232$, $p=0,45$) mikrobiomu. Wyniki przedstawiono na Rycinach 8 i 9.



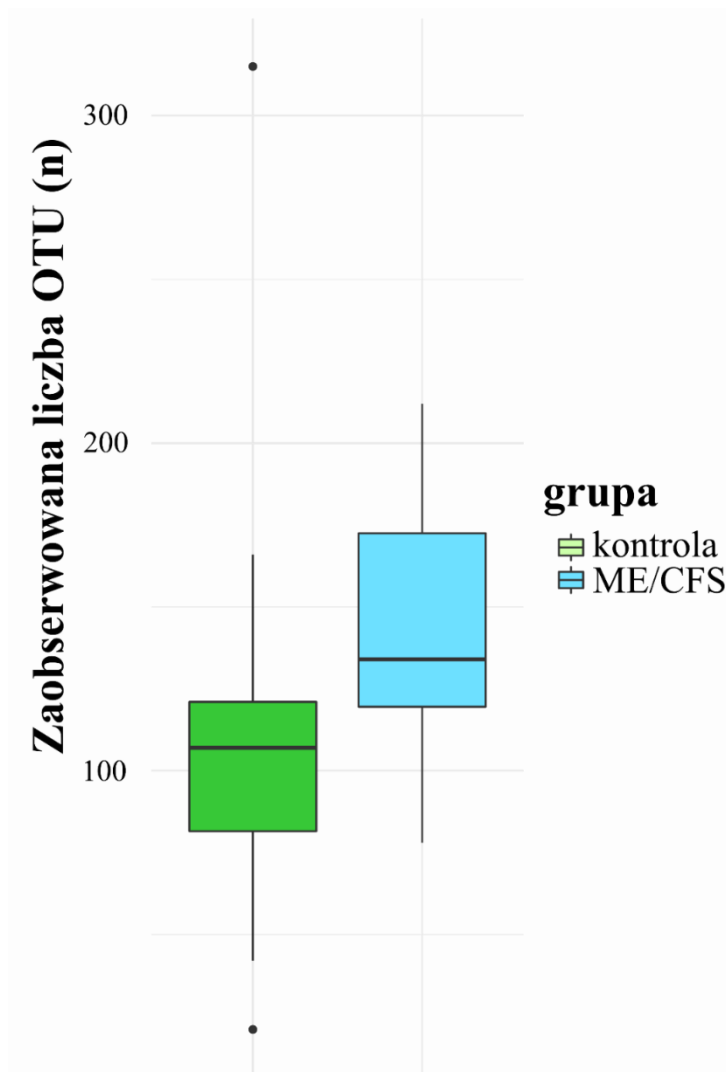
Rycina 8. Wskaźnik różnorodności Shannona.



Rycina 9. Wskaźnik równomierności Shannona.

IV.3.2. Liczba jednostek OTU

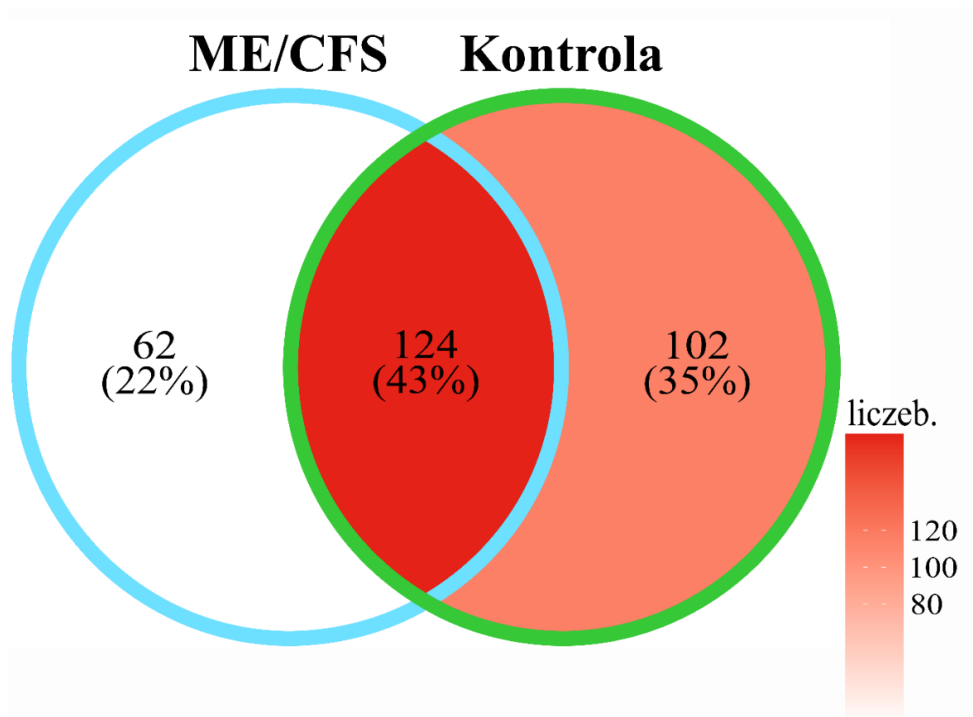
Wykazano istotną statystycznie różnicę w obfitości gatunkowej mikrobiomu jelitowego, rozumianej jako liczba operacyjnych jednostek taksonomicznych OTU, między mikrobiomem stolca u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Pacjenci z ME/CFS charakteryzowali się istotnie wyższym bogactwem gatunkowym mikrobiomu jelitowego (wyższa zaobserwowana liczebność OTU) w porównaniu do grupy kontrolnej (mediana=134, rozstęp kwartylowy=53 w grupie ME/CFS, w porównaniu do mediany=107, rozstępu kwartylowego=39,5 w grupie kontrolnej, $W=106$, $p=0,01$). Wyniki przedstawiono na Rycinie 10.



Rycina 10. Porównanie grupowe zaobserwowanej liczebności OTU

IV.3.3. Liczba wariantów sekwencji ASV

Na Rycinie 11. przedstawiono procentowo ilość wspólnych (środek wykresu) oraz ilość różnych rodzajów bakterii w mikrobiomie jelitowym w analizowanych grupach. Ilość rodzajów bakterii, która była wspólna dla obu porównywanych grup była najbardziej liczebna. Natomiast 102 rodzaje bakterii były charakterystyczne wyłącznie dla osób z grupy kontrolnej.

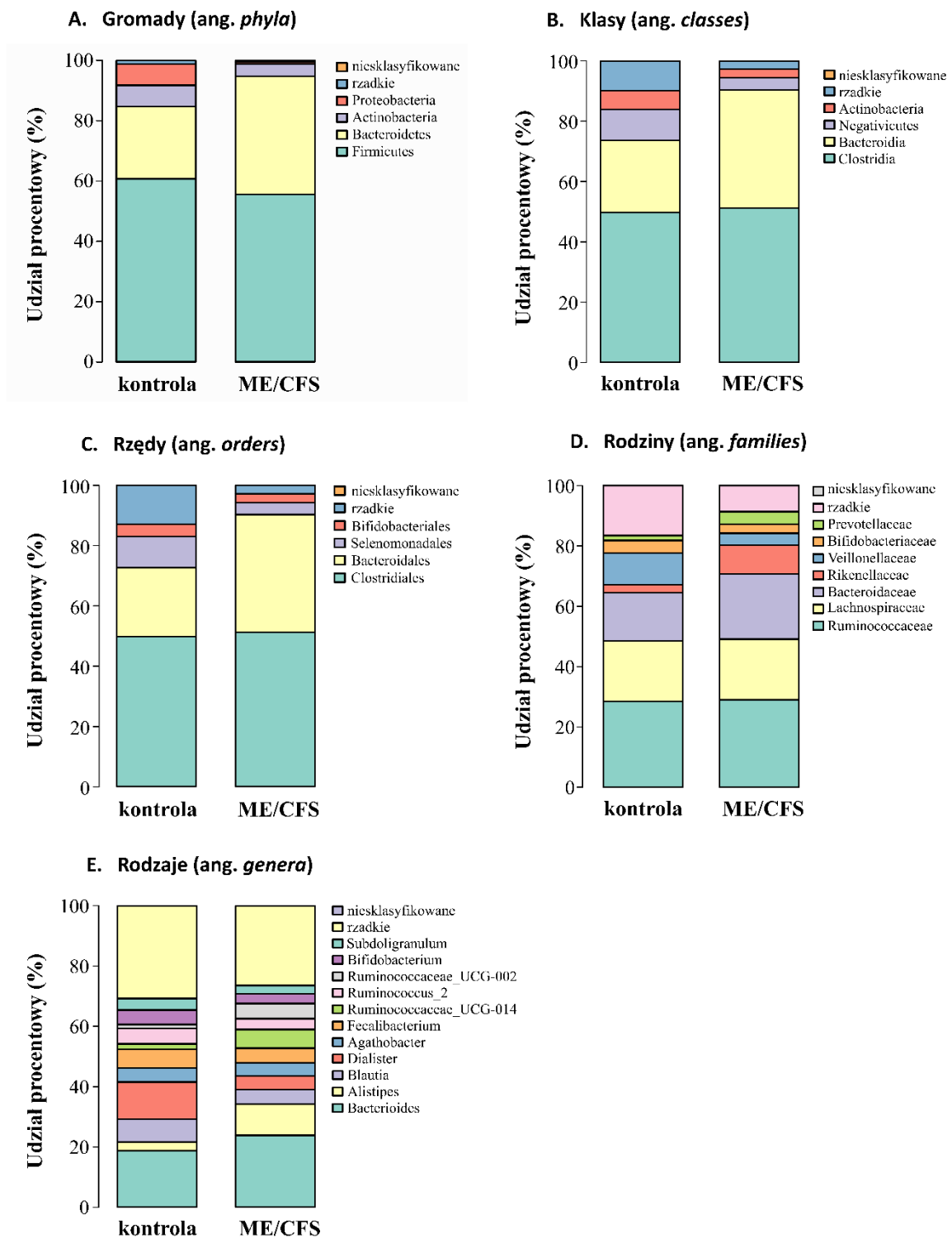


Rycina 11. Ilość wspólnych (środek wykresu) oraz ilość różnych wariantów sekwencji ASV w mikrobiomie jelitowym w analizowanych grupach.

IV.4. Wyniki dotyczące składu jakościowego mikrobiomu jelit

IV.4.1. Charakterystyka taksonomiczna mikrobiomu

Skład jakościowy mikrobiomu stolca z uwzględnieniem gromad, klas, rzędów, rodzin i rodzajów w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono na Rycinie 12. A, B, C, D, E.



Rycina 12. A, B, C, D, E. Skład jakościowy mikrobiomu stolca z uwzględnieniem typów, klas, rzędów, rodzin i rodzajów

IV.4.2. Analiza porównawcza składu jakościowego mikrobiomu stolca u pacjentów z ME/CFS i u zdrowych osób z grupy kontrolnej

Przeprowadzono analizę porównawczą na wszystkich poziomach taksonomicznych (gromady, klasy, rzędu, rodziny i rodzaju) pomiędzy mikrobiomem stolca u pacjentów z ME/CFS oraz pomiędzy mikrobiomem stolca u osób z grupy kontrolnej.

W zakresie mikrobiomu stolca na poziomie gromad, u pacjentów z ME/CFS wykazano mniejszą obfitość *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* i gromad rzadkich niż w grupie kontrolnej (Rycina 12A). Gromada *Bacteroidetes* była względnie bardziej, natomiast *Firmicutes* była względnie mniej liczna w grupie ME/CFS w porównaniu do kontroli (Rycina 12A).

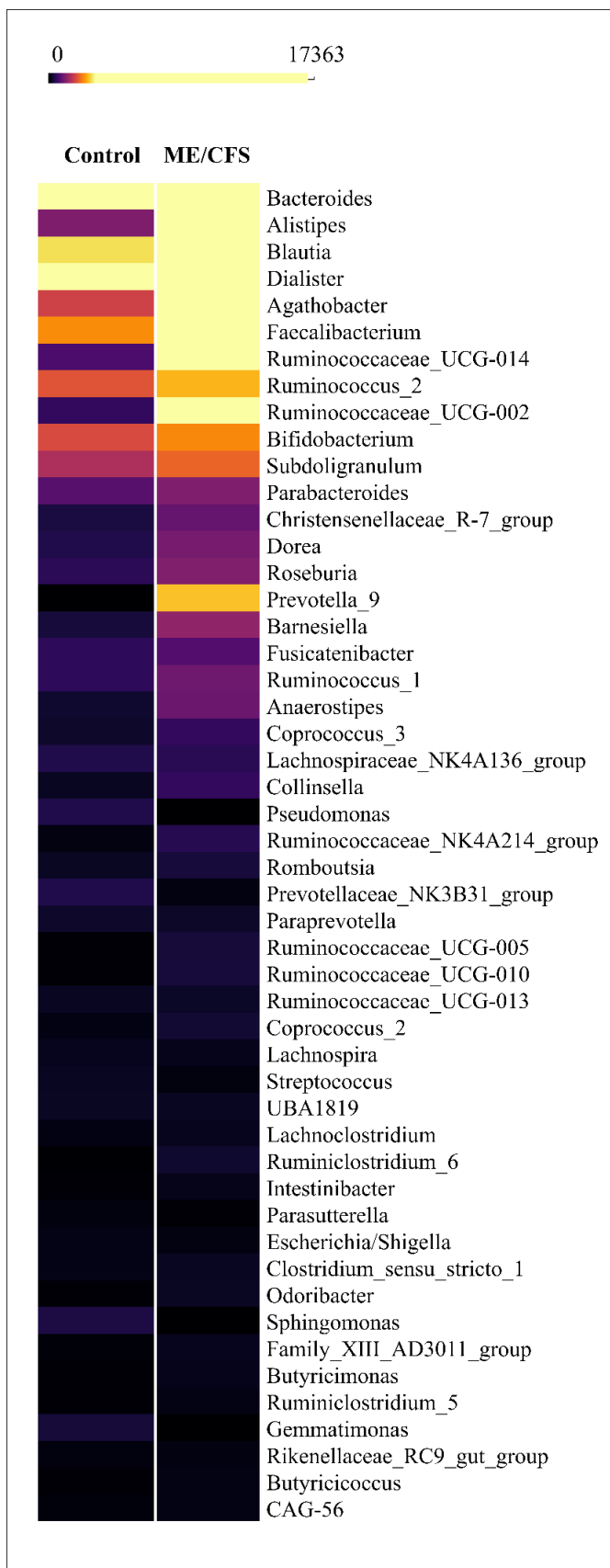
W zakresie mikrobiomu stolca na poziomie klas zaobserwowano w grupie ME/CFS większą, choć nieistotną statystycznie, obfitość *Bacteroidia*, a mniejszą *Negativicutes*, *Actinobacteria* oraz klas rzadkich, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej (Rycina 12B).

W zakresie mikrobiomu stolca na poziomie rzędów u pacjentów z grupy badanej wykazano większą obfitość *Bacteroidales*, a mniejszą *Selenomonadales* oraz rzędów rzadkich niż u osób z grupy kontrolnej (Rycina 12C).

W zakresie mikrobiomu stolca na poziomie rodzin u pacjentów z ME/CFS wykazano stosunkowo mniejszą obfitość bakterii z rodziny *Veillonellaceae* oraz bakterii z rodzin rzadkich, niż u pacjentów z grupy kontrolnej (Rycina 12D).

Następnie analizie poddano skład jakościowy mikrobiomu stolca na poziomie rodzaju. Stwierdzono proporcjonalnie większą obfitość bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Alistipes* i *Ruminococcaceae* u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Obfitość pozostałych rodzajów była stosunkowo wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu do pacjentów z ME/CFS (Rycina 12E).

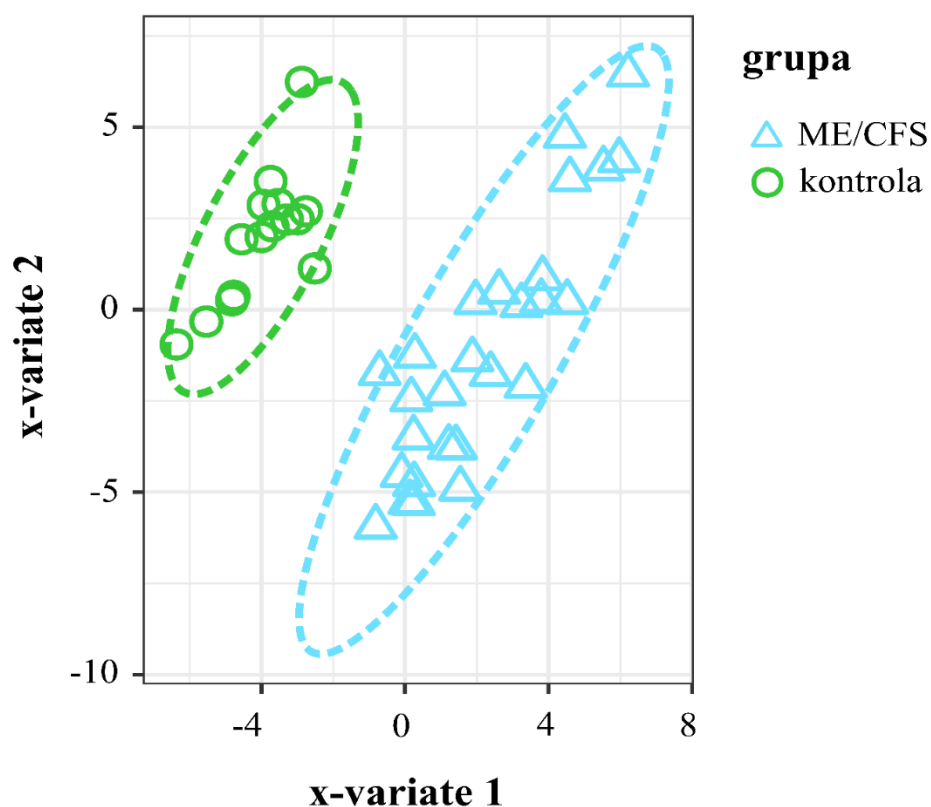
Rycina 14. wskazuje na różnice w częstotliwości występowania 50 najczęstszych rodzajów bakterii jelitowych w mikrobiomie grupy kontrolnej w porównaniu do pacjentów z ME/CFS. Można zaobserwować, że mikrobiom stolca u osób z grupy badanej charakteryzuje wyższa obfitość 10 najczęściej występujących rodzajów bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 13).



Rycina 13. Mapa ciepła, wskazująca na różnicę w częstości występowania 50 najczęstszych rodzajów bakterii w mikrobiomie jelitowym grupy kontrolnej w porównaniu do grupy badanej

IV.4.3. Porównanie obfitości wybranych wariantów sekwencji ASV wśród pacjentów z CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

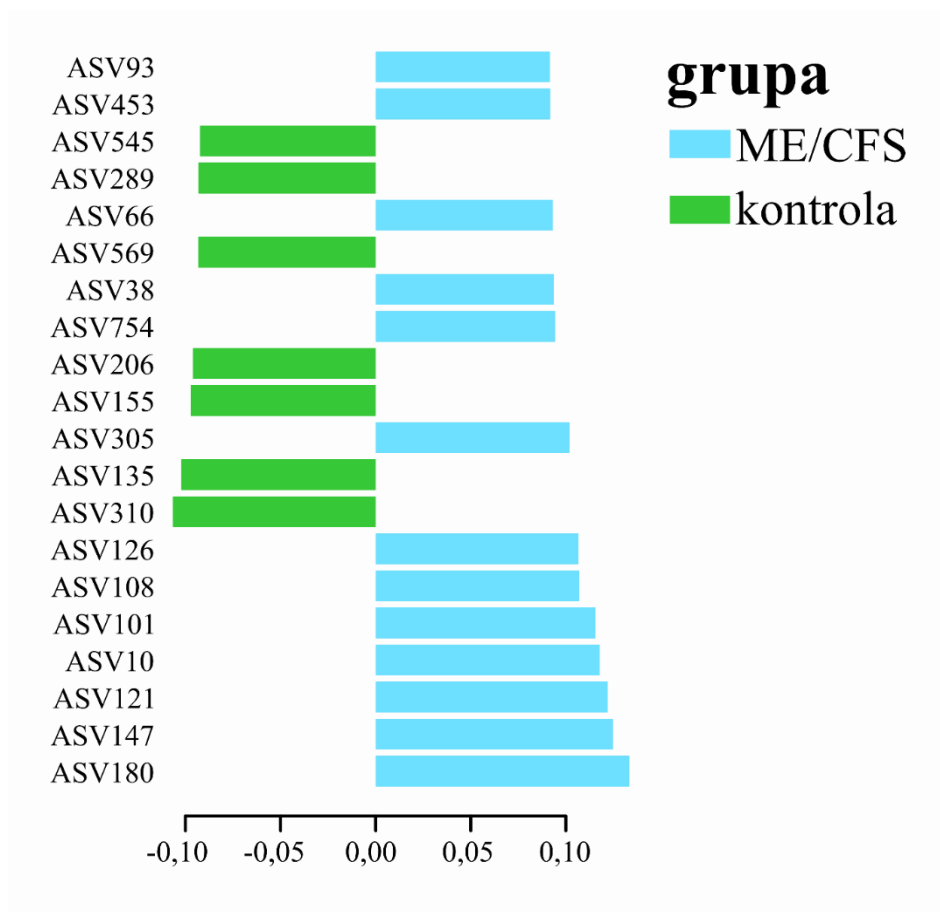
Wykonano analizę różnic w składzie mikrobiomu jelit u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, używając metody sPLS-DA, celu rozróżnienia obfitości (ang. *abundance*) ASV (ang. *amplicon sequence variants*). Zmienna X-1 wyjaśniła 5% zmienności, zaś X-2 4% zmienności. Dla każdej grupy wyznaczone elipsy (zaznaczone liniami przerywanymi) oznaczają poziom ufności ustawiony na 95%. Wykazano, że mikrobiom z grupy pacjentów z ME/CFS został skutecznie oddzielony od grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono na Rycinie 14.



Rycina 14. Porównanie grupowe obfitości ASV w mikrobiomie jelit pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, przy użyciu metody sPLS-DA.

IV.4.4. Porównanie ważności wybranych wariantów sekwencji ASV wśród pacjentów z CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

W zakresie mikrobiomu jelit na poziomie wariacji ASV różnicujących próbki u pacjentów z ME/CFS wykazano, iż najbardziej charakterystycznymi dla mikrobiomu stolca pacjentów z ME/CFS były warianty sekwencji ASV121 (*Alistipes*), ASV147 (*Odoribacter*) oraz ASV180 (*Ruminococcaceae*). Wszystkie trzy najbardziej rozróżniające warianty ASV były bardziej obfite w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Najbardziej rozróżniającymi wariantami sekwencji ASV w mikrobiomie jelit osób z grupy kontrolnej były ASV 135 (*Lachnospiraceae*), ASV155 (*Christensenellaceae*) oraz ASV310 (*Lachnospira*). Wyniki przedstawiono na Rycinie 15.



Rycina 15. Porównanie wag ładunków (ważności) poszczególnych wariantów sekwencji ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

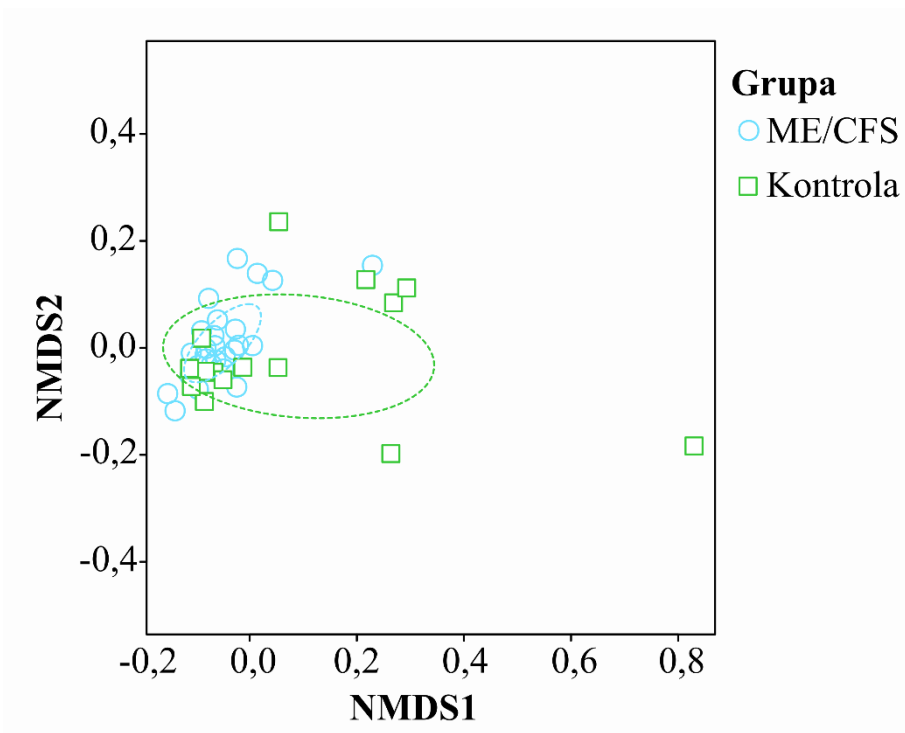
IV.5. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, ze względu na płeć i wiek.

IV.5.1. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej

Rycina 16. ukazuje wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do zdrowych kontroli. Wykres został wygenerowany przy użyciu tabeli OTU, zaznaczone punkty odpowiadają poszczególnym próbkom. Im bliżej siebie znajdują się punkty/próbki w przestrzeni ordynacji, tym bardziej podobne są ich społeczności drobnoustrojów.

Wartości odpowiadające próbkom z grupy ME/CFS zaznaczone są kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości odpowiadające próbkom z grupy kontrolnej zaznaczone są kwadratem z jasnozielonym konturem. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem. Wartość stresu dla modelu wynosi 0.11, co oznacza świetną reprezentację w zredukowanych wymiarach.

Wynik PERMANOVY wykazał istotną statystycznie różnicę pomiędzy mikrobiomem z grupy ME/CFS, a grupą kontrolną pod względem obfitości jednostek OTU ($F=1,82$, $p=0,01$).



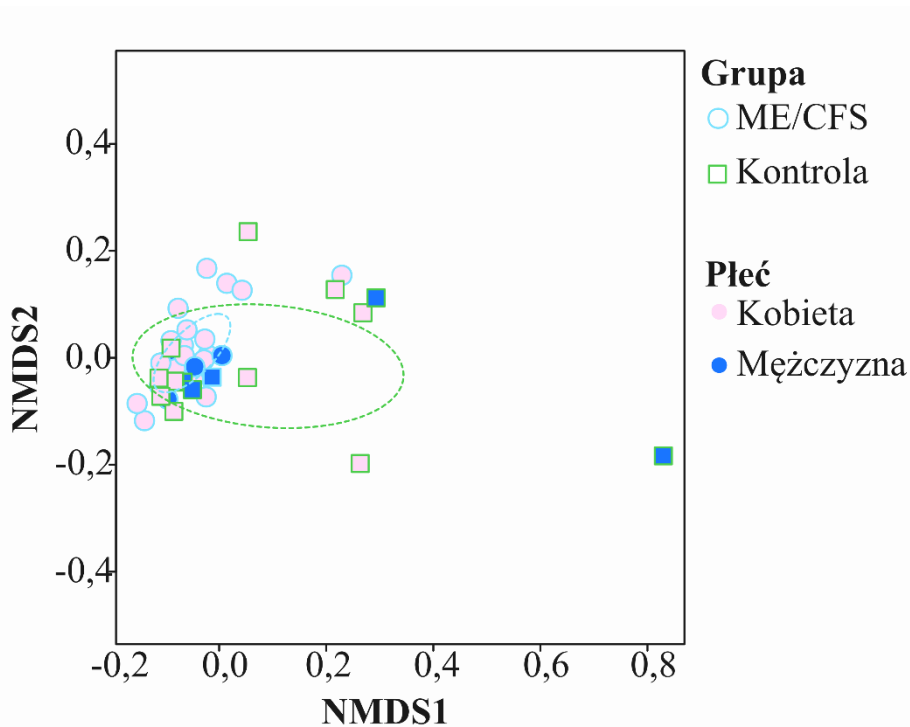
Rycina 16. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

IV.5.2. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć

Rycina 17. przedstawia wynik analizy z użyciem metody redukcji złożoności NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób zdrowych z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć.

Wartości z grupy CFS zaznaczone są kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości z grupy kontrolnej zaznaczone są kwadratem z jasnozielonym konturem. Jasnoróżowe wypełnienie jest oznaczeniem płci żeńskiej, zaś niebieskie wypełnienie jest oznaczeniem płci męskiej. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem.

Wynik PERMANOVY wykazał nieistotną statystycznie interakcję pomiędzy grupą (kontrola vs ME/CFS) a płcią (kobiety vs mężczyźni) pacjentów w zakresie mikrobiomu jelitowego pacjentów ($F=0,9$, $p=0,6$).



Rycina 17. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć.

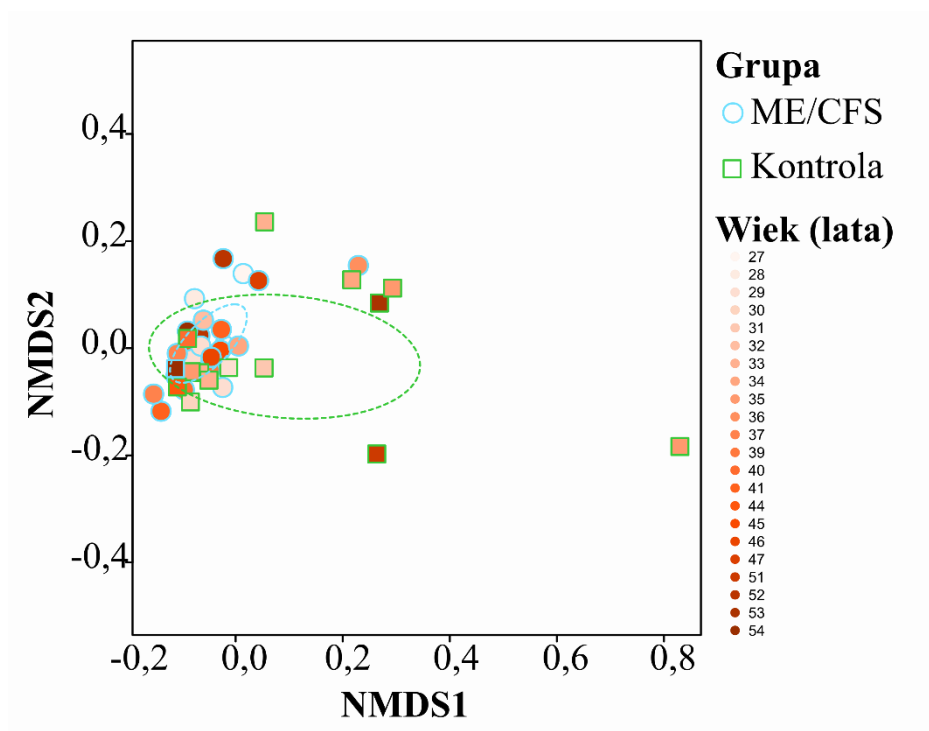
IV.5.3. Ocena różnic w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wiek

Rycina 18. przedstawia wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do osób zdrowych z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wiek.

Wartości pacjentów z grupy badanej zaznaczone są kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości osób z grupy kontrolnej zaznaczone są kwadratem z jasnozielonym konturem. Wypełnienie zaznaczeń zostało wykonane przy użyciu skali czerwonej. Nasycenie koloru wzrasta wraz z wiekiem osób z grupy badanej i kontrolnej. Elipsa oznaczająca 95% przedziału

ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem.

Wynik PERMANOVY wykazał nieistotną statystycznie interakcję pomiędzy mikrobiomem jelit pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej pod względem wieku ($F=0,88$, $p=0,66$).



Rycina 18. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontroli, z uwzględnieniem podziału na wiek.

IV.6. Porównanie skuteczności modeli uczenia się maszynowego w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Do analizy klasyfikacji pacjentów z CFS w porównaniu do grupy kontrolnej przy użyciu metod uczenia się maszynowego wzięto pod uwagę 190 ASV bez brakujących danych. Porównano wydajność losowego drzewa klasyfikacyjnego, maszyny wektorów nośnych oraz sieci neuronowej. Najwyższą wartość AUC (ang. *Area under the ROC Curve*, pole pod krzywą) uzyskał model oparty o losowe drzewo klasyfikacyjne. Natomiast, wszystkie trzy użyte modele w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, nie wykazały wartości AUC traktowanej jako „dopuszczalna” (wszystkie były niższe niż 0,7) (Tabela 13).

Tabela 13. Porównanie wydajności trzech modeli klasyfikacyjnych pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej przy użyciu metod uczenia się maszynowego

Model	AUC	CA	F1	Precision	Recall
Sieć neuronowa	0,59	0,45	0,44	0,56	0,45
Losowe drzewo klasyfikacyjne	0,67	0,74	0,71	0,74	0,74
Maszyna wektorów nośnych	0,49	0,60	0,56	0,55	0,60

IV. 6.1. Porównanie wydajności modelu losowego drzewa klasyfikacyjnego w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

W Tabeli 14. przedstawiono macierz klasyfikacji pacjentów z grupy badanej oraz osób z grupy kontrolnej dla modelu losowego drzewa klasyfikacyjnego. Na podstawie wartości wyselekcjonowanych ASV, dwóch pacjentów z grupy CFS zostało zaklasyfikowanych błędnie przez algorytm jako grupa kontrolna. Dziewięciu uczestników z grupy z grupy kontrolnej zostało zaklasyfikowanych błędnie jako CFS.

Tabela 14. Matryca klasyfikacji pacjentów z grupy badanej i z grupy kontrolnej dla losowego drzewa klasyfikacyjnego

		Przewidywane		
		CFS	kontrola	Σ
Faktyczne	CFS	25	2	27
	kontrola	9	6	15
Σ		34	8	42

IV. 6.2. Porównanie wydajności modelu maszyny wektorów nośnych w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

W Tabeli 15. przedstawiono matrycę klasyfikacji pacjentów z grupy badanej i osób z grupy kontrolnej dla modelu maszyny wektorów nośnych. Na podstawie wartości wyselekcjonowanych ASV, pięciu pacjentów z grupy CFS zostało zaklasyfikowanych błędnie przez algorytm jako grupa kontrolna. Dwunastu uczestników z grupy z grupy kontrolnej zostało zaklasyfikowanych błędnie jako CFS.

Tabela 15. Matryca klasyfikacji pacjentów z grupy badanej i z grupy kontrolnej dla maszyny wektorów nośnych

		Przewidywane		Σ
		CFS	kontrola	
Faktyczne	CFS	22	5	27
	kontrola	12	3	15
Σ		34	8	42

IV. 6.3. Porównanie wydajności modelu sieci neuronowej w klasyfikacji pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

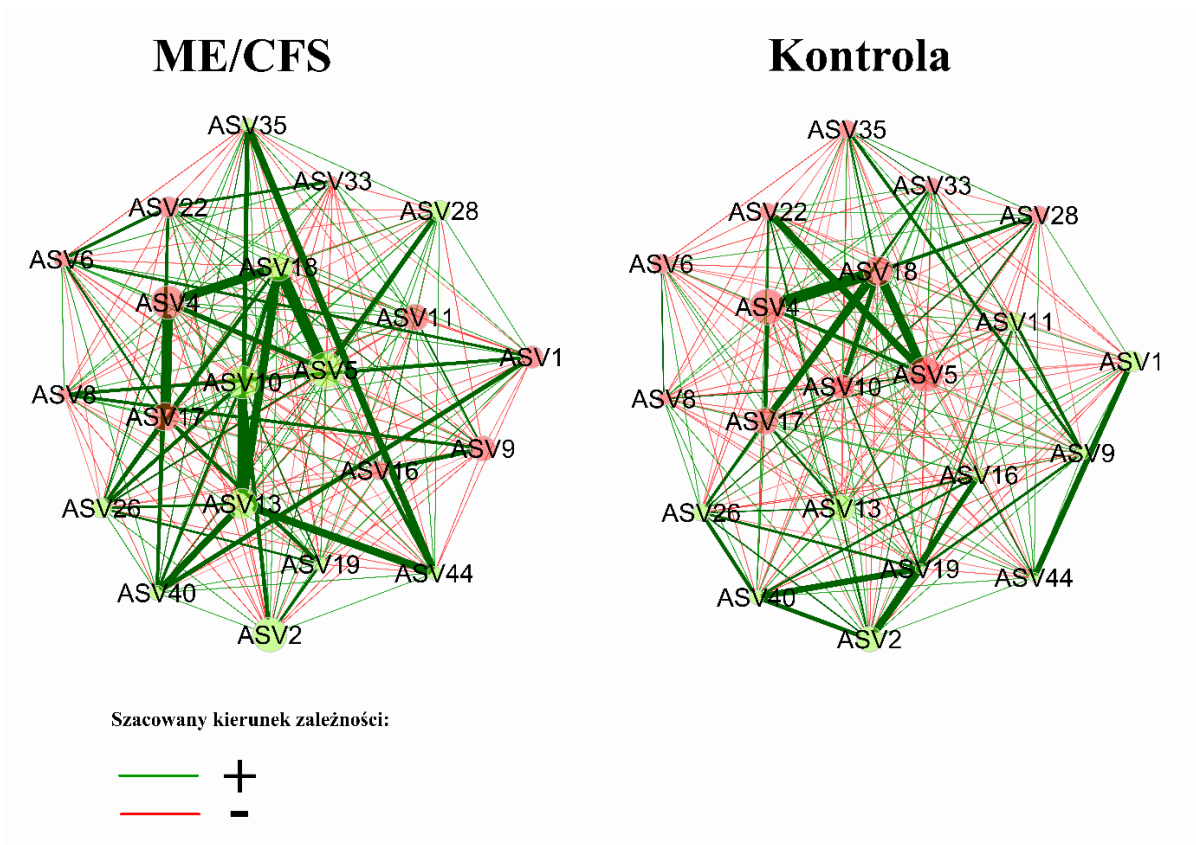
W Tabeli 16. przedstawiono matrycę klasyfikacji pacjentów z grupy ME/CFS i osób z grupy kontrolnej dla modelu sieci neuronowej. Na podstawie wartości wyselekcjonowanych ASV, dziewiętnastu pacjentów z grupy CFS zostało zaklasyfikowanych błędnie przez algorytm jako grupa kontrolna. Czterech uczestników z grupy z grupy kontrolnej zostało zaklasyfikowanych błędnie jako CFS.

Tabela 16. Matryca klasyfikacji pacjentów i grupy kontrolnej dla sieci neuronowej

		Przewidywane		Σ
		CFS	kontrola	
Faktyczne	CFS	8	19	27
	kontrola	4	11	15
	Σ	12	30	42

IV.7. Porównanie wyników analizy sieciowej dla sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

W stworzeniu Ryciny 19. wykorzystano *layout „union”* tak, aby węzły były rozmieszczone tak optymalnie, jak to możliwe, jednakowo dla obu sieci. Ponadto, pojedyncze węzły, nie połączone z innymi, zostały usunięte. Rozmiary węzłów są skalowane do sum wartości dla poszczególnych ASV. Kolory węzłów reprezentują określone klastry. Krawędzie reprezentujące pozytywne związki pomiędzy wartościami poszczególnych ASV (to znaczy gdy wartość jednego ASV wzrasta, to wartość drugiego ASV również wzrasta) są zaznaczone na zielono, negatywne (gdy wartość jednego ASV wzrasta, to drugiego maleje) są zaznaczone na czerwono. Na poniższym schemacie można zauważyć wyraźne różnice jakościowe w sieci mikrobiomu między grupami (Rycina 19). Przykładowo, ASV13 oraz ASV10 są silniej ze sobą powiązane w grupie ME/CFS niż w grupie kontrolnej, dlatego są *hubem* na wykresie po lewej, ale nie po prawej stronie. Im więcej ASV 10, tym więcej ASV 13 w grupie ME/CFS, natomiast takiej zależności nie zaobserwowano w grupie kontrolnej. Co ciekawe, w obu grupach zaobserwowano pozytywną zależność pomiędzy ASV4 i ASV 18, jak i ASV 17 i ASV 18, oraz ASV 18 i ASV 5. W żadnej grupie nie znaleziono silnych negatywnych zależności pomiędzy poszczególnymi ASV.



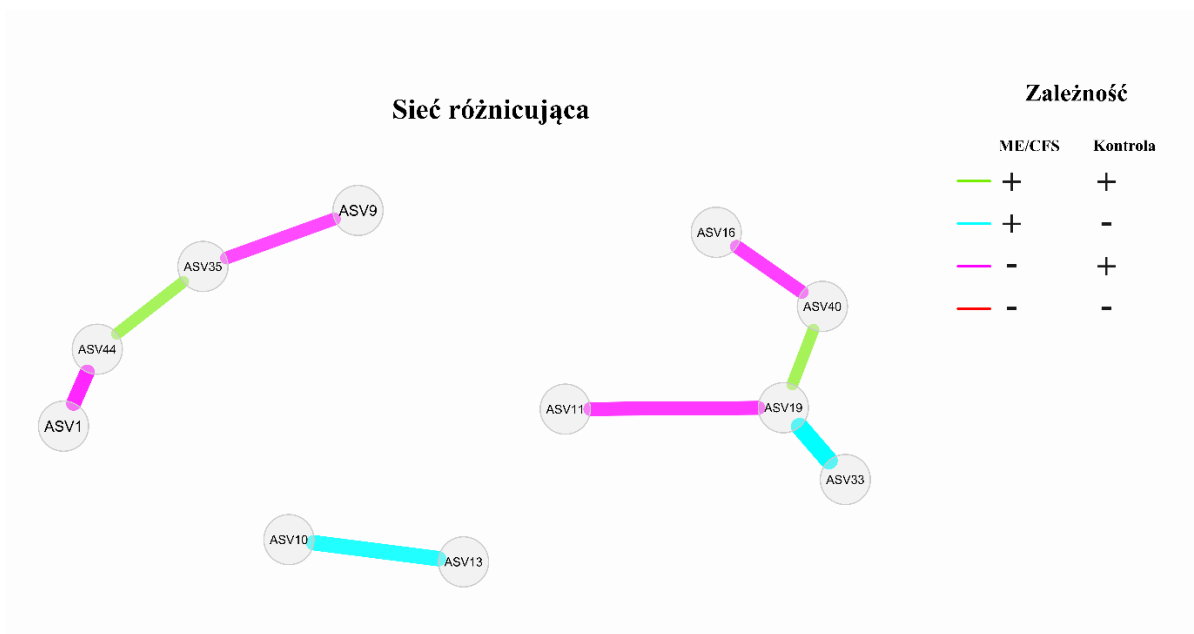
Rycina 19. Porównanie wyników analizy sieciowej dla sieci stworzonej na podstawie zależności pomiędzy poszczególnymi ASV dla pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

W Tabeli 17. przedstawiono różnice w poszczególnych parametrach sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie CFS vs w grupie kontrolnej.

Tabela 17. Porównanie globalnych właściwości sieci dla grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Nazwa zmiennej	CFS	Kontrola	Różnica
Liczba elementów	1,00	1,00	0,00
Współczynnik klastrowania	1,00	1,00	0,00
Modularność	-0,03	-0,03	0,00
Procent dodatniej krawędzi	55,71	56,19	0,48
Gęstość krawędzi	1,00	1,00	0,00
Naturalna łączność	0,23	0,24	0,00
Łączność wierzchołków	20,00	20,00	0,00
Łączność brzegowa	20,00	20,00	0,00
Średnia odmiennosc	0,69	0,69	0,00
Średnia długość ścieżki	0,69	0,69	0,00

Następnie przeanalizowano wyniki dla sieci różnicującej, która podkreśla różnice pomiędzy siecią zależności pomiędzy poszczególnymi ASV w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, co przedstawia Rycina 20. Kolory krawędzi reprezentują kierunek zależności w obu grupach. Jeśli na przykład dwie jednostki ASV są zależne dodatnio w grupie CFS i ujemnie w grupie kontrolnej (takie jak ASV10 i ASV13), odpowiednia krawędź jest zaznaczona na niebiesko. Co ciekawe, brak jest zależności pomiędzy poszczególnymi ASV, które byłyby ujemne w obu badanych grupach.



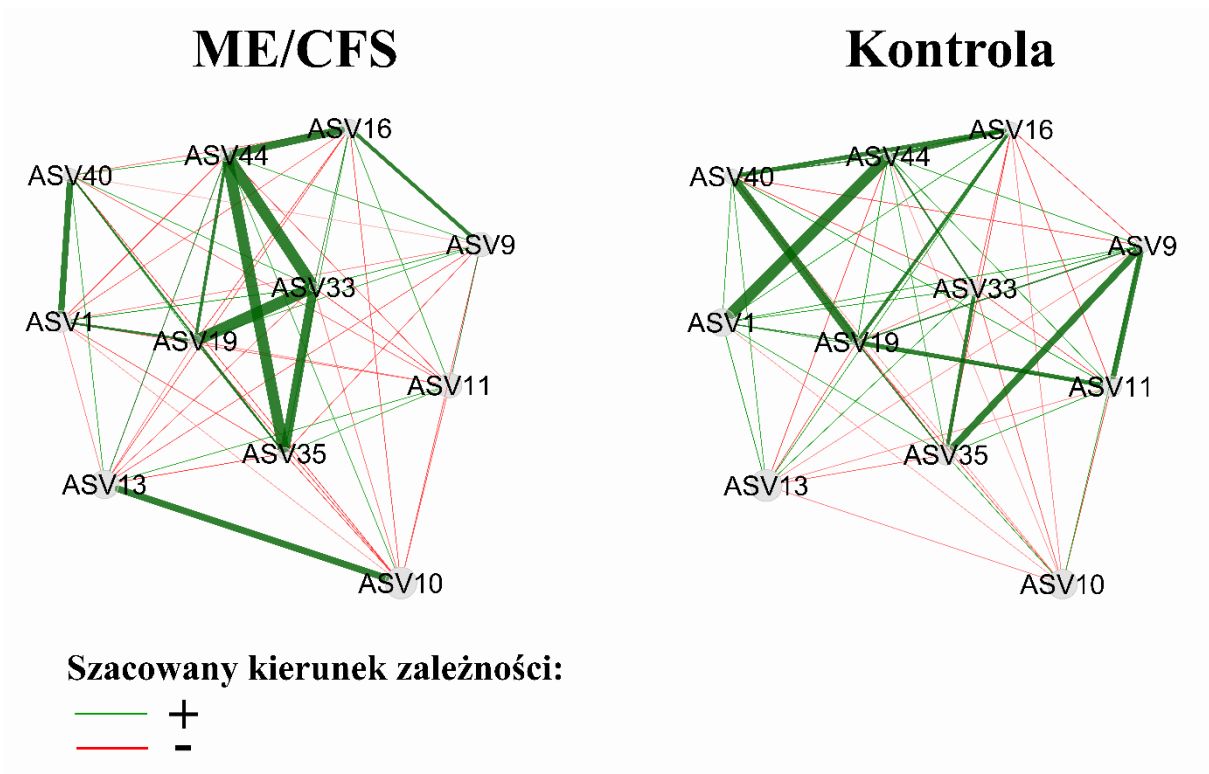
Rycina 20. Sieć różnicująca stworzonej na podstawie różnic w zależności pomiędzy poszczególnymi ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Następnie w Tabeli 18. przedstawiono różnice w poszczególnych parametrach, które określają globalne właściwości sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy sieciami stworzonej na podstawie ASV w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 18. Porównanie globalnych właściwości sieci CFS vs. grupa kontrolna

Nazwa zmiennej	Jacc	P(<=Jacc)	P(>=Jacc)
stopień	0,44	0,86	0,35
centralność pomiędzy	0,00	1,00	1,00
centralność bliskości	0,33	0,65	0,62
centralność wektora własnego	0,44	0,86	0,35
<i>hub taxa</i>	0,00	1,00	1,00

Następnie na Rycinie 21. przedstawiono odpowiednie asocjacje poprzez ukazanie sieci, które obejmują tylko różnie powiązane ASV w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina 21. Sieć ukazująca różnice w zależności pomiędzy ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Następnie w Tabeli 19. przedstawiono różnice w poszczególnych węzłach w sieci stworzonej na podstawie ASV dla pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Jak widać, najwięcej różnic zaobserwowano w przypadku ASV2, ASV33 oraz ASV19.

Tabela 19. Porównanie centralność bliskości (wartości nieznormalizowane)

Nazwa węzła	CFS	kontrola	różnica absolutna
ASV2	28,58	30,61	2,03
ASV33	27,71	29,54	1,83
ASV19	28,71	30,50	1,79
ASV1	28,70	27,05	1,65
ASV13	31,15	29,57	1,58

IV.8. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego i poziomu zmęczenia

IV.8.1. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego

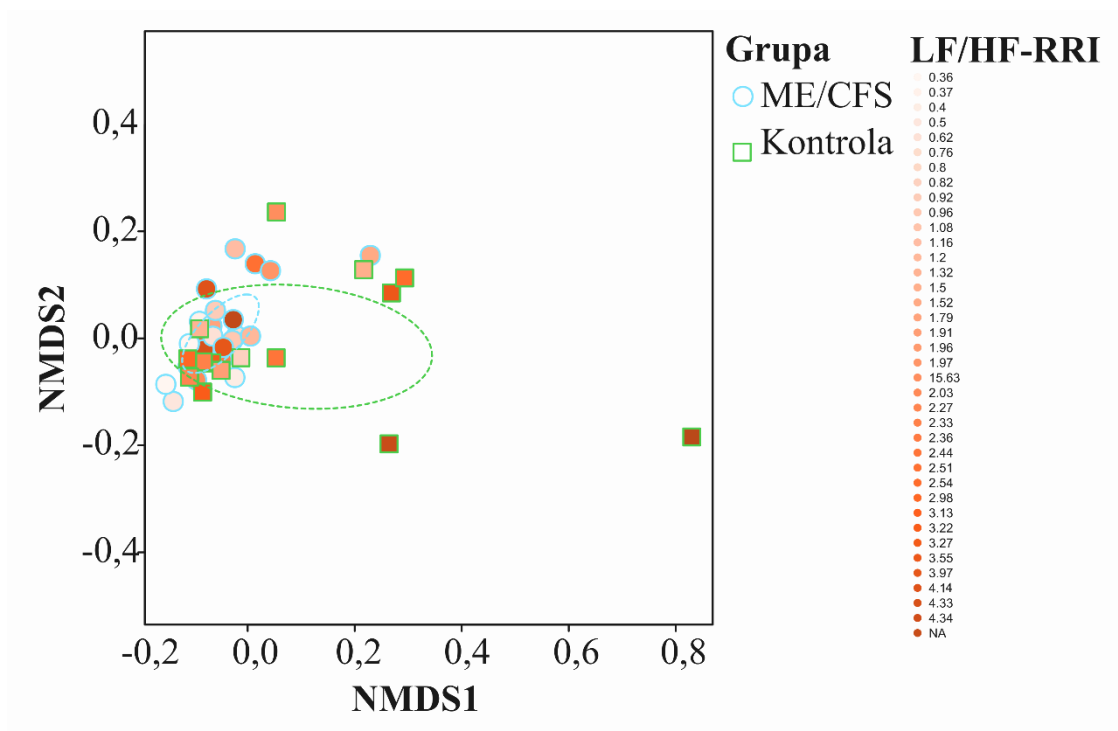
Rycina 22. ukazuje wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, z uwzględnieniem parametru LF/HF-RRI.

Wartości pacjentów z grupy ME/CFS zaznaczone są kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości z grupy kontrolnej zaznaczone są kwadratem z jasnozielonym konturem. Rosnące wartości parametru LF/HF-RRI są odzwierciedlone przez wzrost intensywności nasycenia czerwonego wypełnienia. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem.

Wynik PERMANOVY wykazał istotny efekt parametru LF/HF-RRI w różnicach w mikrobiomie stolca osób z grupy badanej i kontrolnej ($F=1,56$, $p=0,047$) (Tabela 20).

Tabela 20. Wynik PERMANOVY dla efektu grupy i LF/HF-RRI

Zmienna	F	R2	p
Grupa	2,79	0,04	0,01
LF/HF-RRI	1,56	0,93	0,047
Reszty	0,03		



Rycina 22. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału z uwagi na wartość parametru LF/HF-RRI

IV.8.2. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania poznawczego

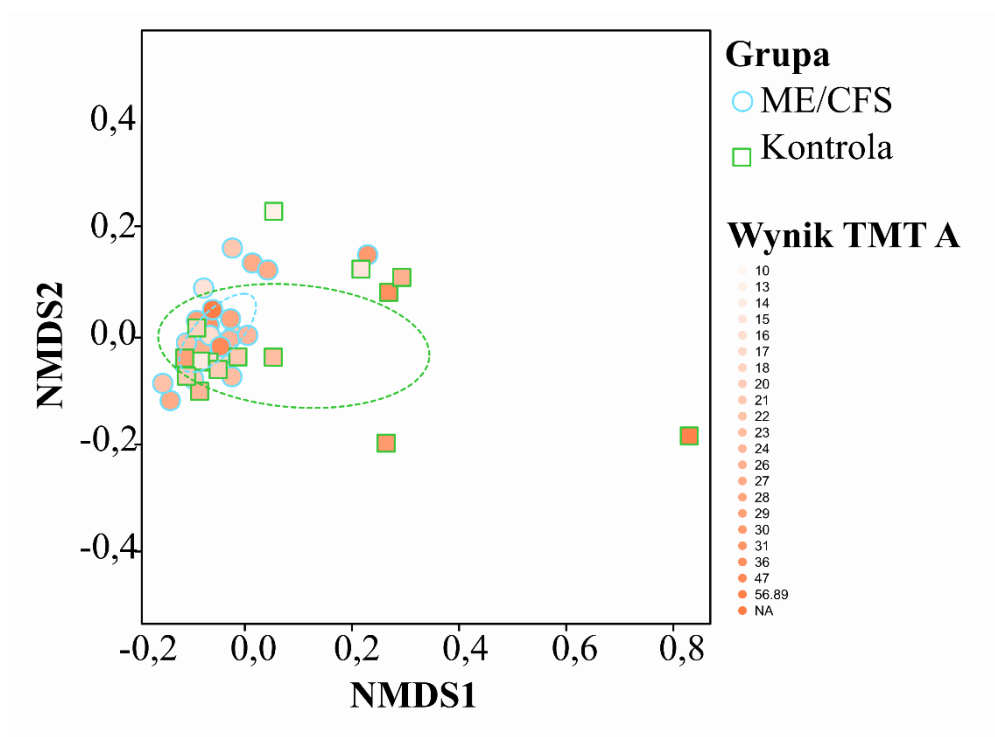
Rycina 23. przedstawia wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem wyniku, jaki pacjenci ci uzyskiwali w teście łączenia punktów A (TMT A).

Wartości z grupy ME/CFS zaznaczone zostały kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości z grupy kontrolnej - kwadratem z jasnozielonym konturem. Rosnące wartości punktacji uzyskanej przez pacjentów w teście TMT A zostały odzwierciedlone przez wzrost intensywności nasycenia czerwonego wypełnienia. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem.

Wynik PERMANOVY wykazał istotny statystycznie efekt wyniki testu TMT A w różnicach w mikrobiomie stolca badanych osób z grupy badanej i kontrolnej ($F=1,32$, $p=0,02$) (Tabela 21). Efekt dla TMT B okazał się nieistotny statystycznie ($p>0,05$).

Tabela 21. Wynik PERMANOVY dla efektu grupy i TMT A

Zmienna	F	R2	p
Grupa	2,22	0,04	0,003
TMT A	1,32	0,54	0,02
Grupa *	1,26	0,20	0,07
TMT A			
Reszty	0,22		



Rycina 23. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziały na wynik uzyskany przez pacjentów w teście TMT A.

IV.8.3. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od poziomu zmęczenia mierzonego przy użyciu skali FIS

Rycina 24. obrazuje wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem wyniku, jaki pacjenci ci uzyskali w Skali Oceny Wpływu Zmęczenia (FIS).

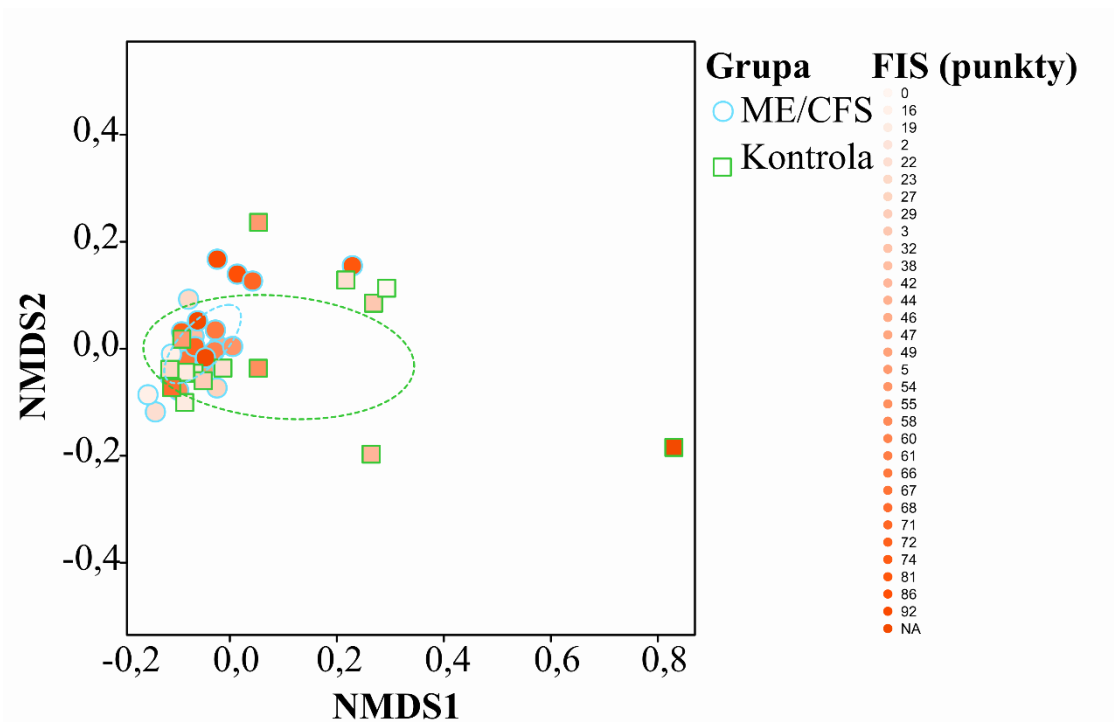
Wykres został wygenerowany przy użyciu tabeli OTU, zaznaczone punkty odpowiadają poszczególnym próbkom. Im bliżej siebie znajdują się punkty/próbki w przestrzeni ordynacji, tym bardziej podobne są ich społeczności drobnoustrojów.

Wartości pacjentów z grupy ME/CFS zaznaczone są kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości osób z grupy kontrolnej zaznaczone są kwadratem z jasnozielonym konturem. Rosnące wartości punktacji uzyskanej w skali FIS są odzwierciedlone przez wzrost intensywności nasycenia czerwonego wypełnienia. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem. Wartość stresu dla modelu wynosi 0.11, co oznacza świetną reprezentację w zredukowanych wymiarach.

Wynik PERMANOVY wykazał istotną statystycznie interakcję pomiędzy grupą (kontrola vs ME/CFS) a wynikami w skali FIS pacjentów w zakresie mikrobiomu jelitowego pacjentów ($F=1,87$, $p=0,01$) ($F=1,82$, $p=0,01$) (Tabela 22). Zmienna FIS wyjaśniła 74% wariancji składu mikrobiomu.

Tabela 22. Wynik PERMANOVY dla interakcji Grupa * FIS

Zmienna	F	R2	p
Grupa	2,17	0,04	0,01
FIS	1,19	0,74	0,13
Grupa:FIS	1,87	0,08	0,01
Reszty	0,14		



Rycina 24. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wynik uzyskany przez pacjentów w skali FIS.

IV.8.4. Porównanie mikrobiomu w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od poziomu zmęczenia mierzonego przy użyciu skali FSS

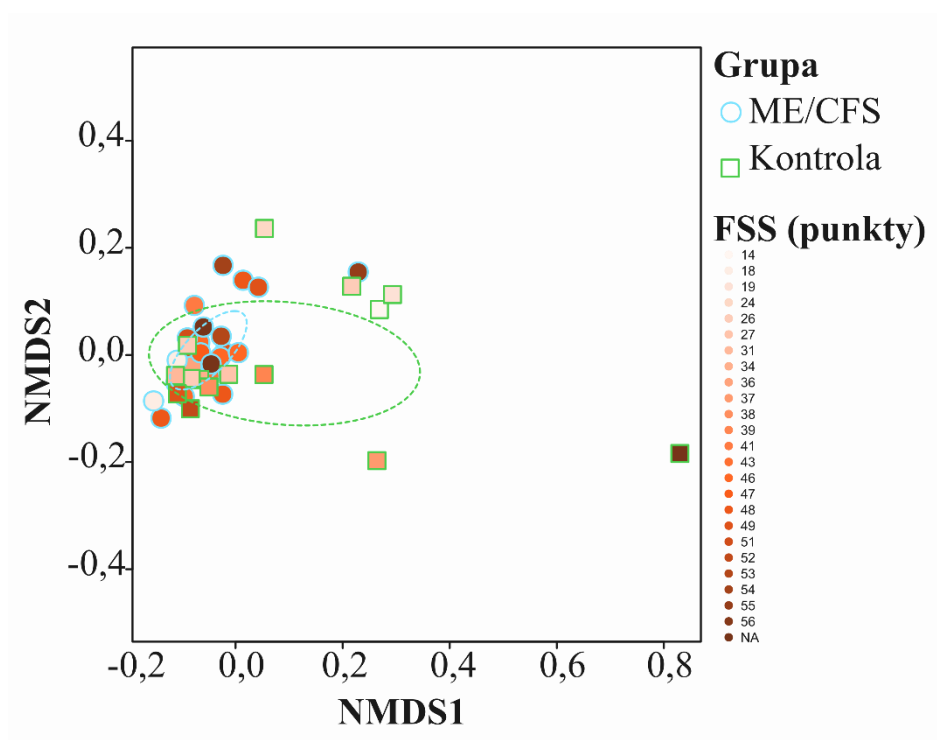
Rycina 25. przedstawia wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do kontroli z uwzględnieniem wyniku uzyskanego przez pacjentów w Skali Oceny Nasilenia Zmęczenia (FSS).

Wartości pacjentów z grupy ME/CFS zaznaczone zostały kołem z jasnoniebieskim konturem, zaś wartości osób z grupy kontrolnej zaznaczone zostały kwadratem z jasnozielonym konturem. Rosnące wartości punktacji uzyskanej w skali FSS są odzwierciedlone przez wzrost intensywności nasycenia czerwonego wypełnienia. Elipsa oznaczająca 95% przedziału ufności dla grupy CFS jest zaznaczona przerywanym, jasnoniebieskim konturem, zaś dla grupy kontrolnej jasnozielonym, przerywanym konturem.

Wynik PERMANOVY wykazał istotną statystycznie interakcję pomiędzy grupą (kontrola vs ME/CFS) a wynikami w skali FSS pacjentów w zakresie mikrobiomu jelitowego pacjentów (F=1,71, p=0,04) (Tabela 23).

Tabela 23. Wynik PERMANOVY dla interakcji Grupa * FSS

Zmienna	F	R2	p
Grupa	1,94	0,04	0,02
FSS	1,08	0,58	0,26
Grupa:FSS	1,71	0,04	0,04
Reszty	0,34		



Rycina 25. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wynik uzyskany w skali FSS.

V. DYSKUSJA

Zespół przewlekłego zmęczenia (ang. *myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome*, ME/CFS) jest przewlekłą chorobą, charakteryzującą się ciężkim, nieustępującym zmęczeniem oraz różnorodnymi objawami towarzyszącymi, które znacznie upośledzają życie społeczne, rodzinne i zawodowe pacjenta. ME/CFS występuje powszechnie w populacji, jednak szacuje się, że u nawet ok. 90% pacjentów nie zostało jak dotąd postawione prawidłowe rozpoznanie [3,18]. Pomimo dużego zainteresowania naukowców tą jednostką chorobową oraz prowadzenia licznych badań naukowych na jej temat, nadal nie wyjaśniono etiologii i patogenezы ME/CFS, co powoduje znaczne utrudnienie diagnostyki oraz leczenie pacjentów wyłącznie objawowo.

Objawy grypopodobne, występujące często na początku rozwoju ME/CFS, sugerują, że czynnikiem spustowym choroby może być czynnik zakaźny lub zapalny [3,230]. Określenie statusu immunologicznego pacjentów z ME/CFS, poszukiwanie specyficznych zaburzeń w poziomach cytokin prozapalnych czy zaburzeń funkcji limfocytów T i innych komórek odpornościowych, były przedmiotem wielu dotychczas prowadzonych badań naukowych, analizujących udział dysfunkcji układu immunologicznego w patogenezie tej choroby [50–58]. Badania te często skupiały się na poszukiwaniu specyficznego biomarkera lub cech różnicujących ME/CFS. Pozytywne próby leczenia pacjentów z ME/CFS z populacji norweskiej lekiem immunomodulującym – rituksimabem – zaliczanym do przeciwciał monoklonalnych przeciw antygenom CD20, znajdujących się na powierzchni limfocytów B, nasuwają podejrzenie, że u podłoża rozwoju zespołu przewlekłego zmęczenia może leżeć proces autoimmunologiczny [282–284].

Istnieją obecnie doniesienia naukowe, że do rozwoju ogólnoustrojowej odpowiedzi autoimmunologicznej oraz przewlekłego stanu zapalnego w organizmie człowieka mogą przyczyniać się zaburzenia homeostazy mikrobiomu przewodu pokarmowego [230]. Przypuszcza się, że wiele dobrze poznanych chorób o podłożu zapalnym lub autoimmunologicznym może mieć związek z nieprawidłowym składem mikrobioty jelitowej i upośledzoną odpowiedzią organizmu na dysbiozę jelitową [198–208]. Jest to również jedna z rozważanych hipotez dotyczących etiologii ME/CFS. Sugeruje się, że dysbioza jelitowa, na drodze specyficznych oddziaływań i produkcji zmienionych, nieprawidłowych produktów metabolizmu, może prowadzić do rozszczelnienia ścisłych połączeń komórek nabłonka jelitowego, uszkodzenia bariery jelitowej i do rozwoju tzw. zespołu nieszczelnego jelita (ang.

leaky gut syndrome). Umożliwia to migrację patogenów oraz produktów ich metabolizmu (m.in. bakteryjnego lipopolisacharydu, LPS) przez ścianę jelita, do okolicznych węzłów chłonnych i krążenia systemowego, co przyczynia się do przewlekłej aktywacji układu immunologicznego, wzrostu produkcji cytokin prozapalnych i rozwoju stanu zapalnego jelit. Wpływa to na dalsze nasilenie przepuszczalności ściany jelit, zmianę stężenia neurotransmiterów syntetyzowanych przez niektóre drobnoustroje mikrobioty jelitowej i zmianę sygnałów nerwowych przekazywanych do wewnętrznego układu nerwowego jelit (ang. *enteric nervous system*, ENS). Patofizjologiczne połączenie mikrobioty, ośrodkowego układu nerwowego, autonomicznego układu nerwowego (razem z ENS) oraz osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) doprowadziło do sformułowania modelu osi mózgowo-jelitowej (ang. *gut-brain axis*). Istnieją doniesienia naukowe wskazujące, że mikrobiota, poprzez niezdefiniowane jeszcze mechanizmy i produkty swojego metabolizmu, może oddziaływać na OUN za pośrednictwem ścieżek układu immunologicznego, nerwowego czy endokrynnego, co może m.in. prowadzić do rozwoju zaburzeń funkcji kognitywnych, zaburzeń funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego czy zaburzeń snu i powodować m.in. rozwój objawów ME/CFS [193,230,285].

Warto zwrócić uwagę, że podobne epizody translokacji bakteryjnej oraz bakteryjnego LPS przez rozszczelnione połączenia w barierze jelitowej, są w literaturze opisywane również w innych jednostkach chorobowych, np. Yu i wsp. opisali obecność LPS produkowanego przez patogenny *Campylobacter jejuni* w splotach nerwowych u pacjentów z zespołem Guillain-Barre [286], a Maes i wsp. [287] wykazali, że pacjenci, u których zdiagnozowano zaburzenia depresyjne, mieli znacząco podwyższone stężenia immunoglobulin IgM i IgA przeciwko lipopolisacharydom Gram-ujemnych enterobakterii należących do prawidłowego mikrobiomu jelitowego, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej, co sugeruje rozszczelnienie bariery jelitowej i translokację bakterii jelitowych do układu krążenia, i mogło mieć wpływ na rozwój objawów dysfunkcji układu nerwowego i patogenezę również chorób neurologicznych i psychicznych.

Istotne jest również, że sugerowany wpływ zaburzeń w składzie i funkcji mikrobiomu jelitowego na rozwój ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i upośledzenia metabolizmu gospodarza jest zbieżny z proponowanym przez Naculą i wsp. modelem przebiegu naturalnego ME/CFS [28]. Zgodnie z modelem Naculą i wsp., w odpowiedzi na czynnik inicjujący, dochodzi do powstania reakcji zapalnej, uwolnienia cytokin prozapalnych, polipeptydów, aktywacji osi

podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i zwiększenia napięcia układu współczulnego, a także aktywacji układu odpornościowego, nerwowego i endokrynnego [28]. Następnie mogą zachodzić liczne zmiany patofizjologiczne prowadzące m. in. do zwiększenia przepuszczalności śródbłonna, zwiększenia napływu komórek zapalnych, agregacji płytek krwi, zmniejszenia przepływu krwi przez kapilary, czy powstawania mikrozakrzepów. W konsekwencji tego dochodzi do niedotlenienia komórek i zwiększonego wydatkowania ATP [28]. Podobne zmiany w organizmie człowieka zachodzą np. w wyniku infekcji, urazu czy stresu, jednak w ME/CFS nie zostaje przywrócony stan homeostazy, czyli równowagi pomiędzy fizjologicznymi procesami organizmu. U osób z ME/CFS dochodzi do nieprawidłowej odpowiedzi na bodziec i rozwoju nieodwracalnych zmian w funkcjonowaniu narządów i układów, takich jak układ immunologiczny, nerwowy i mięśniowy [28].

W literaturze istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że wielokierunkowa dysregulacja metabolizmu gospodarza, następująca w odpowiedzi na dysbiozę jelitową może leżeć u podstaw patogenezy ME/CFS [209–220]. Zrozumienie dokładnego mechanizmu zaburzeń homeostazy mikrobiomu jelitowego w ME/CFS oraz jego roli w rozwoju objawów tej choroby, może w sposób istotny przyczynić się do wyjaśnienia etiologii ME/CFS, a także stać się punktem uchwytu dla opracowania markera diagnostycznego lub leczenia przyczynowego ME/CFS. Jak do tej pory przeprowadzono stosunkowo niewiele badań naukowych dotyczących dysbiozy jelitowej w ME/CFS, a dodatkowo z uwagi na różne czynniki zakłócające, wyniki uzyskane w tych badaniach często są niespójne. W związku z tym nie udowodniono jak dotąd związku dysbiozy jelitowej z rozwojem ME/CFS. Badanie własne uzupełnia luki w wiedzy w tym zakresie, dostarczając nowych danych na temat składu ilościowego i jakościowego mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS.

Istnieją różne metody analizy mikrobiomu. We wcześniejszych badaniach posługiwano się przede wszystkim metodą hodowli, natomiast w ostatnich latach wprowadzono nowe metody analizy mikrobiomu i obecnie przede wszystkim wykorzystuje się dwie z nich: reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) oraz wysokoprzepustowe sekwencjonowanie genu 16S rRNA. Dokładniejszą metodą badawczą, umożliwiającą identyfikację większej liczby gatunków drobnoustrojów, jest sekwencjonowanie 16S rRNA. W niniejszym badaniu do identyfikacji drobnoustrojów z próbek stolca, wykorzystano właśnie wysokoprzepustowe sekwencjonowanie bakteryjnego genu 16S rRNA [172].

W porównaniu z technikami hodowlanymi, metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) są skuteczniejsze w identyfikacji bakterii. Nie dostarczają one jednak informacji o funkcjach metabolicznych organizmu. Obecnie obserwujemy dalszy rozwój metod identyfikacji bakterii, a mianowicie badania metagenomiczne, opierające się na metodach spektrometrii mas [288]. Metody te umożliwiają kliniczną analizę danych dotyczących nowych gatunków bakterii, produktów ich metabolizmu i pełnionych przez nie funkcji, dlatego stanowią przyszłość rozwoju badań nad ludzkim mikrobiomem [288].

W niniejszym badaniu w analizie ilościowej mikrobiomu pacjentów z ME/CFS oraz grupy kontrolnej, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie współczynników różnorodności i równomierności mikrobiomu jelitowego w analizowanych grupach (wskaźnik H i E Shannona). Co ciekawe, w niniejszym badaniu, porównując mikrobiom stolca pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej, wykazano istotną statystycznie różnicę w zakresie liczby operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU). OTU stanowi grupę mikroorganizmów zgrupowanych na podstawie podobieństwa sekwencji DNA danego genu, zwykle 16S rRNA, który służy jako marker taksonomiczny [165]. Pacjenci z ME/CFS charakteryzowali się istotnie wyższym bogactwem gatunkowym mikrobiomu jelitowego, rozumianym jako wyższa ilość jednostek OTU.

W poprzednich badaniach naukowych, w których analizowano bogactwo gatunkowe mikrobiomu przewodu pokarmowego u pacjentów z ME/CFS i u osób zdrowych, wykazano, że pacjenci z ME/CFS charakteryzowali się zmniejszeniem różnorodności mikrobiomu jelitowego [211,212,214]. Giloteaux i wsp. [211], którzy w swoich badaniach również wykorzystali sekwencjonowanie 16S rRNA do analizy mikrobiomu jelitowego z próbek stolca u 48 pacjentów z ME/CFS i 39 osób zdrowych z grupy kontrolnej, wykazali, że grupa ME/CFS charakteryzowała się zmniejszeniem ogólnej obfitości mikrobiomu, rozumianej jako ilość jednostek OTU, zmniejszeniem różnorodności filogenetycznej, a także istotnie statystycznie niższym współczynnikiem różnorodności Shannona (wskaźnik H Shannona). W innym badaniu Giloteaux i wsp. [212], przeprowadzonym na parze monozygotycznych bliźniąt, z których jedno chorowało na ME/CFS, a drugie było zdrowe, również na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA wykazano mniejszą różnorodność mikrobiomu jelitowego. W badaniu Mandarano i wsp. [214] sekwencjonowano mikrobiom jelitowy u 49 pacjentów z ME/CFS i 39 zdrowych, wykorzystując również wysokoprzepustowe sekwencjonowanie genu 18S rRNA (sekwencje

dla eukariota). Wykazano zmniejszenie różnorodności mikroorganizmów eukariotycznych w mikrobiomie jelitowym pacjentów z ME/CFS, jednak różnice te nie były istotne statystycznie.

Zmniejszenie obfitości gatunkowej mikrobiomu jelitowego uważane było dotychczas za wyraz dysbiozy jelitowej, podczas gdy bogaty gatunkowo i różnorodny mikrobiom był uważany za zdrowy [160,216,289]. W badaniach naukowych dotyczących pacjentów z innymi chorobami przewodu pokarmowego opisywano zmniejszenie różnorodności gatunkowej mikrobiomu – m.in. w nieswoistych chorobach zapalnych jelit [290], chorobie Leśniowskiego-Crohna [291], czy zespole jelita drażliwego (IBS) [292–294], który jest chorobą często współwystępującą z ME/CFS. W badaniu Giamarellos-Bourboulis i wsp. [294] posłużyli się metodą PCR dla oznaczenia składu gatunkowego mikrobiomu dwunastnicy. Użycie innej metody sekwencjonowania mikrobiomu oraz badanie próbek z innego odcinka przewodu pokarmowego (z jelita cienkiego, a nie jak w dotychczas opisywanych badaniach z jelita grubego), mogło istotnie wpłynąć na uzyskane wyniki. Co ciekawe, w badaniu Krogsgaard i wsp. [295], opublikowanym w 2018r., gdzie mikrobiom bakteryjny oznaczano z próbek stolca z użyciem sekwencjonowania 16S rRNA, wykazano zwiększenie różnorodności mikrobiomu jelitowego (wyższy wskaźnik H Shannona) w grupie pacjentów z IBS, w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej, jednak wyniki te nie były istotne statystycznie ($p=0,59$) [295]. Istnieją również dwa inne badania naukowe, w których również wykazano wyższą różnorodność mikrobiomu jelitowego u pacjentów z IBS w porównaniu do kontroli [200,296]. W żadnym badaniu jak do tej pory, nie wykazano wyższej różnorodności mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS.

W przeglądzie systematycznym na temat definicji zdrowego mikrobiomu, opublikowanym w 2016 roku, zwrócono uwagę na problemy jakie pojawiają się współcześnie z charakteryzowaniem zdrowego mikrobiomu [297]. Bogactwo gatunkowe mikrobiomu, rozumiane w sposób jakościowy, jako idealny zestaw określonych drobnoustrojów, nie jest praktyczną definicją, z uwagi na duże różnice w składzie gatunkowym mikrobiomu pomiędzy zdrowymi osobami [297]. Natomiast duża obfitość gatunkowa mikrobiomu rozumiana w sposób ilościowy, również nie powinna być wykładnikiem zdrowego mikrobiomu, gdyż wykazano już, że nawet wspólne taksony, od poszczególnych gatunków do całych typów, różnią się liczebnością o więcej niż rząd wielkości wśród zdrowych osobników [297]. Shanahan i wsp. w publikacji z 2021r. [298] zauważają, że różne bakterie często dzielą zdolność do podobnych funkcji metabolicznych, a wielofunkcyjna redundancja jest ważną cechą

mikrobiomu jelitowego. Tak więc, pomimo skrajnej międzyosobniczej różnorodności składu i międzyosobniczej zmienności czasowej mikrobiomu jelitowego, jego funkcja metaboliczna jest znacznie mniej zróżnicowana i wysoce bardziej konserwatywna [298]. Sugeruje to, że definicja funkcjonalna (metabolomiczna i proteomiczna) zdrowego mikrobiomu może być znacznie lepsza od taksonomii w odróżnianiu podejmowania prób określenia składu ilościowego czy jakościowego zdrowego mikrobiomu [298]. Dodatkowo warto zaznaczyć, że większość komensali jelitowych wykazuje wspólne powiązania funkcjonalne na poziomie szczepu, a nie gatunku bakterii. Dla celów klinicznych znacznie bardziej istotna jest więc heterogeniczność bakterii jelitowych na poziomie szczepu, a nie gatunku [353].

Wobec powyższego, obecnie jako definicję zdrowego mikrobiomu można uznać „rdzeń funkcjonalny”, czyli taki skład mikrobiomu, który będzie pełnił określone funkcje metaboliczne i molekularne w danym środowisku oraz będzie odporny na czynniki zakłócające i będzie miał zdolność do późniejszego powrotu do zdrowego profilu funkcjonalnego [297,299]. Należy zaznaczyć, że takie funkcje zdrowego mikrobiomu mogą być zapewniane u różnych osób przez różne mikroorganizmy [289,299]. Istotne jest również dokładniejsze poznanie interakcji pomiędzy mikrobiomem, a gospodarzem, zrozumienie zaburzeń, które w obrębie nich powstają oraz przywrócenie ich prawidłowego przebiegu, poprzez precyzyjną modyfikację składu jakościowego mikrobiomu [298].

Należy również podkreślić, że na podstawie samej informacji na temat ilości jednostek OTU ogółem, nie da się wysunąć wniosków na temat ilości poszczególnych OTU, czy poszczególnych gatunków bakterii jelitowych. Większa ilość jednostek OTU w grupie badanej, może dotyczyć np. gatunków bakterii uważanych powszechnie za prozapalne. Jednocześnie należy stwierdzić, że w świetle obecnej wiedzy nie da się na podstawie różnic wykazanych w samej ilości jednostek OTU, wnioskować na temat ich funkcji i wpływu na rozwój ewentualnych objawów chorobowych. Ilość jednostek OTU jest cechą bardzo osobniczą, zależną od wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych, takich jak m.in. czynniki środowiskowe, czynniki genetyczne, dieta, aktywność fizyczna, czy przebyte antybiotykoterapie. W świetle obecnej wiedzy, nie można również powiedzieć, czy większa ilość jednostek OTU oznacza w badanej populacji cechę zdrowej czy niezdrowej mikrobioty. Zgodnie z aktualną literaturą naukową, nie jest to cecha brana obecnie pod uwagę przy określaniu danej mikrobioty jako dysbiotycznej [297].

W niniejszym badaniu zaobserwowano różnice w składzie jakościowym mikrobiomu jelitowego. Analizę porównawczą mikrobiomu stolca u pacjentów z ME/CFS i u osób z grupy kontrolnej przeprowadzono na wszystkich poziomach taksonomicznych. Na poziomie gromad, u pacjentów z ME/CFS stwierdzono mniejszą obfitość *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* i gromad rzadkich niż w grupie kontrolnej. Na poziomie klas zaobserwowano w grupie ME/CFS większą obfitość *Bacteroidia*, a mniejszą *Negativicutes*, *Actinobacteria* oraz klas rzadkich. Na poziomie rzędów u pacjentów z grupy badanej wykazano większą obfitość *Bacteroidales*, a mniejszą *Selenomonadales* oraz rzędów rzadkich. Na poziomie rodzin u pacjentów z ME/CFS wykazano stosunkowo mniejszą obfitość bakterii z rodziny *Veillonellaceae* oraz bakterii z rodzin rzadkich. Na poziomie rodzajów stwierdzono proporcjonalnie większą obfitość bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Alistipes* i *Ruminococcaceae* u pacjentów z ME/CFS, natomiast obfitość pozostałych rodzajów była stosunkowo wyższa w grupie kontrolnej.

Ciekawe informacje uzyskano w badaniu własnym dokonując porównania częstości występowania 50 najliczniejszych rodzajów bakterii mikrobiomu jelitowego pomiędzy analizowanymi grupami, badaną i kontrolną, do czego wykorzystano wykres ciepła. Wykres ten pozwolił zaobserwować, że mikrobiom stolca u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, charakteryzuje proporcjonalnie wyższa obfitość 10 rodzajów bakterii, a mianowicie: *Alistipes*, *Agathobacter*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae*, *Ruminococcus* i *Subdoligranulum*. Badania takie są ciekawe i na pewno wymagają dalszego rozszerzenia, ponieważ mogą stanowić element typowania specyficznego markera biologicznego ME/CFS.

Jak dotąd opublikowano stosunkowo niewiele badań naukowych dotyczących różnic w składzie mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Jako pierwszy badania takie wykonał Butt i wsp., używając metod tradycyjnej hodowli i wykazując różnice w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób zdrowych [300]. Następnie Sheedy i wsp., stosując metody hodowlane i analizę metabolitów, oznaczyli mikrobiom jelitowy w kohortach pacjentów z ME/CFS i osób zdrowych [220]. Oba te badania wykazały, że gatunki *Enterococcus* i *Streptococcus*, wytwarzające kwas D-mlekowy były silnie nadreprezentowane u pacjentów z ME/CFS, a wśród bakterii beztlenowych *Prevotella* była rodzajem bakterii, którego nadmiar występował u pacjentów z ME/CFS [220,300].

W badaniu Fremonta i wsp. na pacjentach z ME/CFS z Belgii i Norwegii, używając metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania 16S rRNA, wykazano różnice w składzie mikrobiomu jelitowego, w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, m.in. opisano podwyższony poziom bakterii z rodzaju *Lactonifactor* i *Alistipes*, oraz zmniejszoną obfitość bakterii z rodzaju *Firmicutes* w grupie badanej [209]. Badanie to nie wykazało istotnych różnic w poziomie różnorodności mikrobiomu jelitowego między analizowanymi grupami [209]. Zwrócono jednak również uwagę, że istnieją istotne statystycznie różnice w składzie mikrobiomu jelitowego pomiędzy osobnikami z Norwegii i osobnikami z Danii, należącymi do grupy kontrolnej [209].

Z kolei grupa badaczy pod nadzorem Nagy-Szakal [129] wykonała sekwencjonowanie mikrobiomu z próbek stolca w grupie 50 pacjentów z ME/CFS i tak samo licznej grupie kontrolnej, wykorzystując w tym celu metodę sekwencjonowania *shotgun*. W badaniu tym pacjentów podzielono na subgrupy w zależności od nakładania się objawów IBS. Wykazano, że mikrobiota jelitowa pacjentów z ME/CFS różni się istotnie od grupy kontrolnej, ale także wśród pacjentów z ME/CFS wykazano istotne różnice w składzie mikroorganizmów w zależności od współwystępowania IBS. Pacjenci, u których jednocześnie występuje ME/CFS i IBS mieli istotnie podwyższony poziom bakterii *Alistipes*, a obniżony poziom bakterii *Faecalibacterium*, natomiast pacjenci z samym ME/CFS mieli podwyższony poziom *Bacteroides* i obniżony poziom *Bacteroides vulgatus*. W badaniu tym dodatkowo wykazano, że stopień nasilenia dysbiozy jelitowej oraz zmniejszenie różnorodności mikrobiomu jelitowego korelowało pozytywnie ze stopniem nasilenia objawów ME/CFS [129]. Dodatkowo w badaniu tym wykonano liniową analizę dyskryminacyjną (LDA) i wykazano, że 37 taksonów bakteryjnych różni istotnie grupę pacjentów ME/CFS (zarówno z IBS, jak i bez IBS) od grupy kontrolnej. Na poziomie rzędów i rodzin wykazano mniejszą obfitość bakterii rzędu *Pasteurellales* oraz bakterii z rodzin *Lachnospiraceae*, niesklasyfikowanych *Bacillales* i z rodziny *Pasteurellaceae*, natomiast obfitość bakterii z rodziny *Clostridiaceae* była wyższa u pacjentów z ME/CFS. Na poziomie rodzajów obfitość bakterii *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus*, *Gemella*, *Dorea* i *Haemophilus* była niższa w grupie ME/CFS, natomiast obfitość bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Pseudoflavonifactor*, *Anaerostipes* i *Coprobacillus* była wyższa w grupie ME/CFS. Gatunkami bakterii najbardziej różnicującymi grupę ME/CFS i grupę kontrolną były: *F. prausnitzii*, *Alistipes putredinis*, *Faecalibacterium cf.*, *R. inulinivorans*, *D. longicatena*, *D. formicigenerans*, *Eubacterium ventriosum*, *Eubacterium hallii*, *Haemophilus*

parainfluenzae, *P. distasonis*, *R. obeum* i *C. catus* (wszystkie mniej liczne w grupie ME/CFS) oraz nieskasyfikowane *Bacteroides*, nieskasyfikowane *Alistipes*, *P. capillosus*, *Clostridium bolteae*, *R. gnavus*, *C. asparagiforme*, *Anaerostipes caccae*, *C. bacterium*, *C. symbiosum* i *C. scindens* (bardziej liczne w grupie ME/CFS) [129]. Bakterie *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Ruminococcus* i *Coprobacillus* istotnie różniły pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej we wszystkich przeprowadzonych w tym badaniu analizach (TDA, LDA oraz nieparametryczne testowanie) [129]. W takich samych analizach w podgrupie pacjentów z ME/CFS i IBS, w porównaniu do grupy kontrolnej, zidentyfikowano 21 taksonów bakteryjnych, szczególnie wyróżniających grupę ME/CFS+IBS. Wykazano zwiększoną obfitość bakterii z *Clostridiaceae*, bakterii *Clostridium* i rodzaju *Anaerostipes*; oraz zmniejszoną obfitość bakterii z rodziny *Lachnospiraceae*, oraz bakterii z rodzajów *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus* i *Dorea*. Gatunkami bakterii najbardziej różnicującymi grupę ME/CFS+IBS i grupę kontrolną były *F. prausnitzii*, nieskasyfikowana *Faecalibacterium*, *R. inulinivorans*, *C. comes*, *D. longicatena*, *E. hallii*, *D. formicigenerans*, *R. obeum* i *C. catus* (zmniejszona obfitość w grupie ME/CFS + IBS) oraz nieskasyfikowana *Alistipes*, *C. bolteae* i *A. caccae* (zwiększona obfitość w ME/CFS + IBS) [129]. Następnie przeprowadzono takie same analizy w podgrupie pacjentów z ME/CFS bez IBS, w porównaniu do grupy kontrolnej i zidentyfikowano 21 taksonów bakteryjnych, szczególnie wyróżniających grupę ME/CFS bez IBS. Wykazano zwiększoną obfitość bakterii *Pseudomonadales* oraz z rodzin *Clostridiaceae* i *Pseudomonadaceae*, a także bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Pseudoflavonifractor*, *Eggerthella* i *Coprobacillus* w grupie ME/CFS bez IBS, w porównaniu do kontroli. Wykazano zmniejszoną obfitość bakterii z rodzaju *Dorea* w grupie ME/CFS bez IBS, w porównaniu do kontroli. Gatunkami bakterii najbardziej różnicującymi grupę ME/CFS bez IBS i grupę kontrolną były *D. formicigenerans*, *C. catus* i *P. distasonis* (zmniejszona obfitość w grupie ME/CFS bez IBS) oraz nieskasyfikowana *Bacteroides*, *R. gnavus*, *D. longicatena*, *P. capillosus*, *E. lenta*, *C. symbiosum*, *C. scindens*, *C. bacterium* i *Clostridium cf.* (zwiększona obfitość w grupie ME/CFS bez IBS) [129]. Wysłano wniosek, że na podstawie wyników z analiz TDA, LDA i modeli predykcyjnych, bakterie z rodzajów *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Ruminococcus* i *Coprobacillus* były najmocniej związane z ME/CFS, a ich łączna względna obfitość wydawała się przewidywać diagnozę [129].

Shukla i wsp. [210] przeprowadzili badania na 10 pacjentach z ME/CFS i 10 zdrowych osobach kontrolnych, oznaczając skład mikrobiomu w próbkach kału i krwi na początku

badania oraz po wykonaniu cyklu ćwiczeń na cykloergometrze. Do sekwencjonowania użyto metody 16S rRNA [210]. Wykazano, że wyjściowo mikrobiota pacjentów z ME/CFS różniła się istotnie od osób zdrowych, w próbkach stolca pacjentów z ME/CFS odnotowano wyższe poziomy bakterii *Bacteroidetes* i niższe poziomy *Firmicutes* i *Actinobacteria* [210]. Co ciekawe, w próbkach pobieranych po wysiłku fizycznym odnotowano zwiększenie ilości 7 z 9 głównych typów bakterii u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do grupy kontrolnej gdzie wzrost odnotowano tylko w 2 z 9 głównych typów bakterii [210]. Sugeruje to, że aktywność fizyczna może być istotnym czynnikiem wpływającym na skład mikrobioty jelitowej [210].

We wspomnianym już wcześniej badaniu Giloteaux i wsp. [211] oznaczono mikrobiom jelitowy oraz parametry zapalne w surowicy krwi u 48 pacjentów z ME/CFS, porównując je z wynikami zdrowych osób z grupy kontrolnej. Użyto metody sekwencjonowania 16S rRNA. Wykazano istotnie zmniejszoną różnorodność mikrobioty jelitowej u osób z ME/CFS, a wykazane różnice dotyczyły przede wszystkim bakterii typu *Firmicutes* [211]. W analizie jakościowej na poziomie OTU stwierdzono, że czterdzieści jednostek OTU znacznie różni się między grupami. Większość z nich należała do typu *Firmicutes*, w tym przedstawiciele rodziny *Ruminococcaceae*, tacy jak *Oscillospira* spp., *Faecalibacterium prausnitzii* i *Ruminococcus* spp. i przedstawiciele *Lachnospiraceae*, tj. *Coprococcus* spp. Inne OTU obejmowały członków *Actinobacteria*, takich jak *Eggerthella lenta* i *Collinsella aerofaciens* [211]. Poza tym wykonano analizę LDA, w której wykazano większą obfitość dwudziestu czterech rodzajów bakterii w grupie ME/CFS, były to m.in. niesklasyfikowana bakteria z rodziny *Desulfohalobacteriaceae* oraz bakterie należące do typu *Firmicutes*, tj. *Oscillospira*, *Lactococcus*, *Anaerotruncus* i *Coprobacillus* oraz *Eggerthella* należąca do typu *Actinobacteria*. Osiemnaście rodzajów bakterii zostało wykazanych jako bardziej liczne w grupie kontrolnej, były to bakterie należące głównie do typu *Firmicutes* [211]. Zaobserwowano, że bakterie z rodzin *Ruminococcaeae* i *Bifidobacteriaceae*, tj. odpowiednio *Faecalibacterium* i *Bifidobacterium*, były istotnie bardziej liczne u zdrowych osobników [211].

Dodatkowo wykonano badania różnych parametrów z krwi w analizowanych grupach i wykazano znamienne podwyższone poziomy bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS), białka wiążącego lipopolisacharyd (ang. *LPS-binding protein*, LBP) oraz limfocytów CD14 u pacjentów z ME/CFS [211]. Zwiększoną przepuszczalność jelit, podwyższony poziom LPS czy przeciwciał IgA i IgM przeciwko LPS był już opisywany we wcześniejszych badaniach na pacjentach z ME/CFS [302, 308]. Podwyższony poziom LPS, LBP i przeciwciał przeciwko LPS jako markery

endotoksemii mają ograniczone zastosowanie, ponieważ LPS jest produkowany wyłącznie przez bakterie Gram-ujemne. Dlatego ciekawe jest wykazanie podwyższonego poziomu limfocytów CD14 u pacjentów z ME/CFS. Limfocyty CD14 są wytwarzane głównie przez makrofagi i hepatocyty w odpowiedzi na LPS, ale również stymulowane przez inne czynniki bakteryjne i wirusowe. Zaobserwowano, że poziom CD14 dodatnio korelował z poziomami LPS, LBP i hsCRP [211]

W badaniu tej samej grupy badaczy wykonano podobne badanie na parze monozygotycznych 34-letnich bliźniąt, z których jeden chorował na ME/CFS, a drugi stanowił zdrową grupę kontrolną, wykazując zmniejszoną ilość komensalnych bakterii *Faecalibacterium* i *Bifidobacterium* u pacjenta z ME/CFS [212].

W innym badaniu Armstrong i wsp. [217] przebadali 34 kobiety z ME/CFS oraz 25 zdrowych kobiet, jako grupę kontrolną, szukając związku pomiędzy zmianami w składzie mikrobiomu jelitowego i jej metabolitów, a metabolitami obecnymi w krwi i moczu uczestniczek badania. Mikrobiom sekwencjonowano z próbek stolca, a metabolity z próbek stolca, moczu i krwi, do analizy użyto metod hodowli oraz analizy ¹H NMR (magnetyczny rezonans jądrowy). W kohorcie pacjentek z ME/CFS zaobserwowano spadek poziomu mleczanu w kale i wzrost maślanu, izowalerianianu i walerianianu, co korelowało ze wzrostem ilości bakterii *Clostridium* spp. oraz spadkiem ilości bakterii *Bacteroides* spp., w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Jednocześnie zauważono, że różnice te pozytywnie korelowały ze wzrostem mikrobiologicznej fermentacji błonnika i aminokwasów w celu wytworzenia większej ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *short chain fatty acids*, SCFA) u pacjentek z ME/CFS [217]. Wyniki te sugerują, że SCFA w kale były związane z pojawieniem się specyficznych metabolitów w surowicy i moczu, co wskazuje, że SCFA mogą wpływać na zmiany metabolizmu gospodarza [217].

W badaniu Kitami i wsp. [215], opublikowanym w 2020 roku, pobrano próbki stolca od 48 pacjentów z ME/CFS i 52 osób z grupy kontrolnej i wykonano sekwencjonowanie 16S rRNA. Do postawienia rozpoznania ME/CFS użyto tak samo jak w niniejszym badaniu zarówno kryteriów Fukudy z 1994r., jak i kryteriów ME/ICC z 2011r. [215]. Dodatkowo wykonano u analizowanych pacjentów standardowe badania laboratoryjne, oznaczenie metabolitów w osoczu (metabolomika), immunofenotypowanie krwi oraz oznaczenie niektórych genów (transkryptomika). Wykazano znaczące różnice w składzie mikrobiomu jelitowego między analizowanymi grupami. W grupie ME/CFS stwierdzono wyższą obfitość bakterii *Coprobacillus*,

Eggerthella i *Blautia*, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zidentyfikowano 26 potencjalnych markerów molekularnych, które mogą posłużyć do szybszego i dokładniejszego zróżnicowania pacjentów z ME/CFS od osób zdrowych [215]. Jako najdokładniejsze z nich uznano ilość monocytów we krwi obwodowej, skład mikrobiomu jelitowego oraz profil lipoprotein (najbardziej różnicujący były triglicerydy oraz lipoproteiny VLDL) [215]. W badaniu tym skorelowano wykazane zmiany parametrów molekularnych z zaburzeniami snu i zaburzeniami funkcji poznawczych i wykazano, że zmiany w poziomie profilu lipoprotein oraz zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego (szczególnie niższy poziom *Faecalibacterium*) najbardziej korelują z stopniem nasilenia zaburzeń snu u pacjentów z ME/CFS, podczas gdy inne markery molekularne bardziej korelują z stopniem nasilenia zaburzeń funkcji poznawczych u pacjentów z ME/CFS [215].

W badaniu dotyczącym potencjalnej roli mikrobiomu jelitowego w ME/CFS, opublikowanym w 2021 roku przez Lupo i wsp. [1], wykonano analizę mikrobiomu oznaczonego metodą 16S rRNA z próbek stolca i śliny oraz analizę metabolomiczną z próbek stolca, u 35 pacjentów z ME/CFS i 70 osób z grupy kontrolnej (z których 35 miało krewnego z ME/CFS, a 35 nie). W mikrobiomie jelitowym u pacjentów z ME/CFS wykazano mniejszą obfitość bakterii z rodziny *Lachnospiraceae*, szczególnie bakterii *Anaerostipes*, natomiast większą obfitość bakterii *Bacteroides* i *Phascolarctobacterium*, w porównaniu do grupy kontrolnej [1]. Podobny profil zmian składu mikrobiomu jelitowego wykazano w chorobie Alzheimera [206,208]. W mikrobiomie jamy ustnej u pacjentów z ME/CFS wykazano wyższą obfitość bakterii *Rotha dentocariosa*, w porównaniu z grupą kontrolną [1]. Analiza metabolomiczna wykazała wyższy poziom kwasu glutaminowego i argininobursztynowego oraz niższy poziom alfa-tokoferolu w próbkach stolca pacjentów z grupy ME/CFS [1].

Mikrobiom jamy ustnej u pacjentów z ME/CFS w porównaniu z osobami zdrowymi analizowano również w badaniu Wang i wsp. [213], przy użyciu sekwencjonowania 16S rRNA próbek śliny. Wykazano znacząco wyższą obfitość bakterii z rodzajów *Leptotrichia*, *Prevotella* i *Fusobacterium* u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do kontroli, natomiast obfitość rodzajów *Haemophilus*, *Veillonella* i *Porphyromonas* była obniżona w grupie ME/CFS, w porównaniu do zdrowych kontroli [213]. W badaniu tym nie wykazano istotnych statystycznie różnic w różnorodności i równości mikrobiomu jamy ustnej między analizowanymi grupami [213].

Inne badania naukowe dotyczą porównania składu mikrobiomu dla organizmów eukariotycznych między pacjentami z ME/CFS i osobami zdrowymi. W tym celu wykonywano w analizowanych grupach sekwencjonowanie mikrobiomu z próbek stolca dla sekwencji genu 18S rRNA. Mandarano i wsp. [214] zbadali grupę 49 pacjentów z ME/CFS i 39 osób z grupy kontrolnej i wykazali, że pacjenci z grupy ME/CFS charakteryzowali się mniejszą różnorodnością eukariota w badanym mikrobiomie jelitowym, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Dodatkowo w grupie ME/CFS wykazano wyższy stosunek *Basidiomycota/Ascomycota* [214]. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Natomiast w innym badaniu, Ellis i wsp. [218] sekwencjonowali materiał genetyczny prokariota i eukariota w próbkach krwi obwodowej (wykorzystując sekwencjonowanie 16S i 18S rRNA) pobieranych od 30 pacjentów z ME/CFS i od 48 osób zdrowych. Wykazano, że u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia można zauważyć istotnie podwyższone poziomy bakterii z rodziny *Pseudomonadaceae*, szczególnie *Pseudomonas asplenii*, a także niektórych eukariota, np. *Funneliformis mosseae* [218]. Wykazano również, że różnice te korelowały z niższą jakością życia pacjentów z ME/CFS, co oceniano w skali SF-36 [218]. Wykorzystanie do sekwencjonowania mikroorganizmów próbek krwi obwodowej jest ciekawe i może w przyszłości stać się wygodną, szybką i łatwo dostępną metodą do oznaczania specyficznego markera biologicznego i diagnozowania ME/CFS.

Ciekawy kierunek badań został przedstawiony w najnowszej publikacji Guo i wsp. z 2023 roku [301], którzy przeprowadzili szeroką analizę metagenomiczną, obejmującą 106 pacjentów z ME/CFS oraz 91 osób z grupy kontrolnej. Wykazali oni dysbiozę jelitową u chorych na ME/CFS, rozumianą jako zaburzenia składu, funkcji i interakcji pomiędzy bakteriami jelitowymi, w wyniku czego dochodzi do zmiany endogennych metabolitów wytwarzanych przez bakterie jelitowe. W swoich badaniach do sekwencjonowania mikrobiomu jelitowego użyli oni metody *shotgun*. W zakresie alfa-różnorodności wykazano zmniejszenie różnorodności mikrobiomu, zmniejszenie współczynnika różnorodności i równomierności Shannona [301]. W zakresie beta-różnorodności wykazano natomiast, że u pacjentów z ME/CFS obfitość bakterii z rodzaju *Faecalibacterium prausnitzii* oraz *Eubacterium rectale* jest istotnie statystycznie obniżona i wiąże się ze zmniejszoną produkcją kwasu masłowego. Wykazano również negatywną korelację między zmniejszeniem obfitości *Faecalibacterium prausnitzii*, a nasileniem objawów ME/CFS [301].

Podsumowując przegląd badań naukowych, dotyczących różnic w składzie jakościowym mikrobiomu u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do osób zdrowych, warto zauważyć, że przytoczone wyniki badań naukowych są częściowo zbieżne z różnicami w składzie jakościowym mikrobiomu wykazanymi w badaniu własnym, a mianowicie do wspólnych wniosków można zaliczyć ogólny spadek obfitości bakterii typu *Firmicutes* i wzrost obfitości bakterii typu *Bacteroidetes* [1,209–211]. Wśród bakterii różnicujących grupę ME/CFS od zdrowych kontroli w badaniu własnym, podobnie jak w badaniu Nagy-Szakał [129], wymieniono m.in. bakterie z rodzajów *Alistipes* i *Ruminococcaceae*. Bakterie z rodzaju *Ruminococcaceae* zostały również uznane za różnicujące w badaniach Giloteaux i wsp. [211]. Również w niniejszym badaniu wykazano, że bakterie z tych rodzajów występują u większej ilości u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Uwagę zwraca stosunkowo mała powtarzalność wyników badań różnych naukowców, jeżeli chodzi o zidentyfikowanie jakościowych zaburzeń składu mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS. Warto zwrócić uwagę, że przytoczone badania naukowe są przeprowadzane zwykle na małych grupach pacjentów, korzystają z różnych kryteriów diagnostycznych dla postawienia rozpoznania ME/CFS, wykorzystują różne metody badawcze dla sekwencjonowania mikrobiomu jelitowego, tylko niektóre z nich analizują dodatkowe parametry, takie jak np. czynniki biochemiczne, poziomy przeciwciał czy produkty metabolizmu mikrobiomu, a także prowadzone są na populacjach pacjentów różnych ras i narodowości (głównie z krajów europejskich, azjatyckich i amerykańskich), co również istotnie może wpływać na uzyskane wyniki.

Syromyatnikov i wsp. w swojej publikacji z 2022r. [302] podkreślają, że czynniki takie jak rasa i narodowość istotnie wpływają na kompozycję mikrobioty jelitowej i istotnie modyfikują predyspozycję do rozwoju różnych chorób metabolicznych. Stwierdzono, że u Europejczyków (włączając w to narodowości słowiańskie) najbardziej charakterystyczne są *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* i *Verrucomicrobia* [302]. Natomiast u Azjatów skład mikrobioty jest zwykle bardziej zróżnicowany i bogatszy w bakterie z rodzaju *Prevotella*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, *Coprococcus*, *Collinsella*, *Megasphaera*, *Bifidobacterium* i *Phascolarctobacterium* [302]. W mikrobiomie mieszkańców Indii dominują *Bifidobacterium*, *Prevotella* i *Lactobacillus* [303], podczas gdy u Chińczyków główne dominujące rodzaje bakterii jelitowych to *Bacteroides* i *Akkermansia* [304]. Jeżeli chodzi o zmienioną predyspozycję do

rozwoju chorób, zauważono m.in. markerami rozwoju raka jelita grubego u osób rasy białej są bakterie z rodzaju *Bacteroides* i *Prevotella* oraz gatunki *Escherichia coli*, *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Clostridium difficile* [305], natomiast u rasy żółtej są to bakterie rodzaju *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Glutamicibacter*, *Paeniglutamicibacter*, *Fusobacterium* i *Parvimonas* [306].

Wydaje się, że pochodzenie czy miejsce zamieszkania mogą mieć większy wpływ na mikrobiotę, niż BMI czy płeć. Prawdopodobnie może być to wynikiem spożywania określonych pokarmów typowych dla danej strefy klimatycznej, geograficznej lub kulturowej. Należy brać pod uwagę, że większość badań naukowych dotyczących mikrobioty była prowadzona z udziałem Europejczyków lub Amerykanów [160]. Brak jest jak na razie informacji czy wnioski z tych badań mogą mieć zastosowanie w odniesieniu do ludzi z innych obszarów Ziemi [160]. Hipoteza ta wymaga dalszych badań, jednak może się okazać istotne, że typując marker biologiczny czy najbardziej rozróżniające bakterie mikrobiomu dla ME/CFS należy wziąć również pod uwagę, że mogą się one różnić pomiędzy różnymi rasami lub narodowościami pacjentów. Wszyscy pacjenci biorący udział w niniejszym badaniu należeli do rasy kaukaskiej i zamieszkiwali w Polsce.

W badaniu własnym przeprowadzono również analizę jakościową mikrobiomu jelitowego na poziomie wariantów sekwencji ASV. ASV jest jednostką grupowania gatunków na podstawie podobieństwa sekwencji DNA, z rozróżnieniem zmienności sekwencji do poziomu pojedynczego nukleotydu; ta jednostka taksonomiczna umożliwia znacznie dokładniejsze rozróżnienie grup bakterii niż OTU [167]. Wykazano, iż najbardziej charakterystycznymi dla mikrobiomu stolca pacjentów z ME/CFS były warianty ASV dla bakterii *Alistipes*, *Odoribacter* oraz *Ruminococcaceae*. Wszystkie trzy najbardziej rozróżniające warianty ASV były bardziej obfite w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Najbardziej rozróżniającymi wariantami sekwencji ASV w mikrobiomie jelitowym osób z grupy kontrolnej były ASV dla bakterii *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae* oraz *Lachnospira*. Co prawda w przytoczonych wcześniej badaniach naukowych również identyfikowano najbardziej rozróżniające dla ME/CFS rodzaje bakterii jelitowych [129,211], jednak wyznaczano je na podstawie innej metodologii, głównie analizy LDA. Nagy-Szakal i wsp. [129] w swoich badaniach wyznaczyli, jako najbardziej rozróżniające dla pacjentów z ME/CFS (niezależnie od współwystępowania IBS), bakterie z rodzajów: *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Coprobacillus*. W badaniu Kitami i wsp. również

udało się sklasyfikować grupy ME/CFS i kontrolną na podstawie mikrobiomu jelitowego i jako najbardziej różnicujące grupę ME/CFS rodzaje bakterii zidentyfikowano *Coprobacillus*, *Blautia* i *Eggerhella* [215]. W publikacji z 2023r. Guo i wsp. [301] jako najbardziej różnicujące bakterie dla ME/CFS wytypowali *Faecalibacterium praustnitzii* i *Eubacterium rectale*. Różnicowanie mikrobiomu jelitowego pacjentów z ME/CFS i pacjentów z grupy kontrolnej na podstawie wariantów sekwencji ASV nie zostało jak dotąd wykorzystane w żadnych innych badaniach naukowych. Niniejsze badanie wykorzystuje taki rodzaj analizy jakościowej mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS po raz pierwszy, co może stanowić ciekawy kierunek i zostać wykorzystane w przyszłych badaniach naukowych, podejmujących się podobnych analiz. Taki rodzaj analizy w sposób istotny może przyczynić się do znalezienia rodzaju bakterii, która najbardziej różnicuje mikrobiom pacjentów z ME/CFS i umożliwić opracowanie w przyszłości swoistego biomarkera dla tej choroby.

W badaniu własnym wytypowano trzy rodzaje bakterii jelitowych, jako najbardziej różnicujące chorych z ME/CFS od osób zdrowych, a mianowicie bakterie z rodzajów *Alistipes*, *Odoribacter* oraz *Ruminococcaceae*.

Alistipes jest to stosunkowo niedawno odkryty rodzaj bakterii jelitowych, należący do typu *Bacteroidetes*. Po raz pierwszy został wyizolowany w 2003 roku, z tkanki pobranej od pacjenta pediatrycznego z zapaleniem wyrostka robaczkowego [307]. *Alistipes* ma duże znaczenie w rozwoju dysbiozy jelitowej w różnych chorobach metabolicznych [288]. W skład rodzaju *Alistipes* wchodzi 13 gatunków bakterii jelitowych. W ostatnich latach przeprowadzono badania naukowe, w których przedstawiono przeciwstawne dowody, sugerujące, że udział bakterii *Alistipes* w dysbiozie jelitowej może mieć pozytywne lub szkodliwe konsekwencje dla organizmu gospodarza.

Z ekologicznego punktu widzenia bakterie *Alistipes* występują głównie w jelitach zdrowych ludzi, jednak zostały one wyizolowane również z surowicy krwi pacjentów z ropniami okołodbytnicznymi i ropniami mózgu, czy z zapaleniem wyrostka robaczkowego, co podkreśla ich potencjalną oportunistyczną rolę patogenną w chorobach człowieka [308]. *Alistipes* wykryto w innych płynach ustrojowych, mianowicie w moczu i płynie otrzewnowym [308]. Zwiększona obfitość bakterii z rodzaju *Alistipes* została wykazana również w niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD; występującej również pod nazwą metaboliczna stłuszczeniowa choroba wątroby, ang. *metabolic-associated fatty liver disease*, MAFLD) [307], niealkoholowym stłuszczeniowym

zapaleniu wątroby (ang. *non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) [307], włóknieniu wątroby [309], raku jelita grubego [310], chorobach układu krążenia [311], zaburzeniach nastroju, zachowania i rozwoju klinicznych objawów depresji [312], jak również w innych stanach chorobowych. Bakterie *Alistipes* w unikalny sposób mogą uczestniczyć w fermentacji i rozkładzie aminokwasów, przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego i rozwoju chorób na podłożu zapalnym, co jest spójne z faktem, że bakterie z typu *Bactroidetes* są kojarzone zwykle z rozwojem przewlekłego stanu zapalnego w organizmie gospodarza [288]. W obrębie tego rodzaju *Alistipes ihumii* został wyizolowany z kału pacjenta cierpiącego na jadłowstręt psychiczny, podczas gdy *Alistipes obesi* został wyizolowany od pacjenta cierpiącego na chorobliwą otyłość, co nasuwa podejrzenie, że różne gatunki bakterii *Alistipes* mogą odgrywać różne role w żywieniu i zdrowiu ludzi, w zależności funkcjonowania danego mikrobiomu jelitowego i rodzaju odpowiedzi organizmu gospodarza [288].

Liczne badania naukowe udowadniają ciekawy związek zwiększonej obfitości bakterii *Alistipes* z chorobami wątroby. Dowody naukowe, wskazujące na udział dysbiozy jelitowej w rozwoju NAFLD, NASH, marskości i włóknienia wątroby, a na ich podłożu raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC), są na tyle istotne, że stworzono koncepcję osi wątrobowo-jelitowej (ang. *gut-liver axis*, GLA), dla podkreślenia potencjalnej roli dysbiozy w patogenezie tych chorób. Zauważono również, że wieloszczepowe probiotyki mogą być wykorzystane w terapii przewlekłych chorób wątroby, zwłaszcza NAFLD, z uwagi na to, że poprawiają one funkcję bariery jelitowej, powodują spadek wskaźnika masy ciała, redukcję aktywności ALT i zmniejszają stłuszczenie wątroby i poprawiają wydolność wątroby [313,314]. W badaniach prowadzonych nad składem mikrobiomu i zwłóknieniem wątroby, widać, że wraz z postępem zwłóknienia obniża się obfitość bakterii *Alistipes*. Na przykład, u pacjentów z wyrównaną i zdekompensowaną marskością wątroby (ang. *liver cirrhosis*, LC), zaobserwowano spadek liczby *Alistipes indistinctus* w miarę postępu choroby z wyrównanej do zdekompensowanej [315]. Spadek liczebności populacji *Alistipes* spp. koreluje z progresją marskości wątroby do stanu zdekompensowanego [315]. Inne badanie wykazało, że porównując mikrobiom kału między pacjentami cierpiącymi na niewyrównaną marskość wątroby i ostrą encefalopatię wątrobową, rodzaj *Alistipes* pełni rolę ochronną, a spadek jego liczebności koreluje ze wzrostem nawrotów encefalopatii wątrobowej [316]. Rau i wsp. [309] wykazali, że u pacjentów z NAFLD z zaawansowanym stopniem zwłóknienia wątroby zmniejsza się stężenie octanu i propionianu w kale, bez istotnej różnicy w stężeniu maślanu. Koreluje to

z badaniem przeprowadzonym przez Polansky i wsp. (58), którzy wykazali w badaniach na mikrobiomie jelita ślepego kurcząt, że *Alistipes* jest producentem propionianu. Inni badacze wykazali również, że *Alistipes* jest producentem octanu (59). Ze względu na wcześniejsze badania sugerujące, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) wykazują działanie przeciwzapalne, można zauważyć, że zmniejszenie liczebności *Alistipes* przyczynia się do zmniejszenia produkcji SCFA, przez co może przyczyniać się do zaawansowanego zwłóknienia obserwowanego u tych pacjentów z NAFLD.

W badaniach przeprowadzonych na myszach z HCC wykazano potencjalne działanie przeciwzapalne probiotyku bakteryjnego. Po 38 dniach probiotykoterapii zaobserwowano zmniejszenie rozmiarów guza, zmniejszenie ilości limfocytów Th17 oraz wzrost liczby komórek Treg, o działaniu przeciwzapalnym. W kohorcie myszy otrzymujących probiotyk, wykazano istotny wzrost potencjału metabolicznego octanu i propionianu, istotny wzrost liczebności *Alistipes*, a także zwiększenie produkcji SCFA, co przyczyniało się do supresji komórek Th17 w jelicie, ostatecznie zmniejszając rekrutację komórek Th17 do wątroby [317,318]. Na poziomie gatunkowym wykazano, że *Alistipes shahii* był jednym z gatunków, które istotnie zwiększyły swoją obfitość w mikrobiomie badanych myszy, przez co wysunięto hipotezę, że *Alistipes shahii* odgrywa rolę w supresji nowotworu, podobną do tej, którą można obserwować w immunoterapii raka [319]. Bakterie *Alistipes* spp. można więc postrzegać jako potencjalnego producenta SCFA, o działaniu hepatoprotekcyjnym, chroniącym komórki wątroby przed postępującym zwłóknieniem, co z pewnością stanowi ciekawy kierunek dalszych badań naukowych.

Warto zauważyć, że bakterie z rodzaju *Alistipes* zostały powiązane również z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ang. cardiovascular diseases, CVD), takich jak nadciśnienie, migotanie przedsionków, niewydolność serca (HF) i miażdżyca tętnic [320]. Kim i wsp. [321] wykazali istotnie wyższą obfitość gatunków *Alistipes finegoldii* i *Alistipes indistinctus* u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Ponadto wykazano większą ilość genów bakterii *Alistipes finegoldii* u pacjentów z podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi [321]. Sugeruje się, że ten gatunek bakterii może być potencjalnym czynnikiem spustowym rozwoju dysfunkcji bariery jelitowej i stanu zapalnego u pacjentów z podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi, poprzez produkcję prozapalnego LPS, prowadzącego do wzrostu liczby komórek Th17 oraz zmniejszenia obfitości bakterii wytwarzających przeciwzapalny maślan [321].

Inne badania wykazały, że *Alistipes* może odgrywać również rolę ochronną w chorobach układu krążenia. W badaniu przeprowadzonym przez Zuo i wsp. [311], mającym na celu określenia związku między mikrobiomem jelitowym, a migotaniem przedsionków (ang. *atrial fibrillation*, AF), wykazano istotny spadek obfitości *Alistipes* spp. w przewodzie pokarmowym pacjentów z AF. Jednocześnie zaobserwowano istotny wzrost obfitości bakterii *Streptococcus*, co sugeruje potencjalny efekt antagonistyczny między rodzajami *Alistipes* i *Streptococcus*. Dowody na zaangażowanie bakterii *Alistipes* w rozwój CVD są sprzeczne. Ponieważ większość CVD ma wspólne cechy patofizjologiczne, takie jak dysfunkcja śródbłonna [311], możliwe jest, że rola *Alistipes* może zależeć od mechanizmów chorobowych wspólnych dla kilku chorób układu krążenia. Dla tego rodzaju związku między dysbiozą a chorobami serca, wysunięto hipotezę osi jelitowo-sercowej (ang. *gut-heart axis*, GHA) [311]

Ciekawe są również obserwacje dotyczące związku bakterii *Alistipes* z chorobami psychicznymi, takimi jak zaburzenia lękowe, depresja, autyzm, a także chroniczne zmęczenie. W badaniu przeprowadzonym na myszach umieszczonych w stresującym środowisku, wywołanym chowem z podłogą siatkową, zaobserwowano znaczny wzrost liczebności *Alistipes* [312]. Istnieją również dowody naukowe na wzrost *Alistipes* u pacjentów cierpiących na depresję [322]. Uważa się, że *Alistipes* jest organizmem indolo-dodatnim, a tym samym może zmniejszać dostępność serotoniny, co może być związane z rozwojem objawów depresji [322]. Strati i wsp. [323] zaobserwowali u pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu istotny spadek obfitości bakterii *Alistipes* w mikrobiomie jelitowym. Jednak inne badanie naukowe, przeprowadzone na pacjentach z inną formą zaburzeń ze spektrum autyzmu, wykazało zwiększenie obfitości *Alistipes* w mikrobiomie jelitowym [324]. Co ciekawe, wspomniane już wcześniej badanie Fremonta i wsp. na populacji pacjentów norweskich wykazało istotnie większą obfitość bakterii *Alistipes* u pacjentów cierpiących na zespół przewlekłego zmęczenia, w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej [209]. Istnieje potrzeba dalszych badań nad bakteriami *Alistipes* i ich wpływem na oś mózgowo-jelitową, ponieważ istnieją sprzeczne dowody dotyczące ich ochronnej lub patogennej roli w tych chorobach.

Ze względu na dużą różnorodność gatunkową drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym, istnieje silna korelacja między dysbiozą, a przewlekłymi, autoimmunologicznymi chorobami zapalnymi jelit (ang. *inflammatory bowel diseases*, IBD). Najczęstszymi IBD są choroba Leśniowskiego-Crohna (ang. *Crohn's disease*, CD) i wrzodziejące

zapalenie jelita grubego (ang. *ulcerative colitis*, UC). W badaniach na myszach z zapaleniem okrężnicy wykazano, że *Alistipes finegoldii* może być bakterią częściowo łagodzącą objawy zapalne [325]. Wymaga to jednak obserwacji i potwierdzenia w dalszych badaniach naukowych. Podsumowując przytoczone dowody naukowe można zauważyć, że bakterie z rodzaju *Alistipes* mogą wpływać na wiele szlaków metabolicznych w organizmie gospodarza, a ich dalsza rola w patogenezie różnych chorób wymaga dokładnego wyjaśnienia.

Bakterie z rodzaju *Odoribacter*, należące do typu *Bacteroidetes*, zostały pierwotnie wyizolowane z próbki ludzkiego kału i ropnia brzucha w 1975r. i pierwotnie sklasyfikowane jako rodzaj *Bacteroides* [326]. Dopiero w badaniach z 2008r. utworzono odrębny rodzaj *Odoribacter*, tworzący własne skupisko w ramach rzędu *Bacteroidales* i rodziny *Odoribacteraceae* [327]. Gatunek *Odoribacter splanchnicus* jest przedstawicielem mikrobiomu jelitowego człowieka, wytwarzającym krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) [327]. Zmniejszona liczebność *Odoribacter* obserwowana jest w chorobach takich, jak niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD), mukowiscydoza (ang. *cystic fibrosis*, CF), czy nieswoiste choroby zapalne jelit (IBD) [327]. Morgan i wsp. w badaniach dotyczących pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz z pancolitis, czyli jedną z postaci wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, wykazali zmniejszoną liczebność *Odoribacter* w mikrobiomie jelitowym [328]. Wykazano również zmniejszoną względną ilość *Odoribacter* u pacjentów pediatrycznych z chorobą Leśniowskiego-Crohna [329]. Co ciekawe, względna liczebność *Odoribacter* i innych bakterii jelitowych wytwarzających SCFA były podwyższone i utrzymywały się po leczeniu biologicznym przeciwciałem monoklonalnym działającym przeciw czynnikowi martwicy nowotworu alfa (TNF-alfa) u dzieci z CD, w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, co sugeruje, że trwała odpowiedź na terapię była związana z obfitością bakterii jelitowych produkujących SCFA o potencjale przeciwzapalnym [329]. Inni badacze zauważyli, że pacjenci z zespołem jelita drażliwego z postacią biegunkową (IBS-D) z wyższą względną liczebnością *Odoribacter* i *Faecalibacterium* lepiej odpowiadali na wielogatunkowe leczenie skojarzone probiotykami, uzyskując zmniejszenie objawów i korzystne obniżenie markerów stanu zapalnego [330].

Rola bakterii *Odoribacter* w zaburzeniach metabolicznych nadal wymaga dokładnego wyjaśnienia w dalszych badaniach naukowych, istnieją jednak przykłady ich pozytywnego oddziaływania w przewodzie pokarmowym. Bakterie *Odoribacter* wydają się działać synergistycznie z rodzajem *Akkermansia* w takich chorobach metabolicznych, jak otyłość,

zespół metaboliczny, czy cukrzyca [331–333]. Wykazano, że te dwa rodzaje bakterii pozytywnie korelowały ze zdrowym profilem metabolizmu lipidów u otyłych kobiet [331]. Na modelu zwierzęcym, w badaniach na myszach z otyłością, wykazano, że wyższe poziomy *Akkermansia* i *Odoribacter* poprawiają profil metaboliczny pacjentów i uwrażliwiają tkanki na działanie insuliny [332]. Dodatkowo wykazano, że *Odoribacter splanchnicus* może wytwarzać określone sfingolipidy bakteryjne, tj. sulfonolipidy (SL), które potencjalnie pełnią funkcję bioaktywną w jelicie [334]. Należące do sfingolipidów, sulfonolipidy (SL), mogą regulować różne procesy komórkowe gospodarza, takie jak proliferacja komórek, apoptoza, różnicowanie i stan zapalny [335]. Walker i wsp. [334] w badaniu dotyczącym występowania bakteryjnych sulfonolipidów w mysim jelicie ślepym, wykorzystując do tego badania metody spektroskopii masowej, ujawnili, że za produkcję SL odpowiedzialne były dwa rodzaje bakterii jelitowych, a mianowicie *Alistipes* i *Odoribacter*. Jednocześnie potwierdzono, że myszy *germ-free* były wolne od SL, co prowadzi do wniosku, że bakterie jelitowe są kluczowe dla produkowania sulfonolipidów *in vivo* [334].

Głównym czynnikiem wpływającym na skład mikrobiomu jelitowego jest dieta, zwłaszcza dieta wysokotłuszczowa (ang. high-fat diet, HFD), która prowadzi istotnie częściej do wzrostu masy ciała i otyłości, czemu towarzyszy zmiana składu mikrobioty jelitowej. Walker i wsp. przeprowadzili badania czy zmiany w diecie powodują zmiany względnej obfitości SL w jelicie ślepym u myszy [334]. W tym celu wyodrębnili oni trzy grupy myszy. Dwie z nich karmione były dietami wysokotłuszczowymi, w których składzie nie stwierdzono oznaczanych sulfonolipidów, natomiast trzecia grupa (kontrolna) karmiona była standardową dietą. W grupach myszy karmionych HFD zaobserwowano istotne zwiększenie masy w porównaniu z grupą kontrolną [334]. Zaobserwowano, że prawie wszystkie SL były zwiększone u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową [334]. Zatem rodzaj diety zmienia wzorce SL produkowanych przez bakterie jelitowe [334].

Badania nad interakcjami bakterii *Odoribacter* z żywicielem nie są liczne, jednak wydaje się, że bakterie te są komensalami, z wieloma korzystnymi interakcjami z żywicielem.

Warto również zwrócić uwagę na inne doniesienia naukowe dotyczące rodzaju *Odoribacter*. *Odoribacter splanchnicus* zaliczany jest do bakterii siarkowodorkowych, zdolnych do metabolizowania organicznych substratów siarki, takich jak dietetyczne aminokwasy siarkowe i kwasy żółciowe sprzężone z tauryną [326]. Produktem takich reakcji jest siarkowodór, o działaniu prozapalnym i genotoksycznym, przez co zwiększona liczebność bakterii z rodzaju

Odoribacter została powiązana ze zwiększoną zapadalnością na raka jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) [326].

Park i wsp. [336] przeprowadzili analizę składu mikrobiomu stolca u pacjentów z CRC i wykazali, że mikrobiom jelitowy w tej grupie pacjentów jest istotnie zmieniony. Zaobserwowano zwiększenie obfitości *Bacteroidetes*, zmniejszenie obfitości *Firmicutes*, a także względne zubożenie obfitości *Prevotellaceae* i *Ruminococcaceae* [336]. Co ciekawe, obfitość bakterii z rodzajów *Odoribacter* i *Alistipes* była istotnie zwiększona u pacjentów z CRC. Stwierdzono, że rodzaje *Odoribacter* i *Alistipes* były znacząco bardziej obfite nie tylko u pacjentów z późnym CRC, w porównaniu z pacjentami z wczesnym CRC, ale także u pacjentów z CRC w porównaniu z osobami kontrolnymi. Prowadzi to do wniosku, że bakterie *Odoribacter* i *Alistipes* mogą stać się nowymi biomarkerami do diagnozowania CRC i przewidywania stadiów CRC. W podobnych badaniach, Chin-Wen i wsp. jako markery mikrobiologiczne dla CRC wyznaczyli *Bacteroides fragilis* i *Odoribacter splanchnicus* [337]. Byeong i wsp. [338] wykazali zwiększoną obfitość *Odoribacter splanchnicus* w kale pacjentów z CRC w porównaniu do osób zdrowych. Badacze Ci zwrócili uwagę przede wszystkim na funkcję *Odoribacter*, który poprzez produkty swojego metabolizmu, indukował aktywność antyproliferacyjną poprzez apoptozę, ale nie zatrzymywał cyklu komórkowego komórek nowotworowych [338]. Odkrycia te mogą przyczynić się do wyznaczenia potencjalnych kandydatów na probiotyki, które pomogą w leczeniu lub profilaktyce CRC [338].

Warto zauważyć, że żadne z wcześniejszych badań naukowych, analizujących skład mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, nie wykazało zmian w obfitości bakterii z rodzaju *Odoribacter*, jako różnicujących dla pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia. Dokładne wyjaśnienie roli bakterii *Odoribacter* w dysbiozie i patogenezie różnych stanów chorobowych wymaga prowadzenia dalszych badań naukowych.

W analizie jakościowej stolca u pacjentów z ME/CFS, jako różnicujące mikrobiom od grupy kontrolnej wyznaczono również bakterie z rodziny *Ruminococcaceae*. Te należące do *Firmicutes* bakterie, identyfikowano już wcześniej w dysbiozie jelitowej, występującej w szeregu różnych stanów chorobowych. Zmniejszenie obfitości bakterii z rodziny *Ruminococcaceae* wykazano w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (IBD) [339,340]. Zwiększenie względnej obfitości *Ruminococcaceae* wykazano natomiast w przewlekłym zaparciu stolca (ang. *chronic constipation*, CC), szczególnie w postaci z towarzyszącą

dyssynergią dna miednicy [341]. Wykazano negatywną korelację pomiędzy obfitością *Ruminococcaceae*, a poziomem ciśnienia w końcowym odcinku odbytnicy [341].

Bakterie z rodziny *Ruminococcaceae* produkują SCFA, w tym m.in. maślan, który wykazuje działanie ochronne i przeciwzapalne w przewodzie pokarmowym. Maślan indukuje ekspresję kwasu retinowego, co dodatkowo osłabia objawy kliniczne zapalenia okrężnicy, poprzez zwiększenie liczby komórek Treg i zmniejszenie ilości Th17, co wykazano na modelach zwierzęcych [340]. Wang i wsp. [340] w swoich badaniach testowali terapię probiotykami wieloszczepowymi zwiększającymi różnorodność mikrobioty jelitowej i selektywnie promującymi wzrost *Ruminococcaceae*, i wykazali zmniejszenie nasilenia objawów IBD i przedłużenie czasu remisji klinicznej. Odkrycia te mogą zostać wykorzystane w doborze probiotykoterapii dla pacjentów z IBD.

Nawiązując do przytaczanych wcześniej badań naukowych, analizujących skład mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS, warto zauważyć, że Giloteaux i wsp. wykazali zmniejszenie obfitości *Firmicutes*, w tym bakterii z rodziny *Ruminococcaceae*, przede wszystkim wyrażone w mniejszej obfitości bakterii z rodzaju *Faecalibacterium* [211,212]. Natomiast Guo i wsp. [301] wykazali negatywną korelację bakterii z rodziny *Ruminococcaceae*, przede wszystkim gatunku *Faecalibacterium praustnitzii*, z nasileniem objawów ME/CFS. Dalsze badania naukowe, dotyczące znaczenia dysbiozy w zakresie bakterii *Ruminococcaceae* w patogenezie różnych stanów chorobowych, w tym ME/CFS, są niezbędne.

Warto zauważyć również, że w kontekście wykorzystania przeprowadzonych analiz mikrobiomu jelitowego do opracowania skutecznego leczenia przyczynowego lub skutecznej profilaktyki stanów chorobowych, należy dążyć do wykazania, obfitość których bakterii jelitowych jest u osób danych pacjentów istotnie zmniejszona, w porównaniu z osobami zdrowymi, lub funkcje i interakcje pomiędzy którymi bakteriami a organizmem gospodarza są szczególnie zaburzone i w sposób istotny upośledzają metabolizm. Takie wyniki stanowią wiarygodną wskazówkę do dobrania odpowiedniej, spersonalizowanej dla danego pacjenta probiotykoterapii i mogą okazać się skuteczną interwencją leczenia przyczynowego. Z punktu widzenia opracowania metod terapeutycznych, bardziej istotne, jako kierunek dalszych badań, wydaje się analizowanie, które bakterie jelitowe mają istotnie zmniejszoną obfitość u pacjentów z ME/CFS.

Porównując uzyskane w badaniu własnym wyniki z dostępną literaturą naukową na temat dysbiozy jelitowej w innych chorobach, można zauważyć, że zbliżone zaburzenia składu

mikrobioty jelitowej, jak w ME/CFS, pojawiają się również w innych chorobach, m.in. w depresji. Jiang i wsp. [342] porównali próbki kału 46 pacjentów z diagnozą zaburzeń depresyjnych oraz 30 zdrowych. W badaniu istotnie większą obfitość bakterii typów *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* oraz zmniejszony udział *Firmicutes* w mikrobiomie stolca pacjentów z rozpoznaniem depresji [342]. W analizie na poziomie rodzajów, wykazano u pacjentów z depresją podwyższony poziom *Enterobacteriaceae* i *Alistipes*, a obniżony poziom *Faecalibacterium* [342]. Wykazano negatywną korelację pomiędzy *Faecalibacterium*, a nasileniem objawów depresji. W badaniu własnym w analizie jakościowej mikrobiomu stolca u pacjentów z ME/CFS zaobserwowano mniejszą obfitość bakterii *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, a także ogólny wzrost obfitości bakterii należących do typu *Bacteroidetes*, natomiast na poziomie rodzajów również zaobserwowano wzrost obfitości *Alistipes*. Doniesienia te są również zbieżne z innymi dostępnymi analizami mikrobiomu jelitowego w ME/CFS [1,208–210]. Co ciekawe, Jiang i wsp. wykazali również wzrost różnorodności gatunkowej mikrobiomu jelitowego u chorych z depresją, mierzony jako ilość jednostek OTU, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w badaniu własnym [342].

Zauważalny są również znaczące zmiany ilościowe i jakościowe mikrobiomu jelitowego w chorobach otępiennych, takich jak np. choroba Alzheimera. Askarova i wsp. [343] w przeglądzie systematycznym opublikowanym w 2020r. analizowali zmiany jakościowe i ilościowe w mikrobiomie jelitowym u pacjentów z chorobą Alzheimera (ang. *Alzheimer disease*, AD), a także ich powiązania z nowoczesnym trybem życia, dietą, brakiem snu, starzeniem się. Wykazano, że skład mikrobiomu jelitowego w AD jest istotnie zmieniony, zmniejszona jest obfitość komensalnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*, w zwiększona jest obfitość bakterii prozapalnych, takich jak *Propionibacteria*, *Fusobacteria*, *Shigella* i *Clostridia*, zmiany te korelują z deprywacją snu i wysokotłuszczową dietą (HFD) [343]. Ogólnie można więc powiedzieć, że w AD obserwuje się ogólny spadek ilości bakterii *Firmicutes* i wzrost *Bacteroidetes*, co jest częściowo zbieżne z profilem mikrobiomu jelitowego w ME/CFS.

Podobny profil zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego jak w ME/CFS jest spotykany również w chorobach wątroby, a mianowicie NAFLD i NASH, czyli najczęstszych współcześnie przewlekłych schorzeniach wątroby. Lee i wsp. przeanalizowali mikrobiom 171 pacjentów z NAFLD i 31 zdrowych ochotników z grupy kontrolnej i zauważyli oni zwiększenie obfitości bakterii z rodzin *Ruminococcaceae* i *Veillonellaceae* w grupie z NAFLD [344]. Co

ciekawe, zmiany te były bardziej widoczne w mikrobiomie pacjentów nieotyłych z NAFLD, niż pacjentów z otyłością. U pacjentów otyłych z NAFLD najbardziej widocznie było zwiększenie obfitości bakterii z rodziny *Rikenellaceae*, do której należy rodzaj *Alistipes* [344]. Safari i Gerard [345] w przeglądzie systematycznym z 2019r. opisali u pacjentów z NAFLD zmniejszenie obfitości Firmicutes, przede wszystkim rodzin *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* i *Ruminococcaceae*, a wzrost ilości oportunistycznych bakterii produkujących LPS. Co ciekawe, opisali oni również, że niektóre bakterie z typu *Firmicutes* u pacjentów z NAFLD zwiększają swoją obfitość, są to gatunki takie jak *Dorea* i *Ruminococcus* [345]. Le Roy i wsp. w badaniach na modelach zwierzęcych wykazali, że dwa gatunki bakterii, *Lachnospiraceae bacterium* i *Barnesiella intestinihominis*, były znacznie nadreprezentowane w kale pacjentów z NAFLD, podczas gdy *Bacteroides vulgatus* miał istotnie obniżony poziom w porównaniu z grupą kontrolną [346]. Dodatkowo wykazali oni związek rozwoju NAFLD z insulinoopornością i cukrzycą typu 2 [346]. Jest to o tyle ciekawe, że najnowsze badania sugerują również, że insulinooporność może predysponować do rozwoju ME/CFS oraz rozwoju Long-COVID po zakażeniu wirusem SARS-Cov-2 [347].

W badaniach, wykorzystujących sekwencjonowanie mikrobiomu jelitowego z próbek stolca u pacjentów pediatrycznych z IBS, stwierdzono, że w kale tych pacjentów występuje zwiększona obfitość bakterii *Ruminococcus* oraz *Alistipes* [348]. Dodatkowo wykazano, że większy poziom bakterii *Alistipes* dodatnio koreluje z objawami bólowymi w IBS u dzieci [348]. U pacjentów dorosłych z IBS wykazano z kolei zwiększoną obfitość prozapalnych gatunków bakterii, takich jak *Enterobacteriaceae*, oraz zmniejszenie obfitości *Lactobacilli* i *Bifidobacteri* [349].

W badaniach dotyczących mikrobiomu jelitowego w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (IBD), jako najbardziej charakterystyczne OTU dla profilu mikrobiomu w IBD wykazano bakterie z rodzajów *Lachnospira*, *Clostridium*, *Oscillospira* oraz różne bakterie należące do rodziny *Ruminococcaceae* [350]. Kostic i wsp. [351] wykazali, że obfitość bakterii *Enterobacteriaceae* oraz gatunku *E. coli* może być zwiększona w IBD. Wykazali oni również, że we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego bakterie *Odoribacter* i *Leuconostocaceae* występują w mniejszym stężeniu, natomiast w chorobie Leśniowskiego-Crohna zmniejszone są poziomy bakterii *Phascolarctobacterium* i *Roseburia* [351]. Co ciekawe, *Odoribacter* (w badaniu własnym) czy *Roseburia*, we wcześniejszych badaniach dotyczących ME/CFS, zostały przedstawione, jako bakterie istotnie różnicujące mikrobiom w ME/CFS [129].

W fibromialgii (FM), chorobie często współwystępującej, nakładającej się z ME/CFS, badacze wykazali, że obfitość komesalnych bakterii produkujących maślan - *F. prausnitzii* i *B. uniformis* była stosunkowo zmniejszona, podczas gdy obfitość bakterii *Intestinimonas butyriciproducens*, *Flavonifractor plautii*, *Butyricoccus desmolans*, *Eisenbergiella tayi* i *Eisenbergiella massiliensis*, była większa [352].

Nasuwa się wniosek, że zaburzenia homeostazy mikrobiomu jelitowego występują u w różnych stanach chorobowych, a ich dokładny związek z patologią, a także możliwości wykorzystania tej wiedzy w leczeniu chorób wymagają dalszych badań naukowych. Ciekawe jest, że w chorobach takich jak wymienione powyżej, o podłożu również autoimmunologicznym lub zapalnym, profil zmian składu mikrobiomu jelitowego jest częściowo zbieżny ze zmianami, które badanie własne lub inne badania naukowe, wykazali u pacjentów z ME/CFS.

W niniejszym badaniu nie wykazano istotnych różnic w składzie mikrobiomu jelitowego w porównywanych grupach, ze uwzględnieniem podziału na wiek i płeć pacjentów. Bioróżnorodność mikroorganizmów składających się na ludzką mikrobiotę determinowana jest przez wiele czynników endogennych i egzogennych, do których zaliczamy między innymi wiek, płeć, jak również rasę, aktywność fizyczną, dietę czy leki. Zmiany składu mikrobioty jelitowej wraz z wiekiem są procesem naturalnym, tę zmienność można zaobserwować już na etapie analizy udziału poszczególnych typów bakterii dominujących. Wykaz bakterii dominujących na poszczególnych etapach życia człowieka przedstawiono we wcześniejszej części rozprawy w Tabeli 10. [163]. Zmiany w składzie i różnorodności mikrobioty nie są funkcją liniową wieku. Największe różnice obserwuje się na początkowych etapach życia oraz w wieku podeszłym, a w ciągu pozostałych etapów życia mikrobiota ulega niewielkim modyfikacjom [240]. Dopiero w wieku 3 lat skład mikrobioty dziecka zaczyna przypominać mikrobiotę osób dorosłych [163]. W porównaniu z młodymi osobami dorosłymi u osób starszych zaobserwowano zmniejszenie stosunku ilości bakterii *Firmicutes* do *Bacteroidetes*, zmniejszenie różnorodności bakterii *Bifidobacterium*, zwiększenie różnorodności bakterii *Bacteroides* i spadek ilości *Faecalibacterium prausnitzii* [353]. U osób starszych obserwuje się ponadto zmniejszenie liczby bakterii *Bacteroides* i wzrost fakultatywnych beztlenowców, tj. *Escherichia coli* [160]. W porównaniu z młodszymi osobami u osób starszych zaobserwowano większe różnice w składzie mikrobioty jelitowej między osobami w tym samym wieku [160].

Niektóre doniesienia naukowe sugerują zależność mikrobioty jelitowej od płci, a zaobserwowane różnice dotyczyły zarówno obfitości mikrobioty, jak i jej składu [354]. W jednym z badań klinicznych u każdego ze zdrowych uczestników, kobiet i mężczyzn, wyznaczono 16 rodzajów najliczniejszych bakterii w kale [355]. Po porównaniu wyników, zauważono, że u kobiet występuje znamienne więcej bakterii z rodzaju *Alistipes*, *Oscillibacter*, *Fusobacterium*, *Anaerotruncus*, *Cetobacterium* i *Oscillospira* [355]. Co ciekawe, na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono, aby jakiś rodzaj bakterii występował częściej u mężczyzn niż u kobiet [355]. Sugeruje się, że za różnice w składzie mikrobioty mogą być odpowiedzialne żeńskie hormony płciowe.

Jak opisano we wcześniejszej części rozprawy, w części dotyczącej epidemiologii ME/CFS, choroba ta jest istotnie częściej rozpoznawana u kobiet niż u mężczyzn (3:1), a szczyt zachorowań przypada na wiek między trzynastym a piętnastym oraz dwudziestym a czterdziestym rokiem życia [3]. We wspomnianym już wcześniej badaniu Armstronga i wsp. [217] porównywano skład mikrobiomu jelitowego oraz oznaczono profil metabolomiczny u kobiet z ME/CFS, w porównaniu do kobiet zdrowych i wykazano istotne różnice w składzie mikrobiomu. Badania te jednak nie uwzględniały porównania pomiędzy kobietami a mężczyznami. Jak dotąd nie przeprowadzono badań dotyczących różnic w składzie mikrobiomu jelitowego w ME/CFS, w porównaniu do zdrowych kontroli, uwzględniając zróżnicowanie porównywanych grup z uwagi na wiek lub płeć. W badaniu własnym przeprowadzono taką analizę, jednak nie wykazano różnic w składzie mikrobiomu z uwagi na płeć czy wiek, co może wynikać z małej liczebności grupy badanej i kontrolnej. Problem też z pewnością stanowi ciekawy kierunek do kontynuowania w dalszych badaniach naukowych.

Analizowane w badaniu własnym grupy – ME/CFS i grupa kontrolna – nie różniły się również istotnie pod względem takich parametrów jak masa ciała, BMI, czy procent tkanki tłuszczowej. Masa ciała i BMI są bardzo istotnymi czynnikami wpływającymi na skład mikrobioty jelitowej. Wyższe BMI jest związane z mniejszą liczbą rodzajów bakterii należących do rodzin *Rikenellaceae* oraz gatunków bakterii *Alistipes finegoldii* i *Alistipes senegalensis* [335, 341]. Zauważono, że ilość bakterii *Akkermansia* jest odwrotnie proporcjonalna do czynników ryzyka insulinooporności, tj. BMI i stężenia triglicerydów [356].

W porównywanych w niniejszym badaniu grupach (ME/CFS i kontrola) nie przeprowadzono analizy czynników środowiskowych, takich jak np. dieta, aktywność fizyczna, palenie tytoniu, stosowanie niektórych leków czy narażenie na stres, które również w sposób

istotny wpływają na modulowanie składu mikrobioty. Może być to ciekawym i potrzebnym kierunkiem rozszerzenia badań w przyszłości.

W niniejszym badaniu, po raz pierwszy na świecie, podjęto się porównania mikrobiomu jelitowego pacjentów z ME/CFS i zdrowej grupy kontrolnej na podstawie analizy sieciowej dla sieci utworzonej na podstawie ASV mikrobiomu jelitowego analizowanych grup. Pojawienie się badań mikrobiomu na dużą skalę, wymagało pojawienia się również nowych możliwości analitycznych, aby spróbować lepiej zrozumieć wzajemne powiązania i działanie drobnoustrojów. Analiza sieciowa daje ogromne możliwości analizy i modelowania danych dotyczących mikrobiomu oraz integrację tych danych z danymi z analiz omicznych w celu rozpoznania ich powiązań funkcjonalnych [357]. Z przeprowadzonej w niniejszym badaniu analizy sieciowej wynika, że w obu analizowanych grupach, kontrolnej i badanej, istnieją pozytywne zależności pomiędzy ASV4 i ASV 18 (*Agathobacter* i *Fusicatenibacter*), ASV 17 i ASV 18 (*Faecalibacterium* i *Fusicatenibacter*) oraz ASV 18 i ASV 5 (*Fusicatenibacter* i *Blautia*). Zależnością różnicującą analizowane grupy jest pozytywna zależność pomiędzy ASV10 i ASV 13 w grupie ME/CFS (im więcej bakterii z rodzaju *Alistipes*, tym więcej bakterii *Subdoligranulum* pojawia się w mikrobiomie jelitowym w grupie ME/CFS, w grupie kontrolnej jest to korelacja negatywna). Co ciekawe, w żadnej grupie nie znaleziono silnych negatywnych zależności pomiędzy poszczególnymi ASV.

W niniejszym badaniu dokonano także analizy mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do grupy kontrolnej, w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz stopnia nasilenia objawów ME/CFS. Takie analizy nie były wcześniej przeprowadzane. Za wskaźnik funkcjonowania AUN w analizowanych grupach uznano parametr parametru LF/HF-RRI, który obrazuje stopień napięcia współczulnego. Parametr LF/HF-RRI jest powszechnie uznawanym wskaźnikiem czynnościowej równowagi współczulno-przywspółczulnej [141]. W niniejszym badaniu zaobserwowano istotną statystycznie zależność między funkcjonowaniem AUN, wyrażonym jako parametr LF/HF-RRI, a składem mikrobioty stolca.

Za badania, które częściowo oceniają funkcjonowanie AUN u pacjentów z ME/CFS można uznać badania Giloteaux i wsp. [211] na parze monozygotycznych bliźniąt (jedna osoba z ME/CFS, a druga zdrowa), gdzie badani pacjenci wykonywali dwudniową próbę ergospirometryczną (CPET) z oznaczeniem progu maksymalnego wysiłku (VO_2 max). U pacjenta z ME/CFS stwierdzono niższy wyjściowy VO_2 max niż u osoby zdrowej. U pacjenta z

ME/CFS VO_2 max w drugim dniu testu CPET była niższa o 13% niż w pierwszym dniu badania [211]. Jednocześnie u pacjentów tych wykazano istotne różnice w składzie mikrobiomu jelitowego: wykazano mniejszą różnorodność mikrobiomu u pacjenta z ME/CFS, bakterie należące do typów *Bacteroidetes* i *Firmicutes* były bardziej licznie reprezentowane u pacjenta z ME/CFS, a bakterie *Proteobacteria* u osoby zdrowej, na poziomie rodzin, bakterie z rodziny *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* i *Prevotellaceae* były bardziej licznie reprezentowane u osoby zdrowej, a bakterie z rodziny *Bacteroidaceae* były bardziej obfite u pacjenta z ME/CFS, bakterie z rodzajów *Faecalibacterium* i *Bifidobacterium* były mniej liczne u pacjenta z ME/CFS, jednak próbki stolca do sekwencjonowania były pobierane tylko raz, przed próbami CPET [211].

W badaniu własnym wykazano istotną zależność między mikrobiomem stolca a funkcjonowaniem poznawczym pacjentów, rozumianym jako punktacja uzyskana przez pacjentów z testu TMT A. Do oceny funkcji poznawczych w niniejszym badaniu użyto testu łączenia punktów A i B (ang. *Trail Making Test A and B*), służącego do oceny pamięci operacyjnej. Jedynym badaniem, w którym oceniano mikrobiom u pacjentów z ME/CFS oraz jednocześnie oceniano funkcjonowanie poznawcze pacjentów, jest badanie przeprowadzone przez Kitami i wsp. [215]. W badaniu tym do oceny funkcji poznawczych wykorzystano matematyczny test dodawania do siebie różnych liczb i oceny czasu potrzebnego pacjentowi dla rozwiązania tego zadania matematycznego (nie oceniano ilości prawidłowych odpowiedzi). Wykazano, że stopień nasilenia dysfunkcji poznawczej u pacjentów z ME/CFS najsilniej korelował ze wzrostem bakterii z rodzaju *Coprobacillus* w mikrobiomie jelitowym, w porównaniu do grupy kontrolnej [215]. Wykazano także pozytywną korelację pomiędzy nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych, a kombinacją specyficznych genów oznaczonych w badaniach transkryptomicznych [215]. Co ciekawe w badaniu tym oceniano również korelację ocenianych markerów molekularnych z zaburzeniami snu u pacjentów z ME/CFS i wykazano, że zaburzenia snu są najsilniej powiązane ze zmniejszeniem obfitości *Faecalibacterium* w mikrobiomie jelitowym oraz ze zmianami w profilu lipoprotein, w porównaniu do grupy kontrolnej [215].

Następnie w niniejszym badaniu, oceniono związek między mikrobiomem stolca pacjentów z grupy badanej i grupy kontrolnej, z stopniem nasilenia objawów ME/CFS, wyrażonych jako wysokość punktacji uzyskanej przez pacjentów w skalach oceny zmęczenia FIS i FSS, i zaobserwowano istotną zależność. W niektórych z przytoczonych badań naukowych

porównujących skład mikrobioty jelitowej u pacjentów z ME/CFS i u osób zdrowych oceniano również nasilenie objawów ME/CFS [210,212,215]. Shukla i wsp. oceniali nasilenie objawów ME/CFS wg skali CDC (ang. *Centers for Disease Control Symptom Inventory*), Skalę Oceny Bólu wg McGilla (ang. *McGill Pain Questionnaire*, MPQ), Skalę Oceny Nastroju (ang. *Profile Mood States*, POMS), Analogowo-Wzrokową Skalę Oceny Zmęczenia (ang. *Fatigue Visual Analog Scale*, FVAS), i Wielowymiarową Skalę Oceny Zmęczenia (ang. *Multidimensional Fatigue Inventory*, MFI) [210]. Na początku badania oraz od razu po, 48 godzin i 72 godziny po próbie maksymalnego wysiłku fizycznego. Ocena nasilenia objawów wg wymienionych skal w grupie ME/CFS pokazała nasilenie objawów w 48. godzinie po wysiłku fizycznym, co jest charakterystyczne dla powysiłkowego nasilenia zmęczenia (PEM) [210]. Było to skorelowane ze zmianami w składzie mikrobiomu jelitowego, mikrobiom pacjentów z ME/CFS okazał się bardziej niestabilny i na maksymalny wysiłek fizyczny odpowiedział wzrostem obfitości bakterii w 7 z 9 głównych typów bakterii, a dla porównania w grupie kontrolnej w 2 z 9 [210]. Co ciekawe, po 72. godzinach od wysiłku fizycznego, obfitość bakterii z 9 głównych typów w grupie ME/CFS zaczęła się obniżać, co może oznaczać że wzrost obfitości bakterii w mikrobiomie jelitowym jest tymczasową odpowiedzią organizmu na próbę maksymalnego wysiłku fizycznego, sprzężoną z nasileniem objawów takich jak PEM [210]. Giletaux i wsp. [212] w swoich badaniach oceniali nasilenie objawów ME/CFS w skalach Chadlera, Skali Niepełnosprawności Bella (ang. *Bell Disability Scale*, BDS) oraz skale SF-36. Nasilenie objawów wg tych skal oceniano u 2 badanych osób – brata bliźniaka z ME/CFS i brata bez ME/CFS. W początkowej ocenie bliźniak z ME/CFS uzyskał 10 pkt w skali Chadlera (można uzyskać od 0 do 11 punktów, 11 to wynik maksymalny, oznaczający największe nasilenie objawów), 40 pkt w skali Bella (maksymalny wynik, oznaczający brak objawów fizycznej niepełnosprawności to 100pkt) oraz niższe niż zdrowy brat wyniki w skali oceny jakości życia wg skali SF-36 [212]. Było to skorelowane z wykazanymi zmianami w składzie mikrobiomu jelitowego, u brata z ME/CFS wykazano mniejszą różnorodność mikrobiomu oraz mniejszą obfitość bakterii *Faecalibacterium* i *Bifidobacterium* [212]. W badaniu Kitami i wsp. [215] nasilenie objawów ME/CFS oceniano wg skali *Chadlera*, wykazano, że markery molekularne, które zostały zidentyfikowane przez badaczy jako mogące pomóc w odróżnieniu pacjentów z ME/CFS od osób zdrowych (poziom monocytów we krwi obwodowej, zmiany składu mikrobiomu jelitowego oraz profil lipoprotein) są niezależne od nasilenia objawów oraz długości trwania

objawów ME/CFS (wg badaczy tak samo różnicują pacjentów z krótkim, jak i długim czasem trwania objawów).

Badanie własne, podejmując temat analizy składu mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, miało na celu zidentyfikowanie ewentualnego markera molekularnego dla ME/CFS, ale także znalezienie punktu uchwytu dla terapii przyczynowej tej choroby. Wyjaśnienie potencjalnego związku pomiędzy dysbiozą jelitową, a rozwojem i patogenezą ME/CFS, niesie ze sobą duży potencjał dla opracowania nowych metod leczenia ME/CFS. Modyfikacja mikroflory jelitowej może stać się w przyszłości metodą precyzyjnej terapii przyczynowej. Najprostszą i najpowszechniejszą metodą modyfikacji składu gatunkowego mikrobiomu przewodu pokarmowego jest interwencja dietetyczna.

Rodzaj i skład pożywienia wpływają na mikrobiotę jelitową już od pierwszych dni życia człowieka. Zaobserwowano, że wpływ błonnika pochodzącego z warzyw i owoców oraz pełnych ziaren zbóż, silniej zmienia skład mikrobioty jelitowej u kobiet, niż u mężczyzn. Natomiast błonnik z roślin strączkowych silniej koreluje z mikrobiotą mężczyzn. Spożywanie błonnika z warzyw i owoców zwiększa ilość bakterii *Clostridium*, błonnika pochodzącego z roślin strączkowych – ilość bakterii typu *Actinobacteria*, w tym *Bifidobacterium*, natomiast błonnika z ziaren zbóż może zwiększać ilość bakterii *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella copri* i *Clostridiales* oraz zmniejszać ilość bakterii *Bacteroides thetaiotaomicron* [358]. Oddziaływanie błonnika na mikrobiotę jelitową może odbywać się na kilka sposobów. W przypadku błonnika nierozpuszczalnego, który jest odporny na enzymy trawienne i przechodzi w postaci niezmienionej do jelita grubego (np. arabinogalaktan), ulega on fermentacji w świetle jelita i wpływa na zwiększenie syntezy SCFA, w tym kwasu masłowego [359]. Dodatkowo błonnik przyspiesza motorykę przewodu pokarmowego, determinuje konsystencję stolca i oddziałuje na rytm wypróżnień [358], a czas przejścia treści pokarmowej przez przewód pokarmowy ma duże znaczenie dla składu mikrobioty jelitowej [356].

Na podstawie badania Zhernakovej i wsp. wykazano, że dieta bogata w tłuste mleko, węglowodany, białko roślinne i pikantne przekąski wiąże się ze zmniejszeniem różnorodności mikrobioty jelitowej [354]. Wykazano, że u osób na diecie wegetariańskiej lub wegańskiej obserwuje się zmniejszenie ilości bakterii *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* oraz enterobakterii [353]. Jednak dieta bezmięсна nie wpływa na stopień różnorodności mikrobioty (liczbę gatunków mikroorganizmów), a jedynie na ilość poszczególnych bakterii ją budujących [353]. U osób na diecie zachodniej (bogatej w cukry proste, białka i tłuszcz zwierzęcy) dominują

bakterie *Bacteroides*, podczas gdy u osób pozostających na diecie bogatej w warzywa i owoce przeważają bakterie *Prevotella* [353]. Dieta bogata w białka pochodzenia zwierzęcego skutkuje zwiększeniem ilości bakterii *Bacteroidetes* i *Alistipes putredinis*, które potrafią rozkładać białka. Obecność w diecie białek z aminokwasami zawierającymi siarkę powoduje wzrost bakterii z rodzajów *Firmicutes* i *Proteobacteria*, a obecność aminokwasów aromatycznych skutkuje zwiększoną ilością bakterii *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, enterobakterii [353].

Zmniejszenie różnorodności diety powoduje zmniejszenie różnorodności mikrobioty jelitowej, a w następstwie zwiększenie ilości markerów stanu zapalnego [360]. Z kolei zmiana nawyków żywieniowych jest szybkim, powtarzalnym i bezpośrednim sposobem modyfikacji mikrobioty jelitowej [285]. Dieta, poza udowodnionym udziałem w patofizjologii niektórych chorób, jeżeli jest odpowiednia, może zrównoważyć skład mikrobioty i łagodzić stany zapalne, podobnie do prebiotyków [285]. Ilość, rodzaj i równowaga trzech głównych składników diety, tj. białka, węglowodanów i tłuszczów, mają ogromny wpływ na mikrobiotę jelitową. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), głównie maślan, propionian i octan, są głównymi produktami końcowymi mikrobiologicznej degradacji węglowodanów i białek w jelitach. SCFA mają różnorodny pozytywny wpływ na funkcjonowanie przewodu pokarmowego oraz na mikrobiotę jelitową, m.in. stanowią źródło energii dla drobnoustrojów, wpływają pozytywnie na motorykę jelit, pobudzają regenerację nabłonka jelitowego oraz odżywienie komórek. Substancje wytwarzane przez bakterie jelitowe (takie jak SCFA), które pozytywnie oddziałują na organizm gospodarza, nazywamy postbiotykami [160].

W badaniu przeprowadzonym przez Turnbaugh i wsp. [361] badano myszy, które zostały przestawione z diety niskotłuszczowej, bogatej w polisacharydy pochodzenia roślinnego, na dietę wysokotłuszczową (ang. *high fat diet*, HFD) i bogatą w proste węglowodany, która miała przypominać dietę „zachodnią”. Wykazano, że myszy karmione dietą „zachodnią” miały znacznie niższy poziom różnorodności bakteryjnej, a dodatkowo myszy te charakteryzowały się istotnie wyższym względnym odsetkiem *Firmicutes* i niższym względnym odsetkiem *Bacteroidetes* w porównaniu z grupą kontrolną, pozostającą na diecie roślinnej i niskotłuszczowej [361].

Długoterminowe diety oparte na glukozie/fruktozie i białku roślinnym zostały skorelowane z dysbiozą, wzrostem przepuszczalności bariery jelitowej, nasilonym ogólnoustrojowym stanem zapalnym i podwyższonym poziomem endotoksyn w osoczu

[362,363]. Sugeruje się, że dieta bezglutenowa, z obniżoną zawartością skrobi i sacharozy, stosowana w schemacie mającym na celu obniżenie ilości spożywanych kalorii, może wpływać pozytywnie na przewód pokarmowy, powodować wzrost szczelności bariery jelitowej, łagodzenie objawów żołądkowo-jelitowych, obniżenie poziomu CRP i białka wiążącego LPS we krwi i przeciwdziałać IBS i otyłości [364,365]. Wykazano również, że u ludzi których dieta opiera się głównie o białko pochodzenia zwierzęcego mikrobiota jelitowa jest bardziej zróżnicowana, a także obserwuje się zwiększenie ilości *Bacteroides*, a zmniejszenie ilości *Firmicutes* [366]. Mikrobiota u tych osób związana jest z enterotypem bogatym w bakterie *Bacteroides* [367]. Mikrobiota osób, których dieta bogata była w polisacharydy pochodzenia roślinnego wiązała się natomiast z enterotypem bogatym w bakterie *Prevotella* [367].

Jak do tej pory przeprowadzono tylko nieliczne badania oceniające skuteczność interwencji dietetycznych w ME/CFS. Istnieją doniesienia, że kwas eikozapentaenowy, który znajduje się w oleju rybim bogatym w kwasy omega-3, podawany w wysokich dawkach przez 12 tygodni, może łagodzić objawy w przypadkach ME/CFS [368,369].

Maes i wsp., którzy wykazali wcześniej wzmożoną translokację Gram ujemnych bakterii przez ścianę jelit, endotoksemię i wzrost odpowiedzi zapalnej u pacjentów z ME/CFS, przeprowadzili kolejne badanie kliniczne, w którym udział wzięło 41 pacjentów z ME/CFS. Mieli oni przez 10-14 miesięcy stosować dietę przeciwwaplną („*leaky gut diet*”), czyli dietę bez glutenu, bez nabiału i niskowęglowodanową oraz dodatkowo stosować suplementy diety o potencjale antyoksydacyjnym: cynk, glutaminę i N-acetylocysteinę [370]. Oznaczano u nich poziom LPS, przeciwciał przeciwko LPS, LBP i parametrów stanu zapalnego przed dietę i po jej zakończeniu i wykazano, że po zastosowaniu takiej diety, u badanych pacjentów istotnie obniżyły się poziomy przeciwciał IgA i IgM przeciw LPS, a także obniżyły się poziomy parametrów stanu zapalnego, dodatkowo u badanych pacjentów wykazano istotną statystycznie remisję objawów klinicznych ME/CFS [370]. Uzyskane wyniki były wyraźniej zaznaczone u pacjentów w młodszym wieku i tych z chorobą trwającą krócej niż 5 lat [370]. Doniesienia te wymagają potwierdzenia w kolejnych badaniach naukowych, jednak są obiecującym kierunkiem poszukiwania skutecznych interwencji terapeutycznych dla ME/CFS.

Skład mikrobiomu jelitowego może być modyfikowany poprzez stosowanie probiotyków i prebiotyków. Probiotyki są to żywe drobnoustroje, które podawane w odpowiednich ilościach wywierają korzystny efekt zdrowotny na organizm gospodarza. Prebiotyki są składnikami żywności, które nie podlegają trawieniu, pozostają w przewodzie

pokarmowym i selektywnie stymulują rozwój lub aktywność metaboliczną określonych bakterii w jelicie grubym. Synbiotykiem jest to połączenie probiotyku i prebiotyku. Właściwości probiotyków są szczepozależne, co oznacza że każdy ze szczepów wymaga oddzielnych badań w celu określenia jego właściwości i skuteczności w konkretnej sytuacji klinicznej. [160,285]

Mechanizmy działania probiotyków wciąż pozostają przedmiotem badań, jednak można wyróżnić trzy zasadnicze kierunki ich aktywności: mechanizmy powszechnie występujące i wspólne dla wielu rodzajów probiotyków, jak na przykład wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), mechanizmy częste, wspólne dla poszczególnych gatunków, jak na przykład wpływ na metabolizm soli kwasów żółciowych oraz mechanizmy rzadkie, swoiste tylko dla poszczególnych szczepów, jak np. produkcja czynników bioaktywnych, działanie endokryne i neurogenne, czy wpływ na odpowiedź immunologiczną.

Wyniki randomizowanych badań naukowych, wykazały skuteczność specyficznych probiotyków w leczeniu ostrej biegunki infekcyjnej u dzieci i dorosłych [371] oraz zapobieganie biegunce poantybiotykowej [372,373]. Potwierdzono też skuteczność probiotykoterapii w eradykacji *Helicobacter pylori*, a najlepiej udokumentowane działanie w tym zakresie wykazano dla drożdży *Saccharomyces boulardii* [374].

Modyfikacja mikrobioty za pomocą stosowania probiotyków jest także wykorzystywana w terapii chorób czynnościowych przewodu pokarmowego, a zwłaszcza w zespole jelita drażliwego (ZJD; ang. *irritable bowel syndrome*, IBS). Wyniki przeglądu systematycznego z metaanalizą z lat 1989–2013 wykazały u chorych z IBS zmniejszenie nasilenia objawów, uczucia wzdęcia i częstości ewakuacji gazów jelitowych w wyniku terapii probiotykami [375]. Kolejny opublikowany niedawno przegląd systematyczny wykazał korzyść ze stosowania probiotyków w zakresie wielu objawów IBS: objawów ogólnych choroby, objawów bólowych, objawów wzdęcia i rozdęcia, ale nie zmniejsza dolegliwości w postaci nadmiernych gazów. Autorzy sugerują potrzebę podawania probiotyków u pacjentów z IBS przynajmniej przez okres 4 tygodni [376]. Wśród potencjalnie skutecznych szczepów wymienia się *Bifidobacterium infantis* 35624 i *Lactobacillus plantarum* 299v, a u dzieci również *Lactobacillus GG* [377–379].

Prebiotyki, czyli substancje nie podlegające trawieniu i wpływające na rozwój mikrobioty w jelicie grubym, wykazano, że pobudzały do wzrostu *Lactobacillus* lub *Bifidobacterium*, wykorzystując inulinę, oligofruktozę lub fruktooligosacharydy [380]. Wykazano, że arabinogalaktan (uzyskiwany z kory modrzewia zachodniego), niestrawiony w

żołądka i jelicie cienkim, może następnie w jelicie grubym zwiększać ilość *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, zwiększać produkcję SCFA, uszczelniających barierę jelitową i zapobiegających translokacji bakteryjnej, zmniejszać wytwarzanie amoniaku w jelicie grubym, wzmacniać układ immunologiczny poprzez stymulację cytotoksyczności komórek NK, a także regulować rytm wypróżnień [160]. Udowodniono skuteczność niektórych oligosacharydów w odwracaniu dysbiozy jelitowej poprzez promocję wzrostu *Lactobacillus*, redukcję proteobakterii i obniżenie stosunku *Firmicutes* do *Bacteroidetes* na modelach zwierzęcych [381–383]. Dotychczasowe badania naukowe sugerują, że prebiotyki mogą być pomocne w przypadkach ME/CFS, jednak badania kliniczne w tym zakresie nie były jak dotąd prowadzone.

Do tej pory opublikowano niewiele badań naukowych dotyczących probiotykoterapii w ME/CFS. Sullivan i wsp. [384] przebadali 15 pacjentów spełniających kryteria Fukudy i wykazujących ciężki stopień nasilenia objawów choroby, co zostało ocenione za pomocą skali analogowo-wzrokowej (ang. *visual analogue scale*, VAS) oraz protokołu SF-12 Health Survey. Pacjenci przyjmowali przez 30 dni, dwa razy dziennie probiotyk zawierający łącznie 10^8 CFU/ml bakterii *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* F19, *Lactobacillus acidophilus* NSFB 1748 oraz *Bifidobacterium lactis* Bb12. Nie wykazano redukcji ogólnego uczucia zmęczenia, stwierdzono natomiast poprawę funkcji poznawczych (zdolności do koncentracji i zapamiętywania) oraz zmniejszenie lęku, niepokoju i depresji [384]. Rao i wsp. [385] przebadali 39 pacjentów z ME/CFS, którzy przez 8 tygodni przyjmowali doustnie 3 razy dziennie (po każdym głównym posiłku) probiotyk zawierający 8 bilionów CFU bakterii *Lactobacillus casei* szczep Shirota (LcS) albo placebo. U pacjentów przyjmujących probiotyk w porównaniu z pacjentami otrzymującymi placebo odnotowano znaczącą redukcję objawów lękowych oraz depresyjnych. Dodatkowo w grupie pacjentów przyjmujących probiotyk stwierdzono wzrost populacji *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* w porównaniu do kontroli [385]. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że stosowanie *L. casei*, *L. acidophilus* i *B. lactis* może powodować poprawę funkcji kognitywnych u pacjentów w ME/CFS [386].

W opublikowanym w 2018 roku przeglądzie systematycznym, dotyczącym skuteczności probiotykoterapii w IBS lub ME/CFS, obejmującym łącznie 25 badań klinicznych powstałych pomiędzy 2003 a 2016 rokiem, nie zaobserwowano, aby probiotyki w monoterapii mogły spowodować stałą poprawę w tych jednostkach chorobowych [387]. Jednakże zauważono też, że pozytywne działanie probiotyków było związane najczęściej ze stosowaniem preparatów z bakteriami *Lactobacilli* spp., które istotnie zmniejszyły nasilenie

objawów dyspeptycznych, nawet jeżeli nie wykazano jednocześnie ogólnej poprawy u pacjentów [378,388–391]. Zauważono również, że zastosowanie *Saccharomyces* spp. powodowało tylko nieznaczną poprawę w stosunku do wyjściowych objawów [390,392] jednak odnotowano poprawę jakości życia [392] i zmniejszenie stężenia w surowicy poziomu cytokin prozapalnych [393], co może oznaczać że *Saccharomyces* spp. może odgrywać istotną rolę w terapii zarówno w IBS, jak i ME/CFS.

Wallis i wsp. w 2018 opublikowali badanie kliniczne, w którym porównywali wpływ leczenia erytromycyną i wieloszczepowym probiotykiem stosowanymi 2 razy dziennie przez 4 tygodnie na objawy kliniczne u 44 pacjentów z ME/CFS (w tym 27 kobiet), porównując ich do zdrowej grupy kontrolnej [394]. Wykazano istotną redukcję bakterii *Streptococcus* w kale pacjentów z ME/CFS oraz znaczną poprawę parametrów klinicznych, przede wszystkim poprawę jakości snu (mniej przebudzeni nocnych), poprawę parametrów poznawczych (uwagi, szybkości przetwarzania informacji, elastyczności poznawczej, pamięci i płynności werbalnej) [394]. Nastroj, zmęczenie i poziom mleczanów w moczu pozostawały podobne. Większe zmiany w składzie mikrobioty zaobserwowano w grupie mężczyzn z ME/CFS, niż kobiet [394].

Venturini i wsp. w 2019r. opublikowali wyniki pilotażowego badania, w którym pacjentów z ME/CFS leczono 4 różnymi kombinacjami probiotyków przez łącznie 8 tygodni i wykazano obniżenie poziomów markerów zapalnych (cytokin, kalprotektyny kałowej, immunoglobulin) oraz poprawę ogólnego samopoczucia pacjentów i redukcję nasilenia objawów ME/CFS ocenianych za pomocą Skali Chadlera, Skali Depresji Becka i kwestionariusza oceny jakości życia SF-36 [395]. W innym badaniu wykazano, że stosowanie *Bifidobacterium infantis* 35624 u 48 pacjentów z ME/CFS spowodowało obniżanie markerów stanu zapalnego, takich jak CRP, TNF- α i IL-6 [396].

Wyniki badań jak dotąd sugerują, że probiotyki, same lub w skojarzeniu z innymi preparatami, mogą być skuteczne w leczeniu ME/CFS, jednak należy kontynuować badania nad ich skutecznością w zespole przewlekłego zmęczenia, na większych grupach pacjentów i w dłuższych okresach czasu. Nie przeprowadzono jak dotąd badań nad wpływem suplementacji prebiotyków na nasilenie objawów ME/CFS.

Z uwagi na doniesienia naukowe sugerujące obniżenie stanu zapalnego, zwiększenie produkcji SCFA, zmniejszenie przepuszczalności jelit i przywrócenie eubiozy, transplantacja

mikrobioty jelitowej (ang. *fecal microbiota transplantation*, FMT) stanowi bardzo obiecującą metodę modyfikacji mikrobioty jelitowej.

Przeszczepienie (transplantacja) mikrobioty jelitowej (ang. *fecal microbiota transplantation*, FMT), zwane również potocznie przeszczepieniem kału, „transferem flory jelitowej”, czy bakterioterapią, jest to proces przeszczepiania stolca od zdrowego dawcy do pacjenta [285]. Celem takiej terapii jest przywrócenie eubiozy poprzez podaż zbilansowanej i zdrowej populacji mikrobioty bezpośrednio do jelita biorcy [285]. W większości przypadków transplantacja odbywa się za pomocą endoskopii, ale dostępne są również lewatywy lub kapsułki podawane doustnie [285].

Pierwsze udokumentowane FMT dotyczyło postępowania terapeutycznego w przebiegu nawracającego zakażenia *Clostridium difficile* i miało miejsce w Europie w 1983 roku [397]. Obecnie wiadomo, że FMT jako metoda leczenia nawrotowego (drugi nawrót według wytycznych koreańskich, trzeci — według amerykańskich) lub opornego na leczenie zakażenia *C. difficile* (ang. *Clostridioides difficile infection*, CDI), stanowi doskonale udokumentowaną i potwierdzoną co do skuteczności drogę postępowania [398].

Mechanizm działania FMT jest wieloczynnikowy i obejmuje pojawienie się dzięki transferowi od zdrowego dawcy nowych pożądanych szczepów bakteryjnych w mikrobiocie biorcy, jak też zwiększenia liczby bakterii reprezentowanych w zbyt małych ilościach, odnowę kluczowych *Firmicutes* i *Bacteroidetes* oraz spadek niekorzystnych *Proteobacteria*, wypieranie z niszy i konkurencję o składniki odżywcze z *C. difficile*, a także wzrost stężenia wtórnych kwasów żółciowych niesprzyjających namnażaniu tych patogennych drobnoustrojów [399,400]. Zastosowanie FMT w innych chorobach niż CDI obejmuje NChZJ, IBS, jest rozważane w cukrzycy typu 2, zespole metabolicznym, otyłości, insulinooporności, czynnościowym zaparciu stolca, fibromialgii, astmie oskrzelowej, chorobach ze spektrum autyzmu, stwardnieniu rozsianym czy chorobie Parkinsona, choć te ostatnie tylko na etapie eksperymentalnym [285,400].

Jak na razie istnieje wiele ograniczeń, jednak pojawiające się dane naukowe sugerują, że zastosowanie FMT w wielu chorobach związanych z dysbiozą jelitową jest korzystne i może wkrótce stanowić nowe podejście terapeutyczne do różnych chorób. Wyniki badań dotyczące zastosowania FMT w łagodzeniu objawów ME/CFS są bardzo nieliczne. W badaniu Borody i wsp. na 34 pacjentach z ME/CFS, u których wykonano FMT, wykazano, że u 41% doszło do trwałej redukcji nasilenia objawów po 11-28 miesięcy po interwencji terapeutycznej, jednak

35% pacjentów zgłosiło tylko niewielką lub późną ulgę [401]. W innym badaniu, przeprowadzonym na 60 pacjentach z ME/CFS, którym podano 13 bakterii niepatogennych za pomocą kolonoskopii, uzyskano redukcję objawów u 70% pacjentów, a w wyodrębnionej grupie pacjentów w wieku 15-20 lat - 58% przypadków zgłaszało utrzymywanie się pozytywnego efektu terapeutycznego bez nawrotu [402]. Kenyon i wsp. retrospektywnie ocenili 42 pacjentów z ME/CFS rozpoznanych na podstawie kryteriów ICC, wśród których u 30 pacjentów dodatkowo postawiono rozpoznanie IBS [403]. Grupę tę podzielili na 2 podgrupy, 21 pacjentów leczonych było kombinacją leków doustnych o przewidywanym korzystnym wpływie na objawy ME/CFS (suplementy diety, probiotyki, prebiotyki, zmiana stylu życia), a pozostałych 21 pacjentów zostało poddanych FMT od zdrowego dawcy [403]. W badaniu tym oceniono, że poprawa, rozumiana jako złagodzenie nasilenia objawów, w grupie pacjentów po FMT była istotnie wyższa i dłużej się utrzymywała [403]. Jak na razie istnieje wiele ograniczeń, jednak pojawiające się dane naukowe sugerują, że zastosowanie FMT w wielu chorobach związanych z dysbiozą jelitową, w tym w ME/CFS, może wkrótce stanowić nowe podejście terapeutyczne. FMT jest bardzo obiecującą metodą terapeutyczną, wymaga jednak jeszcze wiele badań naukowych, w tym na populacji pacjentów z ME/CFS.

Badanie własne jest jednym z nielicznych badań naukowych na temat różnic w składzie ilościowym i jakościowym mikrobiomu jelitowego, a także na temat związku mikrobiomu z poszczególnymi objawami ME/CFS. Badanie to w sposób istotny uzupełnia współczesną wiedzę na temat dysbiozy jelitowej w ME/CFS. Należy jednak zauważyć, że badanie własne nie wyczerpuje tematu zaburzeń w składzie mikrobioty jelitowej w patogenezie ME/CFS. Badanie to można rozszerzyć na większą grupę badaną i kontrolną, porównać czynniki zewnętrzne (takie jak wysiłek fizyczny, dieta, leki czy stres) i ich związek ze zmianami składu mikrobioty, ponadto można dodatkowo rozszerzyć niniejsze badanie o bardziej zaawansowane metody oznaczania organizmów eukariotycznych w mikrobiomie jelitowym lub o oznaczenie wiromu u tych pacjentów, w końcu można rozszerzyć badania o nowe gałęzie naukowe, takie jak metabolomika, proteomika czy transkryptomika. Ciekawym zagadnieniem jest również określenie związku wykrytych zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego ze zmianą funkcji molekularnej mikrobiomu. Dalsze badania powinny również poza dążeniem do jeszcze bardziej precyzyjnego określenia zmian w składzie mikrobiomu, podjąć próbę identyfikacji markera biologicznego oraz metod leczenia zidentyfikowanych zaburzeń.

Wyniki przeprowadzonego badania naukowego mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego, występujących u pacjentów z ME/CFS, co może w przyszłości przyczynić się do zmodyfikowania dotychczasowych metod diagnostycznych oraz algorytmów leczenia ME/CFS, na przykład poprzez ustalenie w przyszłości wskazań do zindywidualizowanej probiotykoterapii u pacjentów z ME/CFS. Konieczne jest jednak dalsze kontynuowanie badań celem dokładnego ustalenia składu mikrobiomu w populacji objętej tym schorzeniem.

VI. WNIOSKI

1. Wykazano istotnie statystycznie wyższą alfa-różnorodność mikrobiomu stolca w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, rozumianą jako wyższą liczebność jednostek OTU. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie współczynników różnorodności oraz równomierności mikrobiomu stolca między grupą badaną, a kontrolną.
2. Wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie beta-różnorodności mikrobiomu stolca między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, przy wykorzystaniu PERMANOVY.
3. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie składu mikrobiomu stolca, w zależności od płci i wieku, między grupą badaną i kontrolną.
4. Zaobserwowano istotną zależność funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz nasilenia zmęczenia ze składem mikrobiomu stolca porównywanych grup.

VII. PODSUMOWANIE I OGRANICZENIA PRACY

Zespół przewlekłego zmęczenia stanowi istotny problem kliniczny, jednak nadal nie została wyjaśniona etiologia tej choroby, ani nie zostały opracowane metody leczenia przyczynowego. Jedną z hipotez dotyczącą patogenezy ME/CFS jest zaburzenie homeostazy mikrobiomu jelitowego, prowadzące do nieprawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego, endokrynologicznego i nerwowego, upośledzenia metabolizmu organizmu i rozwoju objawów ME/CFS.

Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań naukowych dotyczących zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego w ME/CFS. Przeprowadzone badanie jest innowacyjne i w sposób istotny próbuje uzupełnić luki w wiedzy na temat dysbiozy jelitowej u pacjentów z ME/CFS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Niewątpliwym atutem badania jest to, że kryteria włączenia do badania zostały opracowane w rygorystyczny sposób i obejmują rozpoznanie ME/CFS na podstawie aż dwóch rodzajów kryteriów diagnostycznych (kryteriów Fukudy i kryteriów ME/ICC). Jest to zgodne z najnowszymi doniesieniami naukowymi na temat ME/CFS i istotnie zwiększa prawdopodobieństwo zakwalifikowania do grupy badanej wyłącznie pacjentów z prawidłowo postawioną diagnozą. Grupa badana i grupa kontrolna nie różniły się istotnie pod względem takich czynników jak wiek, płeć, masa ciała, BMI czy procent tkanki tłuszczowej, które mogą wpływać na zmiany w składzie mikrobioty jelitowej. W niniejszym badaniu do sekwencjonowania mikrobioty użyto najnowszej technologii 16S rRNA, co pozwala na bardzo dokładną identyfikację większości drobnoustrojów z próbek stolca, aż do poziomu wariacji sekwencji ASV.

Pomimo wielu mocnych stron, przeprowadzone badanie własne ma również pewne ograniczenia. Można do nich zaliczyć przede wszystkim małą liczebność grupy, zwłaszcza grupy kontrolnej. Dodatkowo z uwagi na obraz kliniczny ME/CFS, głównie na powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM) u pacjentów, nie było możliwe, aby pacjenci z ciężkim stopniem nasilenia objawów wykonali protokół badania, w związku z czym do badania rekrutowano tylko pacjentów z lekkim i umiarkowanym stopniem nasilenia dolegliwości. Niniejsze badanie nie wyczerpuje analizowanego tematu i może zostać rozszerzone o kolejne analizy, m.in. o porównanie analizowanych grup pod kątem czynników mogących wpływać na skład mikrobiomu (jak np. dieta, ruch, leki czy stres), oznaczenie składu organizmów eukariotycznych czy wirusów w analizowanym mikrobiomie, czy o przeprowadzenie analizy metabolomicznej i określenie związku wykrytych zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego

ze zmianą funkcji danego mikrobiomu. Kontynuowanie badań naukowych w tym temacie powinno przede wszystkim dążyć do precyzyjnego określenia zmian w składzie mikrobiomu, a następnie podjąć próbę identyfikacji markera biologicznego oraz metod leczenia ME/CFS na drodze zindywidualizowanej modyfikacji składu mikrobioty jelitowej. Zwiększenie liczebności grupy badanej i kontrolnej, uwzględnienie w analizie również pacjentów z ciężkim stopniem nasilenia objawów, a także przeanalizowanie dodatkowych czynników, mogących wpływać na funkcje i oddziaływanie mikrobioty, z pewnością poprawiłoby wiarygodność niniejszego badania.

Na podstawie przeglądu literatury dokonanego w tej rozprawie można zauważyć, że pomiędzy wieloma pracami naukowymi powstającymi na temat dysbiozy jelitowej w ME/CFS nie ma konsekwencji w zastosowanych kryteriach diagnostycznych służących do postawienia rozpoznania ME/CFS, badane grupy pacjentów zwykle są małe, a przeprowadzone badania różnią się między sobą metodologią wykorzystaną do sekwencjonowania mikrobiomu. Wszystko to powoduje, że możliwość porównywania tych badań ze sobą w celu wyciągnięcia wspólnych wniosków są bardzo ograniczone.

Stosunkowo mała ilość badań naukowych na temat dysbiozy jelitowej w ME/CFS cały czas nie umożliwia również na wyciągnięcie wniosków, czy wykazane zmiany składu drobnoustrojów przewodu pokarmowego stanowią przyczynę czy konsekwencję wystąpienia ME/CFS i czy są związane z którymkolwiek z kilku objawów wtórnych.

Określenie jakościowych zmian składu mikrobiomu jelitowego w ME/CFS stanowi początek do dyskusji nad udziałem tych zmian w zaburzeniu funkcjonowania mikrobiomu, zaburzeniu interakcji mikrobiomu z organizmem gospodarza, a w końcu w patogenezie choroby. Wykazane zmiany składu jakościowego mikrobiomu należałoby odnieść do zdrowego mikrobiomu, czyli takiego składu mikrobiomu w danym organizmie, który zapewnia jego prawidłowe funkcjonowanie i oddziaływanie z gospodarzem. Obecnie nie ma wystarczających informacji w literaturze naukowej na temat definicji zdrowego mikrobiomu, nadal brakuje informacji jakie szczepy bakterii są kluczowe dla pełnienia przez mikrobiom kluczowych funkcji i jakie są prawidłowe interakcje między mikrobiomem a gospodarzem. Pogłębienie wiedzy na temat funkcji metabolicznych i molekularnych mikrobiomu, a także jego oddziaływań i interakcji z organizmem gospodarza stanowi kluczowy kierunek dalszych badań naukowych, który umożliwi odniesienie wyników badań na temat dysbiozy, i pomoże na ustalenie ich przydatności klinicznej.

Można więc powiedzieć, że przeprowadzone badanie stanowi istotne uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat zaburzeń w składzie mikrobiomu jelitowego w zespole przewlekłego zmęczenia, jednak nadal pozostaje pole do kontynuacji i rozszerzenia dalszych badań, przede wszystkim w celu bardziej precyzyjnego ustalenia zaburzeń składu mikrobiomu w populacji objętej ME/CFS, a także wpływu tych zaburzeń homeostazy mikrobiomu na odpowiedź organizmu. Jest to ważny kierunek badań, wpisujący się w dążenie do identyfikacji markera molekularnego dla ME/CFS i ułatwienia diagnostyki tej choroby, a także ustalenie potencjalnego punktu uchwytu dla terapii przyczynowej u pacjentów z ME/CFS.

VIII. STRESZCZENIE

VIII.1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp:

Zespół przewlekłego zmęczenia (ME/CFS) jest ciężką, wyniszczającą chorobą, przebiegającą z okresami zaostrzeń i remisji, znacznie upośledzającą codzienną aktywność i obniżającą jakość życia chorego. Do objawów osiowych choroby należy przewlekłe zmęczenie, powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM), nieregenerujący sen, zaburzenia pamięci i koncentracji, zaburzenia funkcji kognitywnych, objawy dysautonomii. Mimo prowadzenia wielu badań naukowych na temat ME/CFS, nadal nie udało się wyjaśnić etiologii i patogenezы oraz nie opracowano markera biologicznego i leczenia przyczynowego tej choroby. Jednym z sugerowanych czynników przyczynowych jest dysbioza jelitowa i ogólnoustrojowa odpowiedź organizmu gospodarza na zaburzony skład i funkcjonowanie mikrobiomu jelitowego. Dzięki rozwojowi metod badawczych opierających się na rozpoznawaniu sekwencji genu 16S rRNA stało się możliwe dokładniejsze poznanie ludzkiego mikrobiomu. Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań dotyczących składu mikrobiomu jelitowego u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia i nie udało się jak dotąd jednoznacznie potwierdzić związku między zaburzeniami homeostazy mikrobiomu, a rozwojem ME/CFS. Istotnym zagadnieniem staje się zatem poszerzenie wiedzy na temat zaburzeń homeostazy mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, co ma duże znaczenie w uzupełnieniu wiedzy na temat etiologii i patogenezы tej choroby, a także może przyczynić się do poprawy jej diagnostyki oraz stać się potencjalnym punktem uchwytu w terapii tego schorzenia.

Cele pracy:

Celem pracy jest analiza składu ilościowego i jakościowego mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia (ME/CFS). W niniejszej pracy dokonano również oceny zależności mikrobiomu jelitowego z wiekiem i płcią pacjentów, a także z nasileniem wybranych objawów ME/CFS, funkcjonowaniem autonomicznego układu nerwowego i funkcjonowaniem poznawczym pacjentów. Dokonano również porównania mikrobiomu jelitowego pomiędzy grupą badaną i kontrolną na podstawie analizы sieciowej mikrobiomu jelitowego dla sieci stworzonej na podstawie ASV.

Materiał i metody:

Badanie zostało przeprowadzone w okresie od stycznia 2018 roku do marca 2019 roku w Bydgoszczy. W projekcie badawczym wzięli udział pełnoletni ochotnicy w wieku między 25.

a 65. rokiem życia. Rekrutacja do badania odbywała się za pomocą środków masowego przekazu. Wśród zgłoszonych ochotników przeprowadzono kwalifikację i wyodrębniono grupę 32 pacjentów, u których potwierdzono ME/CFS. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 18 zdrowych osób. Ostatecznie 27 pacjentów z grupy badanej i 15 z grupy kontrolnej wyraziło zgodę na wykonanie badania kału i dostarczyło próbki do badania. U wszystkich chorych przeprowadzono ocenę nasilenia objawów zmęczenia, ocenę funkcjonalną autonomicznego układu nerwowego oraz ocenę funkcji poznawczych. Do analizy mikrobiomu jelitowego zastosowano metodę sekwencjonowania genu 16S rRNA. Przeprowadzono analizę statystyczną uzyskanych parametrów.

Wyniki:

W zakresie analizy składu ilościowego mikrobiomu stolca między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie wskaźników różnorodności i równomierności Shannona. Wykazano, że pacjenci z ME/CFS charakteryzowali się istotnie wyższym bogactwem gatunkowym mikrobiomu jelitowego (rozumianym jako wyższa liczebność jednostek OTU) w porównaniu do grupy kontrolnej. W zakresie składu jakościowego mikrobiomu stolca, przeanalizowano wszystkie poziomy taksonomiczne między grupą kontrolną i grupą badaną, i zaobserwowano: na poziomie gromad - mniejszą obfitość *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* i gromad rzadkich u pacjentów z ME/CFS niż w grupie kontrolnej; na poziomie klas - większą obfitość *Bacteroidia*, a mniejszą *Negativicutes*, *Actinobacteria* oraz klas rzadkich w grupie ME/CFS, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej; na poziomie rzędów - większą obfitość *Bacteroidales*, a mniejszą *Selenomonadales* oraz rzędów rzadkich, u pacjentów z grupy badanej niż u osób z grupy kontrolnej; na poziomie rodzin - mniejszą obfitość bakterii z rodziny *Veillonellaceae* oraz bakterii z rodzin rzadkich u pacjentów z ME/CFS, niż u pacjentów z grupy kontrolnej; na poziomie rodzaju - stwierdzono większą obfitość bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Alistipes* i *Ruminococcaceae* u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Porównano również skład jakościowy stolca między grupą badaną a kontrolną na podstawie sekwencji ASV i wykazano, że najbardziej charakterystycznymi sekwencjami dla pacjentów z ME/CFS są warianty sekwencji ASV121 (*Alistipes*), ASV147 (*Odoribacter*) oraz ASV180 (*Ruminococcaceae*), natomiast dla grupy kontrolnej są to ASV 135 (*Lachnospiraceae*), ASV155 (*Christensenellaceae*) oraz ASV310 (*Lachnospira*). Zaobserwowano istotne różnice wykazane przy użyciu metod redukcji złożoności (sPLS-DA i NMDS) pomiędzy mikrobiomem stolca w grupie pacjentów z ME/CFS w

porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie składu mikrobiomu stolca w zależności od płci i wieku między grupą badaną i grupą kontrolną. Mikrobiom stolca pacjentów z grupy badanej i kontrolnej sklasyfikowano przy użyciu metod uczenia maszynowego, wykorzystując do tego celu modele sieci neuronowej, losowego drzewa klasyfikacyjnego oraz maszyny wektorów nośnych, uzyskano wartości poniżej wartości istotnych klinicznie. Przeprowadzono analizę sieciową dla sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, nie zaobserwowano jednak istotnych zależności pomiędzy poszczególnymi ASV. Przy użyciu metody NMDS porównano mikrobiom w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz nasilenia objawów ME/CFS, ocenionych na podstawie skali FSS i FIS, i wykazano zależność między tymi parametrami, a mikrobiomem stolca porównywanych grup.

Wnioski:

1. Wykazano istotnie statystycznie wyższą alfa-różnorodność mikrobiomu stolca w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, rozumianą jako wyższą liczebność jednostek OTU. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie współczynników różnorodności oraz równomierności mikrobiomu stolca między grupą badaną, a kontrolną.
2. Wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie beta-różnorodności mikrobiomu stolca między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, przy wykorzystaniu PERMANOVY.
3. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie składu mikrobiomu stolca, w zależności od płci i wieku, między grupą badaną i kontrolną.
4. Zaobserwowano istotną zależność funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz nasilenia zmęczenia ze składem mikrobiomu stolca porównywanych grup.

VIII.2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Introduction:

Myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is a serious, debilitating disease, with periods of remission and exacerbation, that significantly impairs daily activity and reduces the quality of life of patients. The primary symptoms of ME/CFS include: chronic fatigue, post-exertional malaise (PEM), unrefreshing sleep, memory and concentration disorders, cognitive dysfunction, and symptoms of dysautonomia. Despite conducting many scientific studies on ME/CFS, the etiology and pathogenesis have not been elucidated yet, and there is no biological marker or causative treatment of this disease. One of the suggested causative factors is intestinal dysbiosis and the systemic response of the host's organism to the abnormal composition and functioning of the gut microbiome. The development of research methods based on the recognition of 16S rRNA gene sequences has made it possible to learn more details about the human microbiome. Relatively few studies on the composition of the gut microbiome of people with ME/CFS have been conducted, and the correlation between alternations in microbiome homeostasis and the progression of ME/CFS has not been clearly confirmed. Therefore, it becomes crucial issue to extend the knowledge about gut microbiome alterations in ME/CFS patients, which is important for better understanding the ME/CFS etiology and pathogenesis, and can contribute to improve its diagnosis and also become a potential starting point in the treatment of this disease.

Aims:

The aim of the present research study is to analyse the qualitative and quantitative composition of the gut microbiome in patients who suffer from ME/CFS. The study also assess the relation between the gut microbiome and the age and sex of patients, as well as the intensity of selected ME/CFS symptoms, the functioning of the autonomic nervous system and the cognitive functioning of patients. On the basis of the network analysis of gut microbiome for the network created on grounds of ASV, a comparison between the test and control groups is also conducted.

Material and methods:

The study was conducted from January 2018 to March 2019 in Bydgoszcz. Adult volunteers aged between 25 and 65 took part in the research project. Recruitment for the study was carried out in social media. Qualification was conducted among the volunteers and a group of 32 patients with confirmed ME/CFS was selected. 18 healthy people were included

in the control group. Finally, 27 patients from the study group and 15 from the control group gave their consent for stool test and delivered stool samples for testing. In all included patients, the intensity of fatigue symptoms was assessed, moreover, functional assessment of autonomic nervous system was carried out and cognitive functioning was evaluated. In order to analyse the gut microbiome, method of fragment sequencing of 16S rRNA genes was used. Statistical analysis of obtained parameters was performed.

Results:

The analysis of the quantitative composition of stool microbiome between ME/CFS and the control group, shows no statistically significant differences in terms of Shannon's diversity and uniformity indexes. The study has shown that patients with ME/CFS are characterized by a significantly higher species richness of microbiome (understood as a higher number of OTU's units) compared to the control group. When it comes to the qualitative composition of the stool microbiome, the analysis at all taxonomic levels between the study and control groups were performed, and the results show that: at the phyla level - lower abundance of *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* and rare phyla in the study group (patients with ME/CFS) compared to control group; at the classes level - higher abundance of *Bacteroidia* and lower abundance of *Negativicutes*, *Actinobacteria* and rare classes in the study group compared to the control group; at the orders level - higher abundance of *Bacteroidales*, and lower abundance of *Selenomonadales* and rare orders, in the ME/CFS patients compared to control group; at the families level - lower abundance of *Veillonellaceae* family and bacteria from rare families in ME/CFS patients than in control patients; at the genus level - greater abundance of *Bacteroides*, *Alistipes* and *Ruminococcaceae* in ME/CFS patients compared to control group. The qualitative composition of stool was also compared between the test and control groups on the basis of ASV sequences and the results show that the most characteristic for ME/CFS patients are the following variants of the ASV sequences: ASV121 (*Alistipes*), ASV147 (*Odoribacter*) and ASV180 (*Ruminococcaceae*), while for the control group: ASV 135 (*Lachnospiraceae*), ASV155 (*Christensenellaceae*) and ASV310 (*Lachnospira*). Significant differences demonstrated by using complexity reduction methods (sPLS-DA and NMDS) were observed between the stool microbiome in the group of ME/CFS patients compared to the control group. There were no statistically significant differences in the composition of the stool microbiome depending on sex and age between the test and control groups. The stool microbiome of patients in the test and control groups was classified with the machine learning

methods using for this purpose: neural network models, random classification tree and support vector machine, and the obtained results were below the clinically significant values. A network analysis was conducted for a network created on the basis of ASV sequences in the ME/CFS group compared to the control group, but no significant relations between individual ASVs were observed. Using the NMDS method, the microbiome in the group of patients with ME/CFS and in the control group was compared depending on the functioning of the autonomic nervous system, cognitive functioning and the intensity of ME/CFS symptoms, assessed on the basis of the FSS and FIS scales, and the correlation between these parameters and the stool microbiome of the compared groups was demonstrated.

Conclusions:

1. A statistically significant higher alpha-diversity of the stool microbiome was demonstrated in the group of patients with ME/CFS compared to the control group, understood as a higher number of OUT's units. There were no statistically significant differences in the Shannon's diversity and uniformity index of the stool microbiome between the study group and the control group.
2. Statistically significant differences in the beta-diversity of the stool microbiome between patients with ME/CFS and the control group using PERMANOVA were demonstrated.
3. There were no statistically significant differences in the composition of the stool microbiome depending on gender and age between the study group and the control group.
4. A significant correlation between the functioning of the autonomic nervous system, cognitive functioning and the level of fatigue with the composition of the stool microbiome of the compared groups was observed.

IX. PIŚMIENICTWO

1. Lupo GFD, Rocchetti G, Lucini L, Lorusso L, Manara E, Bertelli M, i in. Potential role of microbiome in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis (CFS/ME). *Sci Rep.* 2021;11:7043.
2. Clayton EW. Beyond myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: an IOM report on redefining an illness. *Jama.* 2015;313:1101–2.
3. Shepherd C, Chaudhuri A. ME/CFS/PVFS—An Exploration of the Clinical Issues, The ME Association’s clinical and research guide. *ME Assoc.* 2022;
4. Guideline NG206 N. Myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy)/chronic fatigue syndrome: diagnosis and management [Internet]. *Methods.* 2021. Pobrano z: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg53/chapter/Introduction>
5. Bsted AC, Marshall LM. Review of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: an evidence-based approach to diagnosis and management by clinicians. *Rev Environ Health.* 2015;30:223–49.
6. Sullivan PF, Evengård B, Jacks A, Pedersen NL. Twin analyses of chronic fatigue in a Swedish national sample. *Psychol Med.* 2005;35:1327–36.
7. KUROWSKI M, KUNA P. Zespół przewlekłego zmęczenia. *Alerg Astma Immunolo.*
8. Jason LA, Evans M, Brown A, Sunnquist M, Newton JL. Chronic fatigue syndrome versus sudden onset myalgic encephalomyelitis. *J Prev Interv Community.* 2015;43:62–77.
9. Gilliam AG. Epidemiological study of an epidemic, diagnosed as poliomyelitis, occurring among the personnel of the Los Angeles County General Hospital during the summer of 1934. *US Government Printing Office;* 1938.
10. Hyde BM. The nightingale definition of myalgic encephalomyelitis (ME) *The Nightingale Research Foundation.* *Ott Ont Can.* 2007;
11. Ramsay AM. ‘Epidemic neuromyasthenia’ 1955-1978. *Postgrad Med J.* 1978;54:718–21.
12. Cortes Rivera M, Mastronardi C, Silva-Aldana CT, Arcos-Burgos M, Lidbury BA. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a comprehensive review. *Diagnostics.* 2019;9:91.
13. van der Meer JW, Lloyd AR. A controversial consensus—comment on article by Broderick et al. *J Intern Med.* 2011;271:29–31.
14. Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, Komaroff AL, Schonberger LB, Straus SE, i in. Chronic fatigue syndrome: a working case definition. *Ann Intern Med.* 1988;108:387–9.
15. Tyrrel DA. Report from the National Task Force on Chronic Fatigue Syndrome (CFS)/Post Viral Fatigue Syndrome (PVMS)/Myalgic Encephalomyelitis (ME): An Initiative of the Registered Charity Westcare, Supported by the Department of Health and with Financial Assistance from the Wellcome Trust. *Westcare.* 1994;96–8.
16. Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A, i in. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *Ann Intern Med.* 1994;121:953–9.

17. Brurberg KG, Fønhus MS, Larun L, Flottorp S, Malterud K. Case definitions for chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME): a systematic review. *BMJ Open*. 2014;4:e003973.
18. Nacul LC, Lacerda EM, Pheby D, Champion P, Molokhia M, Fayyaz S, i in. Prevalence of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) in three regions of England: a repeated cross-sectional study in primary care. *BMC Med*. 2011;9:1–12.
19. Jason LA, Richman JA, Rademaker AW, Jordan KM, Plioplys AV, Taylor RR, i in. A community-based study of chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med*. 1999;159:2129–37.
20. Słomko J, Newton JL, Kujawski S, Tafil-Klawe M, Klawe J, Staines D, i in. Prevalence and characteristics of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) in Poland: A cross-sectional study. *BMJ Open*. 2019;9:e023955.
21. Walsh CM, Zainal NZ, Middleton SJ, Paykel ES. A family history study of chronic fatigue syndrome. *Psychiatr Genet*. 2001;11:123–8.
22. Buchwald D, Herrell R, Ashton S, Belcourt M, Schmaling K, Sullivan P, i in. A twin study of chronic fatigue. *Psychosom Med*. 2001;63:936–43.
23. Reynolds KJ, Vernon SD, Bouchery E, Reeves WC. The economic impact of chronic fatigue syndrome. *Cost Eff Resour Alloc*. 2004;2:1–9.
24. Griffith JP, Zarrouf FA. A systematic review of chronic fatigue syndrome: don't assume it's depression. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2008;10:120.
25. Cairns R, Hotopf M. A systematic review describing the prognosis of chronic fatigue syndrome. *Occup Med*. 2005;55:20–31.
26. Lewis I, Pairman J, Spickett G, Newton JL. Is chronic fatigue syndrome in older patients a different disease?—a clinical cohort study. *Eur J Clin Invest*. 2013;43:302–8.
27. McManimen SL, Devendorf AR, Brown AA, Moore BC, Moore JH, Jason LA. Mortality in patients with myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome. *Fatigue Biomed Health Behav*. 2016;
28. Nacul L, O'Boyle S, Palla L, Nacul FE, Mudie K, Kingdon CC, i in. How myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) progresses: the natural history of ME/CFS. *Front Neurol*. 2020;826.
29. Bitner A, Klawe JJ, Zalewski P, Tafil-Klawe M. Etiologia zespołu przewlekłego zmęczenia z uwzględnieniem zaburzeń funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego [Etiology of chronic fatigue syndrome with reference to the autonomic nervous system dysfunction]. *Probl Hig Epidemiol*. 2013;94:6–8.
30. Smith J, Fritz EL, Kerr JR, Cleare AJ, Wessely S, Matthey DL. Association of chronic fatigue syndrome with human leucocyte antigen class II alleles. *J Clin Pathol*. 2005;58:860–3.
31. Gow JW, Hagan S, Herzyk P, Cannon C, Behan PO, Chaudhuri A. A gene signature for post-infectious chronic fatigue syndrome. *BMC Med Genomics*. 2009;2:1–11.
32. Kerr JR, Petty R, Burke B, Gough J, Fear D, Sinclair LI, i in. Gene expression subtypes in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *J Infect Dis*. 2008;197:1171–84.

33. Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, i in. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *Bmj*. 2006;333:575.
34. Katz BZ, Shiraishi Y, Mears CJ, Binns HJ, Taylor R. Chronic fatigue syndrome after infectious mononucleosis in adolescents. *Pediatrics*. 2009;124:189–93.
35. Kerr JR, Coyle PV, DeLeys RJ, Patterson CC. Follow-up study of clinical and immunological findings in patients presenting with acute parvovirus B19 infection. *J Med Virol*. 1996;48:68–75.
36. Kerr JR, Barah F, Matthey DL, Laing I, Hopkins SJ, Hutchinson IV, i in. Circulating tumour necrosis factor- α and interferon- γ are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. *J Gen Virol*. 2001;82:3011–9.
37. Fremont M, Metzger K, Rady H, Hulstaert J, De Meirleir K. Detection of herpesviruses and parvovirus B19 in gastric and intestinal mucosa of chronic fatigue syndrome patients. *In Vivo*. 2009;23:209–13.
38. Chapenko S, Krumina A, Logina I, Rasa S, Chistjakovs M, Sultanova A, i in. Association of active human herpesvirus-6,-7 and parvovirus b19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Adv Virol*. 2012;2012.
39. Magnus P, Gunnes N, Tveito K, Bakken IJ, Ghaderi S, Stoltenberg C, i in. Chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) is associated with pandemic influenza infection, but not with an adjuvanted pandemic influenza vaccine. *Vaccine*. 2015;33:6173–7.
40. Shepherd C. Post COVID-19 Fatigue, Post/Long Covid-19 Syndromes and Post-Covid ME/CFS. 2020.
41. Chu L, Valencia IJ, Garvert DW, Montoya JG. Onset patterns and course of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Front Pediatr*. 2019;12.
42. Heim C, Nater UM, Maloney E, Boneva R, Jones JF, Reeves WC. Childhood trauma and risk for chronic fatigue syndrome: association with neuroendocrine dysfunction. *Arch Gen Psychiatry*. 2009;66:72–80.
43. Nater UM, Maloney E, Heim C, Reeves WC. Cumulative life stress in chronic fatigue syndrome. *Psychiatry Res*. 2011;189:318–20.
44. Harvey SB, Wadsworth M, Wessely S, Hotopf M. The relationship between prior psychiatric disorder and chronic fatigue: evidence from a national birth cohort study. *Psychol Med*. 2008;38:933–40.
45. Hotopf M, Noah N, Wessely S. Chronic fatigue and minor psychiatric morbidity after viral meningitis: a controlled study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;60:504–9.
46. Kerr JR. Epstein-Barr Virus Induced Gene-2 Upregulation Identifies a Particular Subtype of Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *Front Pediatr*. 2019;7:59.
47. Stringer EA, Baker KS, Carroll IR, Montoya JG, Chu L, Maecker HT, i in. Daily cytokine fluctuations, driven by leptin, are associated with fatigue severity in chronic fatigue syndrome: evidence of inflammatory pathology. *J Transl Med*. 2013;11:1–11.

48. Esfandyarpour R, Kashi A, Nemat-Gorgani M, Wilhelmy J, Davis RW. A nanoelectronics-blood-based diagnostic biomarker for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116:10250–7.
49. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G. Immunological aspects of chronic fatigue syndrome. *Autoimmun Rev*. 2009;8:287–91.
50. Hornig M, Gottschalk CG, Eddy ML, Che X, Ukaigwe JE, Peterson DL, i in. Immune network analysis of cerebrospinal fluid in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome with atypical and classical presentations. *Transl Psychiatry*. 2017;7:e1080–e1080.
51. Montoya JG, Holmes TH, Anderson JN, Maecker HT, Rosenberg-Hasson Y, Valencia IJ, i in. Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114:E7150–8.
52. Moneghetti KJ, Skhiri M, Contrepolis K, Kobayashi Y, Maecker H, Davis M, i in. Value of circulating cytokine profiling during submaximal exercise testing in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Sci Rep*. 2018;8:2779.
53. Fletcher MA, Zeng XR, Barnes Z, Levis S, Klimas NG. Plasma cytokines in women with chronic fatigue syndrome. *J Transl Med*. 2009;7:1–8.
54. Russell L, Broderick G, Taylor R, Fernandes H, Harvey J, Barnes Z, i in. Illness progression in chronic fatigue syndrome: a shifting immune baseline. *BMC Immunol*. 2016;17:1–11.
55. Lutz L, Rohrhofer J, Zehetmayer S, Stingl M, Untersmayr E. Evaluation of Immune Dysregulation in an Austrian Patient Cohort Suffering from Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Biomolecules*. 2021;11:1359.
56. Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, Levis S, Hurwitz B, Antoni M, i in. Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26. *PloS One*. 2010;5:e10817.
57. Mandarano AH, Maya J, Giloteaux L, Peterson DL, Maynard M, Gottschalk CG, i in. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients exhibit altered T cell metabolism and cytokine associations. *J Clin Invest*. 2020;130:1491–505.
58. Blomberg J, Gottfries C-G, Elfaitouri A, Rizwan M, Rosén A. Infection elicited autoimmunity and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: an explanatory model. *Front Immunol*. 2018;229.
59. Chaudhuri A, Majeed T, Dinan T, Behan PO. Chronic fatigue syndrome: A disorder of central cholinergic transmission. *J Chronic Fatigue Syndr*. 1997;3:3–16.
60. Chaudhuri A, Condon BR, Gow JW, Brennan D, Hadley DM. Proton magnetic resonance spectroscopy of basal ganglia in chronic fatigue syndrome. *Neuroreport*. 2003;14:225–8.
61. Natelson BH, Weaver SA, Tseng C-L, Ottenweller JE. Spinal fluid abnormalities in patients with chronic fatigue syndrome. *Clin Vaccine Immunol*. 2005;12:52–5.
62. Natelson BH, Vu D, Coplan JD, Mao X, Blate M, Kang G, i in. Elevations of ventricular lactate levels occur in both chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *Fatigue Biomed Health Behav*. 2017;5:15–20.

63. Hornig M, Gottschalk G, Peterson DL, Knox KK, Schultz AF, Eddy ML, i in. Cytokine network analysis of cerebrospinal fluid in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Mol Psychiatry*. 2016;21:261–9.
64. Glassford JA. The neuroinflammatory etiopathology of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Front Physiol*. 2017;8:88.
65. Komaroff AL. Inflammation correlates with symptoms in chronic fatigue syndrome. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114:8914–6.
66. Nakatomi Y, Mizuno K, Ishii A, Wada Y, Tanaka M, Tazawa S, i in. Neuroinflammation in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: an 11C-(R)-PK11195 PET study. *J Nucl Med*. 2014;55:945–50.
67. Yamamoto S, Ouchi Y, Onoe H, Yoshikawa E, Tsukada H, Takahashi H, i in. Reduction of serotonin transporters of patients with chronic fatigue syndrome. *Neuroreport*. 2004;15:2571–4.
68. Yamato M, Kataoka Y. Fatigue sensation following peripheral viral infection is triggered by neuroinflammation: who will answer these questions? *Neural Regen Res*. 2015;10:203.
69. Shan ZY, Kwiatek R, Burnet R, Del Fante P, Staines DR, Marshall-Gradisnik SM, i in. Progressive brain changes in patients with chronic fatigue syndrome: a longitudinal MRI study. *J Magn Reson Imaging*. 2016;44:1301–11.
70. Shan ZY, Kwiatek R, Burnet R, Del Fante P, Staines DR, Marshall-Gradisnik SM, i in. Medial prefrontal cortex deficits correlate with unrefreshing sleep in patients with chronic fatigue syndrome. *NMR Biomed*. 2017;30:e3757.
71. Konturek S, Traczyk WZ, Trzebski A, Godlewski A. *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2007.
72. Newton JL, Okonkwo O, Sutcliffe K, Seth A, Shin J, Jones DEJ. Symptoms of autonomic dysfunction in chronic fatigue syndrome. *QJM Int J Med*. 2007;100:519–26.
73. Wyller VB, Godang K, Mørkrid L, Saul JP, Thaulow E, Walløe L. Abnormal thermoregulatory responses in adolescents with chronic fatigue syndrome: relation to clinical symptoms. *Pediatrics*. 2007;120:e129–37.
74. Wyller VB, Saul JP, Amlie JP, Thaulow E. Sympathetic predominance of cardiovascular regulation during mild orthostatic stress in adolescents with chronic fatigue. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2007;27:231–8.
75. Wyller VB, Barbieri R, Saul JP. Blood pressure variability and closed-loop baroreflex assessment in adolescent chronic fatigue syndrome during supine rest and orthostatic stress. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111:497–507.
76. Van Cauwenbergh D, Nijs J, Kos D, Van Weijnen L, Struyf F, Meeus M. Malfunctioning of the autonomic nervous system in patients with chronic fatigue syndrome: a systematic literature review. *Eur J Clin Invest*. 2014;44:516–26.
77. Tanaka M, Tajima S, Mizuno K, Ishii A, Konishi Y, Miike T, i in. Frontier studies on fatigue, autonomic nerve dysfunction, and sleep-rhythm disorder. *J Physiol Sci*. 2015;65:483–98.

78. Boneva RS, Decker MJ, Maloney EM, Lin J-M, Jones JF, Helgason HG, i in. Higher heart rate and reduced heart rate variability persist during sleep in chronic fatigue syndrome: a population-based study. *Auton Neurosci*. 2007;137:94–101.
79. Orjatsalo M, Alakuijala A, Partinen M. Autonomic nervous system functioning related to nocturnal sleep in patients with chronic fatigue syndrome compared to tired controls. *J Clin Sleep Med*. 2018;14:163–71.
80. Kemp J, Sunnquist M, Jason LA, Newton JL. Autonomic dysfunction in myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome: comparing self-report and objective measures. *Clin Auton Res*. 2019;29:475–7.
81. van Campen CL, Rowe PC, Verheugt FW, Visser FC. Cognitive function declines following orthostatic stress in adults with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Front Neurosci*. 2020;14:688.
82. Martínez-Martínez L-A, Mora T, Vargas A, Fuentes-Iniestra M, Martínez-Lavín M. Sympathetic nervous system dysfunction in fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, irritable bowel syndrome, and interstitial cystitis: a review of case-control studies. *JCR J Clin Rheumatol*. 2014;20:146–50.
83. Komaroff AL, Cho TA. Role of infection and neurologic dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Semin Neurol*. \copyright Thieme Medical Publishers; 2011. s. 325–37.
84. Tak LM, Cleare AJ, Ormel J, Manoharan A, Kok IC, Wessely S, i in. Meta-analysis and meta-regression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in functional somatic disorders. *Biol Psychol*. 2011;87:183–94.
85. Torres-Harding S, Sorenson M, Jason L, Reynolds N, Brown M, Maher K, i in. The associations between basal salivary cortisol and illness symptomatology in chronic fatigue syndrome. *J Appl Biobehav Res*. 2008;13:157–80.
86. Nijhof SL, Rutten JM, Uiterwaal CS, Bleijenberg G, Kimpen JL, van de Putte EM. The role of hypocortisolism in chronic fatigue syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;42:199–206.
87. Morris G, Anderson G, Maes M. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Hypofunction in Myalgic Encephalomyelitis (ME)/Chronic Fatigue Syndrome (CFS) as a Consequence of Activated Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Pathways. *Mol Neurobiol*. 2017;54:6806–19.
88. Tanriverdi F, Karaca Z, Unluhizarci K, Kelestimur F. The hypothalamo–pituitary–adrenal axis in chronic fatigue syndrome and fibromyalgia syndrome. *Stress*. 2007;10:13–25.
89. Jones DEJ, Hollingsworth KG, Taylor R, Blamire AM, Newton JL. Abnormalities in pH handling by peripheral muscle and potential regulation by the autonomic nervous system in chronic fatigue syndrome. *J Intern Med*. 2010;267:394–401.
90. Jones DEJ, Hollingsworth KG, Jakovljevic DG, Fattakhova G, Pairman J, Blamire AM, i in. Loss of capacity to recover from acidosis on repeat exercise in chronic fatigue syndrome: a case-control study. *Eur J Clin Invest*. 2012;42:186–94.
91. Fluge Ø, Mella O, Bruland O, Risa K, Dyrstad SE, Alme K, i in. Metabolic profiling indicates impaired pyruvate dehydrogenase function in myalgic encephalopathy/chronic fatigue syndrome. *JCI Insight*. 2016;1.

92. Lien K, Johansen B, Veierød MB, Haslestad AS, Bøhn SK, Melsom MN, i in. Abnormal blood lactate accumulation during repeated exercise testing in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Physiol Rep*. 2019;7:e14138.
93. Tomas C, Brown A, Strassheim V, Elson J, Newton J, Manning P. Cellular bioenergetics is impaired in patients with chronic fatigue syndrome. *PLoS One*. 2017;12:e0186802.
94. Lawson N, Hsieh C-H, March D, Wang X. Elevated energy production in chronic fatigue syndrome patients. *J Nat Sci*. 2016;2.
95. Collin SM, Nikolaus S, Heron J, Knoop H, White PD, Crawley E. Chronic fatigue syndrome (CFS) symptom-based phenotypes in two clinical cohorts of adult patients in the UK and The Netherlands. *J Psychosom Res*. 2016;81:14–23.
96. Wilson A, Hickie I, Hadzi-Pavlovic D, Wakefield D, Parker G, Straus SE, i in. What is chronic fatigue syndrome? Heterogeneity within an international multicentre study. *Aust N Z J Psychiatry*. 2001;35:520–7.
97. Słomko J, Estévez-López F, Kujawski S, Zawadka-Kunikowska M, Tafil-Klawe M, Klawe JJ, i in. Autonomic phenotypes in chronic fatigue syndrome (CFS) are associated with illness severity: a cluster analysis. *J Clin Med*. 2020;9:2531.
98. Nisenbaum R, Reyes M, Unger ER, Reeves WC. Factor analysis of symptoms among subjects with unexplained chronic fatigue. *J Psychosom Res*. 2004;56:171–8.
99. Brown A, Jason LA. Meta-analysis investigating post-exertional malaise between patients and controls. *J Health Psychol*. 2020;25:2053–71.
100. McManimen SL, Jason LA. Post-exertional malaise in patients with ME and CFS with comorbid fibromyalgia. *SRL Neurol Neurosurg*. 2017;3:22.
101. Holtzman CS, Bhatia S, Cotler J, Jason LA. Assessment of post-exertional malaise (PEM) in patients with myalgic encephalomyelitis (ME) and chronic fatigue syndrome (CFS): a patient-driven survey. *Diagnostics*. 2019;9:26.
102. Robinson LJ, Durham J, MacLachlan LL, Newton JL. Autonomic function in chronic fatigue syndrome with and without painful temporomandibular disorder. *Fatigue Biomed Health Behav*. 2015;3:205–19.
103. Lewis I, Pairman J, Spickett G, Newton JL. Clinical characteristics of a novel subgroup of chronic fatigue syndrome patients with postural orthostatic tachycardia syndrome. *J Intern Med*. 2013;273:501–10.
104. Capelli E, Zola R, Lorusso L, Venturini L, Sardi F, Ricevuti G. Chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23:981–9.
105. Van Ness JM, Snell CR, Stevens SR, Stiles TL. Metabolic and neurocognitive responses to an exercise challenge in CFS. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39.
106. De Becker P, McGregor N, De Meirleir K. A definition-based analysis of symptoms in a large cohort of patients with chronic fatigue syndrome. *J Intern Med*. 2001;250:234–40.

107. Jason LA, Sunnquist M, Brown A, Evans M, Vernon SD, Furst JD, i in. Examining case definition criteria for chronic fatigue syndrome and myalgic encephalomyelitis. *Fatigue Biomed Health Behav.* 2014;2:40–56.
108. Qanneta R. Obstructive sleep apnea syndrome manifested as a subset of chronic fatigue syndrome: a comorbidity or an exclusion criterion? *Rheumatol Int.* 2014;34:441–2.
109. Reeves WC, Heim C, Maloney EM, Youngblood LS, Unger ER, Decker MJ, i in. Sleep characteristics of persons with chronic fatigue syndrome and non-fatigued controls: results from a population-based study. *BMC Neurol.* 2006;6:1–8.
110. Carruthers BM, van de Sande MI, De Meirleir KL, Klimas NG, Broderick G, Mitchell T, i in. Myalgic encephalomyelitis: international consensus criteria. *J Intern Med.* 2011;270:327–38.
111. Nijs J, Crombez G, Meeus M, Knoop H, Van Damme S, Van Cauwenbergh D, i in. Pain in patients with chronic fatigue syndrome: time for specific pain treatment? *Pain Physician.* 2012;15:E677–86.
112. Winger A, Kvarstein G, Wyller VB, Sulheim D, Fagermoen E, Småstuen MC, i in. Pain and pressure pain thresholds in adolescents with chronic fatigue syndrome and healthy controls: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2014;4:e005920.
113. Rowell LB. Human circulation. *Regul Phys Stress.* 1986;
114. Van Oosterwijk J, Marusic U, De Wandele I, Paul L, Meeus M, Moorkens G, i in. The role of autonomic function in exercise-induced endogenous analgesia: a case-control study in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and healthy people. *Pain Physician.* 2017;20:E389–99.
115. Fondell E, Axelsson J, Franck K, Ploner A, Lekander M, Bälter K, i in. Short natural sleep is associated with higher T cell and lower NK cell activities. *Brain Behav Immun.* 2011;25:1367–75.
116. Burnet RB, Chatterton BE. Gastric emptying is slow in chronic fatigue syndrome. *BMC Gastroenterol.* 2004;4:1–4.
117. Tran MTD, Arendt-Nielsen L, Kupers R, Elberling J. Multiple chemical sensitivity: on the scent of central sensitization. *Int J Hyg Environ Health.* 2013;216:202–10.
118. Castro-Marrero J, Faro M, Aliste L, Sáez-Francàs N, Calvo N, Martínez-Martínez A, i in. Comorbidity in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a nationwide population-based cohort study. *Psychosomatics.* 2017;58:533–43.
119. Asprusten TT, Fagermoen E, Sulheim D, Skovlund E, Sørensen Ø, Mollnes TE, i in. Study findings challenge the content validity of the Canadian Consensus Criteria for adolescent chronic fatigue syndrome. *Acta Paediatr.* 2015;104:498–503.
120. Twisk FN. Accurate diagnosis of myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome based upon objective test methods for characteristic symptoms. *World J Methodol.* 2015;5:68.
121. Jason LA, Sunnquist M, Brown A, Evans M, Newton JL. Are Myalgic Encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome different illnesses? A preliminary analysis. *J Health Psychol.* 2016;21:3–15.
122. Bateman L, Bested AC, Bonilla HF, Chheda BV, Chu L, Curtin JM, i in. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: essentials of diagnosis and management. *Mayo Clin Proc. Elsevier;* 2021. s. 2861–78.

123. Nacul L, Authier FJ, Scheibenbogen C, Lorusso L, Helland IB, Martin JA, i in. European Network on Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (EUROMENE): expert consensus on the diagnosis, service provision, and care of people with ME/CFS in Europe. *Medicina (Mex)*. 2021;57:510.
124. Carruthers BM, Jain AK, De Meirleir KL, Peterson DL, Klimas NG, Lerner AM, i in. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: clinical working case definition, diagnostic and treatment protocols. *J Chronic Fatigue Syndr*. 2003;11:7–115.
125. Abbi B, Natelson B. Is chronic fatigue syndrome the same illness as fibromyalgia: evaluating the ‘single syndrome’ hypothesis. *QJM Int J Med*. 2013;106:3–9.
126. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles M-A, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, i in. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res*. 2010;62:600–10.
127. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles M-A, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RS, i in. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol*. 2011;38:1113–22.
128. Stewart JM. Common syndromes of orthostatic intolerance. *Pediatrics*. 2013;131:968–80.
129. Nagy-Szakal D, Williams BL, Mishra N, Che X, Lee B, Bateman L, i in. Fecal metagenomic profiles in subgroups of patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Microbiome*. 2017;5:1–17.
130. Berstad A, Hauso O, Berstad K, Berstad JE. From IBS to ME—the dysbiotic march hypothesis. *Med Hypotheses*. 2020;140:109648.
131. Aaron LA, Herrell R, Ashton S, Belcourt M, Schmalting K, Goldberg J, i in. Comorbid clinical conditions in chronic fatigue: a co-twin control study. *J Gen Intern Med*. 2001;16:24–31.
132. Fisk JD, Ritvo PG, Ross L, Haase DA, Marrie TJ, Schlech WF. Measuring the functional impact of fatigue: initial validation of the fatigue impact scale. *Clin Infect Dis*. 1994;18:S79–83.
133. Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scale: application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol*. 1989;46:1121–3.
134. García-Campayo J, Pascual A, Alda M, Marzo J, Magallon R, Fortes S. The Spanish version of the FibroFatigue Scale: validation of a questionnaire for the observer’s assessment of fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Gen Hosp Psychiatry*. 2006;28:154–60.
135. Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T, Watts L, Wessely S, Wright D, i in. Development of a fatigue scale. *J Psychosom Res*. 1993;37:147–53.
136. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67:361–70.
137. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1961;4:561–71.
138. Sunnquist M, Lazarus S, Jason LA. The development of a short form of the DePaul Symptom Questionnaire. *Rehabil Psychol*. 2019;64:453.

139. Zajączkowski S, Zajączkowski M, Kosiński A, Grzybiak M, Wierzba TH. Ocena zmienności rytmu serca (HRV) w zaawansowanym wieku. Heart rate variability (HRV) analysis in advanced age. *Geriatrics*. 2014;232–9.
140. Pawlak-Buś K, Kołodziejczyk-Feliksik M, Czerwiński-Mazur P, Moczko J, Kramer L, others. Zmienność rytmu zatokowego-interpretacja patofizjologiczna i metodologia pomiarów. *Folia Cardiol*. 2003;10:719–26.
141. Zalewski P, Słomiński K, Klawe J, Tafil-Klawe M. Ocena czynnościowa autonomicznego układu nerwowego z użyciem systemu Task Force Monitor. *Acta Bio-Opt Inform Medica Inż Biomed*. 2008;14:228–34.
142. Miličević G. Low to high frequency ratio of heart rate variability spectra fails to describe sympatho-vagal balance in cardiac patients. *Coll Antropol*. 2005;29:295–300.
143. van Ravenswaaij-Arts CM, Kollee LA, Hopman JC, Stoeltinga GB, van Geijn HP. Heart rate variability. *Ann Intern Med*. 1993;118:436–47.
144. Frith J, Zalewski P, Klawe J, Pairman J, Bitner A, Tafil-Klawe M, i in. Impaired blood pressure variability in chronic fatigue syndrome—a potential biomarker. *QJM Int J Med*. 2012;105:831–8.
145. Sutcliffe K, Gray J, Tan M, Pairman J, Wilton K, Parry S, i in. Home orthostatic training in chronic fatigue syndrome—a randomized, placebo-controlled feasibility study. *Eur J Clin Invest*. 2010;40:18–24.
146. Bałkowiec-Iskra E, Niewada M. Zespół przewlekłego zmęczenia-postępy leczenia. *Przew Lek GPs*. 2002;5:16–22.
147. Kreijkamp-Kaspers S, Brenu EW, Marshall S, Staines D, Van Driel ML. Treating chronic fatigue syndrome: a study into the scientific evidence for pharmacological treatments. *Aust Fam Physician*. 2011;40:907–12.
148. Attree EA, Arroll MA, Dancey CP, Griffith C, Bansal AS. Psychosocial factors involved in memory and cognitive failures in people with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Psychol Res Behav Manag*. 2014;67–76.
149. Castro-Marrero J, Sáez-Francàs N, Santillo D, Alegre J. Treatment and management of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: all roads lead to Rome. *Br J Pharmacol*. 2017;174:345–69.
150. Clemons A, Vasiadi M, Kempuraj D, Kourelis T, Vantoros G, Theoharides TC. Amitriptyline and prochlorperazine inhibit proinflammatory mediator release from human mast cells: possible relevance to chronic fatigue syndrome. *J Clin Psychopharmacol*. 2011;31:385–7.
151. Thomas MA, Smith AP. An investigation of the long-term benefits of antidepressant medication in the recovery of patients with chronic fatigue syndrome. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2006;21:503–9.
152. Hornig M, Montoya JG, Klimas NG, Levine S, Felsenstein D, Bateman L, i in. Distinct plasma immune signatures in ME/CFS are present early in the course of illness. *Sci Adv*. 2015;1:e1400121.
153. Straus SE, Dale JK, Tobi M, Lawley T, Preble O, Blaese RM, i in. Acyclovir treatment of the chronic fatigue syndrome. Lack of efficacy in a placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1988;319:1692–8.

154. Watt T, Oberfoell S, Balise R, Lunn MR, Kar AK, Merrihew L, i in. Response to valganciclovir in chronic fatigue syndrome patients with human herpesvirus 6 and Epstein–Barr virus IgG antibody titers. *J Med Virol*. 2012;84:1967–74.
155. Montoya JG, Kogelnik AM, Bhangoo M, Lunn MR, Flamand L, Merrihew LE, i in. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy and safety of valganciclovir in a subset of patients with chronic fatigue syndrome. *J Med Virol*. 2013;85:2101–9.
156. Theoharides TC, Asadi S, Weng Z, Zhang B. Serotonin-selective reuptake inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs-important considerations of adverse interactions especially for the treatment of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J Clin Psychopharmacol*. 2011;31:403–5.
157. Degenhardt L, Gisev N, Cama E, Nielsen S, Larance B, Bruno R. The extent and correlates of community-based pharmaceutical opioid utilisation in Australia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2016;25:521–38.
158. Zou Y, Xue W, Luo G, Deng Z, Qin P, Guo R, i in. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. *Nat Biotechnol*. 2019;37:179–85.
159. Rup L. The human microbiome project. *Indian J Microbiol*. 2012;52:315.
160. Panasiuk A, Kowalińska J. *Mikrobiota przewodu pokarmowego*. wyd. 1. Warszawa: PZWL Wydawnictwo Lekarskie; 2019.
161. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 2016;164:337–40.
162. Panasiuk A. *Choroby infekcyjne przewodu pokarmowego*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2018.
163. D’Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta*. 2015;451:97–102.
164. Lederberg J, McCray AT. Ome SweetOmics—A genealogical treasury of words. *The scientist*. 2001;15:8–8.
165. Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, i in. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2005;360:1935–43.
166. Porter TM, Hajibabaei M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Mol Ecol*. 2018;27:313–38.
167. Eren AM, Maignien L, Sul WJ, Murphy LG, Grim SL, Morrison HG, i in. Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods Ecol Evol*. 2013;4:1111–9.
168. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017;11:2639–43.
169. Jeske JT, Gallert C. Microbiome Analysis via OTU and ASV-Based Pipelines—A Comparative Interpretation of Ecological Data in WWTP Systems. *Bioengineering*. 2022;9:146.
170. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, i in. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*. 2010;464:59–65.

171. Methé BA, Nelson KE, Pop M, Creasy HH, Giglio MG, Huttenhower C, i in. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012;486:215–21.
172. Woese CR, Fox GE, Zablen L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, i in. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*. 1975;254:83–6.
173. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, i in. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7:335–6.
174. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, i in. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:7537–41.
175. Meyer F, Paarmann D, D’Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, i in. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:1–8.
176. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:e177.
177. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, i in. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:4578–85.
178. Sharon I, Morowitz MJ, Thomas BC, Costello EK, Relman DA, Banfield JF. Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. *Genome Res*. 2013;23:111–20.
179. Stewart CJ, Marrs EC, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, Embleton ND, i in. Development of the preterm gut microbiome in twins at risk of necrotising enterocolitis and sepsis. *PLoS One*. 2013;8:e73465.
180. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol*. 2009;587:4153–8.
181. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;
182. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012;3:289–306.
183. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci*. 2017;59:201–6.
184. Marsh P. In sickness and in health—what does the oral microbiome mean to us? An ecological perspective. *Adv Dent Res*. 2018;29:60–5.
185. Di Pilato V, Freschi G, Ringressi MN, Pallecchi L, Rossolini GM, Bechi P. The esophageal microbiota in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1381:21–33.
186. Yu G, Torres J, Hu N, Medrano-Guzman R, Herrera-Goepfert R, Humphrys MS, i in. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:302.

187. Wurm P, Dörner E, Kremer C, Spranger J, Maddox C, Halwachs B, i in. Qualitative and quantitative DNA-and RNA-based analysis of the bacterial stomach microbiota in humans, mice, and gerbils. *Msystems*. 2018;3:e00262-18.
188. Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Dore J, Pochart P, i in. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:18–23.
189. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83:460–9.
190. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28:9–17.
191. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, i in. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15718–23.
192. Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2002;123:1972–9.
193. Lakhan SE, Kirchgessner A. Gut inflammation in chronic fatigue syndrome. *Nutr Metab*. 2010;7:1–10.
194. De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16:515–31.
195. Parthasarathy G, Chen J, Chen X, Chia N, O'Connor HM, Wolf PG, i in. Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic constipation. *Gastroenterology*. 2016;150:367–79.
196. Wahlström A, Sayin SI, Marschall H-U, Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab*. 2016;24:41–50.
197. Wierzchanowska WM, Iwanicki T. Rola mikrobiomu jelitowego w funkcjonowaniu układu nerwowego. *Kosmos*. 2020;69:301–11.
198. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, i in. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490:55–60.
199. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, i in. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341:1241214.
200. Labus JS, Hollister EB, Jacobs J, Kirbach K, Oezguen N, Gupta A, i in. Differences in gut microbial composition correlate with regional brain volumes in irritable bowel syndrome. *Microbiome*. 2017;5:49.
201. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, i in. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55:205–11.
202. Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, Eusebi LH, Iughetti L, Ravaioli F, i in. Gut microbiota and celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61:1461–72.

203. Hevia A, Milani C, López P, Cuervo A, Arbolea S, Duranti S, i in. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio*. 2014;5:e01548-14.
204. Wu S, Rhee K-J, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen H-R, i in. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 2009;15:1016–22.
205. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, i in. Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015;30:350–8.
206. Zhuang Z-Q, Shen L-L, Li W-W, Fu X, Zeng F, Gui L, i in. Gut microbiota is altered in patients with Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;63:1337–46.
207. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, i in. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010;16:444–53.
208. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, i in. Gut microbiome alterations in Alzheimer’s disease. *Sci Rep*. 2017;7:13537.
209. Frémont M, Coomans D, Massart S, De Meirleir K. High-throughput 16S rRNA gene sequencing reveals alterations of intestinal microbiota in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients. *Anaerobe*. 2013;22:50–6.
210. Shukla SK, Cook D, Meyer J, Vernon SD, Le T, Clevidence D, i in. Changes in gut and plasma microbiome following exercise challenge in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *PLoS One*. 2015;10:e0145453.
211. Giloteaux L, Goodrich JK, Walters WA, Levine SM, Ley RE, Hanson MR. Reduced diversity and altered composition of the gut microbiome in individuals with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Microbiome*. 2016;4:1–12.
212. Giloteaux L, Hanson MR, Keller BA. A pair of identical twins discordant for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome differ in physiological parameters and gut microbiome composition. *Am J Case Rep*. 2016;17:720.
213. Wang T, Yu L, Xu C, Pan K, Mo M, Duan M, i in. Chronic fatigue syndrome patients have alterations in their oral microbiome composition and function. *PLoS One*. 2018;13:e0203503.
214. Mandarano AH, Giloteaux L, Keller BA, Levine SM, Hanson MR. Eukaryotes in the gut microbiota in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *PeerJ*. 2018;6:e4282.
215. Kitami T, Fukuda S, Kato T, Yamaguti K, Nakatomi Y, Yamano E, i in. Deep phenotyping of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome in Japanese population. *Sci Rep*. 2020;10:19933.
216. Varesi A, Deumer U-S, Ananth S, Ricevuti G. The emerging role of gut microbiota in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): current evidence and potential therapeutic applications. *J Clin Med*. 2021;10:5077.
217. Armstrong CW, McGregor NR, Lewis DP, Butt HL, Gooley PR. The association of fecal microbiota and fecal, blood serum and urine metabolites in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Metabolomics*. 2017;13:1–13.

218. Ellis JE, Missan DS, Shabilla M, Martinez D, Fry SE. Microbial community profiling of peripheral blood in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Hum Microbiome J.* 2018;9:16–21.
219. Du Preez S, Corbitt M, Cabanas H, Eaton N, Staines D, Marshall-Gradisnik S. A systematic review of enteric dysbiosis in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Syst Rev.* 2018;7:1–12.
220. Sheedy JR, Wettenhall RE, Scanlon D, Gooley PR, Lewis DP, McGregor N, i in. Increased d-lactic acid intestinal bacteria in patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo.* 2009;23:621–8.
221. Scully P, McKernan DP, Keohane J, Groeger D, Shanahan F, Dinan TG, i in. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2010;105:2235–43.
222. Maes M, Mihaylova I, Leunis J-C. Increased serum IgA and IgM against LPS of enterobacteria in chronic fatigue syndrome (CFS): indication for the involvement of gram-negative enterobacteria in the etiology of CFS and for the presence of an increased gut–intestinal permeability. *J Affect Disord.* 2007;99:237–40.
223. Hietbrink F, Besselink MG, Renooij W, de Smet MB, Draisma A, van der Hoeven H, i in. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock.* 2009;32:374–8.
224. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011;
225. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:283–309.
226. Siniscalco D, Brigida AL, Antonucci N. Autism and neuro-immune-gut link. *AIMS Mol Sci.* 2018;5:166–72.
227. Lu R, Wang W, Uzzau S, Vigorito R, Zielke H, Fasano A. Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (Zot) receptor from human brain. *J Neurochem.* 2000;74:320–6.
228. Maes M, Twisk FN, Kubera M, Ringel K, Leunis J-C, Geffard M. Increased IgA responses to the LPS of commensal bacteria is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity in chronic fatigue syndrome. *J Affect Disord.* 2012;136:909–17.
229. Safadi JM, Quinton AM, Lennox BR, Burnet PW, Minichino A. Gut dysbiosis in severe mental illness and chronic fatigue: a novel trans-diagnostic construct? A systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2022;27:141–53.
230. Navaneetharaja N, Griffiths V, Wileman T, Carding SR. A role for the intestinal microbiota and virome in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS)? *J Clin Med.* 2016;5:55.
231. Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun.* 2003;17:13–9.
232. Zhu X, Han Y, Du J, Liu R, Jin K, Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget.* 2017;8:53829.

233. Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23:187–92.
234. Dinan TG, Cryan JF. The impact of gut microbiota on brain and behaviour: implications for psychiatry. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18:552–8.
235. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, i in. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One.* 2013;8:e78898.
236. Marvel CL, Paradiso S. Cognitive and neurological impairment in mood disorders. *Psychiatr Clin.* 2004;27:19–36.
237. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, i in. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology.* 2011;141:599–609.
238. Bercik P, Collins S, Verdu E. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24:405–13.
239. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, i in. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:16050–5.
240. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a010090.
241. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57:173–85.
242. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, i in. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6:263ra158-263ra158.
243. Iyer KR, Horslen S, Torres C, Vanderhoof J, Langnas A. Functional liver recovery parallels autologous gut salvage in short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 2004;39:340–4.
244. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, i in. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut.* 2011;60:307–17.
245. Chrobak A, Nowakowski J, Dudek D. Interactions between the gut microbiome and the central nervous system and their role in schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Arch Psychiatry Psychother.* 2016;18.
246. Maes M, Kubera M, Leunis J-C, Berk M, Geffard M, Bosmans E. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neoepitopes. *Acta Psychiatr Scand.* 2013;127:344–54.
247. Ait-Belgnaoui A, Durand H, Cartier C, Chaumaz G, Eutamene H, Ferrier L, i in. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37:1885–95.
248. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res.* 2008;43:164–74.

249. Schnorr SL. The diverse microbiome of the hunter-gatherer. *Nature*. 2015;518:S14–5.
250. Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced Intestina damage. *Curr Mol Med*. 2008;8:274–81.
251. Kanchanatawan B, Thika S, Anderson G, Galecki P, Maes M. Affective symptoms in schizophrenia are strongly associated with neurocognitive deficits indicating disorders in executive functions, visual memory, attention and social cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;80:168–76.
252. Reitan RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Percept Mot Skills*. 1958;8:271–6.
253. Kujawski S, Słomko J, Godlewska BR, Cudnoch-Jędrzejewska A, Murovska M, Newton JL, i in. Combination of whole body cryotherapy with static stretching exercises reduces fatigue and improves functioning of the autonomic nervous system in Chronic Fatigue Syndrome. *J Transl Med*. 2022;20:273.
254. Crowe SF. The differential contribution of mental tracking, cognitive flexibility, visual search, and motor speed to performance on parts A and B of the Trail Making Test. *J Clin Psychol*. 1998;54:585–91.
255. Kortte KB, Horner MD, Windham WK. The trail making test, part B: cognitive flexibility or ability to maintain set? *Appl Neuropsychol*. 2002;9:106–9.
256. Arbuthnott K, Frank J. Trail making test, part B as a measure of executive control: validation using a set-switching paradigm. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2000;22:518–28.
257. Thiem D, Gołębiewski M, Hulisz P, Piernik A, Hryniewicz K. How does salinity shape bacterial and fungal microbiomes of *Alnus glutinosa* roots? *Front Microbiol*. 2018;9:651.
258. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cytowane 24 kwiecień 2023]. Pobrano z: <https://www.r-project.org/>
259. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13:581–3.
260. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, i in. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2012;41:D590–6.
261. Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, i in. *vegan: Community Ecology Package* [Internet]. 2022 [cytowane 24 kwiecień 2023]. Pobrano z: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
262. Chen J, Zhang X, Yang L. *GUniFrac: Generalized UniFrac Distances, Distance-Based Multivariate Methods and Feature-Based Univariate Methods for Microbiome Data Analysis* [Internet]. 2022 [cytowane 24 kwiecień 2023]. Pobrano z: <https://cran.r-project.org/web/packages/GUniFrac/index.html>
263. *NMDS Tutorial in R* [Internet]. *sample(ECOLOGY)*. 2012 [cytowane 24 kwiecień 2023]. Pobrano z: <https://jonlefccheck.net/2012/10/24/nm-ds-tutorial-in-r/>

264. Lê Cao K-A, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:1–17.
265. Lee D, Lee W, Lee Y, Pawitan Y. Sparse partial least-squares regression and its applications to high-throughput data analysis. *Chemom Intell Lab Syst*. 2011;109:1–8.
266. Demšar J, Curk T, Erjavec A, Gorup Č, Hočevar T, Milutinovič M, i in. Orange: data mining toolbox in Python. *J Mach Learn Res*. 2013;14:2349–53.
267. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. 2010;5:1315–6.
268. Peschel S, Müller CL, von Mutius E, Boulesteix A-L, Depner M. NetCoMi: network construction and comparison for microbiome data in R. *Brief Bioinform*. 2021;22:bbaa290.
269. Newman ME. Modularity and community structure in networks. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:8577–82.
270. Costantini G, Perugini M. Generalization of clustering coefficients to signed correlation networks. *PLoS One*. 2014;9:e88669.
271. Ronhovde RK, Nussinov Z. An edge density definition of overlapping and weighted graph communities. *ArXiv Prepr ArXiv13013120*. 2013;
272. WU Jun MB. Natural Connectivity of Complex Networks. *Chin Phys Lett*. 2010;27:78902–078902.
273. Gabow HN. Using expander graphs to find vertex connectivity. *J ACM JACM*. 2006;53:800–44.
274. Zhang Q, Xu L, Yang W. Reliability analysis of the augmented cubes in terms of the extra edge-connectivity and the component edge-connectivity. *J Parallel Distrib Comput*. 2021;147:124–31.
275. netAnalyze: Microbiome Network Analysis in stefpeschel/NetCoMi: Network Construction and Comparison for Microbiome Data [Internet]. [cytowane 24 kwiecień 2023]. Pobrano z: <https://rdr.io/github/stefpeschel/NetCoMi/man/netAnalyze.html>
276. Stiller B, Franco M, Killer C, Rafati S, Rodrigues B, Scheid E, i in. *Communication Systems XIV*. Zürich, Switzerland: University of Zurich Department of Informatics (IFI); 2021.
277. Hansen D, Shneiderman B, Smith M, Himmelboim I. Social network analysis: Measuring, mapping, and modeling collections of connections. 2020. s. 31–51.
278. Jia Y, Lu V, Hoberock J, Garland M, Hart JC. Edge v. node parallelism for graph centrality metrics. *GPU Comput Gems Jade Ed*. Elsevier; 2012. s. 15–28.
279. Metcalf L, Casey W. *Cybersecurity and applied mathematics*. Syngress; 2016.
280. Smith MA, Shneiderman B, Milic-Frayling N, Mendes Rodrigues E, Barash V, Dunne C, i in. Analyzing (social media) networks with NodeXL. *Proc Fourth Int Conf Communities Technol*. 2009. s. 255–64.
281. Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim S-T, Weigel D, i in. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002352.

282. Morris G, Berk M, Galecki P, Maes M. The emerging role of autoimmunity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/cfs). *Mol Neurobiol*. 2014;49:741–56.
283. Fluge Ø, Bruland O, Risa K, Storstein A, Kristoffersen EK, Sapkota D, i in. Benefit from B-lymphocyte depletion using the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome. A double-blind and placebo-controlled study. *PLoS One*. 2011;6:e26358.
284. Gürçan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:10–25.
285. Skrzydło-Radomańska B, Wronecki J. Czy mikrobiotę jelitową można skutecznie modyfikować? *Gastroenterol Klin Postępy Stand*. 2018;10:123–34.
286. Yu RK, Usuki S, Ariga T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. *Infect Immun*. 2006;74:6517–27.
287. Ormstad H, Simonsen CS, Broch L, Maes M, Anderson G, Celius EG. Chronic fatigue and depression due to multiple sclerosis: Immune-inflammatory pathways, tryptophan catabolites and the gut-brain axis as possible shared pathways. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;46:102533.
288. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo AC, Rodriguez-Palacios A. The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front Immunol*. 2020;11:906.
289. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, i in. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012;12:611–22.
290. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:13780–5.
291. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, i in. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:16731–6.
292. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24:521–e248.
293. Jeffery IB, O’toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, i in. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*. 2012;61:997–1006.
294. Giamarellou-Bourboulis E, Tang J, Pylaris E, Pistiki A, Barbatzas C, Brown J, i in. Molecular assessment of differences in the duodenal microbiome in subjects with irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50:1076–87.
295. Krogsgaard LR, Lee O, Johannesen TB, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, i in. Characteristics of the bacterial microbiome in association with common intestinal parasites in irritable bowel syndrome. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9.
296. Ponnusamy K, Choi JN, Kim J, Lee S-Y, Lee CH. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J Med Microbiol*. 2011;60:817.

297. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8:1–11.
298. Shanahan F, Ghosh TS, O'Toole PW. The healthy microbiome—what is the definition of a healthy gut microbiome? *Gastroenterology.* 2021;160:483–94.
299. Shafquat A, Joice R, Simmons SL, Huttenhower C. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends Microbiol.* 2014;22:261–6.
300. Butt H, Dunstan R, McGregor N, Roberts T. Bacterial colonisation in patients with persistent fatigue. *Proc AHMF Int Clin Sci Conf.* 2001. s. 1–2.
301. Guo C, Che X, Briese T, Ranjan A, Allicock O, Yates RA, i in. Deficient butyrate-producing capacity in the gut microbiome is associated with bacterial network disturbances and fatigue symptoms in ME/CFS. *Cell Host Microbe.* 2023;31:288–304.
302. Syromyatnikov M, Nesterova E, Gladkikh M, Smirnova Y, Gryaznova M, Popov V. Characteristics of the Gut Bacterial Composition in People of Different Nationalities and Religions. *Microorganisms.* 2022;10:1866.
303. Jain A, Li XH, Chen WN. Similarities and differences in gut microbiome composition correlate with dietary patterns of Indian and Chinese adults. *AMB Express.* 2018;8:104.
304. Xu J, Lawley B, Wong G, Otal A, Chen L, Ying TJ, i in. Ethnic diversity in infant gut microbiota is apparent before the introduction of complementary diets. *Gut Microbes.* 2020;11:1362–73.
305. Tortora SC, Bodiwala VM, Quinn A, Martello LA, Vignesh S. Microbiome and colorectal carcinogenesis: Linked mechanisms and racial differences. *World J Gastrointest Oncol.* 2022;14:375–95.
306. Gantuya B, El Serag HB, Matsumoto T, Ajami NJ, Uchida T, Oyuntsetseg K, i in. Gastric mucosal microbiota in a Mongolian population with gastric cancer and precursor conditions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020;51:770–80.
307. Rautio M, Eerola E, Väisänen-Tunkelrott M-L, Molitoris D, Lawson P, Collins MD, i in. Reclassification of *Bacteroides putredinis* (Weinberg et al., 1937) in a New Genus *Alistipes* gen. nov., as *Alistipes putredinis* comb. nov., and Description of *Alistipes finegoldii* sp. nov., from Human Sources. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26:182–8.
308. Shkoporov A, Chaplin A, Khokhlova E, Shcherbakova V, Motuzova O, Bozhenko V, i in. Description of *Alistipes inops* sp. nov. and *Coprobacter secundus* sp. nov. isolated from human feces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65.
309. Rau M, Rehman A, Dittrich M, Groen AK, Hermanns HM, Seyfried F, i in. Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease. *United Eur Gastroenterol J.* 2018;6:1496–507.
310. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, Klepsch V, Adolph TE, Reider SJ, i in. Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host Microbe.* 2016;19:455–69.
311. Zuo K, Li J, Li K, Hu C, Gao Y, Chen M, i in. Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation. *GigaScience.* 2019;8:giz058.

312. Bangsgaard Bendtsen KM, Krych L, Sørensen DB, Pang W, Nielsen DS, Josefsen K, i in. Gut Microbiota Composition Is Correlated to Grid Floor Induced Stress and Behavior in the BALB/c Mouse. *PLoS ONE*. 2012;7:e46231.
313. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, i in. Randomised clinical trial: the beneficial effects of VSL# 3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:1276–85.
314. Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64:413–7.
315. Shao L, Ling Z, Chen D, Liu Y, Yang F, Li L. Disorganized Gut Microbiome Contributed to Liver Cirrhosis Progression: A Meta-Omics-Based Study. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [cytowane 29 maj 2023];9. Pobrano z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03166>
316. Sung CM, Lin Y, Chen K-F, Ke H, Huang H-Y, Gong Y-N, i in. Predicting Clinical Outcomes of Cirrhosis Patients With Hepatic Encephalopathy From the Fecal Microbiome. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;8:301-318.e2.
317. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, i in. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PloS One*. 2011;6:e25792.
318. Li J, Sung CYJ, Lee N, Ni Y, Pihlajamäki J, Panagiotou G, i in. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016 [cytowane 29 maj 2023];113. Pobrano z: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1518189113>
319. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, i in. Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science*. 2013;342:967–70.
320. Jie Z, Xia H, Zhong S-L, Feng Q, Li S, Liang S, i in. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun*. 2017;8:845.
321. Kim S, Goel R, Kumar A, Qi Y, Lobaton G, Hosaka K, i in. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2018;132:701–18.
322. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, i in. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2014;26:1155–62.
323. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, i in. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5:24.
324. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, i in. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PloS One*. 2013;8:e76993.
325. Dziarski R, Park SY, Kashyap DR, Dowd SE, Gupta D. Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PloS One*. 2016;11:e0146162.

326. Wolf PG, Kolossov V, Zhou Z, Ly L, Doden H, Devendran S, i in. Abstract 3342: The colorectal cancer associated microbe *Odoribacter splanchnicus* produces genotoxic hydrogen sulfide via cysteine metabolism. *Cancer Res.* 2020;80:3342.
327. Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, i in. Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects in vitro. *Front Microbiol.* 2020;11:575455.
328. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, i in. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13:R79.
329. Wang Y, Gao X, Ghoulane A, Hu H, Li X, Xiao Y, i in. Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *J Crohns Colitis.* 2018;12:337–46.
330. Hod K, Dekel R, Aviv Cohen N, Sperber A, Ron Y, Boaz M, i in. The effect of a multispecies probiotic on microbiota composition in a clinical trial of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 2018;30:e13456.
331. Brahe LK, Le Chatelier E, Prifti E, Pons N, Kennedy S, Hansen T, i in. Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. *Nutr Diabetes.* 2015;5:e159.
332. Etxeberria U, Hijona E, Aguirre L, Milagro FI, Bujanda L, Rimando AM, i in. Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61.
333. Lai Z-L, Tseng C-H, Ho HJ, Cheung CKY, Lin J-Y, Chen Y-J, i in. Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Sci Rep.* 2018;8:15625.
334. Walker A, Pfitzner B, Harir M, Schaubeck M, Calasan J, Heinzmann SS, i in. Sulfonolipids as novel metabolite markers of *Alistipes* and *Odoribacter* affected by high-fat diets. *Sci Rep.* 2017;7:11047.
335. Heaver SL, Johnson EL, Ley RE. Sphingolipids in host-microbial interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2018;43:92–9.
336. Park J, Kim N-E, Yoon H, Shin CM, Kim N, Lee DH, i in. Fecal Microbiota and Gut Microbe-Derived Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer. *Front Oncol [Internet].* 2021 [cytowane 30 maj 2023];11. Pobrano z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.650026>
337. Png C-W, Chua Y-K, Law J-H, Zhang Y, Tan K-K. Alterations in co-abundant bacteriome in colorectal cancer and its persistence after surgery: a pilot study. *Sci Rep.* 2022;12:9829.
338. Oh BS, Choi WJ, Kim J-S, Ryu SW, Yu SY, Lee J-S, i in. Cell-Free Supernatant of *Odoribacter splanchnicus* Isolated From Human Feces Exhibits Anti-colorectal Cancer Activity. *Front Microbiol [Internet].* 2021 [cytowane 30 maj 2023];12. Pobrano z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.736343>
339. Carstens A, Dicksved J, Nelson R, Lindqvist M, Andreasson A, Bohr J, i in. The Gut Microbiota in Collagenous Colitis Shares Characteristics With Inflammatory Bowel Disease-Associated Dysbiosis. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10:e00065.

340. Wang L, Liao Y, Yang R, Zhu Z, Zhang L, Wu Z, i in. An engineered probiotic secreting Sjl6 ameliorates colitis via Ruminococcaceae/butyrate/retinoic acid axis. *Bioeng Transl Med*. 2021;6:e10219.
341. Yu T, Ding Y, Qian D, Lin L, Tang Y. Characteristics of fecal microbiota in different constipation subtypes and association with colon physiology, lifestyle factors, and psychological status. *Ther Adv Gastroenterol*. 2023;16:17562848231154100.
342. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, i in. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 2015;48:186–94.
343. Askarova S, Umbayev B, Masoud A-R, Kaiyrylkyzy A, Safarova Y, Tsoy A, i in. The Links Between the Gut Microbiome, Aging, Modern Lifestyle and Alzheimer’s Disease. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 [cytowane 31 maj 2023];10. Pobrano z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00104>
344. Lee G. Distinct signatures of gut microbiome and metabolites associated with significant fibrosis in non-obese NAFLD.
345. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:1541–58.
346. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, i in. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013;62:1787–94.
347. Al-Hakeim HK, Abed AK, Moustafa SR, Almulla AF, Maes M. Tryptophan catabolites, inflammation, and insulin resistance as determinants of chronic fatigue syndrome and affective symptoms in Long COVID [Internet]. *Psychiatry and Clinical Psychology*; 2023 mar. Pobrano z: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.03.11.23287152>
348. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta T-A, Diaz M-A, Mandal D, Raza S, i in. GASTROINTESTINAL MICROBIOME SIGNATURES OF PEDIATRIC PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME. *Gastroenterology*. 2011;141:1782–91.
349. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, Pascua-García R, Santos J. A review of microbiota and irritable bowel syndrome: future in therapies. *Adv Ther*. 2018;35:289–310.
350. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, i in. Dynamics of the human gut microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *Nat Microbiol*. 2017;2:17004.
351. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. 2014;146:1489–99.
352. Minerbi A, Gonzalez E, Brereton NJB, Anjarkouchian A, Dewar K, Fitzcharles M-A, i in. Altered microbiome composition in individuals with fibromyalgia. *PAIN*. 2019;160:2589.
353. Marteau P, Doré J. Gut microbiota: An organ all its own. 2017;
354. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, i in. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;352:565–9.

355. Kabbani TA, Pallav K, Dowd SE, Villafuerte-Galvez J, Vanga RR, Castillo NE, i in. Prospective randomized controlled study on the effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and amoxicillin-clavulanate or the combination on the gut microbiota of healthy volunteers. *Gut Microbes*. 2017;8:17–32.
356. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, i in. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352:560–4.
357. Jiang D, Armour CR, Hu C, Mei M, Tian C, Sharpton TJ, i in. Microbiome multi-omics network analysis: statistical considerations, limitations, and opportunities. *Front Genet*. 2019;10:995.
358. Dominianni C, Sinha R, Goedert JJ, Pei Z, Yang L, Hayes RB, i in. Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS One*. 2015;10:e0124599.
359. Banasiewicz T, Paszkowski J, Borejsza-Wysocki M, Bobkiewicz A, Pietrzak A, Szczepkowski M, i in. Efficacy of combined prophylactic therapy (rifaximine alpha+ prebiotic arabinogalactan with lactoferrin) on GUT function in patients with diagnosed symptomatic uncomplicated diverticular disease. *Pol J Surg*. 2019;91:1–8.
360. Shanahan F, van Sinderen D, O'Toole PW, Stanton C. Feeding the microbiota: transducer of nutrient signals for the host. *Gut*. 2017;66:1709–17.
361. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3:213–23.
362. Snelson M, Clarke RE, Nguyen T-V, Penfold SA, Forbes JM, Tan SM, i in. Long term high protein diet feeding alters the microbiome and increases intestinal permeability, systemic inflammation and kidney injury in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65:2000851.
363. Do MH, Lee E, Oh M-J, Kim Y, Park H-Y. High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients*. 2018;10:761.
364. Nilholm C, Roth B, Ohlsson B. A dietary intervention with reduction of starch and sucrose leads to reduced gastrointestinal and extra-intestinal symptoms in IBS patients. *Nutrients*. 2019;11:1662.
365. Ott B, Skurk T, Hastreiter L, Lagkouvardos I, Fischer S, Büttner J, i in. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. *Sci Rep*. 2017;7:11955.
366. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, i in. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–63.
367. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, i in. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334:105–8.
368. Kaliannan K, Wang B, Li X-Y, Kim K-J, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep*. 2015;5:11276.
369. Puri B. The use of eicosapentaenoic acid in the treatment of chronic fatigue syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70:399–401.

370. Maes M, Leunis J-C. Normalization of leaky gut in chronic fatigue syndrome (CFS) is accompanied by a clinical improvement: effects of age, duration of illness and the translocation of LPS from gram-negative bacteria. *Neuroendocrinol Lett.* 2008;29:902.
371. Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R, i in. Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58:531–9.
372. Riddle MS, DuPont HL, Connor BA. ACG clinical guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2016;111:602–22.
373. Szajewska H, Canani RB, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, i in. Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;62:495–506.
374. Malfertheiner P, Megraud F, O’morain C, Gisbert J, Kuipers E, Axon A, i in. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut.* 2017;66:6–30.
375. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, i in. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2014;109:1547–61.
376. Hungin A, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, i in. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice—an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38:864–86.
377. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O’mahony L, i in. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2006;101:1581–90.
378. Ducrotté P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol WJG.* 2012;18:4012.
379. Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:1302–10.
380. Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, i in. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nat Commun.* 2013;4:2163.
381. Boudry G, Hamilton MK, Chichlowski M, Wickramasinghe S, Barile D, Kalanetra KM, i in. Bovine milk oligosaccharides decrease gut permeability and improve inflammation and microbial dysbiosis in diet-induced obese mice. *J Dairy Sci.* 2017;100:2471–81.
382. Yu T, Wang Y, Chen X, Xiong W, Tang Y, Lin L. *Spirulina platensis* alleviates chronic inflammation with modulation of gut microbiota and intestinal permeability in rats fed a high-fat diet. *J Cell Mol Med.* 2020;24:8603–13.
383. Zhang Z, Lin T, Meng Y, Hu M, Shu L, Jiang H, i in. FOS/GOS attenuates high-fat diet induced bone loss via reversing microbiota dysbiosis, high intestinal permeability and systemic inflammation in mice. *Metabolism.* 2021;119:154767.

384. Sullivan Å, Nord CE, Evengård B. Effect of supplement with lactic-acid producing bacteria on fatigue and physical activity in patients with chronic fatigue syndrome. *Nutr J*. 2009;8:4.
385. Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, i in. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog*. 2009;1:1–6.
386. Lavasani S, Dzhambazov B, Nouri M, Fåk F, Buske S, Molin G, i in. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS One*. 2010;5:e9009.
387. Corbitt M, Campagnolo N, Staines D, Marshall-Gradisnik S. A systematic review of probiotic interventions for gastrointestinal symptoms and irritable bowel syndrome in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME). *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018;10:466–77.
388. Cappello C, Tremolaterra F, Pascariello A, Ciacci C, Iovino P. A randomised clinical trial (RCT) of a symbiotic mixture in patients with irritable bowel syndrome (IBS): effects on symptoms, colonic transit and quality of life. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28:349–58.
389. Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, Popp K. Randomised clinical trial: Bifidobacterium bifidum MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:1123–32.
390. Kajander K, Hatakka K, Poussa T, Färkkilä M, Korpela R. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22:387–94.
391. Ringel-Kulka T, Palsson OS, Maier D, Carroll I, Galanko JA, Leyer G, i in. Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:518–25.
392. Abbas Z, Yakoob J, Jafri W, Ahmad Z, Azam Z, Usman MW, i in. Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26:630–9.
393. Pineton de Chambrun G, Neut C, Chau A, Cazaubiel M, Pelerin F, Justen P, i in. A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015;47:119–24.
394. Wallis A, Ball M, Butt H, Lewis DP, McKechnie S, Paull P, i in. Open-label pilot for treatment targeting gut dysbiosis in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: neuropsychological symptoms and sex comparisons. *J Transl Med*. 2018;16:1–16.
395. Venturini L, Bacchi S, Capelli E, Lorusso L, Ricevuti G, Cusa C, i in. Modification of immunological parameters, oxidative stress markers, mood symptoms, and well-being status in CFS patients after probiotic intake: observations from a pilot study. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
396. Groeger D, O'Mahony L, Murphy EF, Bourke JF, Dinan TG, Kiely B, i in. *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes*. 2013;4:325–39.
397. Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis*. 1984;16:211–5.

398. Leffler DA, Lamont JT. Clostridium difficile infection. *N Engl J Med*. 2015;372:1539–48.
399. Weingarden AR, Hamilton MJ, Sadowsky MJ, Khoruts A. Resolution of severe Clostridium difficile infection following sequential fecal microbiota transplantation. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47:735.
400. Kelly C, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, i in. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*. 2015;149:223–37.
401. Borody T. Bacteriotherapy for chronic fatigue syndrome: a long-term follow-up study. *CFS Natl Consens Conf*. 1995.
402. Borody TJ, Nowak A, Finlayson S. The GI microbiome and its role in chronic fatigue syndrome: a summary of bacteriotherapy. *J Australas Coll Nutr Environ Med*. 2012;31:3–8.
403. Kenyon J, Coe S, Izadi H. A retrospective outcome study of 42 patients with Chronic Fatigue Syndrome, 30 of whom had Irritable Bowel Syndrome. Half were treated with oral approaches, and half were treated with Faecal Microbiome Transplantation. *Hum Microbiome J*. 2019;13:100061.

X. SPIS TABEL

Tabela 1. Przebieg naturalny ME/CFS

Tabela 2. Potencjalne czynniki infekcyjne wywołujące ME/CFS

Tabela 3. Kryteria Fukudy 1994r.

Tabela 4. Kryteria ME/ICC 2011r.

Tabela 5. Kryteria *the Institute of Medicine* dla SEID 2015r.

Tabela 6. Różnicowanie ME/CFS

Tabela 7. Zmiany składu mikrobiomu jelitowego człowieka w ciągu życia

Tabela 8. Podsumowanie publikacji naukowych potwierdzających zmiany składu mikrobioty jelitowej w ME/CFS

Tabela 9. Parametry użyte do porównania sieci stworzonej na podstawie zależności pomiędzy poszczególnymi ASV w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy ME/CFS

Tabela 10. Porównanie grupy badanej i grupy kontrolnej

Tabela 11. Charakterystyka kliniczna pacjentów z ME/CFS

Tabela 12. Nasilenie symptomów ogółem w grupie CFS

Tabela 13. Porównanie wydajności trzech modeli klasyfikacyjnych pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej przy użyciu metod uczenia się maszynowego

Tabela 14. Matryca klasyfikacji pacjentów z grupy badanej i z grupy kontrolnej dla losowego drzewa klasyfikacyjnego

Tabela 15. Matryca klasyfikacji pacjentów z grupy badanej i z grupy kontrolnej dla maszyny wektorów nośnych

Tabela 16. Matryca klasyfikacji pacjentów i grupy kontrolnej dla sieci neuronowej

Tabela 17. Porównanie globalnych właściwości sieci dla grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Tabela 18. Porównanie globalnych właściwości sieci ME/CFS vs. grupa kontrolna

Tabela 19. Porównanie centralność bliskości (wartości nieznormalizowane)

Tabela 20. Wynik PERMANOVY dla efektu grupy i LF/HF-RRI

Tabela 21. Wynik PERMANOVY dla efektu grupy i TMT A

Tabela 22. Wynik PERMANOVY dla interakcji Grupa * FIS

Tabela 23. Wynik PERMANOVY dla interakcji Grupa * FSS

XI. SPIS RYCIN

Rycina 1. Hipotetyczny model patogenezы ME/CFS

Rycina 2. Warunki fizjologiczne i rozmieszczenie mikrobioty w przewodzie pokarmowym

Rycina 3. Wpływ mikrobiomu na zachowanie homeostazy organizmu człowieka

Rycina 4. Szlaki komunikacji na drodze osi mózgowo-jelitowej

Rycina 5. Rola dysbiozy jelitowej i zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej w patogenezie ME/CFS

Rycina 6. Mechanizmy oddziaływania na szlaku osi HPA

Rycina 7. Schemat badania

Rycina 8. Wskaźnik różnorodności Shannona.

Rycina 9. Wskaźnik równomierności Shannona.

Rycina 10. Porównanie grupowe zaobserwowanej liczebności OTU

Rycina 11. Ilość wspólnych (środek wykresu) oraz ilość różnych wariantów sekwencji ASV w mikrobiomie jelitowym w analizowanych grupach.

Rycina 12. A, B, C, D, E. Skład jakościowy mikrobiomu stolca z uwzględnieniem typów, klas, rzędów, rodzin i rodzajów

Rycina 13. Mapa ciepła

Rycina 14. Porównanie grupowe obfitości ASV w mikrobiomie jelit pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, przy użyciu metody sPLS-DA.

Rycina 15. Porównanie wag ładunków (ważności) poszczególnych wariantów sekwencji ASC w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rycina 16. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rycina 17. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na płeć.

Rycina 18. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontroli, z uwzględnieniem podziału na wiek.

Rycina 19. Porównanie wyników analizy sieciowej dla sieci stworzonej na podstawie zależności pomiędzy poszczególnymi ASV dla pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Rycina 20. Sieć różnicująca stworzonej na podstawie różnic w zależności pomiędzy poszczególnymi ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Rycina 21. Sieć ukazująca różnice w zależności pomiędzy ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej

Rycina 22. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału z uwagi na wartość parametru LF/HF-RRI.

Rycina 23. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wynik uzyskany przez pacjentów w teście TMT A.

Rycina 24. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wynik uzyskany przez pacjentów w skali FIS.

Rycina 25. Wynik analizy NMDS, która została przeprowadzona na nieważonej macierzy odległości UniFrac z tabeli i drzewa rozrzedzonego OTU, wśród pacjentów z grupy ME/CFS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na wynik uzyskany w skali FSS.

XII. ANEKS

XII.1. Wykaz skrótów

- ACTH – ang. *adrenocorticotropic hormone* - hormon adrenokortykotropowy, in. adrenokortykotropina
- AD – ang. *Alzheimer's disease* – choroba Alzheimerera
- AF - ang. *atrial fibrillation* - migotanie przedsionków
- ALT - aminotransferaza alaninowa
- APT - ang. *Adaptive Pacing Therapy* - terapię adaptacyjną
- ASV - ang. *amplicon sequence variant* - wariant sekwencji amplikonu
- ATP – adenozynotrifosforan
- AUC - ang. *Area Under The Curve* - obszar pod krzywą ROC
- AUN – autonomiczny układ nerwowy
- BBB - ang. *blood-brain barrier* - bariera krew-mózg
- BDI - ang. *Beck Depression Inventory* - Skala depresji Becka
- BDS - ang. *Bell Disability Scale* - Skala Niepełnosprawności Bella
- BPV - ang. *blood pressure variability* - zmienność ciśnienia tętniczego
- CBT - ang. *Cognitive Behavioural Therapy* - terapia poznawczo-behawioralna
- CC – ang. *chronic constipation* – przewlekłe zaparcie stolca
- CCC – ang. *Canadian Consensus Criteria* – kryteria kanadyjskie
- CDC – ang. *Center for Disease Control and Prevention* - Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób
- CD – ang. *Crohn's disease* – choroba Crohna
- CDI - ang. *Clostridioides difficile infection* - zakażenie *C. difficile*
- CF - ang. *cystic fibrosis* - mukowiscydoza
- CFS – ang. *chronic fatigue syndrome* – zespół przewlekłego zmęczenia
- CFU – ang. *colony forming unit* – jednostka tworząca kolonię
- CFQ - ang. *Chadler Fatigue Questionnaire* – Skala Oceny Zmęczenia Chadlera
- CMV – wirus cytomegalii
- COMPASS-31 – ang. *Composite Autonomic Symptom Score* – Skala Oceny Układu Autonomicznego
- contBP - urządzenie do ciągłego pomiaru ciśnienia krwi
- CPET – ang. *cardio-pulmonary exercise test* – test ergospirometryczny

CRC - ang. *colorectal cancer* - rak jelita grubego

CRH – ang. *corticotropin-releasin hormone* - hormon uwalniający kortykotropinę, in. kortykoliberyna

CRHR - ang. *corticotropin-releasing hormone receptor* – receptor wiążący kortykoliberynę

CVD - ang. *cardiovascular diseases* - choroby sercowo-naczyniowe

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DSS - dekstran siarczanu sodu

DSQ – ang. *DePaul Symptom Questionnaire* – Skala Nasilenia Symptomów DePaul’a

ENS - ang. *enteric nervous system* - wewnętrzny układ nerwowy jelit

EBV - wirus Epsteina-Barr

EKG - elektrokardiograf

FDA - ang. *Food and Drug Administration* - amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

FFS – ang. *FibroFatigue Scale* – skala FibroFatigue

FIS – ang. *Fatigue Impact Scale* - Skala Oceny Wpływu Zmęczenia

FSS - ang. *Fatigue Severity Scale* - Skala Oceny Nasilenie Zmęczenia

FM – ang. *fibromyalgy* – fibromialgia

FMT - ang. *fecal microbiota transplantation* - przeszczepienie mikrobioty jelitowej

FVAS - ang. *Fatigue Visual Analog Scale* - Analogowo-Wzrokową Skala Oceny Zmęczenia

GABA - kwas gamma-aminomasłowy

GALT - ang. *gut-associated lymphoid tissue* - tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego

GBA – ang. *gut-brain axis* – oś mózgowo-jelitowa

GES - ang. *guided graded exercise self-help* – terapia stopniowanym wysiłkiem fizycznym wykonywana samodzielnie w domu

GET - ang. *Graded Exercise Therapy* - terapia stopniowanym wysiłkiem fizycznym

GHA - ang. *gut-heart axis* - oś sercowo-jelitowa

GKS – glikokortykosteroidy

GLA - ang. *gut-liver axis* - oś wątrobowo-jelitowa

HADS - ang. *Hospital Anxiety and Depression Scale* - Szpitalna Skala Lęku i Depresji

HAV – wirus zapalenia wątroby typu A

HBV - wirus zapalenia wątroby typu B

HCC – ang. *hepatocellular cancer* - rak wątrobowokomórkowy

HCV - wirus zapalenia wątroby typu C

HDL - ang. *high density lipoprotein* – lipoproteiny o wysokiej gęstości

HDV - wirus zapalenia wątroby typu D

HEV - wirus zapalenia wątroby typu E

HF - ang. *high frequency* - zakres widma wysokich częstotliwości

HF – ang. *heart failure* – niewydolność serca

HFD – ang. *high-fat diet* – dieta wysokotłuszczowa

HHV-6, HHV-7, HHV-8 – ang. *human herpesvirus 6, 7, 8* – ludzki herpeswirus typu 6, 7, 8

HLA - ang. *human leucocyte antigen* – ludzkie antygeny leukocytarne/ in. układ zgodności tkankowej

HMP - ang. *Human Microbiome Project* - projekt sekwencjonowania ludzkiego mikrobiomu

HPA - ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal* – oś podwzgórze – przysadka – nadnercza

HR – ang. *heart rate* – rytm serca

HRV – ang. *heart rate variability* – zmienność rytmu serca

HSV-1, HSV-2 – ang. *herpes simplex virus 1, 2* - wirus opryszczki pospolitej typu 1 i 2

HUT – ang. *head upright tilt table test* – test pionizacyjny

IBS – ang. *irritable bowel syndrome* – zespół jelita drażliwego

IBD – ang. *inflammatory bowel diseases* – choroby zapalne jelit

ICC/ME – ang. *International Consensus Criteria for ME* – międzynarodowe kryteria diagnostyczne dla ME

IDO - ang. *indoleamine-2,3-dioxygenase* - enzym indoloamino-2,3,-dioksygenaza

IKG - kardiograf impedancyjny

IL - interleukina

in. – inaczej

INF- γ - interferon γ

IOM – ang. *the Institute of Medicine* – Instytut Medycyny

KYNA - ang. *kynurenic acid* - kwas kynureninowy

LBP - ang. *LPS-binding protein* - białko wiążące lipopolisacharyd

LC - ang. *liver cirrhosis* - zdekompensowana marskość wątroby

LDA – ang. *linear discriminant analysis* – liniowa analiza dyskryminacyjna

LDL - ang. *low density lipoprotein* – lipoproteiny o niskiej gęstości

LEfSe – ang. *linear discriminant analysis effect size* – efekt wielkości w analizie LDA

LF - ang. *low frequency* - zakres widma niskich częstotliwości

LF/HF - stosunek mocy gęstości widma niskich do wysokich częstotliwości

LPS - lipopolisacharyd

LVWI – ang. *left ventricular work index* – wskaźnik pracy lewej komory

Lx – luks – jednostka natężenia światła

MAFLD - ang. *metabolic-associated fatty liver disease* - metaboliczna stłuszczeniowa choroba wątroby

MAS - ang. *macrophage activation syndrome* - zespół aktywacji makrofagów

MCS - ang. *Multiple Chemical Sensitivities* - Zespół Chemicznej Nadwrażliwości

ME – ang. *myalgic encephalomyelitis* – encefalopatia bólowa

MEA - ang. *Mialgic Encephalomyelitis Assosiation* – Towarzystwo ds. Zespołu Przewlekłego Zmęczenia

MFI - ang. *Multidimensional Fatigue Inventory* - Wielowymiarowa Skala Oceny Zmęczenia

m.in. – między innymi

MPQ - ang. *McGill Pain Questionnaire* - skala oceny bólu wg McGilla

NAFLD – ang. *non-alcoholic fatty liver disease* – niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby

NASH – ang. *non-alcoholic steatohepatitis* – niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby

NChZJ - nieswoiste choroby zapalne jelit

NF-κB - ang. *nuclear factor-κB* - czynnik jądrowy κB

NGS - ang. *next-generation sequencing* - sekwencjonowanie nowej generacji

NICE - ang. *National Institute for Health and Clinical Excellence* - Instytut Doskonałości Klinicznej

NMDA – receptor N-metylo-D-asparaginowy

NMDS - ang. *non-metric multidimensional scaling* - niemetryczne wielowymiarowe skalowanie

np. – na przykład

OB – odczyn Biernackiego

OI - ang. *orthostatic intolerance* – nietolerancja ortostatyczna

oscBP - urządzenie do oscylometrycznego pomiaru ciśnienia krwi

OTU - ang. *Operational Taxonomic Unit* - operacyjna jednostka taksonomiczna

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PCI – prostacykliny

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

PEM – ang. *post-exertional malaise* - powysiłkowe nasilenie zmęczenia

PENE - ang. *post-exertional neuroimmune exhaustion* - powysiłkowe wyczerpanie neuroimmunologiczne

PET- pozytronowa tomografia emisyjna

PGE – prostaglandyny

POMS - ang. *Profile Mood States* - Skala Oceny Nastroju

PoTS – ang. *postural orthostatic tachycardia syndrome* – zespół posturalnej tachykardii ortostatycznej

PPS – ang. *post polio syndrome* – zespół post-polio

PSQI - ang. *Pennsylvania Sleep quality Index* – pensylwańska skala jakości snu

PVFS – ang. *post-viral fatigue syndrome* – powirusowy zespół zmęczenia

PXR - ang. *pregnane X receptor* - receptor pregnanu X

RAA – układ renina-angiotensyna-aldosteron

REE – ang. *resting energy expenditure* - spoczynkowy wydatek energetyczny

RM – rezonans magnetyczny

RNA – kwas rybonukleinowy

rRNA – rybosomalny RNA

RNS - ang. *reactive nitrogen species* – reaktywne formy azotu

ROC - ang. *Receiver Operating Character* – krzywa ROC

ROS - ang. *reactive oxygen species* – reaktywne formy tlenu

RR – ciśnienie tętnicze

SARS - ang. *severe acute respiratory syndrome* – zespół ostrej niewydolności oddechowej

SARS-Cov-2 – ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* – koronawirus typu 2

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

SEID – ang. *systemic exertion intolerance disease* – ogólnoustrojowa nietolerancja wysiłku

SF - sulfonolipidy

SF-36 – ang. *Short Form Health Survey* – Kwestionariusz Oceny Jakości Życia SF-36

SIBO - ang. *small intestine bacterial overgrowth* - zespół rozrostu bakteryjnego w jelicie cienkim

SMC - ang. *specialist medical care* – specjalistyczna opieka medyczna

sPLS-DA -ang. *sparse version of the Partial Least Squares Regression-Discriminant Analysis*

SSRI - ang. *selective serotonin reuptake inhibitors* - inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny

TCA - ang. *tricyclic antidepressants* - trójcykliczne leki przeciwdepresyjne

TDA – ang. *topological data analysis* – topograficzna analiza danych

TFM - *Task Force Monitor*

tj. – to jest

TMT - ang. *Trail Making Test* - test łączenia punktów

TNF- α – ang. tumor necrosis factor α – czynnik martwicy nowotworów α

TP - ang. *total power* - całkowita moc widma

UC – ang. *ulcerative colitis* – wrzodziejące zapalenie jelita grubego

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

VAS - ang. *visual analogue scale* – skala analogowo-wzrokowa

VLF - ang. *very low frequency* - pasmo bardzo niskich częstotliwości

VO₂ – pobór tlenu

VO₂ max – maksymalny pobór tlenu

XMRV – ang. *Xenotropic murine leukemia virus-related virus* – wirus XMRV

ZJD- zespół jelita drażliwego

ZPZ – zespół przewlekłego zmęczenia

¹H NMR - magnetyczny rezonans jądrowy

XII.2. Skale zmęczenia

XII.2.1. Skala Oceny Wpływu Zmęczenia

(ang. *Fatigue Impact Scale, FIS*) [132]

L.p.	Z powodu zmęczenia:	Nie jest to dla mnie problem	Jest to mały problem	Jest to średni problem	Jest to duży problem	Jest to bardzo duży problem
1.	Czuję się mniej czujny	0	1	2	3	4
2.	Czuję się bardziej odizolowany od ludzi	0	1	2	3	4
3.	Muszę zmniejszyć obciążenie pracą lub swoje obowiązki	0	1	2	3	4
4.	Jestem bardziej kapryśny	0	1	2	3	4
5.	Mam trudności ze skupieniem uwagi przez dłuższy czas	0	1	2	3	4
6.	Czuję, że nie mogę jasno myśleć	0	1	2	3	4
7.	Pracuję mniej efektywnie (w domu lub poza domem)	0	1	2	3	4
8.	Muszę bardziej polegać na pomocy innych	0	1	2	3	4
9.	Mam trudności z planowaniem działań z wyprzedzeniem	0	1	2	3	4
10.	Jestem bardziej niezdarny i nieskoordynowany	0	1	2	3	4
11.	Uważam, że jestem bardziej zapominalski	0	1	2	3	4
12.	Jestem bardziej drażliwy i łatwiej się złościę	0	1	2	3	4
13.	Muszę zwolnić tempo mojej aktywności fizycznej	0	1	2	3	4
14.	Mam mniejszą motywację do robienia czegokolwiek, co wymaga wysiłku fizycznego	0	1	2	3	4
15.	Mam mniejszą motywację do angażowania się w działania społeczne	0	1	2	3	4
16.	Mniej podróżuję	0	1	2	3	4
17.	Mam problem z dłuższym wykonywaniem wysiłku fizycznego	0	1	2	3	4
18.	Trudno mi podejmować decyzje	0	1	2	3	4
19.	Mam niewiele kontaktów towarzyskich poza własnym domem	0	1	2	3	4
20.	Normalne codzienne wydarzenia są dla mnie stresujące	0	1	2	3	4
21.	Mam mniejszą motywację do robienia czegokolwiek, co wymaga myślenia	0	1	2	3	4

22.	Unikam sytuacji, które są dla mnie stresujące	0	1	2	3	4
23.	Czuję, że moje mięśnie są znacznie słabsze niż powinny	0	1	2	3	4
24.	Czuję, że mój fizyczny dyskomfort jest zwiększony	0	1	2	3	4
25.	Mam trudności z radzeniem sobie z czymś nowym	0	1	2	3	4
26.	Jestem w stanie ukończyć mniej zadań wymagających myślenia	0	1	2	3	4
27.	Czuję, że nie jestem w stanie sprostać wymaganiom, jakie stawiają mi ludzie	0	1	2	3	4
28.	W mniejszym stopniu niż dotychczas zapewniam wsparcie finansowe sobie i rodzinie	0	1	2	3	4
29.	Mniej angażuję się w aktywność seksualną	0	1	2	3	4
30.	Trudno mi uporządkować myśli, kiedy robię coś w domu lub w pracy	0	1	2	3	4
31.	Jestem mniej zdolny do wykonywania zadań wymagających wysiłku fizycznego	0	1	2	3	4
32.	Martwię się, jak wyglądam w oczach innych ludzi	0	1	2	3	4
33.	Jestem mniej zdolny do radzenia sobie z problemami emocjonalnymi	0	1	2	3	4
34.	Czuję spowolnienie w myśleniu	0	1	2	3	4
35.	Trudno mi się skoncentrować	0	1	2	3	4
36.	Mam trudności z pełnym uczestnictwem w zajęciach rodzinnych	0	1	2	3	4
37.	Muszę ograniczyć aktywność fizyczną	0	1	2	3	4
38.	Wymagam częstszych lub dłuższych okresów odpoczynku	0	1	2	3	4
39.	Nie jestem w stanie zapewnić mojej rodzinie tyle wsparcia, ile powinienem	0	1	2	3	4
40.	Nawet drobne trudności wydają się bardzo poważne	0	1	2	3	4

XII.2.2. Skala Oceny Nasilenia Zmęczenia

(ang. *Fatigue Severity Scale, FSS*) [133]

W ostatnim tygodniu:	Nie zgadzam się całkowicie		3	Nie mam zdania			6	Zdecydowanie się zgadzam
	1	2		4	5	7		
1. Mam obniżoną motywację, kiedy jestem zmęczona/-y	1	2	3	4	5	6	7	
2. Ćwiczenia fizyczne wywołują u mnie zmęczenie	1	2	3	4	5	6	7	
3. Bywam łatwo zmęczona/-y	1	2	3	4	5	6	7	
4. Zmęczenie ogranicza moją wydolność fizyczną	1	2	3	4	5	6	7	
5. Zmęczenie jest przyczyną moich częstych kłopotów	1	2	3	4	5	6	7	
6. Moje zmęczenie uniemożliwia mi fizyczne funkcjonowanie przez dłuższy czas	1	2	3	4	5	6	7	
7. Zmęczenie utrudnia mi wykonywanie pewnych obowiązków i odpowiedzialności	1	2	3	4	5	6	7	
8. Zmęczenie jest jednym z trzech moich najbardziej dokuczliwych przypadłości	1	2	3	4	5	6	7	
9. Zmęczenie komplikuje moje życie zawodowe, rodzinne, społeczne.	1	2	3	4	5	6	7	

XII.3. Zgoda Komisji Bioetycznej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 660/2017

Bydgoszcz, 14.11.2017r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **14.11.2017r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

prof. dr hab. Jacek J. Klawe
Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- prof. dr hab. n. med. Małgorzata Tafil-Klawe, prof. dr hab. n. med. Jacek Klawe, dr hab. n. med. Paweł Zalewski, dr n. o zdr. Joanna Słomko, dr n. o zdr. Monika Zawadka-Kunikowska, dr n. med. Justyna Szrajda, dr n. med. Mariusz Kozakiewicz, mgr Sławomir Kujawski, mgr Adam Piesik, mgr Sebastian Szyper, lek. Łukasz Sokolowski, Anna Dobosiewicz,

w sprawie badania:

„Zastosowanie kriostymulacji ogólnoustrojowej u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia (CFS).”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania w tym również uczestników stanowiących grupę kontrolną o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania, a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- **UWAGA!** Uczestnicy badania stanowiący grupę kontrolną nie mogą być rekrutowani spośród studentów lub pracowników podlegających zależności służbowej lub dydaktycznej z badaczami.

- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (14.11.2017 r.) do końca 2021 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

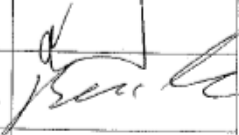
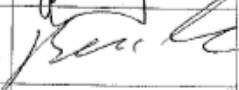
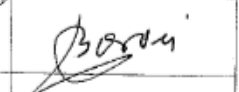
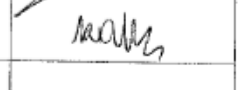
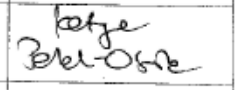
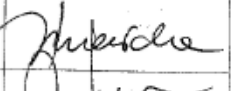
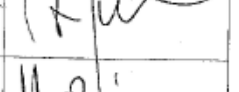
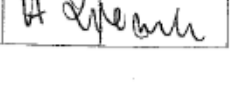
Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
prof. dr hab. Jacek J. Kławe
Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 14.11.2017 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balear-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawiak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Poietek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemińska		

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 660/2017

Bydgoszcz, 26.03.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(której skład podano w załączeniu) na posiedzeniu w dniu **26.03.2019 r.** przeanalizowała prośbę o wyrażenie zgody na poszerzenie składu zespołu badawczego o:

1. Monikę Prylińską
2. Annę Dobosiewicz
3. Ewelinę Litwę
4. Marcina Kożuchowskiego
5. Bartłomieja Wrzesińskiego:

którą złożył:

prof. dr hab. Jacek J. Kławe
Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

w sprawie badania:

„Zastosowanie kriostymulacji ogólnoustrojowej u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia (CFS).”

Po zapoznaniu się ze złożonym dokumentem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania jawnego Komisja przyjęła do wiadomości podane informacje i wyraża zgodę na powyższe pod warunkami określonymi w uchwale Komisji podjętej w dniu 14.11.2017 r. oraz w ewentualnych aneksach do tejże uchwały.

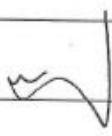

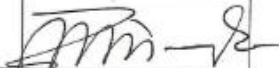
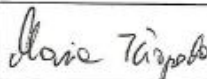
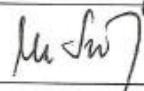


Zgoda na kontynuowanie przedmiotowego badania obowiązuje do końca sierpnia 2021 roku.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
prof. dr hab. Jacek J. Kławe
Katedra Higieny, Epidemiologii i Ergonomii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 26.03.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		