

GUT MICROBIOTA IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

Magdalena Nalewajska¹, Jarosław Przybyciński¹, Małgorzata Marchelek-Myśliwiec¹,
Violetta Dziezdziejko^{2*}, Kazimierz Ciechanowski¹

¹Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

²Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

Received in December 2018, accepted in May 2019

Abstract: In health, the relationship between gut microflora and the host is of a mutualistic kind. Microbiota offers many benefits to the host, including harvesting energy, regulating host immunity, and the synthesis of vitamins. Alteration in gut microflora can lead to homeostasis disruption and development of various diseases. Dysbiosis is commonly observed in chronic kidney disease (CKD). Nutrient processing by gut microbiota results in the production of some uremic toxins, and these accumulate in CKD causing deleterious effects. Increased permeability of the intestinal barrier, which is also seen in CKD contributes to the development of the uremic state. These factors are associated with chronic inflammation and oxidative stress and therefore are involved in CKD-related complications, including disease progression, cardiovascular disease, anemia, mineral-metabolism, and insulin resistance. This review describes connections between altered gut microflora and development of CKD and its complications, as well as possible therapeutic options.

1. Microbiota – short characteristic. 2. Mechanisms leading to alterations in gut microbiota and their effects on intestinal barrier permeability. 3. Causes of chronic kidney disease progression related to gut microbiota alterations. 4. Complications of chronic kidney disease related to gut microbiota alterations. 4.1. Cardiovascular disease. 4.2. Anemia. 4.3. Bone metabolism disorders. 4.4. Insulin resistance in CKD. 5. Therapeutic options. 6. Summary

MIKROBIOTA JELIT A PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK

Streszczenie: Mikrobiota jelitowa w prawidłowych warunkach pozostaje w symbiozie z organizmem gospodarza. Bakterie jelitowe odgrywają istotną rolę w fermentacji składników pokarmowych, stymulują układ odpornościowy i wytwarzają witaminy. Zaburzenie składu flory jelitowej może prowadzić do zaburzeń homeostazy ustroju i rozwoju wielu chorób. Zaburzenie składu mikrobioty jelitowej obserwowane jest m.in. u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN). W wyniku rozkładu resztek pokarmowych powstają substancje toksyczne, które kumulują się u pacjentów z obniżoną filtracją kłębuszkową i wywołują szkodliwe dla organizmu działania. Zjawisko to nasila się dodatkowo w wyniku zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej, co obserwuje się w PChN. Nadmierna produkcja toksyn i zwiększone ich wchłanianie w jelicie prowadzą do nasilenia reakcji zapalnych i stresu oksydacyjnego, co skutkuje rozwojem powikłań PChN, takich jak: progresja choroby, choroby sercowo-naczyniowe, anemia, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej i powikłania metaboliczne. W tej pracy przedstawiono związek zmienionej flory jelitowej z rozwojem przewlekłej choroby nerek i jej powikłań oraz potencjalne możliwości terapeutyczne.

1. Mikrobiota – krótka charakterystyka. 2. Mechanizmy doprowadzające do jakościowych i ilościowych zmian mikrobioty jelit w przewlekłej chorobie nerek i ich wpływ na strukturę bariery jelitowej. 3. Przyczyny progresji przewlekłej choroby nerek związane z zaburzeniem mikrobioty jelitowej. 4. Powikłania przewlekłej choroby nerek związane ze zmianą mikrobioty jelitowej. 4.1. Choroby sercowo-naczyniowe. 4.2. Anemia. 4.3. Zaburzenia metabolizmu kostnego. 4.4. Insulinooporność w przewlekłej chorobie nerek. 5. Możliwości terapeutyczne. 6. Podsumowanie

Key words: intestinal barrier, dysbiosis, gut microflora, microbiota, chronic kidney disease

Słowa kluczowe: bariera jelitowa, dysbioza, flora jelitowa, mikrobiota, przewlekła choroba nerek

1. Microbiota – short characteristic

Microorganisms inhabiting the human organism are currently referred to as a microbiota (formerly – microflora) and the set of their genomes is called a microbiome. It includes not only bacteria but also fungi, viruses and archaea. A microbiota colonizes, among others, the skin, the upper respiratory tract, the auditory meatus, the genital tract and the entire human gastroin-

testinal tract. In the human gastrointestinal tract, there are 10^{14} microorganisms, which is equal to 10-fold number of eukaryotic cells in which microbial cells constitute 1.5–2 kg of human body weight. The greatest number and diversity of microorganisms occur in the large intestine [55]. Scientific research conducted in the last few years has shown that microorganisms have the ability to communicate (cross-talk) between each other and the host cells. The diverse network of connections and

* Corresponding author: Violetta Dziezdziejko, Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powst. Włkp. 72, 70-111 Szczecin; phone: + 48 91 466 15 30; e-mail: viola@pum.edu.pl

transmission of signals creates a complicated ecosystem which is also the basis for maintaining the state of the host's metabolic and immune homeostasis.

The first contact with microorganisms takes place already in foetal life. The presence of the DNA of bacteria whose contact with the foetus stimulates its immune system [64] has been confirmed in the placenta. In the postnatal period, the composition of the microbiota is affected by: the mode of delivery (caesarean section vs. natural birth), diet, hygiene or the necessity of taking antibiotics. The full development of human intestinal microbiota is observed in adulthood [34].

The composition of intestinal microbiota varies between individuals, and homogeneous microbiota exists within small populations. The possibility of carrying out thorough genetic tests allowed for isolating and accurate characterisation of the so-called enterotypes, or permanent systems of intestinal microbiomes. Enterotypes are characteristic for a given host and differ in the type of dominant bacteria. Three enterotypes have been distinguished in humans: *Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcus* [3]. These include the following bacteria: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Dorea* [44]. A given enterotype affects the composition of the entire intestinal flora by inhibiting or promoting the growth of other bacteria; it also specializes in the synthesis of specific compounds [54]. *Bacteroides* produces biotin, *Prevotella* – thiamine, and *Ruminococcus* specializes in the synthesis of heme [48]. Genomic diversity amongst enterotypes leads to variability in the functioning of metabolic pathways, including differences in obtaining energy from food [54]. It resulted in the creation of a hypothesis whereby knowledge of the enterotype of a given host will allow the selection of a personalized diet, as well as medications [10].

In healthy condition, the bacteria of intestinal flora remain in symbiosis with the host, which means the phenomenon of two different species coexisting, beneficial to both sides. In the intestine, there are conditions favouring growth of anaerobic bacteria which convert the non-absorbed carbohydrates supplied with food through the process of fermentation. The energy-yielding nutrients produced therefrom are later used by the host's cells. Short-chain fatty acids (SCFA) are the most important of these products. The butyrate formed in the course of their biochemical transformation is the main energy substrate for enterocytes. Its appropriate concentration determines the correct metabolism of these cells, and thus the maintenance of the integrity of the intestinal barrier [11]. The intestinal barrier through the presence of tight junctions and the transmembrane transport system enables complex communication between the host and the intestinal microbiota, mainly in the immune system. Proteins that build tight junctions

are primarily: the peripheral membrane protein ZO-1 (zonula occludens – 1 ZO1) and the proteins connecting the membranes of neighbouring cells (transmembrane proteins) – occludin and claudin [58].

A change in the environment in which a microbiota exists: the presence of toxins, diet, antibiotic therapy, stress or medications taken cause the dominant bacteria and the compounds synthesized by them to change, which leads to damaging the intestinal barrier. This is the case, among others, in chronic kidney disease [2].

2. Mechanisms leading to alterations in gut microbiota and their effects on intestinal barrier permeability

Chronic kidney disease (CKD) is a condition with a complex aetiology. The most common causes of this disease are lifestyle diseases: diabetes and hypertension. Its development is also promoted by immunological and genetic diseases as well as congenital malformations. The severity of this disease is assessed, among others, by the decrease in glomerular filtration rate (GFR) and is divided into five stages. In stage I of CKD, glomerular filtration is not yet impaired but morphological changes in the kidneys may appear, e.g. urolithiasis, cysts. In stage II, GFR falls below 89 ml/min/1.73 m², however it is higher than 60 ml/min/1.73 m². Stage III is characterized by a further reduction in glomerular filtration and is between 59 and 30 ml/min/1.73 m². Stage IV is GFR between 29–15 ml/min/1.73 m², and the last stage is V, in which GFR falls below 15 ml/min/1.73 m² [7].

The essence of CKD is not only the retention of uremic toxins, impaired production of erythropoietin, calcium-phosphate management disorders and lack of the active form of vitamin D, but also persistent inflammation. Its source is, among others, impaired integrity of the intestinal barrier, which occurs in uraemia [48]. In this situation, the pro-inflammatory molecules and bacterial toxins leak from the gastrointestinal tract into the bloodstream of the host. What is most often listed in this case is bacterial lipopolysaccharides (LPS), integral components of the outer membrane of Gram-negative bacteria and cyanobacteria, which play a key role in bacteria life processes, but also constitute their main pathogenic factor [5]. The presence of the fragments and metabolites of bacteria outside the intestinal lumen induces and sustains an inflammatory response. This pathomechanism is also superimposed by: a decreased clearance of cytokine, intravenous iron administration in patients undergoing dialysis and finally the haemodialysis procedure itself (use of filtration membranes, dialysis fluids) [7]. As previously mentioned, in the case of CKD, there is an accumulation of a number of uremic toxins, including urea and uric acid. It has

been observed that their presence in the gastrointestinal tract lumen results in both quantitative and qualitative changes in the intestinal microbiota. Their excessive concentration makes them become alternative metabolic substrates for bacteria. The bacteria possessing urease, uricase and p-cresol-forming enzymes (*Alteromonadaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Methylococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Polyangiaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Xanthomonadaceae*) are beginning to dominate. On the other hand, those that metabolize non-absorbable carbohydrates (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*) [11, 62] are dying. Urease breaks down urea into ammonia. The increase in the synthesis of ammonia contributes to the increase of pH, and thus leads to damage to tight junctions in the intestinal epithelial cells and the destruction of the intestinal barrier [59]. In a study carried out by Vaziri *et al.*, it was proved that the metabolic changes result in the impairment of function and the destruction of proteins by – and the intramembranes forming part of tight junctions – ZO1 protein, claudin and occluding [59].

Other, coexisting factors that adversely affect the integrity of the intestinal barrier include: swelling of the intestinal wall which occurs in CKD, excessive use of diuretics, aggressive ultrafiltration during haemodialysis, gastrointestinal bleeding, infiltration of the intestinal epithelial lamina propria by lymphocytes [17, 19, 33, 37]. Uremic toxins inhibit activity and reduce the number of transmembrane transporters, which is very important from the clinical point of view, because it may lead to changes in the pharmacokinetics of certain drugs and impair their metabolism in CKD patients [31].

The type of diet and eating habits in this group of patients should be mentioned as well. They have a huge impact on the content of the intestinal flora. Often this disease is accompanied by a lack of appetite, nausea and reluctance to accept certain foods [6]. Patients with CKD should control the amount of fluid intake and also limit the consumption of proteins and products rich in phosphorus and potassium to prevent hyperphosphatemia and hyperkalemia. Unfortunately, this also involves limiting the consumption of vegetables and fruit. This is not beneficial because it has been proved that a diet rich in fibre and low in red meat, sodium and simple sugars increases the survival rate of patients with CKD [23, 24].

3. Causes of chronic kidney disease progression related to gut microbiota alterations

When glomerular filtration rate (GFR) decreases, adverse metabolic processes are accelerated. Indoxyl sulphate (IS) is the final product of the degradation

of tryptophan in indol pathway. The first stage of this pathway is initiated by tryptophanase – an enzyme synthesized by *Escherichia coli* bacterium which is part of the intestinal flora. As a result of this process indole is formed, which is absorbed into the bloodstream through the intestinal barrier and undergoes sulfonation in the liver. Under the right conditions, IS is excreted from the organism with urine [37]. IS concentrations observed in patients with CKD with impaired renal filtration function are higher than in healthy subjects – basing on research conducted the relationship between IS concentration and the progression of kidney disease and the development of vascular complications has been demonstrated [28]. With the use of the established cell lines and animal models, the negative influence of IS on the proximal cells of the renal tubules causing their progressive damage has been proved. Interstitial fibrosis and glomerulosclerosis have also been observed [37]. A study conducted by Leong *et al.* confirmed that in patients with CKD in stages I–IV the risk of the progression of kidney disease associated with high levels of IS is increased [28].

Trimethylamine N-oxide (TMAO) is also included in the group of uremic toxins. It originates from choline, phosphatidylcholine and L-carnitine, supplied with food, with the participation of intestinal bacteria [8]. In the study conducted by Hoyles *et al.*, it was observed that *Enterobacteriaceae* metabolizes TMAO trimethylamine oxide most effectively [20]. High concentrations of TMAO are associated with an increased risk of the development and progression of kidney disease, which was confirmed, among others, in the Framingham Heart Study with the participation of 1,500 participants [46]. In turn, in studies conducted on mice, the influence of TMAO on the development of tubulointerstitial fibrosis and increased collagen deposition in the kidneys has been demonstrated [8].

4. Complications of chronic kidney disease related to gut microbiota alterations

4.1. Cardiovascular disease

Cardiovascular diseases (CVD) are one of the major causes of mortality among CKD patients. A relationship between high levels of uremic toxins in the blood serum of patients with CKD and the risk of CVD occurrence has been demonstrated [60]. P-cresol sulphate (PCS) is a product of the metabolism of tyrosine and phenylalanine and, apart from indoxyl sulphate (IS) described above, it is the main compound affecting the occurrence of CVD in patients with CKD [30]. In the meta-analysis, a positive correlation has been found between IS and PCS concentration and mortality

among CKD patients; high concentration of PCS, but not IS was associated with an increased risk of CVD in the CKD group [30]. In the work previously published by Sato *et al.*, plasmatic IS concentrations were determined in patients with coronary artery disease and decreased glomerular filtration rate (GFR). With the use of echocardiography, it was confirmed that in patients with higher IS concentrations, left ventricular diastolic dysfunction was greater than in patients with lower concentrations [50]. In other studies, IS was associated with an increased risk of coronary calcification and restenosis after coronary stent implantation [21, 56]. In 2018, Claro *et al.* demonstrated that IS and PCS are independent prognostic factors for total mortality among CKD patients. The results of the study confirmed the key role of uremic toxins in the pathogenesis of CVD in the mechanism of inflammatory reaction in patients with impaired renal function [9]. Trimethylamine N-oxide (TMAO), in turn, influences the development of atherosclerosis by accumulation of cholesterol in macrophages. High levels of TMAO in plasma are associated with an increased risk of significant cardiovascular events, regardless of the typical CVD risk factors [60].

4.2. Anemia

Indoxyl sulphate interferes with the synthesis of erythropoietin and intensifies erythropoietin (programmed red blood cell death), leading to the decrease in haemoglobin concentration in patients with CKD [1, 38].

4.3. Bone metabolism disorders

CKD is associated with renal osteodystrophy. It has a complex aetiology, but its source is primarily secondary hyperparathyroidism and deficiency of the active form of vitamin D ($1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Recent studies have indicated the negative effect of uremic toxins, which are subject to changes under the influence of altered intestinal microbiota, on metabolic changes taking place in bone tissue in this group of patients. *In vitro* studies have shown that the indoxyl sulphate (IS) mentioned above inhibits stem cell differentiation towards osteoblasts, osteoblast proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity [15]. The exact mechanism of action of IS in this case is not known, but there are indications that it is related to the production of free radicals and oxidative stress [15]. Another problem in people with CKD is parathyroid hormone (PTH) impairment. The concentration of PTH increases with the decrease of GFR and is an expression of the organism's defence against the decrease in calcium concentration. Can the change in the composition of a microbiota be one of the mechanisms which impair the response of bone tissue

cells to the action of PTH? Indoxyl sulphate appears to reduce the production of PTH-dependent intracellular cAMP and reduce the expression of the PTH receptor gene in osteoblasts [15]. It also inhibits the differentiation of osteoclasts and reduces bone resorption [61]. The results of *in vivo* studies coincide with the results of preclinical studies. In a cross-sectional study, in which 47 dialysed patients participated, it was found that the concentration of indoxyl sulphate showed a negative correlation with bone markers – ALP and ALP bone fraction [18]. It is currently believed that, among others, IS may contribute to the development of adynamic bone disease in CKD patients, i.e. a form of renal osteodystrophy where bone turnover is reduced. One of the features is the inadequate low PTH concentration in relation to the decreased GFR [15]. Other uremic toxins associated with a microbial metabolism disorder which have an impact on bone metabolism are p-cresol sulphate (PCS) and nitric oxide synthetase inhibitor (ADMA) [15]. *In vitro* studies have shown the association of high PCS concentrations, both with aberrant osteoblast differentiation and proliferation, decrease in their survival rate, a PTH-dependent cAMP mediated transmission disorder and a reduction in PTH receptor expression. ADMA inhibits the differentiation of osteoblasts [15].

4.4. Insulin resistance in CKD

In 1980, in the work of DeFronzo *et al.*, insulin resistance (IR) was proved to occur in patients with CKD [12]. The phenomenon of insulin resistance in patients with CKD appears already in the early stages of the disease and progresses with the decrease in glomerular filtration [53]. IR is an important, negative phenomenon in CKD as it is associated with an increased risk of developing cardiovascular diseases. The pathogenesis of IR in CKD is multifactorial. The importance of reduced physical activity, chronic inflammation, oxidative stress, vitamin D deficiency, development of metabolic acidosis, and CKD anaemia in the development of IR has been proved [52, 53]. The changed composition of intestinal microbiota is another link in the emergence of insulin resistance [26]. In 2004, Backhed *et al.* demonstrated that the transplantation of the microbiota from the intestinal gut of overweight mice to conventionally grown GF (germ-free) mice, resulted in a significant increase in adipose tissue content and insulin resistance just within the first 14 days of observation, despite the reduction of intake food [4]. It has also been proved that in comparison to mice without obesity, overweight mice are observed to have a 50% reduction in *Bacteroides* and a proportional increase in the abundance of *Firmicutes*. The change of intestinal microbiota in obese

animals has an impact on greater use of energy from food than is the case of lean individuals [29, 57]. Metabolic toxins produced by the microbiota and accumulated in the bodies of CKD patients may also contribute to the development of IR [26]. In the studies by McCaleb *et al.*, rat adipocytes were isolated and incubated with serum from CKD, obese, and type 2 diabetics respectively – adipocytes exhibited reduced glucose uptake in CKD patients, which was not observed in patients with diabetes or obesity [32]. Thus, the existence of uremic-specific molecules, which exhibit insulin-resistant activity, was suggested. In another study, a decrease in plasma glucose concentration and insulin requirement was observed in patients with CKD after reduction of protein intake with food, confirming the key role of end products of intestinal protein degradation in the development of insulin resistance [47]. Among these compounds, p-cresol sulphate (PCS) seems to be the most important. Chronic administration of PCS to mice with normal renal function was associated with the development of insulin resistance and ectopic redistribution of fat cells [27]. Importantly, after administration of the compound, PCS concentration was comparable to that occurring in patients with end-stage kidney disease. Ectopic redistribution of lipids in skeletal muscle, liver, myocardium (lipid overload theory) is responsible for disturbed phosphorylation of the IRS-1 receptor substrate in tyrosine residues, blocking the intracellular signalling pathway and thus causing insulin resistance [40].

5. Therapeutic options

In recent years, the significant impact of the microbiome on human health has been recognized. This led to the flourishing of research into the therapeutic possibilities of diseases through exerting an impact on bacterial flora. This also applies to chronic kidney disease. The use of prebiotics, probiotics, and synbiotics is one of the proven methods of therapeutic interventions in the case of symbiosis disorders. Prebiotics are specific nutrients, containing mainly fibre, oligosaccharides, such as inulin. They promote the growth of beneficial intestinal bacteria and by changing the pH, they affect the intestinal barrier status and also increase the activity of intestinal hormones such as GLP-1 (glucagon-like peptide-1). Probiotics are selected strains of microorganisms, able to survive in the human body and exert a beneficial effect on health. They must be characterised by the ability to adhere to the intestinal epithelium so that they are not removed from them in a short time (e.g. during diarrhoea). In addition, they must be resistant to hydrochloric acid contained in the stomach, digestive enzymes, bile acids. The preparation

combining probiotics and prebiotics is called a synbiotic [48, 51]. Probiotics may be of natural origin, e.g. fermented products – mainly dairy products, such as yogurt or kefir, pickled products, or commercially produced preparations taken orally [16]. Although they have been used for many years and are generally considered safe, they may also have pathogenic significance. Cases of generalized infections caused by various probiotic strains have been reported. Most cases were associated with *Saccharomyces boulardi* and *Cerevisiae fungemia*. However, bacterial infections caused by *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, and *Bifidobacterium breve* strains have also been found. In the literature one can also find descriptions of endocarditis caused by probiotic *Streptococcus* strains. Some of these cases may have been the result of the transfer of bacteria to the area of intravenous puncture through the hands of the staff, who previously administered probiotics. Another negative aspect may be altered metabolism in the intestinal lumen. Administration of a probiotic increases the intestinal epithelial oxygen requirement or increases the formation of lactate, which can lead to dangerous complications. Moreover, in theory, probiotics may overstimulate the intestinal immune system or spread antibiotic-resistant genes among other intestinal bacteria. As of now, these fears have not been justified [13]. To date, numerous studies have been carried out using a variety of bacterial strains, mainly of the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* and prebiotics [48]. The action of probiotics is complex and specific to individual bacterial strains. It consists, among others, in sealing barrier joints, increasing mucin production, and protecting enterocytes from apoptosis. In addition to the intestinal barrier protective effect, they have an antagonistic effect on the pathogenic intestinal flora by secreting bacteriocins and competition in occupying intestinal niches. The stimulating effect on immunity and the formation of regulatory lymphocytes is also important [25]. A significant reduction in the levels of harmful metabolites, such as cresol compounds, indoxyl sulphate, or urea nitrogen (BUN, blood urea nitrogen), has been obtained in studies. In one of the studies, an increase in glomerular filtration was observed after prebiotics were applied. The examined patients with chronic kidney disease first consumed 1.6 g of fibre per day for 2 weeks. Then the dietary fibre supply was increased to 23 g per day for 4 weeks. The disadvantage of this study was the small number of participants – 13 people, although a statistically significant decrease in creatinine was obtained, persisting for at least up to 4 weeks after the end of the nutritional intervention [49]. These effects are achieved mainly by creating a suitable environment for the growth of sucrose bacteria at the expense of proteolytic substances, increased absorption of nitro-

gen compounds by the intestinal flora, lower production of harmful metabolites, and their excretion with stool. An appropriate diet increases the production of short-chain fatty acids, possessing the capacity for “sealing” the intestine [48]. Fatty acids also have a direct metabolic and immunomodulatory effect by directly impacting the FFAR1, FFAR2, and FFAR3 receptors. In this way, they increase leptin levels, stimulate the activity of regulatory lymphocytes, and reduce the amount of reactive forms of oxygen [14]. Other potentially beneficial effects of prebiotics depend on the activation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), the YY peptide (PYY-anorexigenic neuropeptide), and other intestinal hormones. They consist in lowering body weight, improving lipid metabolism, and reducing insulin resistance [51]. However, a study conducted in the population of peritoneal dialysis patients proved a lower level of proinflammatory cytokines and endotoxin after a 6-month period of consuming probiotics from the strains of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [39]. The analysis of the NHANES cohort indicates a lower severity of albuminuria in people consuming probiotics and yogurt, at least 3 times a week. Unfortunately, in the study based on completing nutrition questionnaires, no specific type of probiotics was indicated [39, 63]. In studies on rats, it has been proved to slow down the progression of kidney disease, and even to prolong the survival after the use of probiotics of the strains of *Bacillus pasteurii* or *Lactobacillus sporogenes* [39, 51].

There are also numerous observational and interventional studies on humans and animals, proving the benefits of taking an increased amount of fibre. It may have both the form of oligosaccharides or resistant starch. A large observational study on a population of approximately 14,000 confirmed the reduction of the signs of inflammation and overall mortality along with an increase in fibre intake [36, 45]. On the other hand, the results of some studies do not confirm the benefits of using fibre in CKD. In a randomized, double-blind study involving 40 patients with CKD in stage III–IV, the therapeutic effect of arabinoxylan administered over 4 weeks was not proved [42]. Arabinoxylan is a compound derived from the walls of plant cells, mainly cereal products, being a polymer of arabinose and xylose.

Currently, the most promising results are obtained through the use of synbiotics. Studies using different bacterial strains combined with inulin and other probiotics have led to a decrease in the concentration of toxic metabolites, mainly p-cresol sulphate, inflammatory parameters, and even a slowdown in CKD progression. The research was conducted on various groups of patients, both dialyzed and remaining in the third and fourth stage of CKD. After the application of the strains of *Lactobacillus acidophilus*, a decrease in the serum concentration of dimethylamine was obtained, whereas

after the administration of *Bifidobacterium longum* – a decrease in the serum concentration of indoxyl sulphate, homocysteine, and triacylglycerols. The disadvantage of these studies is the relatively small number of examined groups (up to 40 people) and they require confirmation in a larger population [39]. A recently published meta-analysis of randomized trials using probiotics in patients with stage III–V CKD indicates a reduction in p-cresol sulphate and an increase in the concentration of interleukin-6. The use of probiotic did not have a significant statistical effect on the concentration of creatinine, nitrogen in urea, and other toxins, or on the concentration of haemoglobin and C-reactive protein (CRP). The meta-analysis was based on eight studies, covering a total of 261 patients. Patients received eight different probiotic preparations at different doses. Among the administered bacterial strains, there were: *Lactobacillus: acidophilus, gasseri, bulgaricus, plantarum, casei, salivarius, sporogenes, Bifidobacterium: bifidum, longum, infantis, breve*, and *Streptococcus thermophilus* [22].

An interesting possibility for treating microbiota disorders is the modification of the bacterial genome used in the form of probiotics in order to adjust their metabolism to give the greatest benefits to CKD patients. In theory, it is possible to deliver bacteria with a modified genome to the gastrointestinal tract of patients, equipped with enzymes breaking down uremic toxins. Currently, there are no practical tests assessing such possibilities [39, 41, 51].

Other potential possibilities of exerting influence include the use of antibiotics which kill abnormal intestinal flora or inhibitors of fermentation of undigested carbohydrates, such as acarbose, which leads to the inhibition of the digestion of polysaccharides by intestinal cells, providing an energy substrate for intestinal bacteria [48]. The use of rifaximin, a broad-spectrum bactericidal antibiotic, has a proven effect of reducing the production of trimethylamine oxide by removing intestinal bacteria. More specific effects can be obtained by blocking bacterial enzymes such as TMA – lyase and tryptophanase, to prevent the production of toxins without a bactericidal effect. So far, however, there has been a lack of studies proving the safety and efficacy of such procedure in humans [43]. Lubiprostone, a CIC-2 chloride channel activator used in the treatment of constipation, may also contribute to restoring the intestinal microbial balance by multiplying bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Prevotella* [39].

Yet another approach is proposed which does not directly affect the intestinal microbiota, but rather counteracts the negative effects of uremic toxin formation. It involves the use of substances which bind harmful metabolites in the digestive tract. Studies have been carried out using a carbon compound called AST-120

with respect to the activity of sevelamer hydrochloride. A reduction in the concentration of indoxyl sulphate in the blood was observed; moreover, administration of AST-120 to patients with ESRD during the pre-dialysis period led to a reduction in overall mortality in this group of patients [48].

Among the new potential therapies impacting the intestinal microbiome there is also canagliflozin. This antidiabetic medication, in addition to blocking SGLT-2 glucose transporters in the renal tubules, also has a weak inhibitory effect on SGLT-1, sodium-dependent glucose transporters and SGLT-1 galactose found in the intestines. A study on mice with renal failure indicates that canagliflozin inhibits the absorption of carbohydrates in the initial section of the small intestine, leading to their greater concentration in the final section of the small intestine and large intestine. This affects the development of potentially beneficial bacteria, e.g. of the genus *Bifidobacterium*. The production of short-chain fatty acids is increased and the formation of p-cresol sulphate and, to a lesser extent, indoxyl sulphate is clearly reduced. This opens up new possibilities and the need for research on SGLT-1 inhibitors as a drug restoring intestinal eubiosis [35].

6. Summary

In recent years, there has been a growing interest in intestinal microbiota in the context of its impact on human health. Thanks to the development of bioinformatics and progress in the field of DNA sequencing techniques, the relationship between altered intestinal microbiota and the occurrence of many diseases, including chronic kidney disease, has been proved. Altered intestinal flora stimulates the production of metabolic toxins and increases their absorption in the intestine, which in turn leads to the progression of kidney disease and the development of its complications. It is believed that restoring the normal intestinal flora in these patients can slow down the disease and reduce the risk of complications. The results of preclinical studies on potential therapeutic options are promising, however, there is still a need for clinical trials in large populations to establish unambiguous treatment strategies in patients with chronic kidney disease. Perhaps in the future, modifying the composition of the intestinal flora will allow better treatment and control of kidney diseases.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

1. Ahmed M.S., Abed M., Voelkl J., Lang F.: Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol.* **14**, 244 (2013)
2. Anders H.J., Andersen K., Stecher B.: The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* **83**, 1010–1016 (2013)
3. Arumugam M., Bork P. et al.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180 (2011)
4. Baekhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 15718–15723 (2004)
5. Baumgart D.C., Dignass A.U.: Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **5**, 685–694 (2002)
6. Bossola M., Luciani G., Rosa F., Tazza L.: Appetite and Gastrointestinal Symptoms in Chronic Hemodialysis Patients. *J. Renl. Nutr.* **21**, 448–454 (2011)
7. Carrero J.J., Stenvinkel P.: Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 49–55 (2009)
8. Castillo-Rodriguez E., Sanchez-Niño M.D. et al.: Impact of altered intestinal microbiota on chronic kidney disease progression. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070300 (2018)
9. Claro L.M., Pécoits-Filho R. et al.: The impact of uremic toxicity induced inflammatory response on the cardiovascular burden in chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10100384 (2018)
10. Costea P.I., Bork P. et al.: Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **3**, 8–16 (2018)
11. Cummings J.H., Macfarlane G.T.: Collaborative JPEN-Clinical Nutrition Scientific Publications Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN-Parenter Enter.* **21**, 357–365 (1997)
12. DeFronzo R.A., Alvestrand A., Smith D., Hendler R., Hendler E., Wahren J.: Insulin resistance in uremia. *J. Clin. Invest.* **67**, 563–568 (1981)
13. Doron S., Snyderman D.R.: Risk and Safety of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 129–34 (2015)
14. Esgalhado M., Kemp J.A., Damasceno N.R., Fouque D., Mafra D.: Short-chain fatty acids: a link between prebiotics and microbiota in chronic kidney disease. *Future Microbiol.* **12**, 1413–1425 (2017)
15. Fujii H., Goto S., Fukagawa M.: Role of uremic toxins for kidney, cardiovascular, and bone dysfunction. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10050202 (2018)
16. George Kerry R., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H.S., Das G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**, 927–939 (2018)
17. Gerson L.B.: Causes of gastrointestinal hemorrhage in patients with chronic renal failure. *Gastroenterology*, **145**, 895–897 (2013)
18. Goto S., Fujii H., Hamada Y., Yoshiya K., Fukagawa M.: Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients. *Ther. Apher. Dial.* **14**, 417–423 (2010)
19. Cigarran Guldris S., Gonzalez Parra E., Cases Amenós A.: Gut microbiota in chronic kidney disease. *Nefrología (English Edition)*, **37**, 9–19 (2017)
20. Hoyles L., Dumas M.E. et al.: Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota. *Microbiome*, **6**, 73 (2018)
21. Hsu C.C., Lu Y.C., Chiu C.A., Yu T.H., Hung W.C., Wang C.P., Lu L.F., Chung F.M., Lee Y.J., Tsai I.T.: Levels of indoxyl sulfate

- are associated with severity of coronary atherosclerosis. *Clin. Invest. Med.* **36**, E42–49 (2013)
22. Jia L., Jia Q., Yang J., Jia R., Zhang H.: Efficacy of probiotics supplementation on chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Blood Press. Res.* **43**, 1623–1635 (2018)
 23. Kelly J.T., Palmer S.C., Wai S.N., Ruospo M., Carrero J.J., Campbell K.L., Strippoli G.F.M.: Healthy dietary patterns and risk of mortality and ESRD in CKD: A meta-analysis of cohort studies. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 272–279 (2017)
 24. Koppe L., Fouque D., Soulage C.O.: The role of gut microbiota and diet on uremic retention solutes production in the context of chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10040155 (2018)
 25. Koppe L., Mafrá D., Fouque D.: Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int.* **88**, 958–966 (2015)
 26. Koppe L., Pelletier C.C., Alix P.M., Kalbacher E., Fouque D., Soulage C.O., Guebre-Egziabher F.: Insulin resistance in chronic kidney disease: new lessons from experimental models. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 1666–1674 (2014)
 27. Koppe L., Soulage C.O. et al.: p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 88–99 (2013)
 28. Leong S.C., Sirich T.L.: Indoxyl Sulfate-review of toxicity and therapeutic strategies. *Toxins*, **8**, E358 (2016)
 29. Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102**, 11070–11075 (2005)
 30. Lin C.J., Wu V., Wu P.C., Wu, C.J.: Meta-Analysis of the associations of p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. *PLoS One*, **10**, e0132589 (2015)
 31. Liu B., Luo F., Luo X., Duan S., Gong Z., Peng J.: Metabolic enzyme system and transport pathways in chronic kidney diseases. *Curr. Drug. Metab.* **19**, 568–576 (2018)
 32. McCaleb M.L., Izzo M.S., Lockwood D.H.: Characterization and partial purification of a factor from uremic human serum that induces insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **75**, 391–396 (1985)
 33. Meijers B., Farré R., Dejongh S., Vicario M., Evenepoel P.: Intestinal barrier function in chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070298 (2018)
 34. Meropol S.B., Edwards A.: Development of the infant intestinal microbiome: a bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Res. C Embryo. Today*, **105**, 228–239 (2015)
 35. Mishima E., Abe T. et al.: Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **315**, F824–833 (2018)
 36. Moraes C., Borges N.A., Mafrá D.: Resistant starch for modulation of gut microbiota: Promising adjuvant therapy for chronic kidney disease patients?. *Eur. J. Nut.* **55**, 1813–1821 (2016)
 37. Nallu A., Sharma S., Ramezani A., Muralidharan J., Raj D.: Gut microbiome in CKD: challenges and opportunities. *Transl. Res.* **179**, 24–37 (2017)
 38. Nangaku M., Mimura I., Yamaguchi J., Higashijima Y., Wada T., Tanaka T.: Role of uremic toxins in erythropoiesis-stimulating agent resistance in chronic kidney disease and dialysis patients. *J. Ren. Nutr.* **25**, 160–163 (2015)
 39. Pan W., Kang, Y.: Gut microbiota and chronic kidney disease: implications for novel mechanistic insights and therapeutic strategies. *Int. Urol. Nephrol.* **50**, 289–299 (2018)
 40. Pawlak, J., Derlacz R.A.: Mechanizm powstawania oporności na insulinę w tkankach obwodowych. *Postępy Biochemii*, **57**, 200–206 (2011)
 41. Piñero-Lambea C., Ruano-Gallego D., Fernández L.Á.: Engineered bacteria as therapeutic agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 94–102 (2015)
 42. Poesen R., Evenepoel P., De Loor H., Delcour J.A., Courtin C.M., Kuypers D., Augustijns P., Verbeke K., Meijers B.: The influence of prebiotic arabinoxylan oligosaccharides on microbiota derived uremic retention solutes in patients with chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *PLoS One*, **11**, e0153893 (2016)
 43. Prokopenko A.J., Nolin T.D.: Microbiota-derived uremic retention solutes: perpetrators of altered nonrenal drug clearance in kidney disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **11**, 71–82 (2018)
 44. Qin, J., Wang J. et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
 45. Krishnamurthy V.M., Wei G., Baird B.C., Murtaugh M., Chonchol M.B., Raphael K.L., Greene T., Beddhu S.: High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **81**, 300–306 (2012)
 46. Rhee E.P., Gerszten R.E. et al.: A combined epidemiologic and metabolic approach improves CKD prediction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1330–1338 (2013)
 47. Rigalleau V., Blanchetier V., Combe C., Guillot C., Deleris G., Aubertin J., Aparicio M., Gin H.: A low-protein diet improves insulin sensitivity of endogenous glucose production in predialytic uremic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1512–1516 (1997)
 48. Sabatino A., Regolisti G., Brusasco I., Cabassi A., Morabito S., Fiaccadori E.: Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 924–933 (2015)
 49. Salmean Y.A., Segal M.S., Langkamp-Henken B., Canales M.T., Zello G.A., Dahl W.J.: Foods with added fiber lower serum creatinine levels in patients with chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.* **23**, e29–32 (2013)
 50. Sato B., Murohara T. et al.: Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **111**, 712–716 (2013)
 51. Sircana A., De Michieli F., Parente R., Framarin L., Leone N., Berrutti M., Paschetta E., Bongiovanni D., Musso G.: Gut microbiota, hypertension and chronic kidney disease: recent advances. *Pharmacol. Res.* doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.013 (2018)
 52. Soulage C.O., Koppe L., Fouque D.: Protein-bound uremic toxins... new targets to prevent insulin resistance and dysmetabolism in patients with chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.* **23**, 464–466 (2013)
 53. Spoto B., Pisano A., Zoccali C.: Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **311**, 1087–1108 (2016)
 54. Strzępa A., Szczepanik M.: Wpływ naturalnej flory jelitowej na odpowiedź immunologiczną. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **67**, 908–920 (2013)
 55. Tojo R., Suarez A., Clemente M.G., de los Reyes-Gavilan C.G., Margolles A., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P.: Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 15163–15176 (2014)
 56. Tsai M.L., Hsieh I.C., Hung C.C., Chen C.C.: Serum free indoxyl sulfate associated with in-stent restenosis after coronary artery stentings. *Cardiovasc. Toxicol.* **15**, 52–60 (2015)
 57. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031 (2006)
 58. Vaziri N.D., Goshtasbi N., Yuan J., Jellbauer S., Moradi H., Rafatellu M., Kalantar-Zadeh K.: Uremic Plasma impairs barrier

- function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am. J. Nephrol.* **36**, 438–443 (2012)
59. Vaziri N.D., Yuan J., Norris K.: Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **37**, 1–6 (2013)
60. Velasquez M.T., Centron P., Barrows I., Dwivedi R., Raj D.S.: Gut microbiota and cardiovascular uremic toxicities. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070287 (2018)
61. Watanabe K., Tominari T., Hirata M., Matsumoto C., Hirata J., Murphy G., Nagase H., Miyaura C., Inada M.: Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio*, **7**, 1178–1185 (2017)
62. Wong J., Piceno Y.M., DeSantis T.Z., Pahl M., Andersen G.L., Vaziri, N.D.: Expansion of Urease – and uricase-containing, indole – and p-Cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* **9**, 230–237 (2014)
63. Yacoub R., Kaji D., Patel S.N., Simoes P.K., Busayavalasa D., Nadkarni G.N., He J.C., Coca S.G., Uribarri J.: Association between probiotic and yogurt consumption and kidney disease: insights from NHANES. *Nutr. J.* **15**, 10 (2016)
64. Zhuang L., Chen H., Zhang S., Zhuang J., Li Q., Feng Z.: Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.002

MIKROBIOTA JELIT A PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK

Magdalena Nalewajska¹, Jarosław Przybyciński¹, Małgorzata Marchelek-Myśliwiec¹,
Violetta Dziezdziejko^{2*}, Kazimierz Ciechanowski¹

¹Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wpłynęło w grudniu 2018 r., zaakceptowano w maju 2019 r.

Streszczenie: Mikrobiota jelitowa w prawidłowych warunkach pozostaje w symbiozie z organizmem gospodarza. Bakterie jelitowe odgrywają istotną rolę w fermentacji składników pokarmowych, stymulują układ odpornościowy i wytwarzają witaminy. Zaburzenie składu flory jelitowej może prowadzić do zaburzeń homeostazy ustroju i rozwoju wielu chorób. Zaburzenie składu mikrobioty jelitowej obserwowane jest m.in. u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN). W wyniku rozkładu resztek pokarmowych powstają substancje toksyczne, które kumulują się u pacjentów z obniżoną filtracją kłębuszkową i wywołują szkodliwe dla organizmu działania. Zjawisko to nasila się dodatkowo w wyniku zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej, co obserwuje się w PChN. Nadmierna produkcja toksyn i zwiększone ich wchłanianie w jelicie prowadzą do nasilenia reakcji zapalnych i stresu oksydacyjnego, co skutkuje rozwojem powikłań PChN, takich jak: progresja choroby, choroby sercowo-naczyniowe, anemia, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej i powikłania metaboliczne. W tej pracy przedstawiono związek zmienionej flory jelitowej z rozwojem przewlekłej choroby nerek i jej powikłań oraz potencjalne możliwości terapeutyczne.

1. Mikrobiota – krótka charakterystyka. 2. Mechanizmy doprowadzające do jakościowych i ilościowych zmian mikrobioty jelit w przewlekłej chorobie nerek i ich wpływ na strukturę bariery jelitowej. 3. Przyczyny progresji przewlekłej choroby nerek związane z zaburzeniem mikrobioty jelitowej. 4. Powikłania przewlekłej choroby nerek związane ze zmianą mikrobioty jelitowej. 4.1. Choroby sercowo-naczyniowe 4.2. Anemia 4.3. Zaburzenia metabolizmu kostnego 4.4. Insulinooporność w przewlekłej chorobie nerek. 5. Możliwości terapeutyczne. 6. Podsumowanie

GUT MICROBIOTA IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

Abstract: In health, the relationship between gut microflora and the host is of a mutualistic kind. Microbiota offers many benefits to the host, including harvesting energy, regulating host immunity, and synthesis of vitamins. Alteration in gut microflora can lead to homeostasis disruption and development of various diseases. Dysbiosis is commonly observed in chronic kidney disease (CKD). Nutrient processing by gut microbiota results in production of some uremic toxins, and these accumulate in CKD causing deleterious effects. Increased permeability of the intestinal barrier, which is also seen in CKD contributes to the development of the uremic state. These factors are associated with chronic inflammation and oxidative stress and therefore are involved in CKD-related complications, including: disease progression, cardiovascular disease, anemia, mineral-metabolism and insulin resistance. This review describes connections between altered gut microflora and development of CKD and its complications, as well as possible therapeutic options.

1. Microbiota – short characteristic. 2. Mechanisms leading to alterations in gut microbiota and their effects on intestinal barrier permeability. 3. Causes of chronic kidney disease progression related to gut microbiota alterations. 4. Complications of chronic kidney disease related to gut microbiota alterations. 4.1. Cardiovascular disease. 4.2. Anemia. 4.3. Bone metabolism disorders. 4.4. Insulin resistance in CKD. 5. Therapeutic options. 6. Summary

Słowa kluczowe: bariera jelitowa, dysbioza, flora jelitowa, mikrobiota, przewlekła choroba nerek

Keywords: intestinal barrier, dysbiosis, gut microflora, microbiota, chronic kidney disease

1. Mikrobiota – krótka charakterystyka

Mikroorganizmy zasiedlające organizm człowieka obecnie są określane terminem mikrobiota (dawniej – mikroflora), a zespół ich genomów nazywany jest mikrobiomem. Należą do niej nie tylko bakterie, ale także grzyby, wirusy i archeony. Mikrobiota kolonizuje między innymi skórę, górne drogi oddechowe, przewody słuchowe, drogi rodne oraz cały przewód pokar-

mowy człowieka. W ludzkim przewodzie pokarmowym bytuje 10^{14} mikroorganizmów, co równa się 10-krotności liczby komórek eukariotycznych. Komórki drobnoustrojów stanowią 1,5–2 kg masy ciała człowieka. Największa liczebność i różnorodność mikroorganizmów występuje w jelicie grubym [55]. Badania naukowe przeprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat wykazały, że mają one możliwość porozumiewania się (cross-talk) między sobą oraz komórkami gospodarza. Różnorodna

* Autor korespondencyjny: Violetta Dziezdziejko, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Al. Powst. Włkp. 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 15 30; e-mail: viola@pum.edu.pl

się powiązań i przesyłania sygnałów stwarza bowiem skomplikowany ekosystem, który stanowi zarazem podstawę utrzymania stanu homeostazy metabolicznej i immunologicznej gospodarza.

Do pierwszego kontaktu z mikroorganizmami dochodzi już w życiu płodowym. W łożysku potwierdzono obecność DNA bakterii, których kontakt z płodem stymuluje jego układ odpornościowy [64]. W okresie postnatalnym na skład mikrobioty wpływa: sposób porodu (cięcie cesarskie vs poród drogami natury), dieta, higiena czy konieczność przyjmowania antybiotyków. Pełny rozwój mikrobioty jelitowej u człowieka obserwujemy w wieku dorosłym [34].

Skład mikrobioty jelitowej różni się między osobnikami, a ujednoczona mikrobiota istnieje w obrębie małych populacji. Możliwość przeprowadzenia dokładnych badań genetycznych pozwoliła na wyodrębnienie i dokładne scharakteryzowanie tak zwanych enterotypów, czyli trwałych układów mikrobiomów jelitowych. Enterotypy są charakterystyczne dla danego gospodarza i różnią się rodzajem dominujących bakterii. U ludzi zostały wydzielone trzy enterotypy: *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* [3]. Wśród nich można wymienić następujące bakterie: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Dorea* [44]. Dany enterotyp ma wpływ na skład całej flory jelitowej poprzez hamowanie, bądź promowanie wzrostu pozostałych bakterii, specjalizuje się również w syntezie określonych związków [54]. *Bacteroides* wytwarzają biotynę, *Prevotella* – tiaminę, a *Ruminococcus* specjalizują się w syntezie hemu [48]. Zróżnicowanie genomowe w obrębie enterotypów prowadzi do zmienności w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych, w tym różnic w pozyskiwaniu energii z pożywienia [54]. Dzięki temu powstała hipoteza, że poznanie enterotypu danego gospodarza pozwoli na dobór spersonalizowanej diety, a także leków [10].

W stanie zdrowia, bakterie flory jelitowej pozostają w symbiozie z gospodarzem, co oznacza zjawisko współistnienia dwóch różnych gatunków, korzystne dla obu stron. W jelicie panują warunki, faworyzujące wzrost bakterii beztlenowych, które poprzez proces fermentacji przetwarzają dostarczane z pożywieniem niewchłanialne węglowodany. Wytworzone z nich substancje energetyczne wykorzystywane są później przez komórki gospodarza. Najważniejszymi z tych produktów są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA). Powstały w toku ich przemian biochemicznych maślan jest głównym substratem energetycznym dla enterocytów. Jego odpowiednie stężenie warunkuje prawidłowy metabolizm tych komórek, a tym samym utrzymanie integralności bariery jelitowej [11]. Bariera jelitowa poprzez obecność szczelnych połączeń zwanych barierowymi (tight junctions) oraz systemu transporterów przez błonowych umożliwia złożoną komu-

nikację pomiędzy gospodarzem a mikrobiotą jelitową, głównie w zakresie układu odpornościowego. Białka, które budują szczelne połączenia to przede wszystkim: białko strefy zamykającej (zonula occludens – ZO1) oraz białka łączące błony sąsiednich komórek (transmembrane proteins) – okludyna i kładyna [58].

Zmiana środowiska, w którym bytuje mikrobiota: obecność toksyn, diety, stosowana antybiotykoterapia, stres, czy przyjmowane leki powodują, że zmianom ulega rodzaj dominujących bakterii i syntetyzowanych przez nich związków, co prowadzi do uszkodzenia szczelności bariery jelitowej. Tak dzieje się między innymi w przewlekłej chorobie nerek [2].

2. Mechanizmy doprowadzające do jakościowych i ilościowych zmian mikrobioty jelit w przewlekłej chorobie nerek i ich wpływ na strukturę bariery jelitowej

Przewlekła choroba nerek (PChN) jest jednostką chorobową o złożonej etiologii. Najczęstszą jej przyczyną są choroby cywilizacyjne: cukrzyca i nadciśnienie tętnicze. Do jej rozwoju przyczyniają się też choroby immunologiczne, genetyczne i wady wrodzone. Zaawansowanie choroby ocenia się między innymi na podstawie spadku przesączania kłębuszkowego (GFR – glomerular filtration rate) i dzieli się je na pięć stadiów. W stadium I PChN przesączanie kłębuszkowe nie jest jeszcze upośledzone, mogą natomiast występować zmiany morfologiczne w obrazie nerek, np. kamica, torbiele. W stadium II GFR spada poniżej 89 ml/min/1.73 m², jest jednak wyższe niż 60 ml/min/1.73 m². Stadium III charakteryzuje się dalszym obniżaniem filtracji kłębuszkowej i wynosi ona między 59 a 30 ml/min/1.73 m². Stadium IV to GFR między 29–15 ml/min/1.73 m², a ostatnim jest stadium V, w którym GFR spada poniżej 15 ml/min/1.73 m² [7].

Istotą PChN jest nie tylko retencja toksyn mocznicowych, upośledzenie produkcji erytropoetyny, zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej i brak aktywnej formy witaminy D, ale też utrzymujący się nieprzerwanie stan zapalny. U jego źródła leży między innymi upośledzenie szczelności bariery jelitowej, do której dochodzi w mocznicy [48]. W takiej sytuacji prozapalne molekuly i bakteryjne toksyny przedostają się z przewodu pokarmowego do krwiobiegu gospodarza. Wymienia się tu przede wszystkim bakteryjne lipopolisacharydy (LPS), integralne składniki zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i cyjanobakterii, pełniące kluczową rolę dla procesów życiowych bakterii, ale również stanowiące ich główny czynnik chorobotwórczy [5]. Obecność fragmentów oraz metabolitów bakterii poza światłem jelita indukuje i podtrzymuje odpowiedź zapalną. Na ten pato-

mechanizm nakładają się jeszcze: zmniejszony klirens cytokin, dożylne podawanie żelaza u chorych dializowanych i wreszcie sam zabieg hemodializy (użycie błon filtracyjnych, płynów dializacyjnych) [7]. Jak już wcześniej wspomniano, w PChN dochodzi do kumulacji szeregu toksyn mocznicowych, między innymi mocznika i kwasu moczowego. Zaobserwowano, że ich obecność w świetle przewodu pokarmowego doprowadza zarówno do ilościowych, jak i jakościowych zmian mikrobioty jelitowej. Nadmierne ich stężenie powoduje, że stają się one alternatywnymi substratami metabolicznymi dla bakterii. Zaczynają dominować te bakterie, które posiadają ureazę, urykazę i enzymy formujące p-krezol (*Alteromonadaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Methylococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Polyangiaceae*, *Pseudomonadaceae* i *Xanthomonadaceae*). Giną natomiast te, które metabolizują niewchłanialne węglowodany (*Bifidobacterium* i *Lactobacillus*) [11, 62]. Ureaza rozkłada mocznik do amoniaku. Wzrost syntezy amoniaku przyczynia się do wzrostu pH, a tym samym prowadzi do uszkodzenia szczelnych połączeń w komórkach nabłonka jelit i destrukcji bariery jelitowej [59]. W przeprowadzonym przez Vaziri i wsp. badaniu udowodniono, że skutkiem zmian metabolicznych jest upośledzenie funkcji i destrukcja białek przez – i wewnątrz błonowych wchodzących w skład szczelnych połączeń – białka ZO1, kładyny i okładyny [59].

Do pozostałych, współistniejących czynników, które niekorzystnie wpływają na szczelność bariery jelitowej zaliczamy: obrzęk ściany jelita, do którego dochodzi w PChN, nadmierne użycie diuretyków, agresywną ultrafiltrację w czasie hemodializy, krwawienia z przewodu pokarmowego, infiltrację blaszki właściwej nabłonka jelit (lamina propria) przez limfocyty [17, 19, 33, 37]. Toksyny mocznicowe hamują aktywność oraz redukują liczbę transporterów transbłonowych, co jest bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego, ponieważ może prowadzić do zmian w farmakokinetyce niektórych leków i upośledzać ich metabolizm u chorych z PChN [31].

Należy również wspomnieć o rodzaju diety i nawykach żywieniowych w tej grupie chorych. Mają one ogromny wpływ na skład flory jelitowej. Często tej chorobie towarzyszy brak apetytu, nudności, niechęć do przyjmowania niektórych pokarmów [6]. Chorzy z PChN powinni kontrolować ilość przyjmowanych płynów, a także ograniczać spożywanie białek oraz produktów bogatych w fosfor i potas, aby zapobiec hiperfosfatemii i hiperkaliemii. Niestety wiąże się to również z ograniczeniem spożywania warzyw i owoców. Nie jest to korzystne, ponieważ udowodniono, że dieta bogata w błonnik, a uboga w czerwone mięso, sód i cukry proste zwiększa przeżywalność chorych z PChN [23, 24].

3. Przyczyny progresji przewlekłej choroby nerek związane z zaburzeniem mikrobioty jelitowej

Wraz ze spadkiem przesączania kłębuszkowego (GFR) dochodzi do akceleracji niekorzystnych przemian metabolicznych. Siarczan indoksyłu (IS) jest końcowym produktem degradacji tryptofanu w szklaku indolowym. Pierwszy etap tego szlaku inicjowany jest przez tryptofanazę – enzym syntetyzowany przez bakterie *Escherichia coli* wchodzące w skład flory jelitowej. W wyniku tego procesu powstaje indol, który przez barierę jelitową wchłania się do krwiobiegu i ulega sulfonowaniu w wątrobie. W warunkach prawidłowych IS wydalany jest z organizmu wraz z moczem [37]. U pacjentów z PChN z upośledzoną funkcją filtracyjną nerek obserwuje się wyższe stężenia IS niż u osób zdrowych – na podstawie przeprowadzonych badań wykazano związek pomiędzy stężeniem IS a progresją choroby nerek i rozwojem powikłań naczyniowych [28]. Wykorzystując utrwalone linie komórkowe i modele zwierzęce udowodniono niekorzystny wpływ IS na komórki proksymalne kanalików nerkowych, powodujący ich postępujące uszkodzenie. Obserwuje się też włóknienie śródmiąższowe i stwardnienie kłębuszków nerkowych [37]. W badaniu przeprowadzonym przez Leong i wsp. potwierdzono zwiększone ryzyko progresji choroby nerek u pacjentów z PChN w stadium I–IV, związane z wysokim stężeniem IS [28].

Tlenek trimetyloaminy (TMAO) zaliczany jest również do grupy toksyn mocznicowych. Powstaje on z dostarczanych z pokarmem: cholin, fosfatydylocholin i L-karnityny przy udziale bakterii jelitowych [8]. W badaniu Hoyles i wsp. zaobserwowano, że *Enterobacteriaceae* najefektywniej metabolizują tlenek trimetyloaminy TMAO [20]. Wysokie stężenia TMAO wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju i progresji choroby nerek, co potwierdzono m.in. w badaniu Framingham Heart Study z udziałem 1500 uczestników [46]. Z kolei w badaniach przeprowadzonych na myszach, udowodniono wpływ TMAO na rozwój włóknienia cewkowo-śródmiąższowego i zwiększone odkładanie kolagenu w nerkach [8].

4. Powikłania przewlekłej choroby nerek związane ze zmianą mikrobioty jelitowej

4.1. Choroby sercowo-naczyniowe

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD) stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów u chorych z PChN. Wykazano związek pomiędzy wysokimi stężeniami toksyn mocznicowych w surowicy krwi chorych z PChN, a ryzykiem wystąpienia CVD [60]. Siarczan p-krezolu (PCS) stanowi produkt przemiany tyrozyny

i fenyloalaniny i obok opisanego wyżej, siarczanu indoksyłu (IS), stanowi główny związek wpływający na wystąpienie CVD u chorych z PChN [30]. W przeprowadzonej meta-analizie stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem IS i PCS a śmiertelnością wśród chorych z PChN; wysokie stężenie PCS, ale nie IS wiązało się ponadto ze zwiększonym ryzykiem CVD w grupie PChN [30]. We wcześniej opublikowanej przez Sato i wsp. pracy oznaczono osoczowe stężenia IS u chorych z chorobą wieńcową i obniżonym przesączaniem kłębuszkowym GFR. Wykorzystując echokardiografię potwierdzono, że u chorych z wyższymi stężeniami IS dysfunkcja rozkurczowa lewej komory była większa, niż u chorych z niższymi stężeniami [50]. W innych badaniach udowodniono związek IS ze zwiększonym ryzykiem zwapnienia naczyń wieńcowych i restenozy po wszczępieniu stentów do naczyń wieńcowych [21, 56]. W 2018 roku Claro i wsp. wykazali, że IS i PCS stanowią niezależne czynniki prognostyczne śmiertelności całkowitej wśród chorych z PChN. Wyniki badania potwierdziły kluczową rolę toksyn uremicznych w patogenezie CVD w mechanizmie reakcji zapalnej u chorych z upośledzoną funkcją nerek [9]. Tlenek trimetyloaminy (TMAO) wpływa z kolei na rozwój miażdżycy poprzez akumulację cholesterolu w makrofagach. Wysokie stężenia TMAO w osoczu wiążą się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia istotnych incydentów sercowo-naczyniowych, niezależnie od klasycznych czynników ryzyka CVD [60].

4.2. Anemia

Siarczanu indoksyłu zaburza syntezę erytropoetyny i nasila eryptozę (zaprogramowaną śmierć krwinek czerwonych), prowadząc tym samym do zmniejszenia stężenia hemoglobiny u chorych z PChN [1, 38].

4.3. Zaburzenia metabolizmu kostnego

PChN wiąże się z występowaniem osteodystrofii nerkowej. Ma ona złożoną etiologię, ale u jej źródła leży przede wszystkim wtórna nadczynność przytarczyc i niedobór aktywnej formy witaminy D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Ostatnie badania wskazują na negatywny wpływ toksyn mocznicowych, podlegających przemianom pod wpływem zmienionej mikrobioty jelitowej, na przemiany metaboliczne, zachodzące w tkance kostnej w tej grupie chorych. Badania *in vitro* wykazały, że wspomniany wyżej siarczan indoksyłu (IS) hamuje różnicowanie komórek macierzystych w kierunku osteoblastów, proliferację osteoblastów i aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) [15]. Dokładny mechanizm działania IS w tym przypadku nie jest znany, jednak istnieją przesłanki, iż ma on związek z produkcją wolnych rodników i stresem oksydacyjnym [15]. Kolejnym problemem u osób

z PChN jest upośledzone działanie parathormonu (PTH). Stężenie PTH rośnie wraz ze spadkiem GFR i jest wyrazem obrony organizmu przed spadkiem stężenia wapnia. Czy zatem zmiana składu mikrobioty może być jednym z mechanizmów upośledzających odpowiedź komórek tkanki kostnej na działanie PTH? Okazuje się, że siarczan indoksyłu wpływa na zmniejszenie produkcji zależnego od PTH wewnątrzkomórkowego cAMP i zmniejszenie ekspresji genu receptora PTH w osteoblastach [15]. Hamuje również różnicowanie osteoklastów i zmniejsza resorpcję kostną [61]. Wyniki badań *in vivo* są zbieżne z wynikami badań przedklinicznych. W badaniu przekrojowym, w którym uczestniczyło 47 dializowanych chorych stwierdzono, że stężenie siarczanu indoksyłu wykazuje negatywną korelację z markerami kostnymi – ALP i frakcją kostną ALP [18]. Aktualnie uważa się, że między innymi IS może przyczyniać się do rozwoju adynamicznej choroby kości u pacjentów z PChN, czyli takiej formy osteodystrofii nerkowej, w której dochodzi do zmniejszenia obrotu kostnego. Jedną z cech jest nieadekwatnie niskie, w stosunku do obniżonego GFR, stężenie PTH [15]. Inne toksyny mocznicowe związane z zaburzeniem metabolizmu mikrobioty, wykazujące wpływ na metabolizm kostny to siarczan p-krezolu (PCS) oraz inhibitor syntetazy tlenku azotu (ADMA) [15]. Badania *in vitro* wykazały związek wysokich stężeń PCS, zarówno z zaburzeniem różnicowania i proliferacji osteoblastów, zmniejszeniem ich przeżywalności, zaburzeniem przekazywania w szlaku cAMP zależnym od PTH, jak i zmniejszeniem ekspresji receptora dla PTH. ADMA hamuje natomiast różnicowanie osteoblastów [15].

4.4. Insulinooporność w przewlekłej chorobie nerek

W 1980 roku, w pracy DeFronzo i wsp. udowodniono występowanie insulinooporności (IO) u chorych z PChN [12]. Zjawisko insulinooporności u chorych z PChN pojawia się już w początkowych stadiach choroby i ulega progresji wraz ze spadkiem przesączania kłębuszkowego [53]. IO jest ważnym, negatywnym zjawiskiem w PChN, gdyż wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Patogeneza IO w PChN jest wieloczynnikowa. Udowodniono znaczenie zmniejszonej aktywności fizycznej, przewlekłego stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego, niedoboru witaminy D, rozwoju kwasicy metabolicznej oraz anemii towarzyszącej PChN w rozwoju IO [52, 53]. Zmieniony skład mikrobioty jelitowej jest kolejnym ogniwem w powstaniu insulinooporności [26]. W 2004 roku, Backhed i wsp. wykazali, że przeszczepienie mikrobioty z jelit myszy z otyłością, hodowanymi konwencjonalnie myszom GF (germ-free) skutkowało u nich znacznym wzrostem zawartości tkanki tłuszczowej i wystąpieniem insulinooporności już

w ciągu pierwszych 14 dni obserwacji, mimo ograniczenia spożycia pokarmów [4]. Udowodniono także, że w porównaniu z myszami bez otyłości, u myszy otyłych obserwuje się zmniejszoną o 50% liczebność bakterii *Bacteroides* i proporcjonalny wzrost liczebności *Firmicutes*. Zmiana mikrobioty jelitowej u zwierząt otyłych ma wpływ na większe wykorzystanie energii z pożywienia, niż ma to miejsce u osobników szczupłych [29, 57]. Do rozwoju IO mogą przyczyniać się także toksyny metaboliczne produkowane przez mikrobiotę i kumulowane w organizmie chorych z PChN [26]. W badaniach McCaleb i wsp. wyizolowano szczurze adipocyty i inkubowano z surowicą odpowiednio chorych z PChN, otyłych i z cukrzycą typu 2 – adipocyty wykazywały zmniejszony wychwyt glukozy u chorych z PChN, czego nie obserwowano w grupie chorych z cukrzycą i otyłością [32]. Sugerowano tym samym istnienie molekuł specyficznych dla uremii, które wykazują działanie insulinooporne. W innym badaniu obserwowano zmniejszenie osoczowego stężenia glukozy i zapotrzebowania na insulinę u chorych z PChN po zmniejszeniu ilości przyjmowanego z pokarmem białka, potwierdzając kluczową rolę końcowych produktów rozkładu białek w jelicie w rozwoju insulinooporności [47]. Wśród tych związków najważniejszy wydaje się siarczan p-krezolu (PCS). Przewlekle podawanie PCS myszom z prawidłową funkcją nerek wiązało się z rozwojem insulinooporności i ekstopową redystrybucją komórek tłuszczowych [27]. Co ważne, po podaniu związku, stężenie PCS było porównywalne z tym występującym u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek. Ekstopowa redystrybucja lipidów w mięśniach szkieletowych, wątrobie, mięśniu sercowym (teoria przeładowania lipidami) odpowiada za zaburzoną fosforylację substratu dla receptora insulinowego IRS – 1 w resztach tyrozynowych, blokując wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania sygnału insulinowego i tym samym powoduje insulinooporność [40].

5. Możliwości terapeutyczne

W ostatnich latach uznano znaczący wpływ mikrobiomu na zdrowie człowieka. Doprowadziło to do rozwoju badań nad możliwościami terapeutycznymi chorób poprzez oddziaływanie na florę bakteryjną. Dotyczy to również przewlekłej choroby nerek. Do sprawdzonych metod interwencji leczniczych w przypadku zaburzenia symbiozy należy stosowanie prebiotyków, probiotyków i synbiotyków. Prebiotyki to specyficzne składniki pokarmowe stanowiące błonnik, głównie oligosacharydy, takie jak inulina. Prowadzą one do promowania wzrostu dobroczynnych bakterii jelitowych i poprzez zmianę pH oddziałują na stan bariery jelitowej, a także zwiększają aktywność hormonów jelito-

wych takich jak GLP-1 (glukagonopodobny peptyd-1). Probiotyki bowiem to wyselekcjonowane szczepy mikroorganizmów, zdolne do przeżycia w organizmie człowieka i wywierające korzystny efekt na zdrowie. Ich cechą musi być zdolność przylegania do nabłonka jelita, aby nie zostały z nich usunięte w krótkim czasie (np. w trakcie biegunki). Ponadto muszą być odporne na kwas solny zawarty w żołądku, enzymy trawienne, kwasy żółciowe. Preparat łączący probiotyki i prebiotyki nazywany jest synbiotykem [48, 51]. Probiotyki mogą być pochodzenia naturalnego np.: ze sfermentowanych produktów – głównie mlecznych, takich jak jogurt czy kefir, produktów kiszonych lub komercyjnie wytwarzanych preparatów przyjmowanych doustnie [16]. Chociaż stosowane są od wielu lat i generalnie uznawane za bezpieczne, mogą mieć również znaczenie chorobotwórcze. Opisano przypadki uogólnionych infekcji powodowanych przez różne szczepy probiotyczne. Najwięcej przypadków dotyczyło fungemii *Saccharomyces boulardi* oraz *cerevisae*. Stwierdzano jednak także zakażenia bakteryjne powodowane przez szczepy *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* oraz *Bifidobacterium breve*. W literaturze można również spotkać opisy zapalenia wsierdzia, wywołanego przez probiotyczne szczepy *Streptococcus*. Część z tych przypadków mogło być skutkiem przeniesienia bakterii w okolicę wkluc dożylnych poprzez dłonie personelu, podającego wcześniej probiotyki. Innym negatywnym aspektem może być zmieniony metabolizm w świetle jelit. Podanie probiotyku zwiększa zapotrzebowanie na tlen nabłonka jelit lub zwiększa powstawianie mleczanów, co może prowadzić do niebezpiecznych powikłań. Dodatkowo w teorii probiotyki mogą nadmiernie stymulować układ immunologiczny jelit lub przenosić geny antybiotykoodporności wśród innych bakterii jelitowych. Aktualnie obawy te nie znalazły uzasadnienia [13]. Do tej pory przeprowadzono liczne badania z użyciem rozmaitych szczepów bakteryjnych, głównie z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* oraz prebiotyków [48]. Działanie probiotyków jest złożone i specyficzne dla poszczególnych szczepów bakteryjnych. Polega ono między innymi na uszczelnianiu połączeń barierowych, zwiększaniu produkcji mucyny i ochronie enterocytów przed apoptozą. Poza działaniem ochronnym na barierę jelitową mają one antagonistyczny wpływ na patogenną florę jelitową poprzez wydzielanie bakteriocyn i konkurencję w zajmowaniu nisz w jelitach. Nie bez znaczenia jest efekt stymulujący odporność oraz pobudzający tworzenie limfocytów regulatorowych [25]. W badaniach uzyskiwano istotne zmniejszenie poziomów szkodliwych metabolitów, takich jak: związki krezolu, siarczan indoksyli czy azot mocznika (BUN, blood urea nitrogen). W jednym z badań obserwowano wzrost przesączania kłębuszkowego po zastosowaniu prebiotyków. Badani pacjenci z przewlekłą chorobą

nerek spożywali najpierw przez 2 tygodnie 1,6 g błonnika na dobę. Następnie zwiększano podaż błonnika w diecie do 23 g na dobę przez 4 tygodnie. Wadą tego badania była mała ilość uczestników – 13 osób, chociaż osiągnięto istotny statystycznie spadek stężenia kreatyniny, utrzymujący się co najmniej do 4 tygodni po zakończeniu interwencji żywieniowej [49]. Efekty te osiągane są głównie poprzez stworzenie odpowiedniego środowiska do wzrostu bakterii sacharolitycznych kosztem proteolitycznych, zwiększoną absorpcję związków azotu przez florę jelitową, mniejszą produkcję szkodliwych metabolitów i ich wydalanie ze stolcem. Odpowiednia dieta powoduje zwiększenie produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, posiadających właściwości „uszczelniające” jelito [48]. Kwasy tłuszczowe mają też bezpośredni efekt metaboliczny oraz immunomodulujący poprzez bezpośrednie działanie na receptory FFAR1, FFAR2 i FFAR3 (free fatty acid receptor). W ten sposób podwyższają poziom leptyny, pobudzają aktywność limfocytów regulatorowych i zmniejszają ilość reaktywnych form tlenu [14]. Inne potencjalnie dobroczynne efekty działania prebiotyków zależą od aktywacji glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP-1), peptydu YY (PYY – neuropeptyd anoreksygeniczny) i innych hormonów jelitowych. Polegają one na obniżeniu masy ciała, poprawieniu metabolizmu lipidów i zmniejszeniu insulinooporności [51]. Badanie przeprowadzone w populacji pacjentów dializowanych otrzewnowo udowodniło natomiast mniejszy poziom cytokin prozapalnych i endotoksyny po 6-miesięcznym okresie spożycia probiotyków szczepów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [39]. Analiza kohorty NHANES wskazuje na mniejsze nasilenie albuminurii u osób spożywających probiotyki i jogurt, co najmniej 3 razy na tydzień. Niestety w badaniu opartym na uzupełnianiu kwestionariuszy żywieniowych, nie wskazano na konkretny typ stosowanych probiotyków [39, 63]. W badaniach na szczurach udowodniono spowolnienie progresji choroby nerek, a nawet wydłużenie przeżycia po zastosowaniu probiotyków szczepów *Bacillus pasteurii* lub *Lactobacillus sporogenes* [39, 51].

Dostępne są także liczne badania obserwacyjne i interwencyjne u ludzi i zwierząt, udowadniające korzyści wynikające z przyjmowania zwiększonej ilości błonnika. Może on mieć zarówno formę oligosacharydów, jak i skrobii odpornej. Duże badanie obserwacyjne na populacji około 14 000 osób potwierdziło zmniejszenie wykładników zapalenia oraz ogólnej śmiertelności wraz ze zwiększeniem spożycia błonnika [36, 45]. Z drugiej strony wyniki niektórych badań nie potwierdzają korzyści ze stosowania błonnika w PChN. W randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu z udziałem 40 pacjentów z PChN w stadium III–IV, nie udowodniono efektu terapeutycznego arabinoksyalanu podawanego przez 4 tygodnie

[42]. Arabinoksyalan to związek pochodzący ze ścian komórek roślinnych, głównie produktów zbożowych będący polimerem arabinozy i ksylazy.

Aktualnie najbardziej obiecujące wyniki uzyskuje się dzięki użyciu synbiotyków. Badania z użyciem różnych szczepów bakteryjnych w połączeniu z inuliną i innymi probiotykami prowadziło do obniżenia stężenia toksycznych metabolitów, głównie siarczanu p-krezolu, parametrów zapalnych, a nawet zwolnienia progresji PChN. Badania prowadzone były na różnych grupach pacjentów, zarówno dializowanych jak i pozostających w stadium III–IV PChN. Po zastosowaniu szczepów *Lactobacillus acidophilus* uzyskano spadek stężenia w surowicy dimetyloaminy, natomiast po podaniu bakterii *Bifidobacterium longum* – spadek stężenia w surowicy siarczanu indoksyłu, homocysteiny i triacylogliceroli. Wadą tych badań pozostaje dość mała liczebność badanych grup (do 40 osób) i wymagają potwierdzenia w większej populacji [39]. Niedawno opublikowana meta-analiza randomizowanych badań z użyciem probiotyków u pacjentów z PChN stadium III–V wskazuje na obniżenie stężenia siarczanu p-krezolu i podwyższenie stężenia interleukiny-6. Zastosowanie probiotyku nie miało istotnie statystycznego wpływu na stężenie kreatyniny, azotu mocznika i innych toksyn, ani na stężenie hemoglobiny oraz białka C-reaktywnego (CRP). Meta-analiza oparta była na ośmiu badaniach, obejmujących w sumie 261 pacjentów. Chory przyjmowali osiem różnych preparatów probiotycznych w różnych dawkach. Wśród podawanych szczepów bakteryjnych były: *Lactobacillus acidophilus*, *gasseri*, *bulgaricus*, *plantarum*, *casei*, *salivarius*, *sporogenes*, *Bifidobacterium bifidum*, *longum*, *infantis*, *breve*, oraz *Streptococcus thermophilus* [22].

Ciekawą możliwością leczenia zaburzeń mikrobioty jest modyfikacja genomu bakterii używanych następnie w formie probiotyków, tak aby dostosować ich metabolizm, by dawał największe korzyści pacjentom z PChN. W teorii możliwe jest dostarczenie do przewodu pokarmowego pacjentów bakterii o zmodyfikowanym genomie, wyposażonych w enzymy, rozkładające toksyny mocznikowe. Na dzień dzisiejszy brakuje praktycznych badań oceniających takie możliwości [39, 41, 51].

Inne, potencjalne możliwości oddziaływania to stosowanie antybiotyków, zabijających nieprawidłową florę jelitową lub inhibitorów fermentacji niestrawionych węglowodanów, takich jak akarboza, która prowadzi do hamowania trawienia polisacharydów przez komórki jelitowe, dostarczając substratu energetycznego dla bakterii jelitowych [48]. Zastosowanie rifaksyminy, czyli antybiotyku bakteriobójczego o szerokim spektrum działania ma udowodniony efekt zmniejszający produkcję tlenu trimetyloaminy poprzez usunięcie bakterii jelitowych. Bardziej specyficzne efekty można uzyskać poprzez blokadę enzymów bakteryjnych takich

jak TMA – liaza i tryptofanaza, aby uniemożliwić produkcję toksyn bez efektu bakterioobójczego. Do tej pory brakuje jednak badań udowodniających bezpieczeństwo i skuteczność takiego postępowania u ludzi [43]. Lubiproston, aktywator kanału chlorkowego CIC-2 używany w leczeniu zaparć, może również wpływać na przywrócenie równowagi mikrobiologicznej jelita poprzez namnażanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Prevotella* [39].

Proponowane jest jeszcze inne podejście, które bezpośrednio nie wpływa na mikrobiotę jelitową, a raczej przeciwdziała negatywnemu wpływowi tworzenia toksyn mocznicowych. Polega na stosowaniu substancji wiążących szkodliwe metabolity w przewodzie pokarmowym. Prowadzono badania z zastosowaniem związku węgla – AST-120 oraz badano pod tym kątem działanie chlorowodoru sewelameru. Obserwowano zmniejszenie stężenia siarczanu indoksyłu we krwi; co więcej podawanie AST-120 pacjentom ze schyłkową niewydolnością nerek w okresie przeddializacyjnym prowadziło do zmniejszenia ogólnej śmiertelności w tej grupie chorych [48].

Wśród nowych, potencjalnych terapii oddziałujących na mikrobiom jelitowy znajduje się również kanagliflozyna. Ten lek przeciwcukrzycowy, oprócz blokowania transporterów glukozy SGLT-2 w cewkach nerkowych, ma również słabe działanie hamujące sodozależnych transporterów glukozy i galaktozy SGLT-1, znajdujących się w jelitach. Badanie na myszach z niewydolnością nerek wskazuje, że kanagliflozyna hamuje wchłanianie węglowodanów w początkowym odcinku jelita cienkiego, prowadząc do ich większej koncentracji w końcowym odcinku jelita cienkiego i w jelicie grubym. Wpływa to na rozwój potencjalnie korzystnych bakterii np. z rodzaju *Bifidobacterium*. Zwiększa się produkcja krótko-łańcuchowych kwasów tłuszczowych, a wyraźnie zmniejsza powstawanie siarczanu p-krezolu i w mniejszym stopniu siarczanu indoksyłu. Otwiera to nowe możliwości i potrzebę badań nad inhibitorami SGLT-1, jako lekami przywracającymi eubiozę jelitową [35].

6. Podsumowanie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania mikrobiotą jelitową w kontekście jej wpływu na stan zdrowia człowieka. Dzięki rozwojowi bioinformatyki i postępowi w zakresie technik sekwencjonowania DNA udowodniono związek zmienionej mikrobioty jelitowej z występowaniem wielu chorób, w tym przewlekłej choroby nerek. Zmieniona flora jelitowa stymuluje produkcję toksyn metabolicznych i zwiększa ich wchłanianie w jelicie, co w konsekwencji prowadzi do progresji choroby nerek i rozwoju jej powikłań. Uważa się, że przywrócenie prawidłowej flory jelito-

wej u tych pacjentów może spowolnić rozwój choroby i zredukować ryzyko powikłań. Wyniki badań przedklinicznych nad potencjalnymi możliwościami terapeutycznymi są obiecujące, jednak w dalszym ciągu istnieje potrzeba przeprowadzenia badań klinicznych na dużych populacjach, aby ustalić jednoznaczne strategie lecznicze u chorych z przewlekłą chorobą nerek. Być może w przyszłości modyfikowanie składu flory jelitowej pozwoli na lepsze leczenie i kontrolowanie chorób nerek.

Piśmiennictwo

1. Ahmed M.S., Abed M., Voelkl J., Lang F.: Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol.* **14**, 244 (2013)
2. Anders H.J., Andersen K., Stecher B.: The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* **83**, 1010–1016 (2013)
3. Arumugam M., Bork P. i wsp.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180 (2011)
4. Baekhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 15718–15723 (2004)
5. Baumgart D.C., Dignass A.U.: Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **5**, 685–694 (2002)
6. Bossola M., Luciani G., Rosa F., Tazza L.: Appetite and Gastrointestinal Symptoms in Chronic Hemodialysis Patients. *J. Renl. Nutr.* **21**, 448–454 (2011)
7. Carrero J.J., Stenvinkel P.: Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 49–55 (2009)
8. Castillo-Rodriguez E., Sanchez-Niño M.D. i wsp.: Impact of altered intestinal microbiota on chronic kidney disease progression. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070300 (2018)
9. Claro L.M., Pécóits-Filho R. i wsp.: The impact of uremic toxicity induced inflammatory response on the cardiovascular burden in chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10100384 (2018)
10. Costea P.I., Bork P. i wsp.: Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **3**, 8–16 (2018)
11. Cummings J.H., Macfarlane G.T.: Collaborative JPEN-Clinical Nutrition Scientific Publications Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN-Parenter Enter.* **21**, 357–365 (1997)
12. DeFronzo R.A., Alvestrand A., Smith D., Hendler R., Hendler E., Wahren J.: Insulin resistance in uremia. *J. Clin. Invest.* **67**, 563–568 (1981)
13. Doron S., Snyderman D.R.: Risk and Safety of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 129–134 (2015)
14. Esgalhado M., Kemp J.A., Damasceno N.R., Fouque D., Mafra D.: Short-chain fatty acids: a link between prebiotics and microbiota in chronic kidney disease. *Future Microbiol.* **12**, 1413–1425 (2017)
15. Fujii H., Goto S., Fukagawa M.: Role of uremic toxins for kidney, cardiovascular, and bone dysfunction. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10050202 (2018)
16. George Kerry R., Patra J.K., Gouda S., Park Y., Shin H.S., Das G.: Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**, 927–939 (2018)

17. Gerson L.B.: Causes of gastrointestinal hemorrhage in patients with chronic renal failure. *Gastroenterology*, **145**, 895–897 (2013)
18. Goto S., Fujii H., Hamada Y., Yoshiya K., Fukagawa M.: Association Between Indoxyl Sulfate and Skeletal Resistance in Hemodialysis Patients. *Ther. Apher. Dial.* **14**, 417–423 (2010)
19. Cigarran Guldris S., Gonzalez Parra E., Cases Amenós A.: Gut microbiota in chronic kidney disease. *Nefrología (English Edition)*, **37**, 9–19 (2017)
20. Hoyles L., Dumas M.E. i wsp.: Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota. *Microbiome*, **6**, 73 (2018)
21. Hsu C.C., Lu Y.C., Chiu C.A., Yu T.H., Hung W.C., Wang C.P., Lu L.F., Chung F.M., Lee Y.J., Tsai I.T.: Levels of indoxyl sulfate are associated with severity of coronary atherosclerosis. *Clin. Invest. Med.* **36**, E42–49 (2013)
22. Jia L., Jia Q., Yang J., Jia R., Zhang H.: Efficacy of probiotics supplementation on chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Blood Press. Res.* **43**, 1623–1635 (2018)
23. Kelly J.T., Palmer S.C., Wai S.N., Ruospo M., Carrero J.J., Campbell K.L., Strippoli G.F.M.: Healthy dietary patterns and risk of mortality and ESRD in CKD: A meta-analysis of cohort studies. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 272–279 (2017)
24. Koppe L., Fouque D., Soulage C.O.: The role of gut microbiota and diet on uremic retention solutes production in the context of chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10040155 (2018)
25. Koppe L., Mafra D., Fouque D.: Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney Int.* **88**, 958–966 (2015)
26. Koppe L., Pelletier C.C., Alix P.M., Kalbacher E., Fouque D., Soulage C.O., Guebre-Egziabher F.: Insulin resistance in chronic kidney disease: new lessons from experimental models. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 1666–1674 (2014)
27. Koppe L., Soulage C.O. i wsp.: p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 88–99 (2013)
28. Leong S.C., Sirich T.L.: Indoxyl Sulfate-review of toxicity and therapeutic strategies. *Toxins*, **8**, E358 (2016)
29. Ley R.E., Bäckhed E., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102**, 11070–11075 (2005)
30. Lin C.J., Wu V., Wu P.C., Wu, C.J.: Meta-Analysis of the associations of p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. *PLoS One*, **10**, e0132589 (2015)
31. Liu B., Luo F., Luo X., Duan S., Gong Z., Peng J.: Metabolic enzyme system and transport pathways in chronic kidney diseases. *Curr. Drug. Metab.* **19**, 568–576 (2018)
32. McCaleb M.L., Izzo M.S., Lockwood D.H.: Characterization and partial purification of a factor from uremic human serum that induces insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **75**, 391–396 (1985)
33. Meijers B., Farré R., Dejongh S., Vicario M., Evenepoel P.: Intestinal barrier function in chronic kidney disease. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070298 (2018)
34. Meropol S.B., Edwards A.: Development of the infant intestinal microbiome: a bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Res. C Embryo. Today*, **105**, 228–239 (2015)
35. Mishima E., Abe T. i wsp.: Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **315**, F824–833 (2018)
36. Moraes C., Borges N.A., Mafra D.: Resistant starch for modulation of gut microbiota: Promising adjuvant therapy for chronic kidney disease patients?. *Eur. J. Nut.* **55**, 1813–1821 (2016)
37. Nallu A., Sharma S., Ramezani A., Muralidharan J., Raj D.: Gut microbiome in CKD: challenges and opportunities. *Transl. Res.* **179**, 24–37 (2017)
38. Nangaku M., Mimura I., Yamaguchi J., Higashijima Y., Wada T., Tanaka T.: Role of uremic toxins in erythropoiesis-stimulating agent resistance in chronic kidney disease and dialysis patients. *J. Ren. Nutr.* **25**, 160–163 (2015)
39. Pan W., Kang, Y.: Gut microbiota and chronic kidney disease: implications for novel mechanistic insights and therapeutic strategies. *Int. Urol. Nephrol.* **50**, 289–299 (2018)
40. Pawlak, J., Derlacz R.A.: Mechanizm powstawania oporności na insulinę w tkankach obwodowych. *Postępy Biochemii*, **57**, 200–206 (2011)
41. Piñero-Lambea C., Ruano-Gallego D., Fernández L.Á.: Engineered bacteria as therapeutic agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 94–102 (2015)
42. Poesen R., Evenepoel P., De Loor H., Delcour J.A., Courtin C.M., Kuypers D., Augustijns P., Verbeke K., Meijers B.: The influence of prebiotic arabinoxylan oligosaccharides on microbiota derived uremic retention solutes in patients with chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *PLoS One*, **11**, e0153893 (2016)
43. Prokopenko A.J., Nolin T.D.: Microbiota-derived uremic retention solutes: perpetrators of altered nonrenal drug clearance in kidney disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **11**, 71–82 (2018)
44. Qin, J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
45. Krishnamurthy V.M., Wei G., Baird B.C., Murtaugh M., Chonchol M.B., Raphael K.L., Greene T., Beddhu S.: High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **81**, 300–306 (2012)
46. Rhee E.P., Gerszten R.E. i wsp.: A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1330–1338 (2013)
47. Rigalleau V., Blanchetier V., Combe C., Guillot C., Deleris G., Aubertin J., Aparicio M., Gin H.: A low-protein diet improves insulin sensitivity of endogenous glucose production in predialytic uremic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1512–1516 (1997)
48. Sabatino A., Regolisti G., Brusasco I., Cabassi A., Morabito S., Fiaccadori E.: Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 924–933 (2015)
49. Salmean Y.A., Segal M.S., Langkamp-Henken B., Canales M.T., Zello G.A., Dahl W.J.: Foods with added fiber lower serum creatinine levels in patients with chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.* **23**, e29–32 (2013)
50. Sato B., Murohara T. i wsp.: Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **111**, 712–716 (2013)
51. Sircana A., De Michieli F., Parente R., Framarin L., Leone N., Berrutti M., Paschetta E., Bongiovanni D., Musso G.: Gut microbiota, hypertension and chronic kidney disease: recent advances. *Pharmacol. Res.* doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.013 (2018)
52. Soulage C.O., Koppe L., Fouque D.: Protein-bound uremic toxins... new targets to prevent insulin resistance and dysmetabolism in patients with chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.* **23**, 464–466 (2013)
53. Spoto B., Pisano A., Zoccali C.: Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **311**, 1087–1108 (2016)

54. Strzępa A., Szczepanik M.: Wpływ naturalnej flory jelitowej na odpowiedź immunologiczną. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67**, 908–920 (2013)
55. Tojo R., Suarez A., Clemente M.G., de los Reyes-Gavilan C.G., Margolles A., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P.: Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 15163–15176 (2014)
56. Tsai M.L., Hsieh I.C., Hung C.C., Chen C.C.: Serum free indoxyl sulfate associated with in-stent restenosis after coronary artery stentings. *Cardiovasc. Toxicol.* **15**, 52–60 (2015)
57. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031 (2006)
58. Vaziri N.D., Goshtasbi N., Yuan J., Jellbauer S., Moradi H., Raffatellu M., Kalantar-Zadeh K.: Uremic Plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am. J. Nephrol.* **36**, 438–443 (2012)
59. Vaziri N.D., Yuan J., Norris K.: Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **37**, 1–6 (2013)
60. Velasquez M.T., Centron P., Barrows I., Dwivedi R., Raj D.S.: Gut microbiota and cardiovascular uremic toxicities. *Toxins*, **10**, doi: 10.3390/toxins10070287 (2018)
61. Watanabe K., Tominari T., Hirata M., Matsumoto C., Hirata J., Murphy G., Nagase H., Miyaura C., Inada M.: Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio*, **7**, 1178–1185 (2017)
62. Wong J., Piceno Y.M., DeSantis T.Z., Pahl M., Andersen G.L., Vaziri, N.D.: Expansion of Urease – and uricase-containing, indole – and p-Cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* **9**, 230–237 (2014)
63. Yacoub R., Kaji D., Patel S.N., Simoes P.K., Busayavalasa D., Nadkarni G.N., He J.C., Coca S.G., Uribarri J.: Association between probiotic and yogurt consumption and kidney disease: insights from NHANES. *Nutr. J.* **15**, 10 (2016)
64. Zhuang L., Chen H., Zhang S., Zhuang J., Li Q., Feng Z.: Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.002