POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 1, 21–29
DOI: 10.2478/am-2022.0003

BAKTERIE MODYFIKOWANE GENETYCZNIE – PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA W PROFILAKTYCE, DIAGNOSTYCE I TERAPII

Barbara Macura[1], Aneta Kiecka[2]*, Marian Szczepanik[2]

[1] Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka
[2] Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Katedra Biologii Medycznej

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano we wrześniu 2021 r.

Streszczenie: Prawidłowy stan mikrobioty warunkuje wiele efektów prozdrowotnych w organizmie człowieka. Zaburzenia w równowadze mikrobioty mogą być regulowane poprzez dostarczanie do organizmu probiotyków. Niestety, ich podawanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Probiotyki są głównie wykorzystywane w profilaktyce wielu schorzeń, a w terapii wykazują jedynie działanie wspomagające. Ponadto probiotyki w czasie obróbki technologicznej oraz w czasie przechodzenia przez przewód pokarmowy mogą tracić swoją biologiczną aktywność. Ograniczenia te mogą zostać pokonane dzięki wprowadzeniu modyfikacji genetycznych do komórek bakteryjnych. Aktualne badania wykazują, że takie modyfikacje mogą zmienić właściwości biologiczne bakterii i znacznie rozszerzyć zakres ich wykorzystania w medycynie o właściwości diagnostyczne i terapeutyczne.

1. Wprowadzenie. 2. Rola prawidłowej mikrobioty w organizmie człowieka. 3. Probiotyki naturalne w profilaktyce i terapii. 4. Probiotyki naturalne – korzyści i ograniczenia. 5. Modyfikacje genetyczne bakterii – perspektywy i zagrożenia. 6. Bakterie modyfikowane genetycznie w diagnostyce i terapii. 7. Wykorzystanie bakterii modyfikowanych genetycznie w medycynie. 8. Podsumowanie

GENETICALLY MODIFIED BACTERIA – THE PERSPECTIVE OF APPLICATION IN PREVENTION, DIAGNOSTICS AND THERAPY

Abstract: The microbiota plays an important role in human health. Disturbance in microbiota composition can be compensated by administration of probiotic microorganisms. However, their application is associated with some constraints. Probiotics are commonly used in disease prevention, whereas they play only a supportive role in disease therapy. Moreover, probiotics during technological processes and gastrointestinal tract passage may lose their beneficial properties. These constraints can be overcome by genetic modification of bacteria. The current research shows that genetically modified bacteria can have new biological properties and can be used in diagnostics and therapy.

1. Introduction. 2. The role of microbiota in human body. 3. Natural probiotics in disease prevention and therapy. 4. Natural probiotics – advantages and limitations. 5. Engineering bacteria – prospects and threats. 6. Genetically modified bacteria in diagnostics and therapy. 7. Usage of genetically modified bacteria in medicine. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakterie modyfikowane genetycznie, farmabiotyki, mikrobiota, probiotyki
Keywords: genetically modified bacteria, pharmabiotics, microbiota, probiotics

1. Wprowadzenie

Biologia syntetyczna to nowa dziedzina nauki, w której organizmy żywe są genetycznie programowane do wykonywania określonych zadań. Organizmy takie planuje się zastosować między innymi w medycynie, rolnictwie, energetyce, przemyśle oraz badaniach podstawowych w biologii. Modyfikacje genetyczne mogą dotyczyć zarówno bakterii, powszechnie uznanych za posiadające właściwości probiotyczne (na przykład bakterii z rodzaju *Lactobacillus*), aby wzmocnić to działanie lub bakterii, które takich właściwości nie posiadają, ale dzięki modyfikacjom genetycznym mogą uzyskać pożądane właściwości prozdrowotne. Co więcej, planuje się wykorzystać bakterie modyfikowane genetycznie w profilaktyce, diagnostyce i terapii wielu chorób, między innymi tych związanych z zaburzeniami funkcjonowania przewodu pokarmowego oraz w chorobach nowotworowych [13, 24, 51, 52].

2. Rola prawidłowej mikrobioty w organizmie człowieka

Terminem mikrobiota określa się wszystkie drobnoustroje występujące w organizmie ludzkim w rejonach pokrytych komórkami nabłonkowymi – w obrębie błon śluzowych oraz na skórze człowieka [15, 48]. Szczególnie dużo drobnoustrojów bytuje w przewodzie pokarmowym i w kobiecej pochwie [6, 44]. Drobnoustroje

* Autor korespondencyjny: mgr Aneta Kiecka, Katedra Biologii Medycznej, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kopernika 7a, 31-034; tel. 12 422 99 49; e-mail: aneta.kiecka@uj.edu.pl

w jelicie grubym to w większości bakterie bezwzględnie beztlenowe z rodzaju *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Butyrovibrio*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* oraz *Bifidobacterium*. W jelicie grubym zidentyfikowano także bakterie tlenowe i względnie beztlenowe: Gram-ujemne pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki Gram-dodatnie *Lactobacillus*, ziarniaki z rodzaju *Enterococcus* i *Streptococcus* oraz nieliczne grzyby *Candida* spp. [15]. Skład ilościowy i jakościowy mikrobioty u poszczególnych osób może znacznie się różnić, jednak główne rodzaje bakterii jelitowych, obecne u wszystkich ludzi, stanowią około 30% całej mikrobioty jelit [29]. Warto zaznaczyć, iż w początkowym odcinku przewodu pokarmowego, jamie ustnej, wykryto około 700 gatunków z 9 typów bakterii, a w jelicie grubym około 800 gatunków z 9 typów bakterii. Liczba mikroorganizmów w jamie ustnej wynosi około 10^8 jtk (jednostka tworząca kolonię) na 1 gram treści i przeważają bakterie z rodzajów *Streptococcus, Peptococcus, Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oraz *Fusobacterium*. Z kolei bakteriami dominującymi w pochwie są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [29]. Fizjologiczna rola mikrobioty jest szeroka i obejmuje wiele aspektów funkcjonowania organizmu człowieka. Najważniejsze efekty zdrowotne wynikające z oddziaływania prawidłowej mikrobioty na organizm człowieka przedstawiono w tabeli I [15, 20, 23, 29, 40].

Określenie „dysbioza" oznacza zaburzenie składu, proporcji oraz funkcji drobnoustrojów tworzących mikrobiotę [8]. Konsekwencją dysbiozy jest rozluźnienie połączeń ścisłych między enterocytami i zwiększenie przesiąkliwości nabłonka jelitowego (leaky gut syndrome), co może sprzyjać między innymi chronicznym stanom zapalnym bezpośrednio pod warstwą komórek nabłonkowych (mikrozapalenie), endotoksemii, jak również zmianom chorobowym w odległych obszarach ustroju, zaliczanym do grupy chorób niezakaźnych (non-communicable diseases) [2]. Zatem dysbioza oraz uszkodzenie bariery nabłonkowej stanowią czynnik sprzyjający rozwojowi takich schorzeń jak: nieswoiste choroby zapalne jelit (IBD, z ang. inflammatory bowel disease), zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego (biegunki, zaparcia, wzdęcia), zespół jelita drażliwego, choroby alergiczne, choroby autoimmunizacyjne, cukrzyca typu drugiego (T2D), otyłość, zespół metaboliczny, choroba stłuszczeniowa wątroby, miażdżyca, choroby neurodegeneracyjne, depresja, zaburzenia ze spektrum autyzmu, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera oraz schizofrenia [2]. Najważniejsze czynniki, sprzyjające rozwojowi dysbiozy to dieta, niektóre choroby oraz stosowane leki [4, 34, 49].

Jednym ze sposobów utrzymania równowagi w składzie mikrobioty człowieka jest stosowanie probiotyków. Probiotyki to żywe mikroorganizmy, które podawane

Tabela I
Efekty prozdrowotne prawidłowej mikrobioty człowieka

Zjawisko	Efekt prozdrowotny
normalizacja mikrobioty jelita	• ochrona przed kolonizacją patogenami
	• zapobieganie infekcjom jelit
	• zapobieganie biegunce
	• przyspieszenie wymiany enterocytów
	• stabilizacja bariery jelitowej
normalizacja mikrobioty pochwy	• ochrona przed kolonizacją patogenami
	• zapobieganie zakażeniom pochwy w tym również infekcjom wirusowym (HIV/HPV)
efekty metaboliczne	• ułatwienie metabolizmu laktozy
	• synteza krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i niektórych witamin
	• trawienie długołańcuchowych węglowodanów i błonnika pokarmowego
	• uczestnictwo w przemianach kwasów żółciowych i ich wydaleniu
	• wpływ na pasaż jelitowy
	• detoksykacja/usuwanie ksenobiotyków i kancerogenów
	• obniżenie poziomu toksycznych i mutagennych substancji w jelicie
	• redukcja ryzyka rozwoju otyłości, cukrzycy typu 2 i zespołu metabolicznego oraz raka jelita grubego
immunomodulacja	• zapewnienie prawidłowego rozwoju układu odpornościowego
	• regulacja odpowiedzi immunologicznej
wpływ na funkcjonowanie centralnego układu nerwowego	• produkcja neurotransmiterów i neuromodulatorów [kwas gamma-aminomasłowy (GABA), norepinefryna, serotonina, dopamina, acetylocholina, kynurenina]
	• zapobieganie nieprawidłowościom w funkcjonowaniu układu nerwowego (oś jelitowo-mózgowa)

w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza. Metody sprzyjające uzyskaniu bioróżnorodności mikrobioty obejmują nie tylko stosowanie probiotyków, ale również wykorzystanie prebiotyków, synbiotyków i postbiotyków. Prebiotyki to składniki żywności, między innymi fruktooligosacharydy, inulina czy skrobia oporna, które wspierają rozwój bakterii probiotycznych, przykładowo bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus*), w przewodzie pokarmowym. Probiotyki i prebiotyki podawane łącznie określa się jako synbiotyki [15, 40]. Terminem postbiotyki określamy substancje, które posiadają korzystne właściwości biologiczne dla gospodarza, stanowiące konkretne metabolity bakteryjne (np. kwas mlekowy), składowe ścian komórkowych określonych mikroorganizmów, które mogą promować odpowiedź immunologiczną, jak również niektóre białka obecne w lizatach probiotycznych szczepów [17, 37].

3. Probiotyki naturalne w profilaktyce i terapii

Właściwości prozdrowotne probiotyków w profilaktyce i terapii wielu schorzeń są powszechnie znane. Do najczęściej stosowanych drobnoustrojów probiotycznych należą bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz niepatogenne grzyby drożdżopodobne *Saccharomyces boulardii* [15].

Zgodnie z wytycznymi ISAPP (The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) wyróżniono trzy główne mechanizmy działania probiotyków pod względem częstości ich występowania wśród badanych szczepów. Powszechnie występujące mechanizmy (dotyczą rodzaju bakterii) obejmują ochronę przed kolonizacją przez patogeny, wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, short chain fatty acids), stabilizację i normalizację mikrobioty jelitowej, wpływ na zwiększoną wymianę enterocytów oraz regulację pasażu jelitowego. Często występujące mechanizmy (dotyczą gatunku bakterii) polegają na wytwarzaniu witamin, stabilizacji bariery jelitowej, antagonizmie w stosunku do patogenów, metabolizmie soli kwasów żółciowych, aktywności enzymatycznej i neutralizacji karcynogenów. Rzadko występujące mechanizmy (dotyczą szczepu bakterii) to modulacja odpowiedzi immunologicznej, wytwarzanie specyficznych substancji bioaktywnych oraz działanie endokrynne i neurogenne. Różne szczepy bakterii wykazują nieco inne właściwości probiotyczne, a więc należy dobierać konkretny szczep probiotyczny do leczenia konkretnego schorzenia [11, 15, 40].

Probiotyki naturalne, będące niezmodyfikowanymi genetycznie drobnoustrojami (PN), są wykorzystywane między innymi w zapobieganiu i leczeniu biegunki poantybiotykowej, zapobieganiu biegunce spowodowanej *Clostridium difficile* oraz wspomaganiu leczenia w chorobie Leśniowskiego-Crohna, a także w zaburzeniach czynnościowych układu pokarmowego (np. zaparcia), zespole jelita drażliwego, niektórych schorzeniach wątroby, leczeniu i zapobieganiu atopowemu zapaleniu skóry, jak również profilaktyce infekcji układu moczowo-płciowego. PN są również wykorzystywane w zapobieganiu i wspomaganiu leczenia chorób o częściowym podłożu immunologicznym (na przykład atopowe zapalenie skóry czy nieswoiste zapalenie jelit) i nowotworowych, głównie poprzez regulację działania układu odpornościowego [15, 20, 40, 45]. Niektóre bakterie, takie jak np. niepatogenne szczepy *Escherichia coli* oraz *Enterococcus* ssp., również występujące naturalnie w przewodzie pokarmowym, biorą udział w „treningu" immunologicznym w tkance limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT, gut-associated immune system), która stanowi część układu odpornościowego błon śluzowych (MALT, mucosa-associated immune system) [15]. Wykazano, że probiotyki i ich antygeny stymulują mechanizmy odporności wrodzonej oraz nabytej. Postuluje się także znaczenie PN w zapobieganiu i wspomaganiu leczenia stanów lękowych, depresji i innych zaburzeń psychiatrycznych, poprzez produkcję substancji neuroaktywnych [15, 20, 40, 45]. PN są również wykorzystywane we wspomaganiu leczenia takich schorzeń jak otyłość, cukrzyca typu 2 oraz dyslipidemia, poprzez produkcję substancji modyfikujących metabolizm pacjenta [20, 46].

W literaturze coraz częściej pojawia się również pojęcie probiotyków następnej generacji (NGP, next generation probiotics). Są to mikroorganizmy, dotychczas nie stosowane jako probiotyki, jednak wykazujące obiecujące właściwości zdrowotne dla człowieka. Do takich mikroorganizmów zalicza się obecnie między innymi *Prevotella copri* i *Christensenella minuta* – stwarzające możliwość wykorzystania ich w leczeniu oporności na insulinę, *Parabacteroides goldsteinii*, *Akkermansia muciniphila* i *Bacteroides thetaiotaomicron* – wskazujące na możliwość wykorzystania ich w leczeniu otyłości i oporności na insulinę, *Faecalibacterium prausnitzii* – wykazujący właściwości ochronne przed rozwojem chorób jelit, co wykazano u myszy, czy też *Bacteroides fragilis* – wykazujący działanie przeciwzapalne i antynowotworowe [9, 35, 38, 56].

4. Probiotyki naturalne – korzyści i ograniczenia

Korzyści płynące ze stosowania probiotyków naturalnych są wielorakie. W odróżnieniu od tradycyjnych leków podawanych doustnie PN dostarczają lokalnie substancje biologicznie aktywne bezpośrednio do zmienionych chorobowo tkanek, co skutkuje zwiększoną ich skutecznością przy jednoczesnym zmniejszeniu

ogólnoustrojowych skutków ubocznych. PN wytwarzają substancje biologicznie aktywne „na miejscu", co eliminuje potrzebę stosowania kosztownych etapów oczyszczania leku po jego syntezie i umożliwia użycie niższej jego dawki [21, 24]. Przykładem są substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takie jak: kwasy organiczne (obniżają pH), nadtlenek wodoru, związki systemu laktoperoksydazy, diacetyl czy bakteriocyny, a także witaminy z grupy B i K, hydrolazy (wpływające na metabolizm tłuszczów w wątrobie) czy SCFA i maślan (pełniące funkcje odżywcze w stosunku do komórek nabłonka jelita) [29].

Stosowanie PN wiąże się jednak z pewnymi ograniczeniami. PN charakteryzują się wysoką wrażliwością na czynniki fizyko-chemiczne. Większość szczepów probiotycznych ginie w temperaturze 60–85°C. Klasyczne metody uodparniania szczepów na trudne warunki procesów technologicznych polegają na poddaniu ich uprzedniemu działaniu sub-letalnego czynnika stresowego. Może to jednak prowadzić do uszkodzenia komórek i utraty żywotności kultur probiotycznych, prowadząc tym samym do zmniejszenia aktywności podawanego probiotyku [16, 19, 28]. Ponadto doustne przyjmowanie probiotyków jest związane z koniecznością ich przejścia przez żołądek i dwunastnicę, gdzie są narażone na działanie kwasu żołądkowego oraz enzymów trawiennych i żółci. Dopiero w jelicie krętym i okrężnicy panują korzystne dla nich warunki bytowe. Korzyści zdrowotne po zastosowaniu probiotyku w wielu przypadkach uzyskuje się tylko wtedy, gdy szczep probiotyczny dotrze do jelit w stanie metabolicznie aktywnym i w wystarczającej dawce. Trudno jest jednak określić, jaka dawka probiotyku dostaje się do jelit oraz czy jest ona wystarczająca dla osiągnięcia efektu biologicznego [3, 7, 28, 47, 54]. Wskaźniki przeżywalności dla wybranych szczepów oszacowano na 20–40%, przy czym głównymi przeszkodami w ich przeżyciu jest obecność kwasu solnego w żołądku i działanie soli żółciowych [7].

Cały czas poszukuje się nowych rozwiązań biotechnologicznych, które zapewnią ochronę probiotykom przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego i wewnętrznego oraz rozszerzą zakres ich wykorzystania [28, 47].

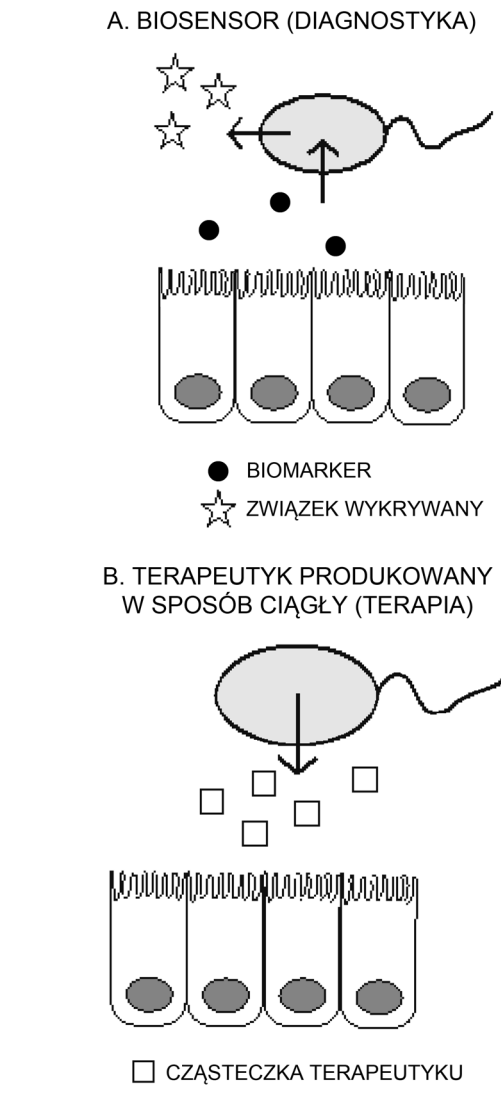
5. Modyfikacje genetyczne bakterii – perspektywy i zagrożenia

Próby modyfikacji genetycznych znanych probiotyków, jak i innych bakterii, które mogłyby w przyszłości pełnić szeroko pojętą rolę prozdrowotną, stają się obecnie jedną z dróg rozwoju nowoczesnej medycyny.

Wprowadzenie modyfikacji genetycznych do komórek bakterii probiotycznych umożliwia zdecydowane podwyższenie ich odporności na warunki fizyko-chemiczne panujące podczas procesów technologicznych oraz w środowisku przewodu pokarmowego.

Przykładowo dowiedziono, że gen *betL* obecny u *Listeria monocytogenes*, warunkujący przetrwanie szczepów patogennych w trudnych warunkach, wprowadzony do genomu szczepu probiotycznego *Lactobacillus salivarius* UCC118, znacząco poprawia jego odporność na biotechnologiczne czynniki stresowe, jak na przykład wysoka temperatura. Gen *betL* koduje system transportu betainy. Betaina, która należy do grupy związków, zwanych osmoprotektantami, chroni cytozol przed utratą wody i stabilizuje białka. Podobne wyniki uzyskano po analogicznej modyfikacji genetycznej szczepu *Lactobacillus paracasei* [10, 19, 39]. Ponadto modyfikacja szczepu *Bifidobacterium breve* UCC2003 genem *betL* pozwoliła osiągnąć jego wysoką przeżywalność w kwaśnym środowisku żołądka. Uzyskane wyniki potwierdzono w podobnych doświadczeniach, klonując geny odpowiedzialne za przeżywalność dzikich szczepów w przewodzie pokarmowym, na przykład gen warunkujący oporność na żółć (*bilE*), występujący naturalnie u *Listeria monocytogenes* [19, 39, 41].

W przyszłości modyfikacje genetyczne bakterii, nie tylko tych o obecnie znanych właściwościach probiotycznych, pozwolą również na rozszerzenie mechanizmów ich biologicznego działania i, co za tym idzie, rozszerzenie możliwości ich zastosowania w diagnostyce oraz terapii. Dobrze zdefiniowane szlaki genetyczne i sieci regulacyjne genów, mają spowodować niezawodność zmodyfikowanych bakterii w produkcji ściśle zdefiniowanych związków biologicznie aktywnych. Bakterie modyfikowane genetycznie (BMG) mogą produkować kilka substancji biologicznie aktywnych, w czasie, dawce i sekwencji możliwej do kontrolowania. W przypadku PN mamy do czynienia raczej z nieokreśloną mieszaniną związków bioaktywnych, których efekty działania są trudne do oceny. Ciągłe modyfikacje BMG umożliwiają ich udoskonalanie, a co za tym idzie, ich skuteczność oraz liczba chorób, w leczeniu których można je stosować, również wzrośnie [24, 32, 42]. Ponadto BMG mogą docierać do miejsc w organizmie, które są nieosiągalne dla PN. Może to z kolei umożliwiać stosowanie niższych dawek leku i obniżyć prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych u pacjenta [21]. Wreszcie BMG mogą być wykorzystywane do produkcji szczepionek. Po podaniu doustnym bakterii zmodyfikowanych genetycznie, zawierających w swym genomie gen kodujący określony antygen, dochodzi do jego ekspresji i rozwinięcia procesu immunizacji w organizmie gospodarza. Ten typ szczepionki jest odporny na warunki transportu i przechowywania, łatwy i higieniczny do podania pacjentowi, a raz wytworzony staje się stosunkowo tani w produkcji [14].



Rys. 1. Funkcje bakterii modyfikowanych genetycznie

(A) BMG pełniąca funkcję diagnostyczną. (B) BMG pełniąca funkcję terapeutyczną. (C) BMG pełniąca funkcje diagnostyczną i terapeutyczną (na podstawie [5]).

O ile bezpieczeństwo stosowania PN jest powszechnie uznane, to bezpieczeństwo stosowania BMG w diagnostyce i terapii chorób nie jest jednak już tak oczywiste. Jednym z postulowanych niebezpieczeństw jest wydostanie się BMG z przewodu pokarmowego pacjenta do środowiska zewnętrznego, gdzie mogłyby wywołać trudne do przewidzenia skutki. Mechanizmem zabezpieczającym przed takim zdarzeniem może być wprowadzenie do genomu BMG genów, których produkt białkowy kieruje komórkę na szlak apoptozy („automatyczne włączniki śmierci"). Gen ten ulega ekspresji po zmianie warunków środowiska, w którym znajdują się zmodyfikowane bakterie. Próbuje się również tak zmodyfikować genetycznie bakterie, aby nie były w stanie przeżyć w środowisku zewnętrznym, w którym brakuje określonej, niezbędnej dla ich przeżycia substancji (zjawisko auksotrofii). Pomimo, że skomplikowane układy genetyczne umożliwiają uwalnianie terapeutyku w odpowiednim organie, w stosownym do stanu zdrowotnego tkanki czasie i stężeniu, to jednak istnieje pewne niebezpieczeństwo rozregulowania tego systemu i związanych z tym komplikacji [5, 25]. BMG muszą cechować się określoną czułością i selektywnością w stosunku do wykrywanych substancji, być stabilne w różnych typach środowiska (m.in. dieta, mikrobiota gospodarza) oraz być niepodatne na mutacje [26, 36]. Poszukiwanie procedur i rozwiązań mających zapewnić maksymalne bezpieczeństwo stosowania farmabiotyków w medycynie jest czasochłonne i kosztowne [1].

6. Bakterie modyfikowane genetycznie w diagnostyce i terapii

Obecnie duże nadzieje w diagnostyce i terapii wiąże się z BMG. Posługując się metodami inżynierii genetycznej możliwe stały się różnorodne modyfikacje materiału genetycznego takie jak dodawanie, usuwanie czy przenoszenie fragmentów DNA pomiędzy organizmami. W ten sposób otrzymuje się genetycznie modyfikowane organizmy (GMO), posiadające pożądane cechy. Najczęściej wykorzystywane bakterie modyfikowane genetycznie o znaczeniu medycznym stanowią bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzące w skład grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB, lactic acid bacteria), a także bakterie *Bacteroides, Escherichia coli* czy *Salmonella* spp. Aktualnie większość badań znajduje się na etapie testowania skuteczności BMG na mysich modelach i niewiele z nich osiągnęło etap badań klinicznych [14, 26, 32, 50, 51, 52, 57].

Trzy główne rodzaje BMG to bakterie pełniące funkcje diagnostyczne (tak zwane biosensory), bakterie produkujące terapeutyk w sposób ciągły oraz bakterie produkujące terapeutyk w odpowiedzi na określony bodziec zewnętrzny tzw. „inteligentny" probiotyk (IP) (Rys. 1, na podstawie [5]).

BMG pełniące funkcje diagnostyczne posiadają zdolność detekcji różnego typu biomarkerów, na przykład biomarkerów stanu zapalnego. Biomarker ten aktywuje ekspresję genu, który koduje białko, na przykład o właściwościach fluorescencyjnych, wykrywane następnie w kale. Z kolei BMG pełniące funkcje terapeutyczne posiadają zdolność ciągłej produkcji leku, który jest uwalniany w miejscu toczącego się procesu chorobowego. Rozwiązanie przyszłości to IP, czyli probiotyk łączący w sobie cechy BMG o działaniu diagnostycznym i terapeutycznym. IP wykrywa jeden lub kilka związków chemicznych, analizuje ich obecność i kombinacje, a następnie reaguje, dostarczając precyzyjną dawkę jednego lub większej liczby odpowiednich leków do chorego narządu. Zasadę działania IP można określić jako ciąg zdarzeń: detekcja(D)/analiza(A)/odpowiedź(O). Opis szczegółowych biotechnologicznych zasad konstruowania obwodów genetycznych można znaleźć między innymi w pracach Landry' i wsp., Yadav i wsp. lub Rottinghaus i wsp. [24, 36, 52]. Związkami chemicznymi, ulegającymi detekcji, mogą być zarówno czynniki zewnętrzne, dodawane do wody lub pożywienia, jak i określone biomarkery produkowane *in situ*. Aktualnie przydatność IP jest badana w takich schorzeniach jak: zapalenie okrężnicy, cukrzyca oraz zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* [5, 24].

7. Wykorzystanie bakterii modyfikowanych genetycznie w medycynie

Bakterie modyfikowane genetycznie mogą zostać wprowadzone do organizmu doustnie, dożylnie, doodbytniczo, dopochwowo czy poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie do konkretnej tkanki, na przykład do guza nowotworowego. Następnie bakterie docierają do pożądanego miejsca w organizmie, co związane jest z preferencyjnym gromadzeniem się określonych szczepów bakterii w różnych tkankach, na przykład w obrębie tkanki nowotworowej [26].

W diagnostyce chorób przewodu pokarmowego przeprowadza się próby wykorzystania BMG, które posiadają zdolność przekształcania substancji, charakterystycznych dla stanu zapalnego w jelicie, w substancje będące biomarkerami, łatwo ulegającymi detekcji w kale, na przykład w postaci związku dającego sygnał fluorescencyjny. Prowadzone są próby nad wykryciem jonów $S_4O_6^{2-}$ i $S_2O_3^{2-}$, a także detekcją NO, H_2S, H_2O_2 i innych związków w kale osób cierpiących na stany zapalne jelit. Z kolei krwawienia w jelicie próbuje się diagnozować dzięki wykrywaniu obecności hemu. Na podobnej zasadzie opiera się wykrycie związków i substancji pochodnych w kale, które pełnią rolę biomarkerów infekcji charakterystycznych dla określonych patogenów (na przykład *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*) [21, 55].

W doświadczeniach związanych z wykorzystaniem BMG w terapii dominują schorzenia zlokalizowane w obrębie przewodu pokarmowego. Choroby zapalne jelit, obejmujące wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna, są wywołane nieprawidłowym funkcjonowaniem układu immunologicznego w obrębie przewodu pokarmowego. Związki o charakterze przeciwzapalnym, takie jak kortykosteroidy, tiopuryny czy przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko czynnikowi martwicy nowotworu (TNF-α, tumor necrosis factor) są stosowane w leczeniu tej grupy schorzeń. Przeciwciała anty-TNF-α charakteryzują się wysoką skutecznością w łagodzeniu objawów chorób zapalnych jelit, ale również znacznymi efektami ubocznymi oraz wysokim kosztem leczenia. Genetycznie modyfikowane LAB, które produkują przeciwciała skierowane przeciwko TNF-α, mogą stanowić terapię alternatywną w stosunku do terapii konwencjonalnej. Skuteczność tej terapii została potwierdzona przy wykorzystaniu zwierzęcych modeli chorób zapalnych jelit. Zaobserwowano, że doustne podanie *Lactobacillus lactis*, wydzielających przeciwciała przeciwko TNF-α, nie wywołuje efektów ubocznych, obserwowanych po dożylnym podaniu wspomnianych przeciwciał. Inne eksperymenty, wykorzystujące bakterie kwasu mlekowego, obejmują neutralizację takich cytokin prozapalnych jak: IL-6, IL-17 oraz IL-23. Zmodyfikowane genetycznie LAB można także wykorzystać do podawania cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 lub IL-27 w celu leczenia zapalenia okrężnicy u myszy. Rekombinowane bakterie *Lactobacillus lactis* mogą również produkować białka wiążące chemokiny o działaniu prozapalnym, co potwierdzono w hodowli komórek nabłonkowych *in vitro*, a także syntetyzować peptydy TFF (trefoil factor family) występujące głównie w przewodzie pokarmowym i pełniące funkcje ochronne w stosunku do jego nabłonka. Inne próby dotyczą podawania enzymów np. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, które ograniczają ilość reaktywnych form tlenu w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita, inhibitora proteazy serynowej lub insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 [5, 26, 27, 30, 33, 43]. Pojawiły się również próby dostarczania do przewodu pokarmowego za pomocą BMG interferującego RNA (iRNA), który blokuje syntezę enzymu COX-2, odpowiedzialnego za katalizowanie reakcji syntezy substancji prozapalnych [5]. Ukazały się także doniesienia o zmodyfikowanych bakteriach *Streptococcus*, wykazujących działanie przeciwpróchnicze w jamie ustnej [14].

Rekombinowane LAB mogą również posłużyć do dostarczania antygenów typowych dla wirusów, bakterii, grzybów oraz pasożytów w celu uzyskania odpowiedzi immunologicznej na błonach śluzowych. Celem tak podanej szczepionki jest wywołanie produkcji przeciwciał klasy IgA w układzie MALT, jednak ogólno-

ustrojowa odpowiedź immunologiczna również została zaobserwowana. Rozważane jest skonstruowanie takiej szczepionki między innymi przeciwko wirusowi ptasiej grypy, rotawirusom, wirusowi HIV oraz wirusowi zapalenia wątroby typu A [1, 33]. W badaniach na myszach wykazano, że doustne podanie zrekombinowanej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wykazującej ekspresję antygenu wirusa ptasiej grypy – hemaglutyniny HA 1, spowodowało wytworzenie przeciwciał, których obecność wykryto w błonie śluzowej (przeciwciała IgA anty-HA1) oraz w surowicy (przeciwciała IgG anty-HA1). Bakterie, przeciwko którym podejmowane są próby konstruowania szczepionek w oparciu o powyższą technologię to między innymi: *Clostridium tetani*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Helicobacter pylori* i *Clostridium perfringens*. Porównano także nasilenie odpowiedzi immunologicznej u myszy, którym podano, doustnie lub donosowo, zmodyfikowane genetycznie *L. lactis*, które posiadały zdolność produkcji fragmentu toksyny bakterii *C. tetani*. Wyższy poziom przeciwciał zaobserwowano w wyniku donosowej drogi podania antygenu [1, 33]. Można również podać bakterie wykazujące ekspresję określonej onkoproteiny. Prowadzone są badania nad wprowadzeniem tego typu szczepionki zapobiegającej rozwojowi raka szyjki macicy [33].

Obecnie leczenie wielu infekcji staje się coraz trudniejsze, głównie ze względu na wzrastającą oporność bakterii na antybiotyki. Podejmowane są próby zastosowania BMG w leczeniu infekcji, poprzez wykorzystanie ich wysokiej specyficzności oraz braku równoczesnego, negatywnego wpływu na mikrobiotę gospodarza. W warunkach *in vitro* i mysich modelach wykazano przeciwbakteryjne działanie wielu substancji, syntetyzowanych przez BMG. Ponadto BMG mogą posiadać zdolność wykrywania patogenów i wydzielania związków, hamujących ich wzrost [1, 18, 30, 55]. Obecnie są prowadzone również badania nad BMG, produkującymi białka o charakterze przeciwwirusowym [30].

Spośród chorób metabolicznych, w których najczęściej wskazuje się na możliwość wykorzystania BMG, wymienia się fenyloketonurię oraz hiperamonemię. Jest to możliwe dzięki dostarczeniu do organizmu enzymów zaangażowanych w przemiany szkodliwych substancji [1, 55]. Kolejnym sposobem na wykorzystanie BMG jest leczenie schorzeń alergicznych, cukrzycy typu I, otyłości oraz nadciśnienia [26, 30, 53, 55].

Szczególne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem właściwości BMG w terapii przeciwnowotworowej. Niektóre bakterie np. atenuowane szczepy *Salmonella* spp. oraz *Listeria* spp. posiadają zdolność preferencyjnej penetracji i proliferacji wewnątrz guzów nowotworowych. Mikroorganizmy te nie tylko wykazują działanie przeciwnowotworowe, ale także w mikrośrodowisku guza mogą pobudzać odpowiedź immunologiczną gospodarza przeciw komórkom nowotworowym. W przyszłości tą strategię leczniczą można by wykorzystywać zarówno w monoterapii, jak i w kombinacji z innymi terapiami przeciwnowotworowymi. BMG o osłabionej wirulencji stanowią również alternatywę w leczeniu chorób nowotworowych; należy jednak zwrócić uwagę, by osłabienie wirulencji jednocześnie nie spowodowało osłabienia działania przeciwnowotworowego. Omawiane modyfikacje genetyczne można również wykorzystać do nasilenia migracji bakterii do komórek nowotworowych, na przykład poprzez ekspresję na ich powierzchni ligandów, specyficznych dla określonego typu nowotworu, co umożliwia redukcję skutków ubocznych związanych z toksycznym oddziaływaniem na zdrowe komórki organizmu. Dalsza modyfikacja genetyczna bakterii umożliwia wzmocnienie ich przeciwnowotworowego działania poprzez produkcję substancji cytotoksycznych, enzymów konwertujących proleki do leków, substancji immunomodulujących, czynników antyangiogennych lub nie-kodujących cząsteczek RNA. Ekspresja określonych genów może być wyzwalana specyficznymi warunkami, panującymi w obrębie guza (np. hipoksja, niskie pH, nasilona nekroza) lub poprzez podanie specyficznych substancji egzogennych, na przykład dożylnie lub dootrzewnowo. Próby kliniczne skuteczności tego typu terapii dotyczą między innymi leczenia czerniaka, raka szyjki macicy oraz nowotworów jelita grubego, wątroby i trzustki [12, 22, 26, 31]. Ciekawym pomysłem terapeutycznym jest również równoczesne podawanie kilku rodzajów genetycznie zmodyfikowanych bakterii [33] oraz ich „molekularne spersonalizowanie", w zależności od typu nowotworu [1, 30].

8. Podsumowanie

Szybki rozwój narzędzi inżynierii genetycznej i biologii syntetycznej umożliwia konstruowanie coraz skuteczniejszych i bezpieczniejszych farmabiotyków, pełniących zarówno funkcje diagnostyczne, jak i terapeutyczne. Bakterie modyfikowane genetycznie stanowią jedną z możliwości rozwoju medycyny spersonalizowanej, która zakłada indywidualne zastosowanie ściśle dobranej substancji leczniczej do stanu chorobowego każdego pacjenta. Taki wysoki poziom personalizacji jest możliwy do osiągnięcia poprzez stosowanie „inteligentnych probiotyków". Co więcej, farmabiotyki umożliwiają również leczenie miejscowe, co ogranicza efekty uboczne, widoczne w czasie leczenia ogólnoustrojowego. Pomimo tak obiecujących perspektyw trudno jest określić, kiedy bakterie zmodyfikowane genetycznie znajdą powszechne zastosowanie w praktyce klinicznej. Liczba badań znajdująca się w fazie klinicznej jest ograniczona, co w dużej mierze jest związane

z ograniczeniami i obawami związanymi z wykorzystaniem organizmów zmodyfikowanych genetycznie w medycynie [1, 26, 32].

Piśmiennictwo

1. Aggarwal N., Breedon A.M.E., Davis C.M., Hwang I.Y., Chang M.W.: Engineering probiotics for therapeutic applications: recent examples and translational outlook. *Curr. Opin. Biotechnol.* **65**, 171–179, doi: 10.1016/j.copbio.2020.02.016 (2020)
2. Akdis C.A.: Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat. Rev. Immunol.* doi: 10.1038/s41577-021-00538-7 (2021)
3. Andrade J.C., Almeida D., Domingos M., Seabra C.L., Machado D., Freitas A.C., Gomes A.M.: Commensal obligate anaerobic bacteria and health: production, storage, and delivery strategies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, doi:10.3389/fbioe.2020.00550 (2020)
4. Bae H.R., Leung P.S.C., Hodge D.L., Fenimore J.M., Jeon S.M., Thovarai V., Dzutsev A., Welcher A.A., Boedigheimer M., Damore M.A., Choi M.S., Fravell R.A. Trinchieri G., Gershwin M.E., Young H.A.: Multi-omics: differential expression of IFN-γ results in distinctive mechanistic features linking chronic inflammation, gut dysbiosis, and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **111**, 102436, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102436 (2020)
5. Barra M., Danino T., Garrido D.: Engineered probiotics for detection and treatment of inflammatory intestinal diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 265, doi: 10.3389/fbioe.2020.00265 (2020)
6. Barrientos-Durán A., Fuentes-López A., de Salazar A., Plaza-Díaz J., García F.: Reviewing the composition of vaginal microbiota: inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis. *Nutrients*, **12**, 419, https://doi.org/10.3390/nu12020419 (2020)
7. Bezkorovainy A.: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 399–405, https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s (2001)
8. Brüssow H.: Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb. Biotechnol.* **13**, 423–434, doi:10.1111/1751-7915.13479 (2020)
9. Chang C.J., Lin T.L., Tsai Y.L., Wu T.R., Lai W.F., Lu C.C., Lai H.C.: Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* **27**, 615–622, doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.011 (2019)
10. Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Dockery P., Stanton C.: Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5104–7, doi: 10.1128/AEM.02626-05 (2006)
11. Da Silva T.F., Casarotti S.N., de Oliveira G.L.V., Penna A.L.B.: The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **61**, 337–355, doi: 10.1080/10408398.2020.1733483 (2021)
12. Duong M.T., Qin Y., You S.H., Min J.J.: Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* **51**, 12, 1–15, doi: 10.1038/s12276-019-0297-0 (2019)
13. Eun-Sook L., Eun-Ji S., Young-Do N., So-Young L.: Probiotics in human health and disease: from nutribiotics to pharmabiotics. *J. Microbiol.* **56**, 773–782 doi: 10.1007/s12275-018-8293-y (2018)
14. Ferreira A.K., Mambelli L.I., Pillai S.Y.: Intervening in disease through genetically-modified bacteria. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **31**, 693–697 (2017)
15. Gałecka M., Basińska A. M., Bartnicka A. Probiotyki – implikacje w praktyce lekarza rodzinnego. *Forum Med. Rodz.* **12**, 170–182 (2018)
16. Gardiner G.E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M.A., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C.: Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2605–2612, doi: 10.1128/aem.66.6.2605-2612.2000 (2000)
17. Giron F., Quigley E.M.M.: Pharmabiotic manipulation of the microbiota in gastrointestinal disorders: a clinical perspective. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 355–366, doi: 10.5056/jnm18004 (2018)
18. Hwang I.Y., Koh E., Wong A., March J.C., Bentley W.E., Lee Y.S., Chang M.W. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. *Nat. Commun.* **8**, 15028 doi: 10.1038/ncomms15028 (2017)
19. Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post. Mikrobiol.* **52**, 161–170 (2013)
20. Kali A.: Human microbiome engineering: the future and beyond. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, DE01-4, doi: 10.7860/JCDR/2015/14946.6570 (2015)
21. Kang M., Choe D., Kim K., Cho B.K., Cho S.: Synthetic biology approaches in the development of engineered therapeutic microbes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8744, doi: 10.3390/ijms21228744 (2020)
22. Kramer M.G., Masner M., Ferreira F.A., Hoffman R.M.: Bacterial therapy of cancer: promises, limitations and insights for future directions. *Front. Microbiol.* **9**, 16 doi: 10.3389/fmicb.2018.00016 (2018)
23. Kumar M., Yadav A.K., Verma V., Singh B., Mal G., Nagpal R., Hemalatha R.: Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: an overview of potential and prospects. *Future Microbiol.* **11**, 585–600 doi: 10.2217/fmb.16.4. (2016)
24. Landry B.P., Tabor J.J. Engineering diagnostic and therapeutic gut bacteria. *Microbiol. Spectr.* **5**, doi: 10.1128/microbiolspec. BAD-0020-2017 (2017)
25. Lee J.W., Chan C.T.Y., Slomovic S., Collins J.J. Next-generation biocontainment systems for engineered organisms. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 530–537, doi: 10.1038/s41589-018-0056-x (2018)
26. Lim D., Song M.: Development of bacteria as diagnostics and therapeutics by genetic engineering. *J. Microbiol.* **57**, 637–643, doi: 10.1007/s12275-019-9105-8 (2019)
27. Mazhar S.F., Afzal M., Almatroudi A., Munir S., Ashfaq U.A., Rasool M., Raza H., Munir H.M.W., Rajoka M.S.R., Khurshid M.: The prospects for the therapeutic implications of genetically engineered probiotics. *J. Food Qual.* article ID 9676452 https://doi.org/10.1155/2020/9676452 (2020)
28. Moloko G.M., Mapitsi S.T.: Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathog.* **9**, 28, doi: 10.1186/s13099-017-0178-9 (2017)
29. Mroczyńska M., Libudzisz Z., Gałęcka M., Szachta P.: Mikroorganizmy jelitowe człowieka i ich aktywność metaboliczna. *Prz. Gastroenterol.* **4**, 218–224 (2016)
30. Ozdemir T., Fedorec A.J.H., Danino T., Barnes C.P.: Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity. *Cell Syst.* **7**, 5–16, doi: 10.1016/j.cels.2018.06.008 (2018)
31. Paton A.W, Morona R., Paton J.C. Bioengineered microbes in disease therapy. *Trends Mol. Med.* **18**, 417–425, doi: 10.1016/j.molmed.2012.05.006 (2012)
32. Pedrolli D.B., Ribeiro N.V., Squizato P.N., de Jesus V.N., Cozetto D.A: Team AQA Unesp at iGEM 2017. Engineering

microbial living therapeutics: the synthetic biology toolbox. *Trends Biotechnol.* **37**, 100–115, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.09.005 (2019)
33. Plavec T.V., Berlec A.: Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2053–2066, doi: 10.1007/s00253-019-09628-y (2019)
34. Pongking T., Haonon O., Dangtakot R., Onsurathum S., Jusakul A., Intuyod K., Sangka A., Anutrakulchai S., Cha'on U., Pinlaor S., Pinlaor P.: A combination of monosodium glutamate and high--fat and high-fructose diets increases the risk of kidney injury, gut dysbiosis and host-microbial co-metabolism. *PLoS One*, **15**, 4, e0231237, doi:10.1371/journal.pone.0231237 (2020)
35. Ropot A.V., Karamzin A.M., Sergeyev O.V.: Cultivation of the next-generation probiotic akkermansia muciniphila, methods of its safe delivery to the intestine, and factors contributing to its growth *in vivo*. *Curr. Microbiol.* **77**, 8, 1363–1372, doi: 10.1007/s00284-020-01992-7 (2020)
36. Rottinghaus A.G., Amrofell M.B., Moon T.S.: Biosensing in smart engineered probiotics. *Biotechnol. J.* **15**, e1900319, doi: 10.1002/biot.201900319 (2020)
37. Ruszkowski J., Szewczyk A., Witkowski J. M.: Przegląd doustnych prebiotyków, probiotyków, synbiotyków i postbiotyków dostępnych na polskim rynku aptecznym. *Farm. Pol.* **74**, 2, 114–122 (2018)
38. Sharma R., Gupta D., Mehrotra R., Mago P.: Psychobiotics: the next- generation probiotics for the brain. *Curr. Microbiol.* **78**, 2, 449–463, doi: 10.1007/s00284-020-02289-5 (2021)
39. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.: Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3, 2170–2177, doi: 10.1128/AEM.72.3.2170-2177.2006 (2006)
40. Skrzydło-Radomańska B., Wronecki J.: Czy mikrobiotę jelitową można skutecznie modyfikować? *Varia Medica*, **3**, 1, 18–26 (2019)
41. Sleator R.D., Hill C.: Rational design of improved pharmabiotics. *J. Biomed. Biotechnol.* 275287, doi: 10.1155/2009/275287 (2009)
42. Sola-Oladokun B., Culligan E.P., Sleator R.D.: Engineered probiotics: applications and biological containment. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **28**, 8, 353–370, doi: 10.1146/annurev-food-030216-030256 (2017)
43. Tan Y., Shen J., Si T., Ho C.L., Yinqing Li Y., Dai L.: Engineered live biotherapeutics: progress and challenges. *Review Biotechnol. J.* **15**, 10, e2000155, doi: 10.1002/biot.202000155 (2020)
44. Thursby E., Juge N.: Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836, doi: https://doi.org/10.1042/BCJ20160510 (2017)
45. Tyagi P., Tasleem M., Prakash S., Chouhan G.: Intermingling of gut microbiota with brain: exploring the role of probiotics in battle against depressive disorders. *Food Res. Int.* **137**, 109489, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109489 (2020)
46. Vallianou N., Stratigou T., Christodoulatos G.S., Tsigalou C., Dalamaga M.: Probiotics, prebiotics, synbiotics, postbiotics, and obesity: current evidence, controversies, and perspectives. *Curr. Obes. Rep.* **9**, 179–192, https://doi.org/10.1007/s13679-020-00379-w (2020)
47. Vandenplas Y., Huys G., Daube G.: Probiotics: an update. *J. Pediatr. (Rio J.)*, **91**, 6–21, doi: 10.1016/j.jped.2014.08.005. Epub 2014 Oct 23. (2015)
48. Wieërs G., Belkhir L., Enaud R., Leclercq S., Philippart de Foy J.M., Dequenne I., de Timary P., Cani P.D.: How probiotics affect the microbiota. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**, 454, doi:10.3389/fcimb.2019.00454 (2020)
49. Wilkins L.J., Monga M., Miller A.W.: Defining dysbiosis for a cluster of chronic diseases. *Sci. Rep.* **9**, 12918, doi:10.1038/s41598-019-49452-y (2019)
50. Wu C., Huang J., Zhou R.: Genomics of lactic acid bacteria: current status and potential applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 393–404, doi: 10.1080/1040841X.2016.1179623 (2017)
51. Yadav R., Kumar V., Baweja M., Shukla P.: Gene editing and genetic engineering approaches for advanced probiotics: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1735–1746, doi: 10.1080/10408398.2016.1274877 (2018)
52. Yadav M., Shukla P.: Efficient engineered probiotics using synthetic biology approaches: a review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **67**, 22–29, doi: 10.1002/bab.1822 (2020)
53. Yadav M., Shukla P.: Recent systems biology approaches for probiotics use in health aspects: a review. *3 Biotech.* **9**, 448, doi: 10.1007/s13205-019-1980-5 (2019)
54. Yao M., Xie J., Du H., McClements D.J., Xiao H., Li L.: Progress in microencapsulation of probiotics: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**, 2, 857–874, doi: 10.1111/1541-4337.12532 (2020)
55. Zhou Z., Chen X., Sheng H., Shen X., Sun X., Yan Y., Wang J., Yuan Q.: Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. *Microb. Cell Fact.* **19**, 56, doi: 10.1186/s12934-020-01318-z (2020)
56. Zou Y., Chen T.: Engineered akkermansia muciniphila: a promising agent against diseases. *Exp. Ther. Med.* **20**, 285, doi: 10.3892/etm.2020.9415 (2020)
57. Zuo F., Chen S., Marcotte H.: Engineer probiotic bifidobacteria for food and biomedical applications – current status and future prospective. *Review Biotechnol. Adv.* **45**, 107654, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107654 (2020)