

จุลินทรีย์ในลำไส้กับการเกิดโรคอ้วนและโรคไขมันสะสมในตับ ที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

GUT MICROBIOTA AND THE DEVELOPMENT OF OBESITY AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

ปิยะนุช จงสมัค

PIYANUCH JONGSAMAK

ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

ติดต่อผู้พิมพ์ : jongsamak_p@su.ac.th

Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

Corresponding author: jongsamak_p@su.ac.th

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ในลำไส้ หรือ Gut microbiota มีบทบาทสำคัญต่อร่างกาย โดยช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ช่วยสร้างวิตามิน ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย และช่วยปกป้องร่างกายจากการบุกรุกโดยเชื้อโรคภายนอก ชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนแปลงไปยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วนและภาวะดื้ออินซูลิน โดยทำให้ร่างกายได้พลังงานจากการย่อยอาหารมากขึ้นและนำพลังงานส่วนเกินไปเก็บสะสมในรูปไขมันในร่างกายเพิ่มขึ้น โรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) มักพบร่วมกับโรคอ้วนและภาวะ metabolic syndrome จุลินทรีย์ในลำไส้ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทต่อการเกิด NAFLD และภาวะตับอักเสบ (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) โดยพบว่า จุลินทรีย์ในลำไส้ที่เสียสมดุลไปทำให้เกิดการรั่วของผนังลำไส้ (gut leakiness) ส่งผลให้แบคทีเรียในลำไส้เล็ดลอดเข้าสู่กระแสโลหิตและเกิดภาวะ metabolic endotoxemia ตามมาด้วยการอักเสบที่ตับในที่สุด การใช้ probiotics เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษา NAFLD และ NASH ให้ดีขึ้น

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ในลำไส้, โรคไขมันพอกตับ, โรคอ้วน, โพรไบโอติก

Abstract

Gut microbiota plays an important role in human body. It aids in the digestion and absorption of nutrients, synthesis of vitamins, stimulation of immune function, and prevention of pathogen colonization. Recent evidence has revealed that an altered composition of gut microbiota contributes to the development of obesity and insulin resistance through harvesting more energy from the diet and storage of excess energy as fat in adipose tissue. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often associated with the presence of obesity and metabolic syndrome. More recently, it has been reported that gut microbiota may play a crucial role in pathogenesis of NAFLD and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Change in gut microbiota causes gut leakiness which leads to bacterial translocation and metabolic endotoxemia, which

in turn induces liver inflammation. Modulation of gut microbiota by means of probiotics may be a new therapeutic approach for NAFLD and NASH.

Keywords: gut microbiota, non-alcoholic fatty liver disease, obesity, probiotics

บทนำ

ร่างกายมนุษย์เป็นที่อยู่อาศัยของ จุลินทรีย์จำนวนมาก โดยเฉพาอย่างยิ่งใน ลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หนาแน่นมากที่สุด โดยมีอยู่มากถึง 10^{14} เซลล์ ซึ่งมากกว่าจำนวนเซลล์ทั้งหมดในร่างกายถึง 10 เท่า¹ จุลินทรีย์ในลำไส้มีบทบาทสำคัญต่อร่างกายเป็นอย่างมาก โดยช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหารที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ ช่วยสร้างวิตามิน K และวิตามิน B ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย และช่วยปกป้องร่างกายจากการบุกรุกโดยเชื้อโรคภายนอก^{2,3} หากองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้เสียสมดุลไป จะทำให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ และทำให้เกิดพยาธิสภาพนอกเหนือจากบริเวณทางเดินอาหารด้วย โดยเมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนไปกับการเกิดโรคอ้วนและโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วย⁴

ตับเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย เลือดที่ไหลเวียนส่วนใหญ่ (ประมาณ 70%) มาจาก portal vein ซึ่งนำเลือดที่มีสารอาหารที่ย่อยแล้วจากลำไส้ รวมถึงผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ เช่น เอทานอล และ อะเซตัลดีไฮด์ ไปยังตับ ทั้งนี้มีงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงบทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้กับการเกิดพยาธิสภาพที่ตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้

เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)⁵⁻⁷ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคตับเรื้อรังที่สามารถพบได้ ในประชากรทั่วโลก ทั้งผู้ใหญ่และเด็ก โดยมักพบร่วมกับโรคอ้วน ภาวะดื้ออินซูลิน เบาหวานชนิดที่ 2 และโรคหัวใจและหลอดเลือด⁸ ทั้งนี้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่า NAFLD เป็นอาการแสดงออกของตับอันเนื่องมาจากภาวะ metabolic syndrome^{9,10} NAFLD ยังสามารถนำไปสู่การเกิดโรคตับที่รุนแรงขึ้น ได้แก่ ตับอักเสบ (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) ตับแข็ง และมะเร็งตับได้อีกด้วย¹¹ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาภาวะตับอักเสบ (NASH) ที่มีประสิทธิภาพดี การทำความเข้าใจกลไกการเกิดโรคในแง่มุมใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในลำไส้ อาจช่วยให้เกิดการพัฒนารักษาแนวทางใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นได้ ในบทความนี้จะกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ในลำไส้กับโรคอ้วน บทบาทของจุลินทรีย์ในลำไส้ในการเกิด NAFLD และ NASH รวมถึงแนวทางการรักษา NAFLD ด้วย probiotics

จุลินทรีย์ในลำไส้ (Gut microbiota)

ในภาวะปกติ ทารกในครรภ์มารดาจะปราศจากเชื้อใด ๆ ทั้งสิ้น ทารกจะเริ่มได้รับเชื้อในขณะคลอดผ่านช่องคลอดของมารดา จากการกลืนกินเมือกในช่องคลอดเข้าไปทำให้พบจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่องคลอดของมารดา จำพวก

Lactobacillus, *Prevotella*, หรือ *Sneathia* spp. ในทางเดินอาหารของทารก ในขณะที่ทารกที่คลอดโดยวิธีผ่าตัดคลอดทางหน้าท้อง จะได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวหนังของมารดา ได้แก่ *Staphylococcus*, *Corynebacterium* และ *Propionibacterium* spp. ไปอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารแทน¹² นอกจากนี้ยังพบว่าทารกที่ดื่มนมแม่จะพบจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* เป็นส่วนใหญ่ในทางเดินอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากน้ำนมแม่มีโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดพิเศษ (human milk oligosaccharides; HMO) ที่ไม่ถูกย่อยสลายในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของทารก¹³ และยังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์ *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, และ *Bifidobacterium breve* ที่พบในทางเดินอาหารของทารก¹⁴ ส่วนทารกที่กินนมผงดัดแปลงจะพบ *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis* และ *Lactobacillus* เป็นส่วนใหญ่¹⁵⁻¹⁷ อย่างไรก็ตาม ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงอีกเมื่อทารกเริ่มรับประทานอาหารเสริมและจะคล้ายกับจุลินทรีย์ของผู้ใหญ่ นั่นคือมีพวก *Firmicutes* และ *Bacteroidetes* เป็นส่วนใหญ่เมื่อทารกมีอายุ 2-3 ปี^{18,19} จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของผู้ใหญ่นอกจากจะประกอบไปด้วย แบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังมี *Archaea* เชื้อรา ยีสต์ และโปรโตซัวอีกด้วย โดยแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ประกอบด้วย 4 กลุ่ม (Phyla) หลัก²⁰ ได้แก่ *Firmicutes* (65%; *Enterococcus* และ *Clostridium*), *Bacteroidetes* (16%; *Bacteroides*, *Prevotella*), *Proteobacteria* (9%; *Enterobacteriaceae*), และ *Actinobacteria* (5%; *Bifidobacterium*) แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในย่อยสลาย polysaccharides จากพืชผักที่

ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ให้กลายเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids; SCFAs) ซึ่งจะถูกดูดซึมและเป็นแหล่งพลังงานของมนุษย์ ในบรรดากรดไขมันสายสั้น butyrate จัดเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ (colonic epithelial cells) ส่วน acetate และ propionate จะถูกส่งไปที่ตับเพื่อใช้ในการกระบวนการสร้างไขมัน (lipogenesis) และสร้างน้ำตาลกลูโคส (gluconeogenesis)²¹ นอกจากนี้ SCFAs ยังมีบทบาทกระตุ้นการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนและควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่อีกด้วย²¹

จุลินทรีย์ในลำไส้ยังมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานและการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันจากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่เกิดและเจริญเติบโตในภาวะปลอดเชื้อ (germ-free animals) เปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่เลี้ยงในภาวะปกติพบว่าสัตว์ที่เลี้ยงในภาวะปลอดเชื้อ มี Peyer's patch ขนาดเล็กกว่า มีจำนวน CD4⁺ T cells ในชั้น Lamina propria ของเยื่อบุทางเดินอาหารน้อยกว่า การสร้าง IgA ในลำไส้ลดลงและมีระดับแกมมาอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ในเลือดต่ำกว่าภาวะต่าง ๆ เหล่านี้จะหายไปเมื่อให้อาหารที่มีโคลิฟอร์มแบคทีเรียแก่สัตว์ทดลองปลอดเชื้อ^{22,23}

จุลินทรีย์ในลำไส้ยังป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในลำไส้ โดยต้านการเกาะจับของเชื้อก่อโรคบริเวณ brush border ของเซลล์เยื่อบุลำไส้²⁴ และแย่งอาหารทำให้เชื้อก่อโรคไม่เจริญเติบโตและมีจำนวนน้อย²⁵ ส่วนผลผลิตที่ได้จากการหมักใยอาหาร ได้แก่ กรดอะเซติก กรดแลคติก ก็สามารถยับยั้งการเติบโตเชื้อก่อโรคชนิดอื่น นอกจากนี้ การสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียอื่น ได้แก่ แบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งในป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคในลำไส้ได้^{26,27}

จุลินทรีย์ในลำไส้กับโรคอ้วน

จากการศึกษาโดย Backhed และคณะ²⁸ พบว่า หนูที่เลี้ยงในภาวะปลอดเชื้อ (Germ free mice, GF mice) มีไขมันสะสมในร่างกายน้อยกว่าหนูที่เลี้ยงในภาวะปกติประมาณ 40% ทั้ง ๆ ที่ GF mice กินอาหารในปริมาณที่มากกว่าหนูที่เลี้ยงในภาวะปกติ 30% ต่อมาเมื่อ GF mice เหล่านี้ ได้รับจุลินทรีย์ในลำไส้จากหนูที่เลี้ยงในภาวะปกติ พบว่าปริมาณไขมันสะสมในร่างกายของ GF mice เพิ่มขึ้นประมาณ 60% อย่างรวดเร็วภายใน 2 สัปดาห์ ทั้งที่ปริมาณอาหารที่รับประทานลดลง อีกทั้งยังพบภาวะดื้ออินซูลินและไขมันสะสมที่ตับเพิ่มมากขึ้น 2 เท่าด้วย²⁸ และที่สำคัญ หาก GF mice ได้รับจุลินทรีย์ในลำไส้จากหนูที่อ้วนโดยพันธุกรรม (*ob/ob* mice) จะทำให้ GF mice กลุ่มนั้นมีไขมันสะสมและอ้วนขึ้นมากกว่า GF mice กลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ในลำไส้จากหนูที่ผอมโดยพันธุกรรม (*genetically lean* mice) อย่างมีนัยสำคัญ²⁹ ทั้งนี้กลไกที่จุลินทรีย์ในลำไส้ทำให้เกิดความอ้วน คาดว่ามีหลายกลไกด้วยกัน ดังนี้

1. จุลินทรีย์ในลำไส้ ช่วยย่อยสลายและหมักพวก polysaccharides ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายได้ ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids, SCFA) ที่ร่างกายสามารถดูดซึมและนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ gluconeogenesis และ *de novo* lipogenesis ที่ตับ กลไกที่จุลินทรีย์ในลำไส้เพิ่มการสร้างไตรกลีเซอไรด์สะสมที่ตับ คาดว่าเกิดจากระดับน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินในเลือดที่สูงขึ้น ทำให้เกิดการกระตุ้น ChREBP (Carbohydrate Response-Element Binding Protein) และ SREBP-1 (Sterol Responsive-Element Binding Protein-1) ส่งผลให้เพิ่มการ transcription ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างกรดไขมันที่ตับ ได้แก่ Acetyl-CoA carboxylase (ACC1) และ Fatty acid synthase (FAS)²⁸

2. Short chain fatty acids ที่เพิ่มขึ้นยังสามารถกระตุ้น G-protein coupling receptors 2 ชนิด คือ Gpr41 และ Gpr43 ของ L cell ในลำไส้ ทำให้เกิดการหลั่ง Peptide YY เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การเคลื่อนไหวของลำไส้ถูกยับยั้งและ intestinal transit time เพิ่มมากขึ้น ทำให้การดูดซึมสารอาหารจากลำไส้เกิดมากขึ้น²⁸

3. จุลินทรีย์ในลำไส้ลดการแสดงออกของ Fasting-induced adipose factor (FIAF) ในลำไส้ เนื่องจาก FIAF เป็น Lipoprotein lipase (LPL) inhibitor ดังนั้นจึงส่งผลให้ LPL ทำงานได้เพิ่มขึ้น เพิ่มการสลายกรดไขมันจากไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของ Chylomicron และ Very low density lipoprotein (VLDL) ทำให้เกิดการสะสมไขมันที่เนื้อเยื่อไขมันมากขึ้น²⁸

4. จุลินทรีย์ในลำไส้ยับยั้งการทำงานของ Adenosine Monophosphate-activated protein kinase (AMPK) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานมากขึ้นเมื่อร่างกายต้องการใช้พลังงานมากขึ้น ทั้งนี้ AMPK พบมากในตับและกล้ามเนื้อ เมื่อ AMPK ถูกยับยั้งจะทำให้เอนไซม์ Acetyl CoA carboxylase (ACC) ทำงานได้ดีขึ้น จึงเพิ่มการผลิต malonyl CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดไขมันและขณะเดียวกันก็เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) ทำให้การสลายกรดไขมันที่ไม่โตคอนเดรียถูกยับยั้งไปด้วย³⁰

Ley และคณะ³¹ เป็นกลุ่มแรกที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ในหนูอ้วน (*ob/ob* mice) กับหนูผอม โดยทำการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ที่ได้จากจุลินทรีย์ในลำไส้ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากการศึกษ พบว่า *ob/ob* mice มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* ลดลง 50% แต่แบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับหนูผอม ต่อมา Ley และคณะ³² ได้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่พบในคนอ้วนเทียบกับคนผอม พบว่า คนอ้วนมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* น้อยกว่า และมีแบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* มากกว่าคนผอมในกลุ่มควบคุม ต่อมาเมื่อคนอ้วนถูกจำกัดอาหาร ให้ได้รับเฉพาะอาหารที่จำกัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต หรือไขมันเป็นเวลา 52 สัปดาห์ พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* เพิ่มขึ้น ขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* ลดลง โดยมีสัดส่วนของ *Bacteroidetes* ต่อ *Firmicutes* ใกล้เคียงกับสัดส่วนที่พบในคนผอม อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในคนก็ยังเป็นที่ถกเถียงกัน เนื่องจากหลายการศึกษาในคน³³⁻³⁶ ไม่พบว่าปริมาณ *Bacteroidetes* และ *Firmicutes* แตกต่างกันระหว่างคนอ้วนและคนผอม และไม่พบปริมาณ *Bacteroidetes* ลดลงและปริมาณ *Firmicutes* เพิ่มขึ้นดังที่ได้รายงานในสัตว์ทดลองและในคนอ้วนก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม Turnbaugh และคณะ³⁷ ได้รายงานสิ่งที่น่าสนใจคือ ชนิดและจำนวนรวมของจุลินทรีย์ในลำไส้ของคนอ้วนลดลงเมื่อเทียบกับคนผอม นอกจากนี้ Kalliomaki และคณะ³⁸ ยังได้รายงานว่าชนิดของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของเด็กทารกอาจใช้ทำนายว่า เมื่อทารกโตขึ้นจะกลายเป็นคนอ้วนหรือมีน้ำหนักเกินหรือไม่

เนื่องจากพบว่า ตัวอย่างอุจจาระของเด็กทารกที่โตขึ้นแล้วมีน้ำหนักอยู่ในเกณฑ์ปกติเมื่ออายุ 7 ปี มีแบคทีเรีย *Bifidobacterium* อยู่ในปริมาณมากกว่าในอุจจาระของเด็กทารกที่โตขึ้นแล้วกลายเป็นเด็กอ้วนอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ตัวอย่างอุจจาระของเด็กทารกที่โตขึ้นมาแล้วอ้วนนั้นจะพบ *Staphylococcus aureus* อยู่ในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ในหญิงตั้งครรภ์ที่มีน้ำหนักเกินกับหญิงตั้งครรภ์ที่มีน้ำหนักปกติก็มีความแตกต่างกัน³⁹ โดยในผู้หญิงตั้งครรภ์ที่มีน้ำหนักเกินจะพบ *Bacteroides* และ *Staphylococcus* มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และภาวะอ้วนและมีน้ำหนักเกินของมารดาระหว่างตั้งครรภ์ยังมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของ จุลินทรีย์ในลำไส้ ของเด็กทารกแรกเกิดอีกด้วย⁴⁰

ข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วน โดยจะพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* ลดลงและแบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* เพิ่มมากขึ้นในโรคอ้วน จุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนไปส่งผลให้ร่างกายได้รับพลังงานมากขึ้นจากการย่อยอาหารได้สมบูรณ์ อีกทั้งยังส่งเสริมการนำพลังงานส่วนเกินที่ได้ไปเก็บสะสมในรูปไขมันในร่างกาย จึงทำให้เกิดภาวะอ้วนตามมาในที่สุด

ยาปฏิชีวนะและอาหารกับจุลินทรีย์ในลำไส้

การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยพบว่าแบคทีเรียในลำไส้บางชนิดที่ตายไปหลังจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถฟื้นคืนกลับมามีชีวิตได้ใหม่

ทำให้ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ลดลง ทั้งนี้ได้มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ยาปฏิชีวนะกับการเพิ่มน้ำหนักในคน⁴¹ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก โดยพบว่าเด็กที่ได้รับยาปฏิชีวนะในช่วงที่เป็นทารก เมื่อโตขึ้นจะกลายเป็นเด็กอ้วน⁴²⁻⁴⁴ นอกจากนี้ Cho และคณะ⁴⁵ ยังพบว่า การให้ยาปฏิชีวนะในปริมาณต่ำๆ แก่หนูที่ยังไม่หย่านมแม่ เป็นระยะ 7 สัปดาห์ จะทำให้หนูเหล่านี้ มีการสะสมไขมันในร่างกายเพิ่มมากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ พบว่าปริมาณรวมของแบคทีเรียทั้งหมดในหนูกลุ่มที่ได้รับยา และไม่ได้รับยามีค่าเท่ากัน แต่หนูกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะมีปริมาณ *Firmicutes* เพิ่มขึ้น และมี *Bacteroidetes* ลดลง เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับยา ถึงแม้ว่ากลไกที่ยาปฏิชีวนะทำให้เกิดความอ้วนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีรายงานว่ายาปฏิชีวนะทำให้ *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียในลำไส้ที่ทนทานต่อยาปฏิชีวนะนั้น และมักถูกใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เกิดการเพิ่มน้ำหนักตามมา⁴¹

นอกจากยาปฏิชีวนะแล้ว อาหารก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ Hildebrandt MA และคณะ⁴⁶ ได้แสดงให้เห็นว่าอาหารไขมันสูง (high fat diet) มีผลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยทำการศึกษาในหนูปกติ (wild type mouse) และ resistin like molecule beta (RELM-beta) knockout (KO) mouse จากการศึกษ พบว่าเมื่อหนูทั้ง 2 ประเภทได้รับ high fat diet แทนอาหารปกติ (chow diet) หนูปกติจะอ้วนขึ้น ขณะที่ knockout mouse ยังคงผอมเหมือนเดิม อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบ

ของจุลินทรีย์ในลำไส้ ของหนูทั้งสองประเภทมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยพบปริมาณ *Bacteroidetes* ลดลง ส่วนปริมาณ *Firmicutes* และ *Proteobacteria* เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Turnbaugh และคณะ⁴⁷ ที่ทำการทดลองใน Humanized Gnotobiotic mice (Germ-free mice ที่ได้รับ Gut microbiota จากคน) โดยพบว่า เมื่อเปลี่ยนอาหารจาก low-fat, plant polysaccharide-rich diet ไปเป็น high-fat/high sugar western diet องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ จะเปลี่ยนแปลงไปภายใน 1 วัน นอกจากนี้ องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ ในคนก็มีความสัมพันธ์กับประเภทอาหารที่รับประทานเช่นกัน⁴⁸ โดย Wu และคณะ⁴⁸ ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 98 คน ซึ่งได้รับประทานอาหารที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษาพบว่า การรับประทานอาหารประเภทใดประเภทหนึ่งเป็นเวลานาน ๆ จะมีผลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ มากกว่าการรับประทานอาหารประเภทนั้น ๆ ในระยะสั้น และยังพบว่าอาหารที่อุดมด้วยโปรตีนและไขมันจากสัตว์จะสัมพันธ์กับการพบ *Bacteroides* ขณะที่อาหารที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตจะสัมพันธ์กับการพบ *Prevotella* การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ในลำไส้ ของเด็กที่อาศัยในยุโรป ตะวันตกกับเด็กที่อาศัยในเขตชนบทของแอฟริกา⁴⁹ โดยพบว่า เด็กที่อยู่ในยุโรปตะวันตก ซึ่งรับประทานอาหาร Western diet จะพบ *Bacteroides* เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่เด็กในชนบทของแอฟริกา ซึ่งรับประทานอาหารจำพวกพืชผักเป็นส่วนใหญ่ จะพบ *Prevotella* เป็นจำนวนมาก

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) กับโรคอ้วน

โรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของโรคตับเรื้อรัง จากการศึกษาทางระบาดวิทยา พบว่าความชุกของโรคไขมันสะสมในตับขึ้นอยู่กับอายุ เพศ และเชื้อชาติ^{50,51} โดยในกลุ่มประเทศตะวันตก พบร้อยละ 20–30 ในประชากรทั่วไป⁵² ส่วนในประเทศไทยพบความชุกของโรค NAFLD และ non-alcoholic steatohepatitis ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรังที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี ร้อยละ 54.3 และร้อยละ 76.1 ตามลำดับ⁵³ ทั้งนี้อุบัติการณ์ของ NAFLD เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบันตามอุบัติการณ์ของโรคอ้วนและเบาหวานที่เพิ่มขึ้น โดยพบความชุกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 58 ในผู้ที่มีน้ำหนักเกิน และพบสูงขึ้นถึงร้อยละ 91 ในผู้ป่วยโรคอ้วนระดับรุนแรง (morbid obesity)⁵⁴ ส่วนในประเทศไทยพบความชุกของโรค NAFLD ร้อยละ 60 ในผู้ป่วยเบาหวาน⁵⁵

NAFLD คือ ภาวะที่มีไขมันซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ สะสมภายในเซลล์ตับมากกว่า 5% ของน้ำหนักตับ โดยที่ไม่มีประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากพอ หรือสาเหตุอื่นใดที่ทำให้เกิดโรคตับ NAFLD ประกอบด้วยความผิดปกติที่ตับโดยเริ่มจากการมีแค่ไขมันสะสมอยู่ในเซลล์ตับ (simple steatosis) โดยที่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบที่ตับ⁵⁶ ไปจนถึงการมีไขมันสะสมที่ตับร่วมกับการอักเสบในตับแบบ ballooning degeneration พร้อมกับการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในตับ (fibrosis) โดยเรียกภาวะนี้ว่า Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) ซึ่งจัดว่ามีความรุนแรงของโรคมากกว่า

และสามารถนำไปสู่ภาวะตับแข็งและอาจกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด¹¹ ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคนี้ ได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) และภาวะ metabolic syndrome นอกจากนี้ พฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีไขมัน และน้ำตาลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำตาลฟรุกโตส ในปริมาณสูง ร่วมกับการไม่ออกกำลังกายก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงของโรคนี้⁵⁷

ถึงแม้ว่าพยาธิกำเนิดของ NAFLD ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด แต่ NAFLD ก็มีสมมุติฐานการดำเนินไปของโรคคือ “Two-hit hypothesis”⁵⁸ โดย “first hit” เกี่ยวข้องกับการสะสมไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับ (hepatic steatosis) ซึ่งมีภาวะอ้วนลงพุงและภาวะดื้อต่ออินซูลินเป็นตัวกระตุ้นสำคัญ ส่วน “second hit” เกิดตามหลัง steatosis ในผู้ป่วยจำนวนหนึ่ง โดยเริ่มจากกระบวนการ lipid peroxidation แล้วตามด้วยภาวะ oxidative stress ร่วมกับ proinflammatory cytokines (เช่น tumor necrosis factor [TNF]-alpha, adipocytokine) และ mitochondria เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบทำลายของเซลล์ตับ และเกิดพังผืดสะสมภายในตับนำไปสู่ภาวะ non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

ไขมันไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมในเซลล์ตับเกิดจากกระบวนการ esterification ของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) กับกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระในเซลล์ตับได้มาจาก 3 แหล่งด้วยกัน คือ จากการสลายไตรกลีเซอไรด์ (lipolysis) ที่เก็บสะสมในเนื้อเยื่อไขมัน จากอาหารที่รับประทานเข้าไป และจากการสังเคราะห์ขึ้นใหม่ภายในเซลล์ตับ (de novo lipogenesis, DNL)⁵⁹ ในขณะที่กรดไขมันอิสระ

ในเซลล์ตับสามารถถูกสลายผ่านกระบวนการ Beta-oxidation หรือถูกนำไปสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์แล้วปลดปล่อยออกมาจากตับในรูป VLDL ดังนั้นการเกิดไขมันสะสมในเซลล์ตับจึงมีสาเหตุมาจากการสังเคราะห์ไขมันเพิ่มขึ้นมากกว่าการสลายและปลดปล่อยไขมันออกจากตับในรูป VLDL⁵⁹ จากการศึกษาโดย Donnelly และคณะ⁶⁰ พบว่าไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมในเซลล์ตับของผู้ป่วย NAFLD ได้มาจากการดไขมันอิสระที่สลายจากเนื้อเยื่อไขมันประมาณ 60% ส่วนที่เหลือได้มาจากการบวนการ DNL 26% และจากอาหารที่รับประทานเข้าไป 15%

โรคอ้วนและภาวะดื้ออินซูลินก็เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคไขมันสะสมในตับ เนื่องจากภาวะดังกล่าวเพิ่มการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกมาจากเนื้อเยื่อไขมันเข้าสู่กระแสโลหิตมากขึ้น ทำให้กรดไขมันอิสระในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ⁶¹ นอกจากนี้ ระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดที่สูงขึ้นในภาวะดื้ออินซูลิน ยังมีผลยับยั้งกระบวนการ Beta-oxidation ของกรดไขมันอิสระในเซลล์ตับ อีกทั้งยังมีผลเพิ่มการแสดงออกของ SREBP-1 (Sterol Responsive-Element Binding Protein-1) ซึ่งควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างกรดไขมันที่ตับอีกด้วย⁶¹ ดังนั้นผลโดยรวมของภาวะดื้ออินซูลินคือ การสร้างไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับเพิ่มขึ้นอย่างมากนั่นเอง

ไขมันไตรกลีเซอไรด์ที่ตับสร้างขึ้นสามารถถูกปล่อยออกมาสู่กระแสเลือดในรูปของ VLDL เพื่อให้อวัยวะอื่นใช้เป็นแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตาม หากการสังเคราะห์และการปลดปล่อย VLDL ผิดปกติไป เช่น การขาดสาร

อาหาร choline ซึ่งเป็นองค์ประกอบและจำเป็นต่อการหลั่ง VLDL ออกจากตับ ก็จะทำให้เกิดการสะสมไขมันในเซลล์ตับได้เช่นกัน⁶²

การบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลฟรุคโตสในปริมาณสูง ก็มีผลเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมันที่ตับได้เช่นกัน โดยมีผลเพิ่มกระบวนการ *de novo* lipogenesis ที่ตับ ยับยั้งกระบวนการ Beta-oxidation และลดการส่ง VLDL ออกจากเซลล์ตับ⁶³ หลักฐานสำคัญที่ยืนยันว่าน้ำตาลฟรุคโตสเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมไขมันที่ตับน่าจะมาจากการศึกษาแบบ randomized clinical trial โดยเปรียบเทียบการบริโภคเครื่องดื่ม 4 ชนิด คือ เครื่องดื่มที่มีน้ำตาลซูโครส (cola) เครื่องดื่มปราศจากแคลอรี (diet cola) นม และน้ำเปล่า เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าคนที่ดื่ม cola มีไขมันสะสมที่ตับ กล้ามเนื้อ และในช่องท้อง (visceral fat) เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ดื่ม diet cola นม และ น้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญ⁶⁴

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า NAFLD มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับโรคอ้วนและภาวะดื้ออินซูลิน ในขณะเดียวกัน โรคอ้วนก็มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจุลินทรีย์ในลำไส้ที่พบในผู้ป่วย NAFLD จึงอาจความสัมพันธ์กับการเกิดโรคไขมันสะสมในตับและภาวะตับอักเสบ (NASH) ได้เช่นกัน

จุลินทรีย์ในลำไส้และ NAFLD

ตับและทางเดินอาหารเป็นอวัยวะที่มีความสัมพันธ์กัน โดยเลือดที่มาจากลำไส้ส่วนใหญ่ (ประมาณ 70%) มาจาก portal vein ซึ่งนำเลือดที่มีสารอาหารที่ย่อยแล้วจากลำไส้รวมถึงผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ เช่น เอทานอล แอมโมเนีย

และอะเซตัลดีไฮด์ไปยังตับด้วย มีการสันนิษฐานว่าจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไขมันสะสมในตับ (NAFLD) และตับอักเสบ (NASH) โดยกลไกที่จุลินทรีย์ในลำไส้ทำให้เกิดการอักเสบที่ตับเชื่อว่ามีหลายกลไกด้วยกัน ได้แก่ การมีแบคทีเรียเจริญมากผิดปกติในลำไส้เล็ก (small intestinal bacterial overgrowth, SIBO) การปลดปล่อย lipopolysaccharide (LPS) จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และการที่เยื่อบุผิวลำไส้ทำหน้าที่กีดขวางได้ไม่สมบูรณ์ (impaired intestinal barrier integrity) ทำให้ endotoxin ของเชื้อแบคทีเรียถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น และไปยังตับมากขึ้น ส่งผลกระตุ้นการสร้าง Proinflammatory cytokines ที่ตับและทำให้เกิดการอักเสบตามมาเป็นต้น⁶⁵

จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าหนูที่มีภาวะ SIBO จะมีพยาธิสภาพที่ตับในลักษณะคล้ายกับการเกิด NASH⁶⁵ ส่วนในคนพบอุบัติการณ์ของภาวะ SIBO ในผู้ป่วยโรคอ้วนและผู้ป่วย NAFLD สูงกว่าในคนสุขภาพปกติมาก⁶⁶ Wigg และคณะ⁶⁷ พบภาวะ SIBO สูงถึง 50% ในผู้ป่วย NASH ขณะที่ในกลุ่มควบคุมพบภาวะ SIBO เพียง 22% จากรายงานของ Miele และคณะ⁶⁸ พบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ SIBO กับการรั่วของผนังลำไส้ (gut leakiness) ในผู้ป่วย NAFLD และยังพบว่าการแสดงออกของ zonula occludens-1 (ZO-1) ในส่วน duodenum ลดลง ซึ่งบ่งบอกถึง tight junction ที่เสียหายไป ทำให้เยื่อบุผิวลำไส้เกิดการสูญเสียการทำหน้าที่กีดขวาง ทำให้แบคทีเรียรวมทั้งผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียในลำไส้เล็ดลอดเข้าสู่กระแสโลหิตและไปยังตับได้ในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น polymixin B และ metronidazole ในการลด

ปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้พบว่าทำให้ความรุนแรงของภาวะ steatosis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในสัตว์ทดลองและในคน^{69,70}

เป็นที่ทราบกันดีว่าโรคอ้วนและภาวะดื้ออินซูลินมีความสัมพันธ์กับการอักเสบในระดับต่ำ ๆ (low graded systemic inflammation) ทั่วร่างกาย เนื่องจากเนื้อเยื่อไขมันสร้างและหลั่ง proinflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL), และ IL-6 ออกมาเพิ่มมากขึ้น^{71,72} proinflammatory cytokines เหล่านี้ทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน และนำไปสู่การสะสมไขมันที่ตับในที่สุด Cani และคณะ⁷³ ได้สันนิษฐานว่า lipopolysaccharide (LPS) หรือ endotoxin ที่ได้มาจาก outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้อาจเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในระดับต่ำ ๆ ในร่างกาย เนื่องจาก LPS สามารถกระตุ้นการหลั่ง proinflammatory cytokines จาก innate immune cells เช่น macrophages และ Kupffer cells ที่ตับ โดยจับกับ mCD14 และ Toll-like receptor 4 (TLR4) บนผิวเซลล์ จากการศึกษาของ Cani และคณะ⁷³ พบว่า เมื่อให้อาหารที่มีไขมันสูง (high-fat diet) แก่หนูเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ พบว่าหนูมีระดับ LPS ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น 2-3 เท่าเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารปกติ แต่ระดับ LPS ที่เพิ่มขึ้นนี้มีระดับต่ำกว่าระดับ LPS ที่พบในภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ประมาณ 10-50 เท่า จึงได้เรียกภาวะนี้ว่า “metabolic endotoxemia” นอกจากนี้ อาหารไขมันสูงยังทำให้เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เช่น ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น เพิ่มไขมันสะสมที่ตับเกิดภาวะดื้ออินซูลินที่ตับ (hepatic insulin resistance) ร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของ proinflammatory cytokines

ในตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมันที่ช่องท้อง และที่สำคัญคือพบสัดส่วนของแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้เพิ่มมากขึ้น เมื่อภาวะ metabolic endotoxemia ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยการฉีด LPS ในระดับต่ำ ๆ เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังในหนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูเหล่านี้มีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่แสดงออกมาเหมือนกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง⁷³ และเมื่อทำการทดลองในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ LPS receptor (CD14) ที่ผิวเซลล์ของ macrophages หรือ CD14 knockout mice (CD14KO) พบว่าทั้งอาหารที่มีไขมันสูงและการฉีด LPS ในระดับต่ำ ๆ เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนัง ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้ CD14KO mice เหล่านี้เกิดความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ดังที่พบในหนูปกติได้⁷³ อย่างไรก็ตาม หากปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยการให้ยาปฏิชีวนะแก่หนูอ้วน (*ob/ob* mice) หรือให้ยาปฏิชีวนะร่วมกับอาหารไขมันสูงแก่หนูปกติ พบว่าภาวะ metabolic endotoxemia ในหนูลดลง ภาวะ glucose intolerance และการอักเสบที่เนื้อเยื่อไขมันลดลง ภาวะ oxidative stress และการแสดงออกของ macrophage infiltration markers ใน visceral adipose tissue ลดลง⁷⁴ และที่สำคัญยังพบอีกว่าการรับประทานอาหารไขมันสูงมีผลเพิ่ม intestinal permeability และลดการแสดงออกของ tight junction protein gene อีกด้วย⁷⁴

การที่อาหารไขมันสูงมีผลเพิ่มระดับ LPS ในเลือด อาจเนื่องมาจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง มีผลทำให้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้เปลี่ยนแปลงไป โดยทำให้แบคทีเรียแกรมบวก *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้หนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁷³ เนื่องจาก

แบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. มีบทบาทสำคัญในการลดระดับ endotoxin ในลำไส้ และช่วยส่งเสริมความแข็งแรงและการทำหน้าที่กีดขวางของเยื่อบุผิวในลำไส้⁷⁵ ดังนั้น การลดลงของ *Bifidobacterium* spp. เนื่องจากการได้รับอาหารที่มีไขมันสูง จึงทำให้เยื่อบุผิวในลำไส้สูญเสียการทำหน้าที่กีดขวาง ส่งผลให้เพิ่มการดูดซึม LPS จากลำไส้ผ่านทาง การเกิด Chylomicrons แล้วเข้าสู่กระแสเลือด⁷⁶

ในสภาวะร่างกายปกติ endotoxin ปริมาณเล็กน้อยจะถูกดูดซึมจากลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด และจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็วโดย Kupffer cells ที่ตับ อย่างไรก็ตามในเลือดของคนปกติจะสามารถพบ endotoxin โดยเฉลี่ยประมาณ 8.2 pg/mL (3.4-13.5 pg/mL)⁷⁷ จากการศึกษาของ Erridge และคณะ พบว่าระดับ endotoxin ในเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดีเพิ่มขึ้นประมาณ 50% หลังการรับประทานอาหารไขมันสูง⁷⁷ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 211 คน โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพลังงานที่ได้รับ (energy intake) กับภาวะ metabolic endotoxemia⁷⁸ นอกจากนี้ Anderson PD และคณะ⁷⁹ ยังได้แสดงให้เห็นว่าภาวะ metabolic endotoxemia ที่เกิดจาก IV infusion ของ endotoxin ยังมีผลเพิ่มการหลั่ง TNF-alpha และ IL-6 จากเนื้อเยื่อไขมัน และทำให้เกิดการตี้อินซูลินในอาสาสมัครสุขภาพดีด้วย ยิ่งไปกว่านั้น หลายการศึกษาด้วยกันได้รายงานการพบภาวะ metabolic endotoxemia ในผู้ป่วย NAFLD และผู้ป่วย NASH ด้วย โดยพบระดับ endotoxin และ plasminogen activator inhibitor1 ในเลือดเพิ่มขึ้น ร่วมกับการแสดงออกของ TNF-alpha

gene ที่ตับเพิ่มมากขึ้น⁸⁰⁻⁸² ระดับ endotoxin ในเลือดที่สูงขึ้นอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิด ความเสียหายที่ตับได้⁸²

นอกจากกลไกที่จุลินทรีย์ในลำไส้ทำให้เกิด NAFLD และ NASH ดังกล่าวข้างต้น กระบวนการเมแทบอลิซึมของ choline โดย gut microbiota ก็เป็นอีกหนึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดไขมันสะสมในตับ choline เป็นส่วนประกอบสำคัญของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ และยังจำเป็นต่อการหลั่ง VLDL ออกจากเซลล์ ตับ การขาด choline เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดไขมันสะสมในตับ (hepatic steatosis)⁶² และเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีรายงานถึงการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในลำไส้ 2 ชนิด คือ Gammaproteobacteria และ Erysipelotrichi กับการเกิดภาวะไขมันสะสมในตับ เนื่องจากขาด choline⁸³ การศึกษานี้ช่วยสนับสนุนว่า จุลินทรีย์ในลำไส้มีบทบาทหรือเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของเมแทบอลิซึมในร่างกาย

การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วย Probiotics

จากข้อมูลหลักฐานที่กล่าวมาข้างต้นได้ แสดงให้เห็นว่า หากองค์ประกอบของจุลินทรีย์ ในลำไส้เปลี่ยนแปลงไปหรือเสียสมดุลไป ไม่เพียงแต่จะทำให้เยื่อผิวในลำไส้สูญเสียการ ทำหน้าที่กีดขวางแต่ยังมีผลเพิ่มการส่งแบคทีเรีย และ LPS ออกจากลำไส้ไปยัง portal circulation และไปยังตับซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดตับอักเสบและเสียหายในที่สุด การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ใน ลำไส้ให้กลับคืนสู่ภาวะปกติจึงเป็นแนวทางหนึ่ง ที่น่าสนใจและอาจช่วยรักษาภาวะดังกล่าวได้ การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้สามารถทำ ได้โดยใช้ probiotics, prebiotics หรือ

antibiotics

Probiotics หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ เมื่อให้เสริมเข้าไปในร่างกายในปริมาณที่ เพียงพอจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย โดย กลไกที่ probiotics อาจก่อให้เกิดผลดีต่อดัง นั้นได้แก่ การกระตุ้น innate และ adaptive immune response การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้ยึด เกาะที่เยื่อทางเดินอาหาร และบุกรุกเข้าสู่ epithelial cells ของลำไส้ การควบคุมไม่ให้ จุลินทรีย์ในลำไส้เคลื่อนย้ายจากทางเดินอาหาร ไปอยู่ในกระแสโลหิต เป็นต้น โดย probiotics ที่ นิยมนำมาศึกษา ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* สำหรับหลักฐานแรก ที่สนับสนุนความสำคัญของ probiotics ในการ รักษาภาวะ NAFLD คือการศึกษาของ Li และ คณะในปี 2003⁸⁴ โดยพบว่า *ob/ob* mice ที่ ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ VSL#3 (probiotic mixture) หรือ anti-TNF antibodies เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณกรดไขมันทั้งหมดในตับและ ระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ในเลือดลดลง เมื่อเทียบกับ *ob/ob* mice ที่ได้รับ อาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว และถึงแม้ว่า VSL#3 ไม่มีผลลดการแสดงออกของ TNF- α messenger RNA (mRNA) ที่เซลล์ตับ เหมือนกับ anti-TNF antibodies แต่การรักษา ทั้งสองแบบมีผลลดการทำงานของ c-Jun N-terminal kinase (JNK) ซึ่งเป็น TNF-regulated kinase ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินและ ยังมีผลลด DNA-binding activity ของ nuclear factor kappaB (NF-kappaB) ซึ่งเป็นโมเลกุล เป้าหมายของ IKKbeta ในการทำให้เกิดภาวะ ดื้ออินซูลิน ต่อมา Ma และคณะ⁸⁵ พบว่าการให้ VSL#3 probiotic mixture มีผลลดภาวะดื้อ อินซูลินและลด hepatic steatosis ในหนูที่ได้รับ

อาหารไขมันสูง โดยผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจาก VSL#3 ทำให้จำนวน natural killer T-cells (NKT cells) ที่ตับกลับเพิ่มขึ้นมาอยู่ในระดับปกติ (ซึ่งก่อนหน้านี้มีจำนวนลดลงเนื่องจากการได้รับอาหารไขมันสูง) ร่วมกับการลดการแสดงออกของ TNF-alpha ที่ตับ ส่งผลให้ภาวะดี้อินซูลินลดลง นอกจากนี้ Esposito E และคณะ⁸⁶ ยังได้รายงานว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ VSL#3 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการลดลงของ oxidative damage และระดับ TNF-alpha ในตับร่วมกับการลดการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase (COX)-2 อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว และยังพบอีกว่า VSL#3 มีผลเพิ่มการแสดงออกของ peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-alpha) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการอักเสบที่ตับ⁸⁶ ส่วนหนูที่มีภาวะ NASH จากการได้รับอาหารที่ไม่มี methionine และ choline พบว่าการให้ VSL#3 มีผลลดการเกิด fibrosis ที่ตับ แต่ไม่มีผลลด hepatic steatosis หรือ hepatic inflammation⁸⁷ นอกจากนี้ รายงานการศึกษาหลายฉบับยังได้แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* หลายสายพันธุ์ มีผลป้องกันภาวะ NAFLD มีผลลดระดับ serum cholesterol, triglycerides และ uric acid และยังมีผลลดภาวะดี้อินซูลินอีกด้วย⁸⁸⁻⁹²

ส่วนผลการศึกษาในคน พบว่าเมื่อให้ probiotic (VSL#3) แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะ NAFLD หรือผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็ง เป็นเวลา 3-4 เดือน มีผลทำให้ค่า lipid peroxidation markers (malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (4-HNE)) ในเลือดลดลงในผู้ป่วย NAFLD ในขณะที่ค่า plasma levels ของ cytokines (TNF-

alpha, IL-6, and IL-10) จะลดลงในผู้ป่วยโรคตับแข็งเท่านั้น⁹³ ต่อมา Vajro P และคณะ⁹⁴ ได้ทำการศึกษาแบบ randomized controlled trial เป็นกลุ่มแรก โดยศึกษาในผู้ป่วยเด็กอ้วนที่มีภาวะ persisting hypertransaminasemia และ ultrasonographic (US) bright liver จำนวน 20 คน พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain GG เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีระดับ alanine aminotransferase และ anti peptidoglycan-polysaccharide antibodies ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับ placebo แต่ค่า TNF-alpha และ US bright liver parameters ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนอีกการศึกษาหนึ่งที่เป็นแบบ randomized double blind placebo controlled study เช่นกัน แต่ทำการศึกษาในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น NAFLD โดย liver biopsy พบว่าเมื่อให้ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ปริมาณ 500 ล้านตัวต่อวันแก่ผู้ป่วยเป็นเวลา 3 เดือน ค่า alanine amino transferase, aspartate aminotransferase activity, และ gamma-glutamine transferase levels ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ placebo ค่า liver aminotransferases เหล่านี้ไม่เปลี่ยนแปลง⁹⁵ นอกจากนี้ Malaguamera และคณะ⁹⁶ ยังได้แสดงให้เห็นว่าการรับประทาน *Bifidobacterium longum* และ fructo-oligosaccharides ร่วมกับการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม ในผู้ป่วย non alcoholic steato hepatitis (NASH) เป็นเวลา 24 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการศึกษา และทำการตรวจ liver biopsies ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง พบว่าผู้ป่วยจำนวน 70% มีค่า fibrosis scores ดีขึ้น และยังพบว่าค่า TNF-alpha, C-reactive protein (CRP), serum

aspartate aminotransferase (AST), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), serum endotoxin และ NASH activity index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพียงอย่างเดียว และเมื่อไม่นานมานี้ Eslamparast T และคณะ⁹⁷ ได้ศึกษาผลของการให้ synbiotic supplement เป็นเวลา 28 สัปดาห์ ร่วมกับการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในผู้ป่วย NAFLD พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ synbiotic supplement มีระดับ serum alanine aminotransferase (ALT) ลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับ placebo supplement ร่วมกับการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม อีกทั้งค่า Inflammatory parameters ต่าง ๆ (CRP, TNF- α , and NF- κ B p65) ก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ส่วนอีกการศึกษาที่น่าสนใจคือ การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยา Metformin ร่วมกับการให้ probiotics กับการให้ยา Metformin เพียงอย่างเดียว แก่ผู้ป่วย non-alcoholic steatohepatitis (NASH) เป็นเวลา 6 เดือน เมื่อสิ้นสุดการรักษา พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ Metformin ร่วมกับการให้ Probiotics มีระดับ serum alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase activity (AST) และ ultrasound grading ของ NASH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา Metformin อย่างเดียว ค่า serum ALT ลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ค่า AST และ ultrasound grading ของ NASH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า Body mass index (BMI), fasting blood sugar (FBS), cholesterol, และ triglyceride ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองกลุ่ม⁹⁸ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่าการปรับสมดุล

ของจุลินทรีย์ในลำไส้โดยการให้ probiotics สามารถใช้เป็นแนวทางร่วมในการรักษา NAFLD และ NASH ได้ อย่างไรก็ตามยังจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาแบบ randomized clinical trial ขนาดใหญ่ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาที่ผ่านมา ช่วยสนับสนุนว่าจุลินทรีย์ในลำไส้มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย ชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เปลี่ยนแปลงไปสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วนทั้งในสัตว์และในคน โดยพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* ลดลง และแบคทีเรียกลุ่ม *Firmicutes* เพิ่มขึ้นในโรคอ้วน กลไกที่ จุลินทรีย์ในลำไส้ทำให้เกิดโรคอ้วน คือ การเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ทำให้ได้พลังงานมากขึ้น อีกทั้ง ผลผลิตจากการย่อยสลาย เช่น กรดไขมันสายสั้น ก็ยังมีผลเพิ่มการสร้างและเก็บสะสมไขมันในร่างกายโดยตรง นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้กับการทำหน้าที่กีดขวางของผนังลำไส้ โดยพบว่าการมีการมีแบคทีเรียเจริญมากเกินไปผิดปกติในลำไส้เล็ก (small intestinal bacterial overgrowth, SIBO) ทำให้ tight junction เสียหาย ส่งผลให้เยื่อบุผิวลำไส้เกิดการสูญเสียการทำหน้าที่กีดขวาง ทำให้แบคทีเรียรวมทั้งผลผลิตของแบคทีเรียเช่น lipopolysaccharide (LPS) ในลำไส้เล็ดลอดเข้าสู่กระแสโลหิตและไปยังตับซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบตามมาในที่สุด การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและอาจช่วยรักษาภาวะตับอักเสบดังกล่าวได้ จากการศึกษาพบว่า การให้

probiotics เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ในผู้ป่วย NAFLD และ NASH ให้ผลการรักษาที่น่าพึงพอใจ อย่างไรก็ตาม การศึกษาแบบ randomized clinical trial ขนาดใหญ่มีจำนวนไม่มากจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อให้มั่นใจในการนำมาเป็นแนวทางในการรักษาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3): 859–904.
2. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003; 361(9356):512–9.
3. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(2):160–8.
4. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol.* 2014;5:190.
5. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Cartenì M, et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(6):471-6.
6. Miele L, Marrone G, Lauritano C, Cefalo C, Gasbarrini A, Day C, et al. Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target. *Curr Pharm Des.* 2013;19(29):5314-24.
7. Vajro P, Paoletta G, Fasano A. Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56(5):461-8.
8. Federico A, Trappoliere M, Loguercio C. Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: current views and perspectives. *Dig Liver Dis.* 2006;38(11):789-801.
9. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001;50(8):1844-50.
10. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2008;75(10):721-8.
11. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *2010;51(5):1820-32.*
12. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(26):11971–5.

13. Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(6):1589–96.
14. Sela DA, Mills DA. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol*. 2010;18(7):298–307.
15. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol*. 1982;15(2):189–203.
16. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol*. 1984;28(9):975–86.
17. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511–21.
18. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2001;5(7):e177.
19. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(Suppl1):4578–85.
20. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635–8.
21. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1031–64.
22. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1157–70.
23. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):478–85.
24. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 1994;35(4):483–9.
25. Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its

- nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(17):9833–8.
26. Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol*. 1999;25(3):155-72.
 27. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 2000; 47(5):646–52.
 28. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(44):15718-23.
 29. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
 30. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germfree mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):979-84.
 31. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(31):11070-5.
 32. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
 33. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(7):2365–70.
 34. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(11):1720–4.
 35. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):58–65.
 36. Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(1):190–5.
 37. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.
 38. Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(3):534–8.

39. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):894–9.
40. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(5):1023–30.
41. Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, Raoult D. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One*. 2010;5(2):e9074.
42. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sørensen TI, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(4):522-9.
43. Trehan I, Goldbach HS, LaGrone LN, Meuli GJ, Wang RJ, Maleta KM, et al. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N Engl J Med*. 2013;368 (5):425–35.
44. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(1):16-23.
45. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621-6.
46. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24.
47. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JL. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009;1(6):6ra14.
48. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
49. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(33):14691-6.

50. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):339–50.
51. Harmon RC, Caldwell SH. Propensity for non-alcoholic fatty liver disease: more evidence for ethnic susceptibility. *Liver Int.* 2009;29(1):4–5.
52. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-85.
53. Kladchareon N, Treeprasertsuk S, Mahachai V, Wilairatana P, Kullavanijaya P. The prevalence of nonalcoholic steatohepatitis in Thai patients with Non-HBV, non- HCV chronic hepatitis. *J Med Assoc Thai.* 2004;87(Suppl 2):S29-34.
54. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006;45(4):600-6.
55. Sobhonslidsuk A, Pulsombat A, Kaewdoun P, Petraksa S. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and significant hepatic fibrosis defined by non-invasive assessment in patients with type 2 diabetes. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(5):1789-94.
56. Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care.* 2004;27(8):2057-66.
57. Anania FA. Non-alcoholic fatty liver disease and fructose: bad for us, better for mice. *J Hepatol.* 2011;55(1):218-20.
58. Day CP, James OF. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology.* 1998;114(4), 842–5.
59. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):829-38.
60. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343–51.
61. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocr Rev.* 2008;29(7): 939-60.
62. Buchman AL, Dubin MD, Moukarzel AA, Jenden DJ, Roch M, Rice KM, et al. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral

- nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology*. 1995;22(5):1399–403.
63. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2012;23(3):203–8.
 64. Maersk M, Belza A, Stødkilde-Jørgensen H, Ringgaard S, Chabanova E, Thomsen H, et al. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(2):283-9.
 65. Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol*. 2003;38(5):681-7.
 66. Sabaté JM, Jouët P, Harnois F, Mechler C, Msika S, Grossin M, et al. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis. *Obes Surg*. 2008;18(4):371–7.
 67. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48(2):206-11.
 68. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-87.
 69. Pappo I, Becovier H, Berry EM, Freund HR. Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J Surg Res*. 1991;51(2):106-12.
 70. Drenick EJ, Fisler J, Johnson D. Hepatic steatosis after intestinal bypass-prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology*. 1982;82(3):535-48.
 71. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
 72. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-15.
 73. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates

- obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-72.
74. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470-81.
 75. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*. 1999;117(3):577–83.
 76. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009;50(1):90-7.
 77. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1286-92.
 78. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5): 1219-23.
 79. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, et al. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol & Metab*. 2007;92(6):2272-9.
 80. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- α gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non -alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*. 2007;17(10):1374-80.
 81. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*. 2008;138(8):1452–5.
 82. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:15.
 83. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology*. 2011;140(3):976-86.
 84. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory

- activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;37(2):343-50.
85. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol*. 2008;49(5):821-30.
 86. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr*. 2009;139(5):905-11.
 87. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology*. 2009;49(3):989-97.
 88. Bhathena J, Martoni C, Kulamarva A, Tomaro-Duchesneau C, Malhotra M, Paul A, et al. Oral probiotic microcapsule formulation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in Bio F1B Golden Syrian hamsters. *PLoS One*. 2013;8(3):e58394.
 89. Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84(2):341-7.
 90. Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, et al. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(7):736-44.
 91. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*. 2007;23(1):62-8.
 92. Nardone G, Compare D, Liguori E, Di Mauro V, Rocco A, Barone M, et al. Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(3):G669-76.
 93. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(6):540-3.
 94. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus*

- strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(6):740-3.
95. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1090-5.
96. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):545-53.
97. Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhah M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(3):535-42.
98. Shavakhi A, Minakari M, Firouzian H, Assali R, Hekmatdoost A, Ferns G, et al. Effect of a Probiotic and Metformin on Liver Aminotransferases in Non-alcoholic Steatohepatitis: A Double Blind Randomized Clinical Trial. *Int J Prev Med.* 2013;4(5):531-7.