Ljudska mikrobiota: funkcija, modulacija mikrobiote u kliničkim ispitivanjima i implementacija u praksi

Pajić, Aleksandra

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:861948

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Aleksandra Pajić

LJUDSKA MIKROBIOTA: FUNKCIJA, MODULACIJA MIKROBIOTE U KLINIČKIM ISPITIVANJIMA I IMPLEMENTACIJA U PRAKSI

Specijalistički rad

Zagreb, 2017.

Predgovor

Ovaj specijalistički rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen pod stručnim vodstvom doc. dr. med. Srećka Marušića.

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. med. Srećku Marušiću na edukaciji, strpljenju i neprekidnoj pomoći pri izradi specijalističkog rada.

PSS studij: Klinička farmacija

Mentor rada: doc. dr. med. Srećko Marušić

Specijalistički rad obranjen je dana 28. studenog 2017. u 14.00 sati na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Donatella Verbanac
   Sveučilište u Zagrebu
   Medicinski Fakultet
2. nasl. doc. dr. sc. Srećko Marušič
   KB Dubrava, Zagreb
3. izv. prof. dr. sc. Ivan Kosalec
   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad ima 127 listova.

Sažetak

Mikroorganizmi su ubikvitarni - naseljavaju najrazličitije okoliše: najviše planinske vrhove i najdublja mora, plodna tla, pustinje te između ostalog i ljudsko tijelo.

Mikrobne stanice brojčano nadmašuju stanice nositelja za jedan red veličine, stoga je lako zaključiti da ti simbionti igraju važnu ulogu u našem zdravlju. Mikrobiota stupa u interakciju s nositeljem na mnoge načine, stoga sastav mikrobioma može utjecati na ravnotežu cijelog sustava, a promjene u mikrobnim zajednicama mogu ispoljiti značajne utjecaje na homeosatzu pojedinca.

Cilj ovoga rada je izložiti pregled dosadašnjih saznanja o ljudskoj mikrobioti: njezinom razvoju, ulozi u očuvanju zdravlja te razvoju bolesti. Obzirom na neistraženost ljudskog mikrobioma također je cilj procijeniti potencijal modulacije mikrobiote kao nove metode prevencije te čak mogućnosti liječenja bolesti i proširenosti te metode u kliničkoj praksi.

U tu svrhu pretražena je znanstvena literatura, publikacije stručnih institucija, stranice Europske agencije za lijekove (od eng. *European Medicines Agency*, EMA) te drugi izvori.

Pregledom literature identificirane su specifičnosti ljudskih mikrobiota i njihovih uloga u razvoju zdravog organizma i podloge u razvoju bolesti poput Crohnove bolesti te čak psihičkih poremećaja.

Ljudski organizam i mikrobiote su u simbiontskom odnosu, stoga je nedavno predložena hipoteza tzv. „super-organizma“ sastavljenih od ljudskog organizma i mikroorganizama. Gastrointestinalne mikrobiote ispunjavaju važnu metaboličku i imunološku ulogu, a promjene u sastavu mogu utjecati na homeostazu i dovesti do disbioze i razvoja mikrobiotom-povezanih bolesti. Bolesti kod kojih su uočene disbioze mikrobiota uključuju upalne bolesti crijeva, iritabilni sindrom kolona, kolorektalni karcinom, metabolički sindrom, pretilost, alergijske bolesti i neurološke poremećaje poput autizma.

Sama saznanja o ljudskom mikrobiomu su još uvijek skromna te je potrebno uložiti više resursa u razumijevanje njegove uloge u patologiji bolesti s ciljem razvoja boljih terapijskih mogućnosti i potencijalan razvoj ciljane terapije.

Summary

Microorganisms are everywhere - they inhabit various environments: from highest peaks to deepest seas, fertile soil, desert and among other things the human body.

Microbial cells outnumber the host cells for one order of magnitude, so it is easy to conclude that these symbionts play an important role in our health. Microbiota interacts with the host in many ways, therefore, the composition of the microbiome can affect the balance of the entire system, and changes in microbial communities can exert significant effects on the health of the individual.

The aim of this paper is to present the current knowledge of the human microbiota: its development, role in health and disease development. As human microbiome is insufficiently explored, the goal is also to assess the potential of the microbiota modulation as a new method of prevention and treatment, and to assess frequency of this method in clinical practice.

For this purpose, scientific literature search was performed, including screening of publications and professional institutions, European Medicines Agency (EMA) website and other sources.

A literature search identified the specific characteristics of the human microbiota and its role in the development of a healthy organism and development of diseases such as Crohn's disease and even mental disorders.

The human body and microbiota are in symbiont relatonship, therefore, recently a hypothesis called "super-organism" was proposed, in which super-organism is composed of the human organism and microorganisms. Gastrointestinal microbiota fulfills an important metabolic and immunological role, and changes in its composition may affect the homeostasis and lead to the development of dysbiosis and microbiota associated diseases. Diseases in which the dysbiosis was observed include inflammatory bowel diseases, irritable colon syndrome, colorectal cancer, metabolic syndrome, obesity, allergic disease, and neurological disorders such as autism.

The mere knowledge of the human microbiome is still scarce and more resources have to be invested for understanding of its role in the pathology of the disease in order to develop better treatment options and potential development of targeted therapies.

Sadržaj

Sadržaj 1
Popis slika 2
Popis tablica 2
Popis kratica 3
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 3
3. MATERIJALI I METODE- SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 4
3.1. ŠTO SU MIKROORGANIZMI 4
3.2. LJUDSKI MIKROBIOM 6
3.2.1. Sastav mikrobiota 8
3.2.2. Alati u proučavanju ljudske mikrobiote 12
3.2.3. Razvoj ljudske mikrobiote 13
3.2.3.1. Mikrobna kolonizacija GIT-a novorođenčeta 13
3.2.3.2. Prenatalni mikrobni kontakt 14
3.2.3.3. Proces mikrobne kolonizacije novorođenčeta 14
3.2.4. Čimbenici koji utječu na razvoj mikrobiota 17
3.2.4.1. Porod 18
3.2.4.2. Prehrana 19
3.2.4.3. Antibiotici 20
3.2.4.4. Okoliš i životni stil 20
3.2.4.5. Genetika 20
3.2.4.6. Glikozilacija mucina 20
3.2.5. Sastav i stabilnost mikrobiota odraslih 21
3.2.6. Mikrobiota osoba starije životne dobi 22
3.2.7. Funkcija mikrobiota 23
3.2.7.1. Imunološki sustav 25
3.2.7.2. Crijevno-moždana os 35
3.3. UTJECAJ RAZVOJA MIKROBIOTA NA LJUDSKO ZDRAVLJE 44
3.3.1. Alergijske bolesti i astma 45
3.3.2. Metabolički i imunološki poremećaji 47
3.3.2.1. Pretilost 47
3.3.2.2. Diabetes mellitus tip I (T1DM) 49
3.3.2.3. Diabetes mellitus tip II (T2DM) 52
3.3.3. Bolesti probavnog sustava 55
3.3.3.1. Sindrom iritabilnog kolona (eng. irritable bowel syndrome, IBS) 55
3.3.3.2. Upalne bolesti crijeva (Inflammatory bowel disease, IBD) 56
3.3.3.3. Kolorektani karcinom 59
3.3.4. Psihijatrijski poremećaji 61
3.3.4.1. Depresija 62
3.3.4.2. Autizam i poremećaji ponašanja 63
3.4. MODULACIJA MIKROBIOTE 64
3.4.1. Modulacija mikrobiote kroz probiotike i prebiotike 64
3.4.1.1. Modulacija mikrobiote u alergijskih bolesti probioticima 71
3.4.1.2. Modulacije mikrobiote u metaboličkih poremećaja probioticima 72
3.4.1.3. Modulacija mikrobiote u konstipacije i dijareje probioticima 73
3.4.1.4. Modulacija mikrobiote u netoleranciji laktoze probioticima 75
3.4.1.5. Modulacija mikrobiote u IBD-a probioticima 75
3.4.1.6. Modulacija mikrobiote u sindroma iritabilnog kolona (IBS) probioticima 76
3.4.1.7. Modulacija mikrobiote u psihijatrijskih poremećaja probioticima 77
3.4.2. Modulacija mikrobiote kroz fekalne transplantante 79
3.4.3. Modulacija mikrobiote antimikrobnim lijekovima 83
4. RASPRAVA 87
5. ZAKLJUČAK 92
6. LITERATURA 95

Popis slika

Slika 1. Stanište termoacidofila *Sulpholobus acidocaldarius* ... 5
Slika 2. Stanište halofita *Halobacterium salinarum* ... 5
Slika 3. Vulkansko stanište arheja. ... 5
Slika 4. Osnovni oblici bakterija- bacili, koki i spirili. ... 6
Slika 5. Drvo Života – metafora kojom se opisuje međuzavisnost između organizama, živućih i izmrlih, kroz evoluciju. ... 6
Slika 6. Prikaz prijenosa mikrobiote. ... 15
Slika 7. Razvoj dječje mikrobiote. ... 16
Slika 8. Sazrijevanje mikrobiote. ... 17
Slika 9. Utjecaj brojnih čimbenika na razvoj i eubiozu mikrobiota. ... 18
Slika 10. Izlaganje mikrobioti tijekom ranog života regulira IgE serumske razine u odraslih miševa i njihovu osjetljivost na oralno induciranu anafilaksu. ... 28
Slika 11. iNKT stanična kolonizacija je regulirana mikrobiotom tijekom ranog života i utječe na osjetljivost na kolitis i astmu kasnije u životu. ... 32
Slika 12. T_{reg} stanice koloniziraju kožu neonatalnih miševa i induciraju toleranciju na komenzalne bakterije. ... 34
Slika 13. *Gut-brain axis*. ... 36
Slika 14. Utjecaj emotivnog motoričkog sustava na GIT-mikrobiotu. ... 38
Slika 15. Interakcija GIT-mikrobiote, imunoloških stanica lamine proprije i ANS-a. ... 39
Slika 16. Sistematska prezentacija *interkingdom* adrenergičke signalizacije između nositelja i GIT-mikrobiote. ... 44
Slika 17. Prikaz ukupne ekstrahirane energije leptin knock-out miševa i wild type-a. ... 48
Slika 18. Utjecaj mikrobiote na razvoj pretilosti ... 49
Slika 19. Prehrana i mikrobiota povezani mehanizmi u autoimunosti i T1DM razvoju. ... 51
Slika 20. Utjecaj intestinalne mikrobiote u promociji permeabilnosti GIT-a i inzulinskoj rezistenciji. ... 54
Slika 21. Usporedba patologije UC-a i CD-a ... 57
Slika 22. Usporedba zdrave barijere s onom narušenog integriteta. ... 58
Slika 23. Ukriženo hranjenje (cross feeding) ... 65
Slika 24. Smjernice ESCMID-a u liječenju *C. difficile* infekcije. ... 81
Slika 25. Posljedice po zdravlje povezane s disbiozom komenzalne mikrobiote zbog primjene antibiotika tijekom razvoja i odrasle dobi. ... 85

Popis tablica

Tablica 1. Karakteristike pojedinih domena života ... 4
Tablica 2. Mehanizmi interakcije mikrobiota-GBA. ... 41
Tablica 3. Usporedba promjena mikrobiote u psihijatrijskim poremećajima ... 64

Popis kratica

5-HT	5-Hidroksitriptamin, Serotonin
A. muciniphila	*Akkermansia muciniphila*
ACTH	Adrenokortikotrponi Hormon
AI-3	Autoinduktor-3
ANS	Autonomni Nervni Sustav
APRIL	Proliferator Inducirajući Ligand
B. frag	*Bacteroides fragilis*
B. fragilis	*Bacteroides fragilis*
B. fragΔSPT	*Bacteroides fragilis* deficijentan sfingolipidima
B. lactis	*Bifidobacterium lactis*
B. infantis	*Bifidobacterium infantis*
B. longum	*Bifidobacterium longum*
B. vulgatus	*Bacteroides vulgatus*
B. anthracis	*Bacillus anthracis*
B. breve	*Bifidobacterium breve*
BAFF	*B Cell Activating Factor,* B Stanični Aktivirajući Faktor
B-GOS	Bimuno Formulacija Galakto-Oligosaharida
C. difficile	*Clostridium difficile*
CaC_2O_4	Kalcijev Oksalat
CB	Cronhova Bolest
CB	Kanabinoid, Kanabinoidni
CFU	*Colony Forming Unit,* Jedinica za Formiranje Kolonije
$CH_3CH_2CH_2COOH$	Maslačna Kiselina
CH_3CH_2COOH	Propionska Kiselina
CH_3COOH	Actatna Kiselina
CH_4	Metan
CNS	Centralni Nervni Sustav
CRAMP	*Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide*, Katelicidinu Srodan Antimikrobni Peptid
CRC	Kolorektalni Karcinom
CRF	*Corticotropin Releasing Factor*, Kortikotropin-Oslobađajući Faktor
CRP	C-reaktivni protein
DC	*Dendritic Cell,* Dendritička Stanica
DNA	Deoksiribonukleinska Kiselina
E. coli	*Escherichia coli*
E. rectale	Roseburia*/Eubacterium rectale*
E. faecium	*Enterococcus faecium*
eCB	Endokanabinoidi
ECC	Enterokromafina Stanica
EFSA	*European Food Safety Authority,* Eurposka Agencija za Sigurnost Hrane
EMA	*European Medicines Agency,* Europska Agencija za Lijekove
EMS	Emotivni Motorički Sustav
ENS	Enterički Nervni Sustav
ESCMID	*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,* Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti
F. prausnitzii	*Faecalibacterium prausnitzii*
FDA	*Food and Drug Administration*, Američka Agencija za Hranu i Lijekove
fMRI	Funkcionalna Magnetska Rezonancija
FMT	Fekalna Mikrobna Transplantacija
FOS	Frukto-Oligosaharidi
GABA	*γ-Aminobutyric Acid*, γ-Aminomaslačna Kiselina
GALT	*Gut Associated Lymphoid Tissue*
GBA	*Gut-Brain Axis,* Crijevno-Moždana Os
GF	*Germ Free*
GIT	Gastrointestinalni Trakt
GOS	Galakto-Oligosaharidi

H_2S	Sumporovodik
HMP	*Human Microbiome Project,* Projekt Ljudskog Mikrobioma
HOMA-IR	*Homoeostasis Model Assessment-Estimated Insulin*
HPA	Hipotalamičko-Pituitarno Adrenalna Os
IBD	*Inflammatory Bowel Disease*, Upalne Bolesti Crijeva
IBS	Iritabilni Sindrom Kolona
IEC	*Innate Epithelial Cells,* Urođene Epitelne Stanice
Ig	Imunoglobulin
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IKK	IκB Kinaza
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IL-17	Interleukin-17
IL-22	Interleukin-22
IL-25	Interleukin-25
ILC	*Innate Lymphoid Cells,* Urođene Limfoidne Stanice
ILF	Izolirani Limfoidni Folikuli
IND	*Investigational New Drug*
iNKT	Invarijantne T Stanice Ubojice
IRS-1	Inzulin-Receptor-Supstrat 1
JNK	c-Jun N-Terminalna Kinaza
L. casei	*Lactobacillus casei*
L. reuteri	*Lactobacillus reuteri*
L. acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
L. paracasei	*Lactobacillus paracasei*
L. delbrueckii	*Lactobacillus delbrueckii*
L. plantarum	*Lactobacillus plantarum*
L. rhamnosus	*Lactobacillus rhamnosus*
L. bulgaricus	*Lactobacillus bulgaricus*
L. salivarius	*Lactobacillus salivarius*
LPS	Lipopolisaharid
MC	Mastocit
MetaHIT	*Metagenomics Of The Human Intestinal Tract,* Metagenomika ljudskog intestinalnog trakta
MHC	*Major Histocompatibility Complex, Glavni Sustav Tkivne Kompatibilnosti*
Mφ	Makrofag
NE	Noradrenalin
NFκB	Nuklearni Faktor κB
NIH	*National Institutes of Health,* Nacionalni Institut Zdravlja
NK	*Natural Killer,* Prirodnoubilačke stanice
NOD	*Non-Obese Diabetic*, Ne-Pretili Dijabetički
O. formigens	*Oxalobacter formigenes*
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PAMP	*Pathogen Associated Molecular Patterns,* Molekularni Uzorkci Povezani s Patogenima
PD1	*Programmed Cell Death Protein 1, Protein Programirane Stanične Smrti 1*
PD-L1	*Programmed Death-Ligand 1,* Ligand Programirane Stanične Smrti 1
PRR	*Pattern Recognition Receptor,* Receptor za Prepoznavanje Uzorka
PSA	Polisaharid A
R. bromii	*Ruminococcus bromii*
RELMβ	*Resistin-Like Molecule β, Molekula Slična Rezistinu β*
RNA	Ribonukleinska Kiselina
ROR	*Related Orphan Receptor, Srodni Orfan Receptor*
RS	Resistent Starch, Nerazgradivi Škrob

S. boulardii	*Saccharomyces boulardii*
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*
S. thermophilus	*Streptococcus thermophilus*
SFB	Segmentirane Filamentozne Bakterije
SNS	Simpatički Nervni Sustav
SPF	*Specific Pathogen-Free*
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TCR	*T-Cell Receptor, T-Stanični Receptor*
TGF-β	*Transforming Growth Factor–β,* Transformirajući Faktor Rasta-β
TLR	*Toll-Like Receptor*
TNF	*Tumour necrosis factor,* Tumor Nerkotizirajući Faktor
T_{reg} stanice	Regulatorne T Stanice
TSLP	*Thymic Stromal Lymphopoietin,* Limfopoetin Strome Timusa
UC	Ulcerozni Kolitis
WGO	*World Gastroenterology Organisation,* Svjetska Organizacija za Gastroenterologiju
WHO	*World Health Organisation,* Svjetska Zdravstvena Organizacija
ZO-2	Zona Occludens 2
α2AR	α2 Adrenergički Receptor

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Mikroorganizmi su ubikvitarni - naseljavaju najrazličitije okoliše: najviše planinske vrhove i najdublja mora, plodna tla, pustinje te između ostalog i ljudsko tijelo.

Ljudski probavni sustav sadržava kompleksnu zajednicu mikroorganizama čiji broj se procjenjuje kao 10 puta većim od broja stanica u cijelom tijelu (1).

Ove mikrobne zajednice, dinamične su populacije koje se razlikuju od osobe do osobe te mijenjaju svoju strukturu s vremenom. Te se zajednice sastoje od mnoštva mikroorganizama uključujući arheje, bakterije i eukarije (1).

Ljudskih stanica u našem tijelu ima 10 trilijuna u usporedbi s mikroorganizmima koje broje 100 trilijuna. Također u usporedbi broja ljudskih gena s mikrobnim genima, ljudski genom broji oko 20 000 gena dok mikroorganizmi broje od 2 do 20 milijuna gena. Bakterija u ljudskom tijelu, u prosjeku ima deset puta više nego ljudskih stanica (10% ljudskih stanica), a bakterijskih gena ima 100 do 1000 puta više nego što ih je prisutno u ljudskom genomu (0.1-1% ljudskih gena) (1, 2).

Mikrobne stanice brojčano nadmašuju stanice nositelja (domaćina, čovjeka) za jedan red veličine (1, 2), stoga je lako zaključiti da ti simbionti igraju važnu ulogu u našem zdravlju. Mikrobiota stupa u interakciju s nositeljem na mnoge načine, stoga sastav mikrobioma može utjecati na ravnotežu cijelog sustava, a promjene u mikrobnim zajednicama mogu ispoljiti značajne utjecaje na homeostazu pojedinca. Primjerice u crijevima, mikrobne zajednice utječu na metabolizam i preradu nutrijenata te čak na funkcije imunološkog sustava, a s druge strane nositelj, okoliš i interakcije među mikroorganizmima utječu na kvalitativni i kvantitativni sastav mikrobiota (3).

Projekt ljudskog mikrobioma (eng. *Human Microbiome Project,* HMP) je prvi svojim istraživanjima pokušao okarakterizirati ulogu ljudske mikrobiote - mikroorganizama koji žive u simbiozi s ljudskim organizmom. Pokušaj je bio analizirati i karakterizirati mikroorganizme koji koloniziraju ljudsko tijelo te otkriti eventualne promjene u mikrobioti tijekom patoloških stanja. Do dan danas nije razjašnjeno kako promjene u mikrobiomu mogu biti povezane sa zdravljem i bolesti (1).

Postoje publikacije koje su dokazale da postoji uloga mikrobiote u patološkim stanjima, primjerice promjene u mikrobnim zajednicama probavnog sustava mogu biti povezane s metaboličkim bolestima (4), pretilosti (5) te Crohnovom bolesti (6).

Čovjek kao nositelj može svjesno utjecati na mikrobiom mjenjanjući određene karakteristike u svoju korist (modulacija mikrobioma), tj. svjesno utjecati na raznolikost mikrobiota (kao funkcije vremena) te distribuciju mikroorganizama (bakterija) kroz određene tjelesne lokacije (primjerice crijeva) (7, 8).

Ovaj rad je osvrt na ulogu mikrobiote u razvoju zdravog ljudskog organizma te kako modulacijom iste možemo prevenirati ili čak i liječiti neke od bolesti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga rada je izložiti pregled dosadašnjih saznanja o ljudskoj mikrobioti: njezinom razvoju, ulozi u očuvanju zdravlja te razvoju bolesti. Obzirom na neistraženost ljudskog mikrobioma također je cilj procijeniti potencijal modulacije mikrobiote kao nove metode prevencije te čak mogućnosti liječenja bolesti i proširenosti te metode u kliničkoj praksi.

Hipoteza: kod određenih bolesti (gdje mikrobiota igra ulogu) u njihovom liječenju i prevenciji potrebno je uključiti i modulaciju mikrobiote s ciljem uravnoteženja mikrobiota pojedinca i povećanja uspješnosti liječenja standardnom terapijom.

3. MATERIJALI I METODE- SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Pretražena je relevantna znanstvena i stručna literatura, publikacije stručnih udruga i institucija, Europske agencije za lijekove (EMA), te drugi raspoloživi izvori. Ključne riječi za pretraživanje baza podataka (Cochrane, PubMed, UpToDate) uključivale su sljedeće pojmove: *microbiota*, *microbiome*, *human flora*, *dysbiosis*, *clinical practise, probiotic, prebiotic, fecal transplantation* i dr.

Pregledom literature identificirane su specifičnosti ljudskih mikrobiota i njihovih uloga u razvoju zdravog organizma i podloge u razvoju bolesti poput Crohnove bolesti te čak psihičkih poremećaja.

Saznanja i rezultati su prikazani u obliku preglednog rada.

3.1. ŠTO SU MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi spadaju u najbrojnije i najrazličitije organizme na Zemlji. Većina Zemljine biomase, ukupne mase živih bića, je mikrobna. Pod izrazom mikroorganizam obuhvaćamo sve organizme koji su presitni da bi bili vidljivi golim okom, već je potrebna pomoć mikroskopa. Te jednostavne organizme klasificiramo kao bakterije (*Bacteria)*, arheje (*Archaea)* i eukarije (*Eukarya)*. Organizmi u svakoj od ovih grupa dijele neke od karakteristika i funkcija (Tablica 1, Preuzeto iz 9).

Tablica 1. Karakteristike pojedinih domena života

	Bacteria	***Archaea***	***Eukarya***
Stanični tip	Prokariot	Prokariot	Eukariot
Veličina stanice	0.5-4 μm	0.5-4 μm	> 5 μm
Stanični zid	Uglavnom prisutan, sadrži peptidoglikan	Prisutan, nema peptidoglikana	Nije prisutan, ili ako jest, izgrađen je od drugih materijala (celuloza)
Lipidi u membranama	Masne kiseline povezane esterskim vezama	Izopreni povezani eterskim vezama	Masne kiseline povezane esterskim vezama
Proteinska sinteza	Prva amino kiselina-formilmetionin;	Prva amino kiselina-metionin	Prva amino kiselina-metionin;
Genetski materijal	Mali cirkularni kromosom i plazmidi; nema histona	Mali cirkularni kromosom i plazmidi; proteini slični histonima prisutni	Kompleksna jezgra (nucleus) te kromosomi; histoni prisutni
RNA polimeraza	Jednostavna	Kompleksna	Kompleksna
Pokretljivost	Jednostavne flagele, plinske vezikule	Jednostavne flagele, plinske vezikule	Kompleksni organi za pokretanje

	Bacteria	*Archaea*	*Eukarya*
Stanište	Ubikvitarni	Ekstremni okoliš	Ubikvitarni
Organizmi predstavnici	Cijanobakterije	Metan-producirajuće bakterije, halobakterije, ekstremni termofili	Alge, protozoe, gljive, biljke i životinje

Bakterije i arheje su jedostavnije u usporedbi s eukarijama- to su jednostanični organizmi bez jezgre dok eukarije nasuprot tomu imaju jezgru. (9).

Arheje su jednostanični prokarioti bez organela, ali imaju sljedeće jedinstvene karakteristike: plazmidna membrana lipidnog sastava koji se ne javlja ni u kojem drugom živućem organizmu; RNA polimeraza i ribosomi su jedinstveni, no ipak sličniji eukarijama; ovi organizmi napučavaju ekstremne okoliše nalik na primordijalni Zemljin okoliš (9).



Slika 1. Stanište termoacidofila *Sulpholobus acidocaldarius*.
Preuzeto iz (10).



Slika 2. Stanište halofita *Halobacterium salinarum*.
Preuzeto iz (11)



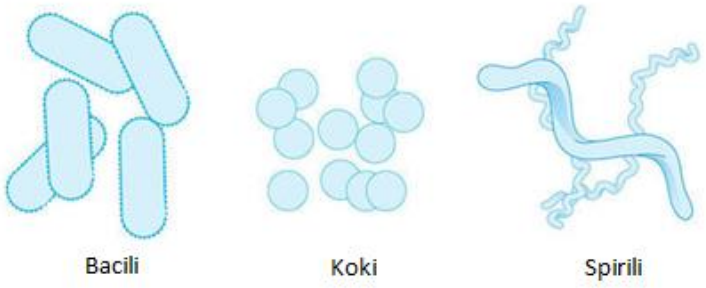
Slika 3. Vulkansko stanište arheja.
Preuzeto iz (12)

Metanogene arheje su anaerobi koji produciraju velike količine metana (CH_4) i imaju bitnu ulogu u ciklusu ugljika (9).

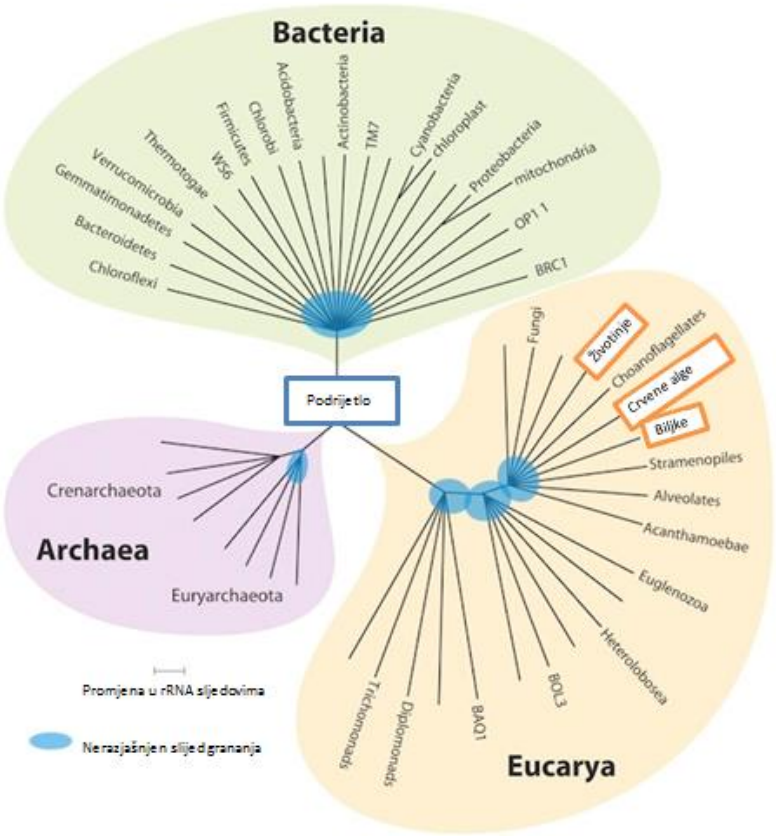
Halofite je moguće naći u ekstremnim slanim lokalitetima poput Mrtvog mora.

Termofili žive u termalnim izvorima, acidičnom tlu te blizu vulkanskog otvora.

Bakterije su jednostanični prokarioti bez organela- njihova stanica sadržava samo stanični zid, staničnu membranu, DNA i enzime. Stanični zid je fleksibilan i sastavljen od peptidoglikana te ima funkciju zaštite (npr. protiv obrambenog sustava nositelja) i služi u signalizaciji drugim bakterijama. Stanična membrana je semipermeabilna, a DNA je kružnog oblika s brojnim plazmidima (9).



Slika 4. Osnovni oblici bakterija- bacili, koki i spirili.
Preuzeto iz (13).



Slika 5. Drvo Života – metafora kojom se opisuje međuzavisnost između organizama, živućih i izmrlih, kroz evoluciju.
Grafički prikaz objedinjuje rezultate brojnih *small-subunit* (SSR) ribosomalnih (r) RNA sekvenciranja. Ovo je pojednostavljeni prikaz domena života, stoga su prikazane su samo malobrojne linije podrijetla. Prilagođeno prema (14).

3.2. LJUDSKI MIKROBIOM

Mikrobiota je skup mikroorganizama prisutan u definiranom okolišu. Prvu definiciju ovog pojma dali su Lederberg i McCray (15) naglašavajući važnost mikroorganizama koji nastanjuju naše tijelo. Ovaj mikrobiološki cenzus utvrđuje se

primjenom molekularnih metoda koje se prvenstveno oslanjaju na analizu 16S rRNA gena, 18S rRNA gena ili drugih markerskih gena i genomskih regija, amplificiranih i sekvenciranih iz danih bioloških uzoraka (16).

Mikrobiom - ovaj pojam se odnosi na cijelo stanište, uključujući mikroorganizme (bakterije, arheje, niže i više eukarije), njihove genome (tj. gene) i okolišne čimbenike. Ova definicija temelji se na onoj "bioma", tj. biotičkim i abiotičkim čimbenicima određenog okoliša. Dok jedni ograničavaju definiciju mikrobioma na skupinu gena i genoma članova mikrobiote, drugi pak tvrde kako je to definicija metagenoma, koji je u kombinaciji s okolinom gradi mikrobiom. Mikrobiom se proučava primjenom jedne ili kombinacijom metagenomike, metabolomike, metatranskriptomike i metaproteomike u kombinaciji s kliničkim ili okolišnim metapodacima (16).

Metagenom predstavlja zbirku genoma i gena članova mikrobiota. Ova je zbirka dobivena sekvencioniranjem metodom sačmarice (od eng. *shotgun*) DNA ekstrahiranog iz uzorka (metagenomika), nakon čega slijedi sastavljanje ili mapiranje u referentnu bazu podataka, nakon čega slijedi anotacija. Metagenomika je proces kojim se karakterizira metagenom, iz kojeg se mogu dobiti informacije o potencijalnoj funkciji mikrobiota (16).

Zajednica (biocenoza) predstavlja skup istovrsnih ili različitih vrsta organizama koji žive na na određenom prostoru (biotopu) u određenom vremenu koji su uzajamno funkcionalno povezani različitim uzajamnim odnosima. Mikroorganizmi koji snažno međusobno stupaju u interakciju u mikro-okolišu čine mikrobnu (lokalnu) zajednicu (17). Okoliš jest vanjsko okruženje uključujući sve biotičke i abiotičke čimbenike koji okružuju i utječu na preživljavanje i razvoj organizma ili populacije (18). Populacija jest skupina jedinki iste vrste koje naseljavaju ili koje su naseljavale u nekom vremenskom razdoblju određeni prostor u biosferi (19).

Ljudske mikrobiote sastoje od mnoštva mikroorganizama uključujući eukarije, arheje i bakterije. Ljudskih stanica u našem tijelu ima oko 10 trilijuna u usporedbi s mikroorganizmima koji broje 100 trilijuna. Također u usporedbi broja ljudskih gena s mikrobnim genima, ljudski genom broji oko 20 000 gena dok mikroorganizmi od 2 do 20 milijuna gena. Bakterija u ljudskom tijelu u prosjeku ima deset puta više nego

ljudskih stanica (10% ljudskih stanica), a bakterijskih gena ima 100 do 1000 puta više nego što ih je prisutno u ljudskom genomu (0.1-1% ljudskih gena). Kada uspoređujemo koliko se ljudske jedinke međusobno razlikuju po svojim ljudskim genima i genima mikrobioma dobivamo 99.99% sličnosti s drugim ljudima kada gledamo naš DNA, no naši mikrobiomi dijele samo 10% sličnosti s drugima (1, 2).

Ljudski mikrobiom se sastoji od brojnih mikrobiota, poput mikrobiota kože (mikroorganizmi koji naseljavaju površinu i dublje slojeve kože), usne šupljine (oralna) (mikroorganizmi koji naseljavaju sluznicu usne šupljine), vagine/penisa te gastrointestinalnog trakta (nadalje GIT) prethodno znane pod nazivom GIT flora i drugih (1).

Zbog svoje male veličine, mikroorganizmi čine 1 do 3% naše tjelesne mase. Većina tih mikroorganizama nije štetna svom nositelju, već ima bitnu ulogu u održavanju zdravlja. Primjerice, mikroorganizmi proizvode neke vitamine koje naše tijelo ne može sintetizirati (izostanak gena); razgrađuju hranu te ekstrahiraju potrebne nam nutrijente, sudjeluju u razvoju i sazrijevanju imunološkog sustava. Sve veći broj studija (1) pokazuje kako promjena u sastavu našeg mikrobioma korelira s brojnim patološkim stanjima, čime se implicira na mogućnost manipulacije tim zajednicama kao mogućom terapijom bolesti.

Radi boljeg razumijevanja ravnoteže i neravnoteže mikrobioma, potrebno je definirati pojmove eubioze i disbioze. Eubioza jest ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava, dok disbioza predstavlja neravnotežu istog (20).

3.2.1. Sastav mikrobiota

Normalan ljudski mikrobiom je vrlo kompleksan sastojeći se od eukarija, bakterija i arheja. Na razvoj normalne mikrobiote utječu brojni čimbenici poput genetike, dobi, spola, stresa i prehrane pojedinca (21) (više u Poglavlju 3.2.3: Razvoj ljudske mikrobiote).

Koža pruža mnoga staništa na kojima se brojne populacije mikroorganizama izlažu promjenjivim čimbenicima poput vlažnosti, temperature, pH i sastavu antimikrobnih peptida i lipida. Također, strukture kože, poput folikula dlaka, sebacealnih, ekrinih i

apokrinih žlijezda tvore staništa koja sadržavaju jedinstvene mikrobiote. Analizom topografske raznolikosti mikroorganizama ljudske kože pomoću 16S rRNA genske filotipizacije otkriveni su brojni utjecaji tih staništa na sastav mikroorganizama. Barem 19 koljena čini bakterijski kožni mikrobiom. Glavni primjeri su koljena *Actinobacteria* (51.8%), *Firmicutes* (24.4%), *Proteobacteria* (16.5%), i *Bacteroidetes* (6.3%), dok većinu identificiranih koljena sačinjavaju *Corynebacterium*, *Propionibacterium* i *Staphylococcus*. Brojnost svake skupine snažno ovisi o karakteristikama pojedinog kožnog staništa. Primjerice lojne (sebacealne) površine na licu pogodne su za *Propionibacterium* vrste i *Staphylococcus* vrste koje tamo dominitaju (22). Također, osim lica, druga pogodna lojna staništa čine leđa i područje iza ušiju koja pogoduju lipofilnim *Propionibacterium* vrstama (23). Na vlažnim staništima poput pazuha dominiraju *Corynebacterium* vrste iako su *Staphylococcus* vrste isto prisutne. Nasuprot tomu, u suhim staništima dominiraju miješane populacije β-*Proteobacteria* i *Flavobacteriales* vrsta (22). Suha staništa se također odlikuju većom bakterijskom raznolikošću, ali i manjom brojnošću bakterija u usporedbi s masnim i vlažnim dijelovima kože. Nadalje, masne (lojne) površine karakterizirane su niskom raznolikošću, ali relativnom temporalnom stabilnošću u usporedbi sa vlažnim i suhim predjelima kože (23).

16S rRNA analizama mikrobioma pluća u zdravih subjekata srušena je dogma o sterilnosti pluća i pokazano kako najbrojnija koljena čine *Bacteroidetes i Firmicutes;* značajni rodovi uključuju *Prevotella*, *Veillonella*, i *Streptococcus*. Sastav mikroorganizama pluća sličniji je onom usne šupljine nego drugih dijelova tijela – prvenstveno zbog toga što usta čine primarni izvor mikroogranizama za respiratorni trakt (24).

Rod *Lactobacillus* sastoji se od preko 130 vrsta koje produciraju mliječnu kiselinu te naseljavaju raznolike okoliše – preko 20 vrsta je pritom otkriveno u rodnici. Za razliku od većine drugih dijelova tijela, zdrave vaginalne zajednice smatraju se onima u kojima dominiraju jedna ili dvije vrste, od kojih su najčešće vrste *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* i *Lactobacillus gasseri.* Laktobacili koriste nekoliko mehanizama kojima inhibiraju kolonizaciju drugih bakterija, uključujući patogone. Vaginalne epitelne stanice proizvode glikogen, koji fermentacijom laktobacila prelazi u D- i L-mliječnu kiselinu. Neke vrste također stvaraju vodikov peroksid – iako koncentracije nisu dovoljno visoke da bi inhibirale rast drugih bakterija. Neke vrste

proizvode bakteriocine koji mogu direktno ubijati druge bakterijske vrste. Laktobacili su bolji kompetitori u usporedbi s drugim mikroogranizmima za nutrijente i receptore epitelnih stanica vagine. Ovi inhibitorni mehanizmi se razlikuju među *Lactobacillus* vrstama – pokazano je kako svaka vrsta posjeduje jedinstvene porodice proteina, a te razlike upućuju na specifične adaptacije. Laktobacili također mogu inhibirati kolonizaciju patogena kompeticijom za receptore domaćina koje također koriste urogenitalni patogeni poput *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, streptokoka grupe B (GBS), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* i *Prevotella bivia* vrsta. Stoga laktobacili s višim afinitetom prema staničnom receptoru nositelja mogu istisnuti *G. vaginalis* i *N. gonorrhoeae* iz receptora (25).

Iz perspektive nositelja, nekoliko čimbenika, uključujući periodički hormonalni ciklus (koji potiče otpuštanje glikogena u vaginalni okoliš te ljuštenje epitelnih stanica na koje se bakterije adheriraju), pridonose obrani organizma (čimbenici urođene imunosti) protiv kolonizacije patogenima. Inhibitorni mehanizmi laktobacila, zajedno sa čimbenicima nositelja, pridonose održavanju zdravog vaginalnog ekosustava (25).

Sastav vaginalnih zajednica oscilira kao funkcija dobi, menarche, menstrualnog ciklusa, trudnoće, infekcija, kontracepcije i seksualnog ponašanja. Izlaganje spermicidima ili *β*-laktamima te drugim antibioticima može smanjiti prevalenciju laktobacila i posljedično povećati osjetljivost prema vaginalnim infekcijama (25).

U usporedbi sa ženskim, muški reproduktivni sustav je slabije opisan. Značajne anatomske lokacije čine uretra i coronal sulcus. Oba područja izložena su stranim mikrobnim zajednicama tijekom seksualnog odnosa. Ograničenje u razumijevanju penilne mikrobiote proizlazi iz nedostatka podataka od zdravih mladih muškaraca koji su imali te onih koji nisu imali seksualne odnose. Ovi podaci bi detaljnije opisali mikrobiom penisa te bi opisali promjene vezane za seksualne aktivnosti. (26)

Prema 16S rRNA analizi, najdominantnija koljena čine *Proteobacteria* i *Firmicutes*, potom koljena *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* (27). Pritom je potrebno obratiti pozornost kako obrezivanje utječe na promjene u sastavu mikrobiota. Autori su ukupno identificirali 42 bakterijske porodice coronal sulcus analizom, od kojih su

najbrojnije bile *Pseudomonadaceae* i *Oxalobactericeae,* bez obzira na status obrezivanja. Prije obrezivanja, najdominantnije porodice čine *Pseudomonadaceae*, porodica *Clostridiales* Incertae Sedis XI te *Prevotellaceae*, dok su *Fusobacteriaceae*, *Bifidobacteraciaceae*, ili *Staphylococcaceae* dominirale u pojedinim uzorcima. Obrezivanje muškaraca dovelo je do značajnih promjena u mikrobiotama sa značajnim smanjenjem brojnosti anaerobnih bakterijskih porodica, poput porodica *Clostridiales* XI te *Prevotellaceae,* koje su prethodno bile obilno prisutne u uzorcima neobrezanih muškaraca. Unutar prethodno navedenih porodica, identificirani su brojni anaerobni rodovi povezani s bakterijskom vaginozom, poput *Anaerococcus* spp., *Finegoldia* spp., *Peptoniphilus* spp., i *Prevotella* spp. Nakon obrezivanja, dominantne porodice su bile *Pseudomonadaceae*, *Corynebactericeae* i *Staphylococcaceae* (27).

Struktura i kompozicija GIT mikrobiota reflektirana je prirodnom selekcijom na razini mikroorganizam-nositelj te potiče simbiozu i funkcionalnu stabilnost. Iako su bakterije dominantne, arheje i eukarije su također prisutne. Upravo zbog brojčane nadmoći bakterija u GIT-mikrobiotama, u ovom radu će naglasak biti na njihovom utjecaju (28).

Kiselina, žuć i izlučevine pankreasa donekle onemogućavaju kolonizaciju želuca i proksimanog tankog crijeva. Međutim, bakterijska gustoća se povećava u distalnom tankom crijevu i dostiže svoj maksimum u debelom crijevu (28).

U usnoj šupljini, na većini staništa dominiraju rodovi *Streptococcus*, potom *Haemophilus* u bukalnoj sluznici, *Actinomyces* u supragingivnom plaku te *Prevotella* u subgingivnom plaku koji je siromašniji kisikom (29).

Tanko crijevo većinom sadrži streptokoke i varijabilan broj bakerija rodova *Clostridium* i *Veillonella.* Za razliku od kolona, bakterijski sastav tankog crijeva pokazuje temporalne fluktuacije, s razlikom u jutarnjem i večernjem profilu. Ovakva dinamika posljedica je unosa prehrambenih namirnica i varira između pojedinaca ovisno o njihovim prehrambenim navikama (21).

Prema 16S rRNA analizi, mikrobiote debelog crijeva čine dva dominantna koljena- *Firmicutes* i *Bacteroidetes.* Slijedeće najbrojnije koljeno jest *Actinobacteria* i to većinski rod *Bifidobacterium* (21).

3.2.2. Alati u proučavanju ljudske mikrobiote

Razumijevanje sastava i funkcionalnog kapaciteta GIT mikrobioma predstavlja velik izazov. Međutim, područje istraživanja se širi te se razvijaju nove tehnike za proučavanje mikrobioma.

Naše razumijevanje sastava mikrobnih zajednica u ljudi ima uporište ponajviše u istraživanjima temeljenim na kultivaciji različitih populacija mikroorganizama. Budući da većina bakterijskih vrsta nije pogodna za kultivaciju u laboratorijskim uvjetima, točno poznavanje odnosa između domaćina i mikroorganizama djelomično je ograničeno (30). Primjerice, samo 10-50% GIT bakterija je moguće kutivirati (iz čega proizlazi popularnost *Escherichia coli* vrste) jer rast većine mikroorganizama ovisi o specifičnom mikrookolišu kojeg nije moguće eksperimentalno reproducirati (6, 29). Laboratorijska kultivacija bez sumnje je metoda od neprocjenjive važnosti za potpuni uvid u fiziologiju i fenotipska obilježja organizama; ipak, široko obuhvatne studije s pomoću kojih bi se procijenile interpersonalne i intrapersonalne varijacije u sastavu mikrobnih zajednica ili dali odgovori na složena epidemiološka pitanja zahtijevaju drugačiji pristup. Tu se ponajprije misli na metode kojima se relativno brzo mogu dobiti detaljne, kvalitetne i prethodno nepoznate informacije o mikrobnoj raznolikosti (30).

Razvoj DNA sekvencirajuće tehnologije je stvorio novo polje istraživanja, metagenomiku, omogućujući ispitivanje i razumijevanje mikrobnih zajednica bez potrebe njihovog kultiviranja. Umjesto ispitivanja genoma kao inidividualnog, primjerice, bakterijskog soja kojeg uzgajamo u laboratoriju, metagenomika ispituje kolekciju genoma deriviranih iz mikrobnih zajednica koje su uzorkovane u prirodnom staništu/okolišu (31).

Revoluciju u proučavanju mikrobioma predstavljaju metode DNA sekvenciranja, pri čemu se koristi 16S rRNA gen kao meta zbog svoje prisutnosti u svim prokariotima (31).

Iako 16S rRNA analiza daje odlične podatke vezano za sastav mikrobiote, iz nje nije moguće dobiti informaciju o funkciji zajednice. Metagenomske studije (*shotgun sequencing*) omogućuju potpunu karakterizaciju genetskog sadržaja zajednice, uključujući funkcionalni kapacitet. Za određivanje specifične mikrobne aktivnosti koriste se specifične analize genske ekspresije (metatranskriptomika), proteinskih produkata (metaproteomika) te metaboličkih profila (metabolomika) (28, 31).

3.2.3. Razvoj ljudske mikrobiote

Mikrobiote su sastavljene od značajnog broja različitih bakterija, otprilike 160 vrsta po osobi po fekalnom uzorku (prema *deep shotgun sequencing* tehnici; prema 16S rRNA tehnikama, ovaj broj je nekoliko puta veći) te ovaj ekosustav ima značajnu ulogu u ljudskom zdravlju (21).

Mikrobna kolonizacija gastrointestinalnog sustava novorođenčeta igra važnu ulogu u imunološkim i metaboličkim putevima. Remećenje ovog kompleksnog procesa kolonizacije je ukazalo na porast u osjetljivosti na bolesti tijekom života (21).

3.2.3.1. Mikrobna kolonizacija GIT-a novorođenčeta

Kolonizacija GIT-a mikroorganizmima je esencijalni proces u našem životnom ciklusu zbog interakcija mikrobiota-nositelj koje imaju važan utjecaj na ljudsko zdravlje i bolest (21). Nakon Tisserove studije (32) koja objašnjava nastanak GIT-mikrobiote novorođenčeta, bila je opće prihvaćena ideja o sterilnosti fetusa in utero i početku mikrobne kolonizacije tijekom i nakon poroda (doticajem s vaginalnom mikrobiotom majke). I danas se smatra kako placentarna barijera čuva sterilnost fetusa u zdravoj trudnoći te se na prisutnost bakterija u uterusu gleda kao na potencijalnu prijetnju na razvoj trudnoće. Ova hipoteza počiva na činjenici da je mikrobiološka analiza amnionske tekućine, mekonija i korioamniona provođena samo u slučajevima sumnje ili dokaza na intrauterinu infekciju (21). Također, nekoliko studija je pokazalo jaku korelaciju između intrauterinih infekcija i preranog poroda (33, 34). Usprkos tome istraživanja o potencijalu bakterijske transmisije preko placentarne barijere su detektirala prisustvo bakterija u placentarnom tkivu (35), pupčanoj vrpci (36), amnionskoj tekućini (37) i fetalnim membranama (37, 38) zdrave novorođenčadi bez ikakvih indikacija infekcije ili upale.

3.2.3.2. Prenatalni mikrobni kontakt

Mekonij nije sterilan kako se prije smatralo, nego sadrži kompleksnu mikrobnu zajednicu (21). Različite su studije dokazale prisustvo mikrobiote mekonija (38; 39): mekonij novorođenčadi sadrži specifičnu mikrobiotu koja se razlikuje od uzoraka dobivenih fecesom te novorođenčadi. Primjerice, *Firmicutes* je glavno koljeno (*phylum*) detektirano u mekoniju dok je *Proteobacteria* bio prisutan u fecesu (38). 16S rRNA gen baziranom *microarray* analizom je pokazana visoka prevalencija bakterija srodnih sa *Streptococcus mitis* i *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) vrstama u uzorku mekonija, dok nasuprot tomu u fecesu su detektirane bakterije srodne *E. coli*, *Enterococcus* rodu i *Klebsiella pneumoniae* vrsti (38). Druga studija (39) je pokazala da mikrobiota mekonija nije podložna utjecaju vrste poroda (vaginalni vs. carski rez) te je u usporedbi s fecesom odrasle osobe imala puno manju raznolikost i veću varijaciju od uzorka do uzorka.

Dogma da fetus boravi u sterilnom okruženju je poljuljana prethodno navedenim saznanjima te se postavlja pitanje utjecaja mikroorganizama koji koloniziraju fetus na ishod poroda i budući zdravstveni status čovjeka (38). Tako se primjerice pokazalo da neki organizmi koji koloniziraju placentu (*Prevotella*, *Gardnerella,* anaerobne bakterije rodova *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, i genitalnih *Mycoplasma*) mogu provocirati inflamatorne procese u novorođenčeta, dok *Lactobacillus* rod nasuprot tomu suprimira takav odgovor organizma (39, 40).

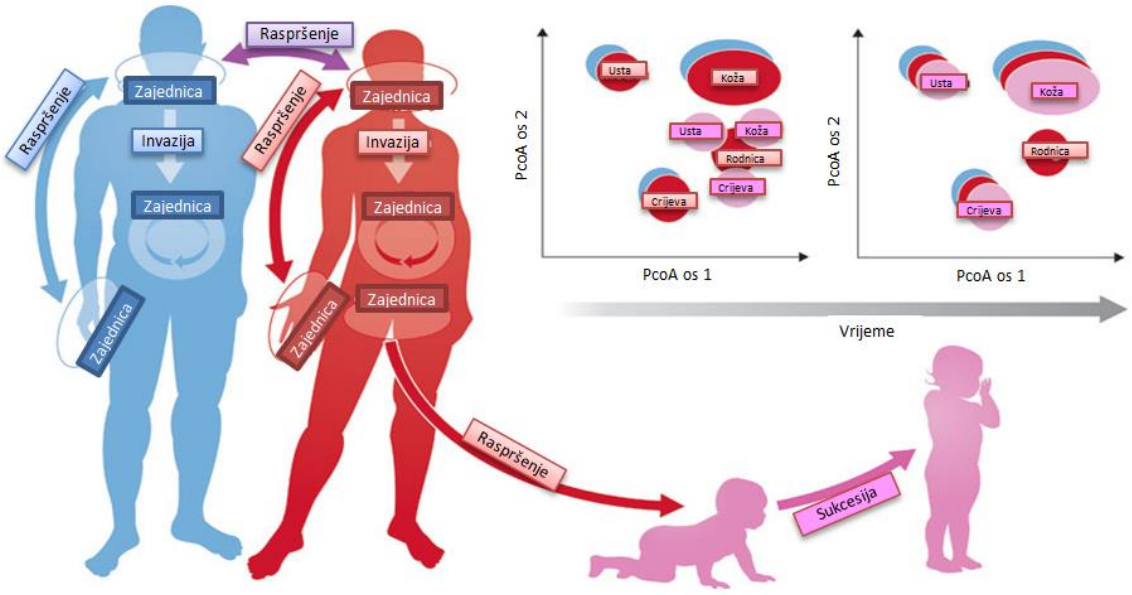
Još uvijek se jako malo zna o identitetu i broju mikroorganizama koji prolaze placentu i koloniziraju fetus in utero te o kratkoročnim i dugoročnim posljedicama koje imaju na homeostazu.

3.2.3.3. Proces mikrobne kolonizacije novorođenčeta

Mikrobni kontakt tijekom prenatalnog života može služiti kao priprema mikrobiotama fetusa i njegovom imunološkom sustavu za izlaganje puno većem inokulumu koji se transferira tijekom vaginalnog poroda i dojenja (21). Visoka raznolikost bakterija kolonizira dijete koje je izloženo postnatalnom okruženju - što se reflektira kao visoka interindividualna raznolikost u sastavu GIT-mikrobiota novorođenčadi (21, 41).

Poslije poroda, ljudsko je crijevo kolonizirano nizom mikroorganizama na koji utječu čimbenici poput gestacijske dobi, tipa poroda (vaginalni vs. carski rez), prehrane (majčno mlijeko vs. nadomjesno mlijeko), higijene te antibiotske terapije (42).

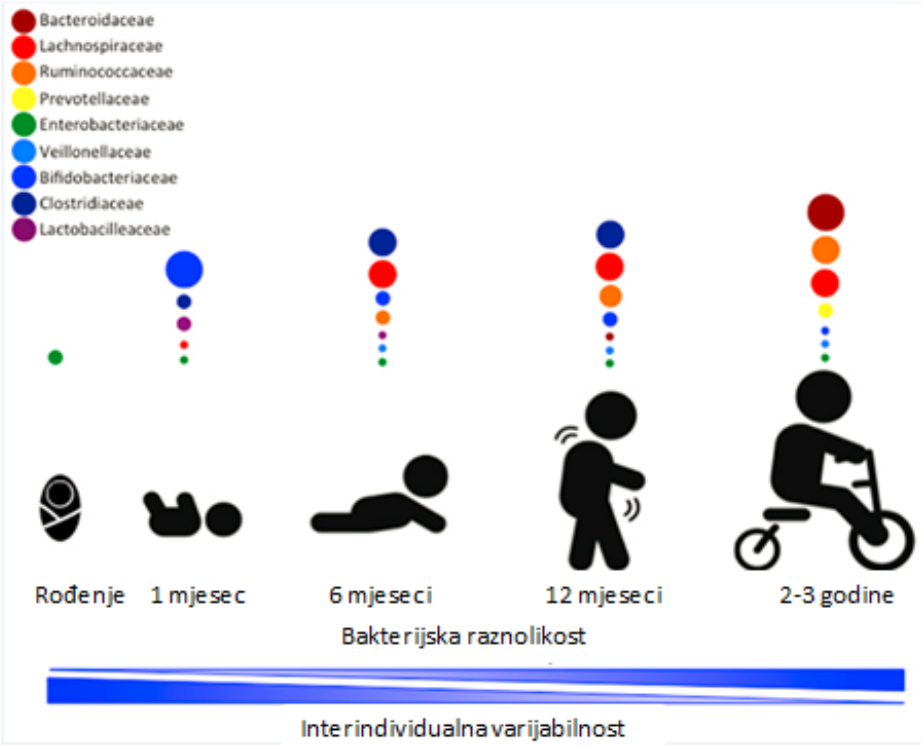
Mikrobna kolonizacija započinje porodom i napuštanjem uterusa. Inicijalna mikrobna zajednica se sastoji od organizama kojima smo izravno izloženi: za djecu rođenu vaginalnim porodom, majčina vagina služi kao izvor inicijalno kolonizirajućih bakterija, a za djecu rođenu carskim rezom, ruke koje dodiruju dijete (mikrobiote kože) su dominantni izvor (43).



Slika 6. Prikaz prijenosa mikrobiote.
Strelice pokazuju način na koji se mikroorganizmi premještaju, koloniziraju i prenose na različita staništa na ljudskom tijelu. Primjerice kontakt s drugom osobom prenosi mikrobne zajednice s osobe na osobu te vaginalni porod prenosi mikrobnu zajednicu vagine na novorođenče.
PCoA- od eng. *Principal Coordinates Analysis*. Prilagođeno prema (44).

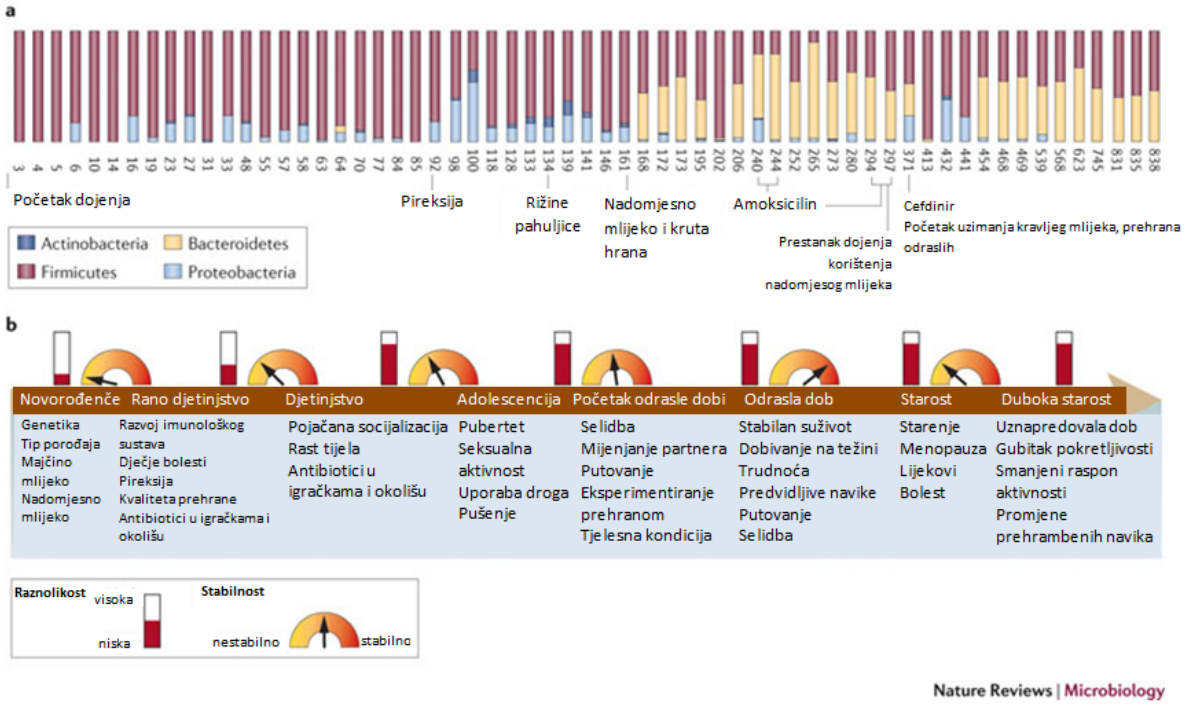
Prvi organizmi koji koloniziraju ljudsko tijelo su fakultativni anaerobi koji stvaraju okoliš koji potiče kolonizaciju striktnih anaeroba poput *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. i *Bifidobacterium* spp. Intestinalna mikrobiota novorođenčeta je karakterizirana niskom raznolikošću koja se povećava kao funkcija vremena i relativnom dominacijom koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (2, 6).

Uvođenje krute hrane u prehranu djeteta utječe na relativnu zastupljenost pojedinih bakterijskih vrsta u GIT-u te dovodi do razvoja mikrobiote slične onoj odrasle osobe (43).



Slika 7. Razvoj dječje mikrobiote.
Mikrobiota novorođenčeta je nerazvijena i jednostavna, potječući od vaginalnih i fekalnih mikrobiota majke ili pak kožnih mikrobiota, ovisno o načinu poroda. Izlaganjem djeteta okolišnim čimbenicima, majčinom mlijeku/nadomjesnom mlijeku, kontaktu s drugima i s okolišem, dijete prikuplja mikrobne zajednice i njegov se mikrobiom razvija i dobiva na raznolikosti. S vremenom bakterijska raznolikost raste dok se interindividualna varijabilnost mikrobioma smanjuje sazrijevanjem mikrobiote. Prilagođeno prema (45).

Mikrobiota postaje raznolikija razvojem dominacije koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* kako vrijeme nakon poroda prolazi (6). Pri kraju prve godine života, dijete posjeduje individualni mikrobiološki profil, vrlo sličan karakteristikama mikrobiota odrasle osobe, koji postiže sa 2 do 5 godina starosti (46). Zbog tog razloga prve tri godine života predstavljaju kritičan period za sazrijevanje intestinalnih mikrobiota.

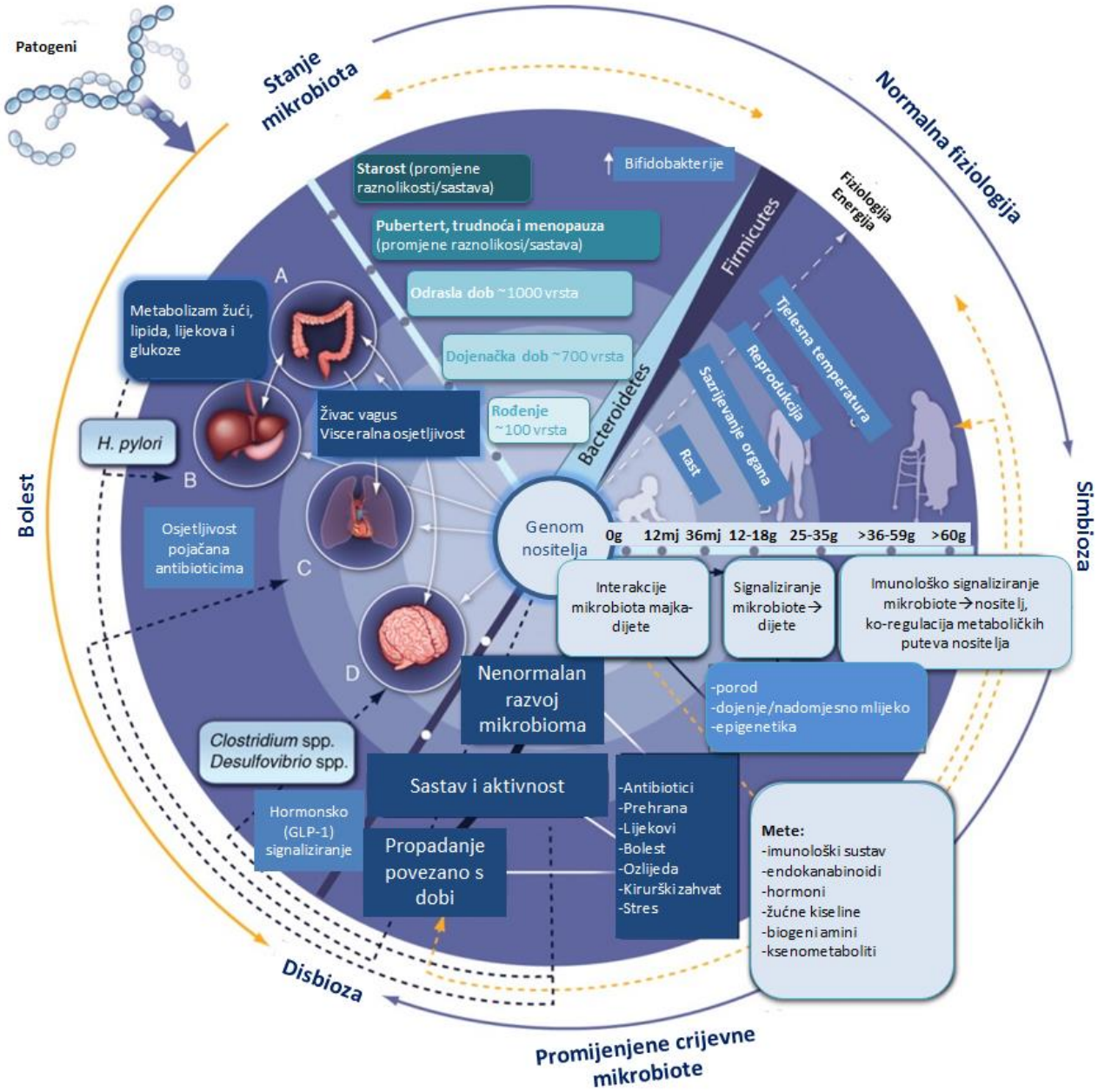


Slika 8. Sazrijevanje mikrobiote.
Ljudsko biće započinje život s uglavnom sterilnim GIT-om i započinje s prikupljanjem mikroorganizama tijekom i nakon poroda. Iz tog razloga, novorođenčad ima nisku mikrobnu raznolikost. GIT-mikrobiote se mogu drastično promijeniti iz dana u dan kako djeca dolaze u kontakt s novim osobama, hranom i tako prikupiti više mikroorganizama. Otprilike u prvoj godini života, mikrobne su zajednice raznolikije od onih po rođenju i nastavljaju se razvijati s uvođenjem krute hrane i dječjim istraživanjem okoline. Naša mikrobna zajednica postaje sve raznolikija i stabilnija kako odrastamo. Kada dosegnemo odraslu dob, naše mikrobne zajednice su kompleksne i ostaju takvima ostatak našeg života. Ipak studije su pokazale kako u starosti naše mikrobiote gube stabilnost u usporedbi s mlađom dobi. Sastav GIT-mikrobiota ponovno postaje varijabilan iz dana u dan i tjedna u tjedan. Prilagođeno prema (43).

3.2.4. Čimbenici koji utječu na razvoj mikrobiota

Na razvoj, interindividualnu varijabilnost i raznolikost mikrobiota utječu brojni čimbenici poput vrste poroda, tipa prehrane, antibiotske terapije, genetike, okolišnih čimbenika, starosti.

Dinamičnost mikrobioma (opisana kao vremenski ovisna funkcija brojnosti mikrobnih vrsta prisutnih na određenom dijelu tijela) objašnjavaju parametri poput brzine rasta (mikroorganizama) te intraspecijskih i interspecijskih interakcija. Ti parametri općenito ovise o čimbenicima neovisnim o nositelju (poput biokemijskih procesa i metaboličkih puteva mikroorganizama) te čimbenicima specifičnim za nositelja - čovjeka, u slučaju ljudskog mikrobioma (poput unosa nutrijenata, genetike nositelja i dr.) (47).



Slika 9. Utjecaj brojnih čimbenika na razvoj i eubiozu mikrobiota.
Način poroda, prehrana, životne navike, okoliš i izlaganje antibioticima samo su neki od čimbenika koji utječu na razvoj našeg mikrobioma. Prilagođeno prema (48).

3.2.4.1. Porod

Prvi postnatalni kontakt s mikroorganizmima se zbiva nedugo nakon poroda. Ovisno o tipu poroda, novorođenče će biti ili kolonizirano s majčinim vaginalnim i fekalnim bakterijama (vaginalni porod) poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterim* spp. ili u djece rođene carskim rezom prvi kontakt s mikroorganizmima predstavlja medicinsko osoblje i prijenos preko ruku (kožne mikrobiote medicinskog osoblja). Djeca rođena carskim rezom radi bolničkih uvjeta nisu direktno izlagana majčinim mikroorganizmima (49).

Tijekom vaginalnog poroda transmisija vaginalnih, ali i fekalnih mikrobiota s majke na dijete je ekstenzivna. Vaginalna mikrobiota je vrlo niskog stupnja raznolikosti sastojeći se većinom od laktobacila. Tijekom prvih nekoliko dana života, GIT-mikrobiota djeteta ima visoki udio laktobacila, reflektirajući majčinu vaginalnu mikrobiotu (41). Fakultativni anaerobi porodice *Enterobacteriaceae* su jedne od bakterijskih vrsta koje se najvjerojatnije prenose fekalnom transmisijom s majke na dijete (50).

Poznato je da tip poroda (carski rez) može značajno utjecati na razvoj GIT-mikrobiota djeteta zbog izbjegavanja izlaganju vaginalnoj i fekalnoj transmisiji. Carski rez dovodi do slabije i odgođene kolonizacije *Bifidobacterium* spp. i *Bacteroides* spp. (pokazano kao slabiji stupanj izolacije i niža incidencija tih vrsta u uzorku). To kao posljedicu dovodi i do smanjenja raznolikosti mikrobiote koja se razvija nakon carskog reza, u usporedbi s vaginalnim porodom (51).

Drugi važni izvor kolonizirajuće mikrobiote jest kontakt s majčinom kožom čime se postiže kolonizacija *Staphylococcus* spp. (52).

3.2.4.2. Prehrana

Vrlo važan utjecaj na razvoj ljudskih mikrobiota ima prehrana, počevši od majčinog mlijeka (ili nadomjesnog mlijeka) sve do prehrambenih navika kasnije u životu.

Bakterije u majčinom mlijeku predstavljaju značajan izvor bakterija u kolonizaciji GIT-a te ovaj put kolonizacije predstavlja značajan utjecaj na djetetov zdravstveni status. Mikrobiota majčinog mlijeka sadrži preko 700 bakterijskih vrsta, većinom streptokoke i stafilokoke koji među prvima koloniziraju GIT novorođenčeta te brojne kompleksne oligosaharide koji obavljaju funkciju prebiotika, stimulirajući rast stafilokoka i bifidobakterija (53).

Raznolikost GIT-mikrobiota raste uvođenjem krute prehrane (izlaganjem novim mikroorganizmima) što je praćeno kolonizacijom *Bacteroides* i *Clostridium* spp. (53).

Prehrambene navike utječu na raznolikost mikrobiota kroz čitav život (54). Zapadnjačka vrsta prehrane rezultira značajno različitim mikrobiotama u usporedbi sa

sastavom mikroorganizama subjekata koji žive u ruralnim sredinama (55) što se očitava manjom raznolikošću i brojnošću bakterijskih vrsta.

3.2.4.3. Antibiotici

Antibiotici mogu imati dugoročni utjecaj na raznolikost mikrobiota te posljedično utjecaj na zdravlje. U nedonošćadi, mikrobiote su karakterizirane sniženom raznolikošću, nižim brojem *Bifidobacterium* i *Bacteroides* rodova te višom razinom potencijalno patogenih bakterija u usporedbi s novorođenčadi (56).

Čak i kratkotrajno izlaganje antibiotskoj terapiji može značajno poremetiti kolonizaciju GIT-a primjerice *Bifidobacterium* rodom dok će takva terapija pogodovati razmnožavanju proteobakterija (55).

Više u Poglavlju 3.4.3: Modulacija mikrobiote antimikrobnim lijekovima.

3.2.4.4. Okoliš i životni stil

Geografska lokacija također igra ulogu u formiranju mikrobiote: razlike u mikrobiotama su povezane s prehrambenim navikama i životnim stilom kakakterističnim za pojedinu lokaciju (grad, selo, religija itd.). U Europi je uočen je takozvani „geografski gradijent" u mikrobiotama djece, gdje djeca južnih krajeva imaju više zastupljene *Bifidobacterium* spp. te manje *Clostridium* spp. i *Atopobium* spp., dok nasuprot tomu djeca sjevernih krajeva imaju više zastupljene *Eubacterium*, *Lactobacillus* i *Bacteroides* rodove (56).

Članovi obitelji su također prepoznati kao bitan okolišni čimbenik u kolonizaciji ljudskog oganizma. Pokazato je da braća i sestre, za razliku od jedinaca, imaju veću zastupljenost *Bifidobacterium* spp. (57).

3.2.4.5. Genetika

Genotip nositelja utječe na strukturu GIT-mikrobiota te mutacija samo jednog gena može dovesti do promjena u sastavu (21, 58).

3.2.4.6. Glikozilacija mucina

Mucinska ovojnica štiti epitel crijeva i formira anatomsko mjesto kontakta mikrobiota-nositelj. Uz funkcije zaštite, lubrikacije te hidracije intestinalnog epitela,

mukus (sluz) igra bitnu ulogu u održavanju intestinalne homeostaze promovirajući mikrobne interakcije s komenzalnim bakterijama, povisujući imunološku reakciju te djelujući kao „mamac“ za patogene (59). Vrčaste stanice (eng. *goblet cell*) su te koje proizvode mucin.

Debljina, sastav, organizacija i uzorak glikozilacije mukusa duž GIT-a korelira s interakcijama pojedinih mikrobnih zajednica s površinom mukusa (60).

Sposobnost mikroorganizama da se poveže s mukusom povećava njihove kolonizacijske mogućnosti te produljuje obitavanje korisnih mikroorganizama (61). Štoviše, bakterijska adhezija na mucinske glikane moguć je mehanizam kako nositelj „bira“ bakterijske vrste koje prezentiraju komplementarni set adhezina (62).

3.2.5. Sastav i stabilnost mikrobiota odraslih

Zdrava odrasla osoba ima određenu mikrobnu raznolikost koja igra ulogu u održavanju imunološke homeostaze. Primjerice, pokazana je povezanost promjene mikrobiota i bolesti probavnog sustava (63).

Bitno je naglasiti da se sastav mikrobiota GIT-a prikazuje kroz fekalni uzorak koje relativno dobro prikazuje zastupljenost određenih mikroorganizama, ali ne reflektira u potpunosti raznolikost GIT-a.

GIT-mikrobiote debelog crijeva se sastoje od koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (5, 41). Slijedeće najbrojnije koljeno je ono *Actinobacteria,* s *Bifidobacterium* rodom kao predstavnikom (16S rRNA sekvenciranje). Također, kada se mikrobiote debelog crijeva u potpunosti razviju, ona ostaju stabilne značajni period (64). Ova je studija pratila mikrobiote 37 zdravih odraslih i pokazala nakon 5 godina praćenja, prisustvo 60% sojeva određenih na početku. Sojevi su tijekom vremena bili stabilni unutar pojedinca te unutar obitelji istog, stoga se smatra da sojevi koje dobijemo od obitelji imaju potencijal utjecanja na metabolizam, fiziologiju i imunološki sustav većinu našeg života (64).

GIT-mikrobiote tankog crijeva pak u svom sastavu većinski sadrže streptokoke i rodove *Clostridium* i *Veillonella* (65, 66). Za razliku od mikrobiota debelog crijeva, tanko crijevo pokazuje vremensku fluktuaciju u bakterijskom sastavu: jutarnji i popodnevni

sastav mikrobiota je značajno različit. Djelomičan utjecaj na ovu fluktuaciju imaju prehrambene navike koje dovode do velike raznolikosti među pojedincima u sastavu mikrobiota (67).

Ovdje je potrebno naglasiti kako sastav i stabilnost mikrobioma možemo svjesno modulirati u korist čovjeka kao nositelja, tj. modulirati temporalno-spacijalne osobine u korist čovjeka (više u Poglavlju 3.4: MODULACIJA MIKROBIOTE). Temporalne osobine najčešće se prikazuju kao promjena alfa- i beta-raznolikosti u funkciji vremena (primjerice dana) dok spacijalne osobine predstavljaju distribuciju mikroorganizama (bakterija) kroz određene tjelesne lokacije (primjerice crijeva ili koža) (7, 8).

3.2.6. Mikrobiota osoba starije životne dobi

Mikrobiom starije populacije (>65 godina starosti) pokazuje veće interindividualne varijacije u usporedbi sa zdravom odraslom populacijom (68). Ta studija je također uočila povezanost GIT-mikrobiota s prehranom, te životom u zajednici (obitelj, dom za starije osobe). Starije osobe imaju različitu i manju raznolikost mikrobiota u usporedbi s mlađom populacijom (69). Velika grupa volontera starijih od 100 godina imala je povišene fakultativne anaerobe proput proteobakterija i bacila, te snižene *Faecalibacterium prauznitzii* i *Clostridium* klastera *XIVa*. Također njihove mikrobiote su imale snižene razine *Bacteroides* i *Bifidobacterium* rodova te porodice *Enterobacteriaceae*, dok su *Clostridium* spp. razine su bile povišene u usporedbi s odraslom populacijom (70).

Trenutno još nije poznat razlog uočenih promjena u sastavu mikrobiota starijih, te je proučavanje istih bio fokus mnogih studija. Studije poput ELDERMET-a imaju za cilj karakterizaciju mikrobiota populacije koja je na pragu starosti čime se želi pratiti i odrediti čimbenike koji utječu na mikrobiote prilikom starenja. Te promjene mogu biti povezane s propadanjem općeg zdravstvenog stanja, a ovakve studije nam mogu omogućiti kako manipulacijom mikrobiota možemo poboljšati zdravstveni status starijih. ELDERMET (akronim od eng. *Gut Microbiota as an indicator and agent of nutritional health in elderly Irish subjects*) konzorcij osnovan je 2007. godine pod pokroviteljstvom vlade Republike Irske s ciljem istraživanja uloge intestinalnih mikrobiota u starijih irskih subjekata. U početnom stadiju ELDERMET projekta, cilj je

istražiti sastav mikrobiota u nekoliko stotina starijih subjekata od kojih su prikupljeni detaljni podaci o kliničkom i zdravstevom statusu te njihovim prehrambenim navikama. Ovi podaci će potom služiti u identifikaciji pojedinaca i kohorti za sekvenciranje fekalnog mikrobioma metodom „sačmarice“ (od eng. *shotgun*) kojim bi se istražila poveznica između mikrobioma i zdravstvenog stanja (71).

3.2.7. Funkcija mikrobiota

Intestinalne mikrobiote zdravog pojedinca ispoljavaju niz pozitivnih učinaka na zdravlje: zaštita od patogena, nutricije, metabolizma te imune modulacije (28; 72).

Povijesne, analize osnovane na proučavanju bakterijskih kultura (uzgoj u laboratorijskim uvjetima) su pokazale kako zdrava odrasla osoba dijeli uobičajene bakterijske vrste s većinom zdrave populacije. Nasuprot tome, zahvaljujući novim tehnologijama i novom pristupu u analizi mikrobiota (analiza neovisna o kultiviranju), pokazana je velika interindividualna mikrobna raznolikost sa samo malim filogenetičkim preklapanjem među pojedincima (29).

Enteričke bakterije stvaraju prirodnu obrambenu barijeru i ispoljavaju brojne protektivne, strukturne i metaboličke promjene na epitelu (28) o čemu će više govora biti u idućim poglavljima.

Intestinalne mikrobiote imaju metaboličku aktivnost koja ima svojstvo adaptacije i obnove (73). Kroz produkciju kratko lančanih masnih kiselina, bakterije pozitivno utječu na diferencijaciju i proliferaciju intestinalnog epitela (74). Ta kompleksna metabolička aktivnost služi kao važan izvor energije i supstrata za nositelja te također pospješuje bakterijski rast.

Komenzalne bakterije također imaju utjecaj na razvoj humoralnih komponenti probavnog mukozalnog imunološkog sustava (75) te moduliraju T-stanični odgovor (74, 76). Iz ovog je moguće zaključiti kako sastav mikrobiota može utjecati na individualne varijacije u imunološkom odgovoru. Više u Poglavlju 3.2.7.1: Imunološki sustav.

Crijevno-moždana os (od eng. *gut-brain axis*, GBA) se sastoji od dvosmjerne komunikacije između centralnog i enteričkog živčanog sustava, povezujući emotivne i

kognitivne centre u mozgu s perifernim intestinalnim funkcijama. Nedavna istraživanja u tom polju impliciraju važnost interakcije GIT-mikrobiota i GBA. Interakcija mikrobiota i GBA se čini dvosmjernom, signaliziranjem GIT-mikrobiota prema mozgu i od mozga prema GIT-mikrobiotama pomoću neuralnih, endokrinih, imunoloških i humoralnih signalnih puteva (77). Više u Poglavlju 3.2.7.2: Crijevno-moždana os.

Probavni sustav sadržava korisne i bakterije koje mogu biti potencijalno štetne za nositelja. U normalnim uvijetima, postoji dvosmjerna komunikacija između nositelja i mikrobiota, što rezultira homeostazom čime crijeva ostaju zdrava te nema preraštanja patogenih bakterija. Mikrobiote ispoljavaju komenzalnu vezu s nositeljem: bakterije uspjevaju u bogatom okolišu crijeva, a nositelj uživa u koristima od brojnih funkcija bakterija (77).

Homeostaza mikrobiote i nositelja pogoduje nositelju, no ako dođe do promjene u sastavu mikrobiota, to dovodi do drastične neravnoteže između korisnih i potencijalno patogenih bakterija, te probavni sustav (crijeva) postaje osjetljiv na napad patogena kao posljedica promjene u mikrobiotama. Ova neravnoteža se naziva disbiozom, koju dalje možemo definirati kao poremećaj u homeostazi (eubiozi) mikrobiote zbog neravnoteže same mikrobiote, promjena u funkcionalnom sastavu i metaboličkim aktivnostima, ili promjeni u lokalnoj distribuciji (78). Eubiozu definiramo kao ravnotežno stanje mikrobnog ekosustava (20).

Generalno, disbiozu možemo kategorizirati u tri različite skupine (78):

1) gubitak korisnih mikroorganizama
2) pretjeran rast potencijalno štetnih mikroorganizama
3) gubitak mikrobne raznolikosti.

Uočeno je da se ova tri tipa često istovremeno ispoljavaju (78). Kasnije u ovom radu će biti riječi o bolestima gdje je uočena disbioza: upalne bolesti crijeva, pretilost, alergije, diabetes mellitus, autizam, kolorektalni karcinom i druge.

3.2.7.1. Imunološki sustav

Upotreba gnotobiotičkih akseničnih pokusnih životinja (od eng. *germ-free, GF animal*) omogućila je razvoj koncepta utjecaja mikrobiote na imunološki sustav. Davne 1885. godine, Louis Pasteur prvi je predložio ugzoj životinja bez mikroorganizama s ciljem boljeg razumijevanja veze mikroorganizama i njihovog nositelja (79).

Prva usporedba akseničnih glodavaca i „mikrobiotom koloniziranih životinja" rezultirala je uočavanjem značajnih fizioloških razlika između GF i SPF (od eng. *specific pathogen-free*) životinja koloniziranih specifičnom mikrobiotom slobodnom od patogena, poput uvećanog cekuma (zbog akumulacije nerazgrađenog mukusa), smanjenog gastrointestinalnog motiliteta (gubitak kritične funkcije razgradnje hrane mikrobiote), specifične morfologije intestinalnih epitelnih stanice koje imaju dulje vile i kraće kripte te sintetiziraju manji broj antimikrobnih peptida. Najvažnije, nedostatak komenzala ima dubok utjecaj na strukturni i funkcionalni razvoj unutar slezene, timusa i limfnih čvorova. Štoviše, te strukturne razlike su najuočljivije na mukoznoj površini što sugerira da interakcija specifičnih zajednica mikroorganizama s nositeljom direktno modulira razvoj limfnog tkiva pridruženog sluznici probavne cijevi-GALT (od engl. *gut associated lymphoid tissue*). Primjerice, tip limfoidnog tkiva znan kao izolirani limfoidni folikuli (ILF) su prisutni u minimalnom broju u odsustvu mikrobiota u tankom crijevu, ali ne i kolonu. Također, GF životinje imaju manje Peyerove ploče i mezenterične limfne čvoreve. Sve te razlike upućuju na sudjelovanje mikrobiota u sazrijevanju imunološkog sustava i sugeriraju važnost mikrobne kolonizacije u razvoju normalnog imunološkog sustava zdravog pojedinca (79).

Kolonizacija mukozne površine je karakterizirana fluktuirajućim promjenama u mikrobnoj raznolikosti tijekom prvih nekoliko godina života, sve do trenutka uspostavljanja ravnoteže koja ostaje relativno stabilna tijekom odrasle dobi u nedostatku okolišnih čimbenika. Obzirom na to, rano-životna mukozalna kolonizacija se dešava istodobno s razvojem i „učenjem" mukoznog imunološkog sustava. Iz priloženog se može zaključiti kako na sazrijevanje imunološkog sustava vjerojatno direktno ili indirektno utječe prisustvo komenzalnih mikroorganizama. Postnatalni period predstavlja potencijalno kritično vrijeme u kojemu mikrobno izlaganje ima utjecaj na morfološki i funkcionalni razvoj imunološkog sustava. Neonatalne imunološke stanice se

razlikuju po funkciji od odraslih tako da preferencijalno razvijaju toleranciju u odgovoru na izlaganje antigenu. Neonatalne imune stanice uče tolerirati novi okoliš kojem su izložene po rođenju, poput izlaganja komenzalnim mikrobiotama. Navedeni koncepti ispitani su na GF životinjama na način da se proučavala varijacija u vremenu izlaganja GF životinja mikrobiotama i pratile promjene u razvoju i funkciji imunološkog sustava (79).

Većina abnormalnosti u GF životinja je ovisna o dobi i može se ispraviti uvođenjem komenzala tijekom bilo koje dobi životinje, no mogućnost obnove staničnih oštećenja koja se dešavaju kao posljedica nedostatka mikrobiota je ograničena na kratko vremensko razdoblje ranog života i stoga jest ovisna o dobi. GF miševi izloženi mikrobioti tijekom odrasle dobi imaju drugačiji profil jejunuma i kolona u usporedbi s konvencionalno uzgojenim miševima (tzv. *specific pathogen-free, SPF mice*), što ukazuje da ako se kolonizacija ne dogodi tijekom kritičnog perioda, intestinalni imunološki razvoj se ne može ostvariti u potpunosti tijekom odrasle dobi. Ovo podupire hipotezu da rano izlaganje mikroorganizmima ima trajne posljedice na nositelja koje se prenose u odraslu dob. Dolje navedena saznanja opisana su u preglednom radu Gensollen i njegovih suradnika (79).

SUBPOPULACIJA T-LIMFOCITA

GF životinje pokazuju velike nedostatke u razvoju primarnih i sekundarnih limfoidnih organa – uključujući GALT, slezenu i timus – koji je povezan sa smanjenim brojem $CD4^+$ i $CD8^+$ intestinalnih T-staničnih subpopulacija kao i smanjenim brojem intraepitelnih limfocita koji izražavaju αβ T-stanični receptor (od eng. *T-cell receptor*, *TCR*). Normalizacija ovih morfoloških i celularnih nedostataka u αβ T-limfocitima se može postići uvođenjem standardne mišje ili ljudske mikrobiote u odraslog miša. GF miševi su tipično više orijentirani prema T_H2 odgovoru. Nakon monokolonizacije GF miševa s *Bacteroides fragilis* vrstom (*B. fragilis*) uočeno je balansiranje između sistemskih T_H1 i T_H2 stanica kao posljedica izlaganja bakterijskom polisaharidu A (PSA). U drugom primjeru, segmentirane filamentozne bakterije (SFB, *Candidatus* Savagella) igraju ključnu ulogu u intersticijalnom T_H-staničnom odgovoru i indukciji sekretornog imunoglobulina (Ig) A. Kolonizacija štakorskom mikrobiotom ili monokolonizacija s SFB-om, samo parcijano obnavlja $CD4^+$ i $CD8^+$ T-stanični broj, što sugerira da je potrebna raznolika mikrobna populacija za obnovu zrelog imunološkog sustava u odraslih miševa.

Određene bakterijske populacije su povezane s razvojem specifičnih T-efektorskih subpopulacija, poput T_H17 stanica, koje su snažan izvor interleukina (IL)-17 koji igra važnu ulogu u održavanju integriteta mukozne barijere i klirensu patogena iz tkiva. Razvoj T_H17 je ovisan o mikrobioti i izostaje iz tankog crijeva GF životinja. T_H17 stanice se mogu obnoviti u odraslih GF miševa kroz kolonizaciju standardom mišjom mikrobiotom ili SFB-om. Posljedično, SFB kolonizacija (GF životinje) daje veću zaštitu u usporedbi s GF životinjama nakon infekcije bakterijskim patogenom *Citrobacter rodentium,* što je direktni rezultat obogaćivanja tankog crijeva s T_H17 stanicama (79).

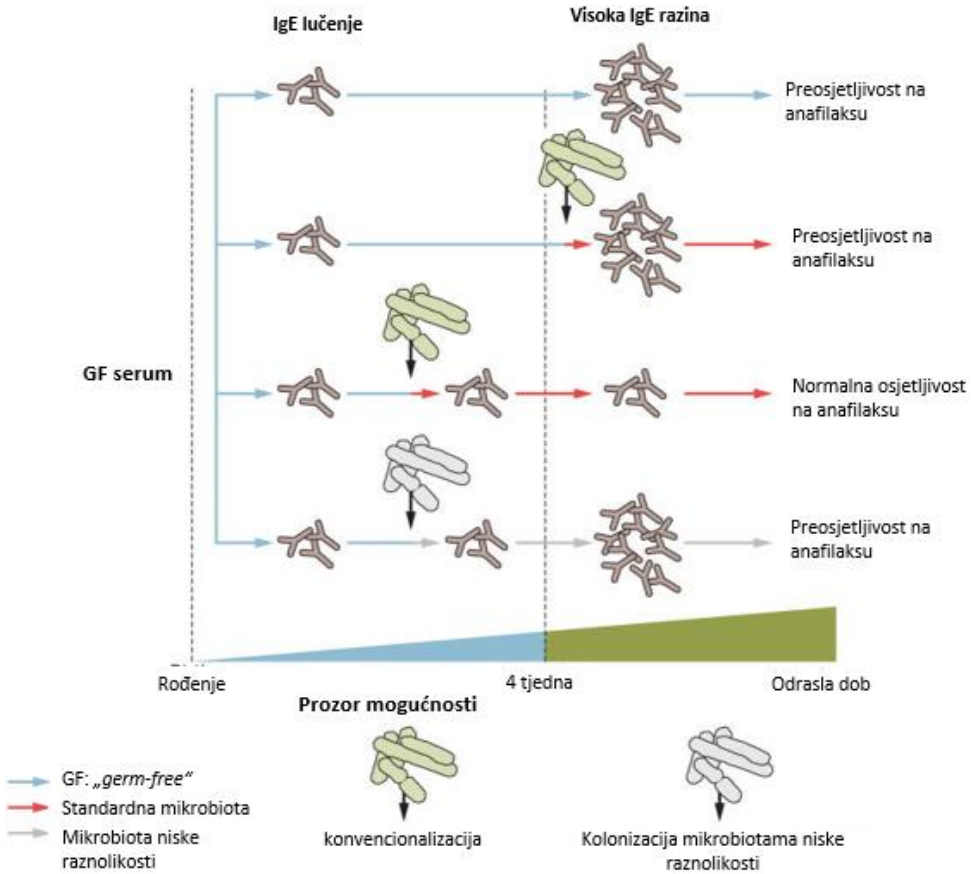
Regulatorne T stanice (T_{reg} stanice) su glavni izvor IL-10 i sposobne su prepoznati antigene komenzalnog podrijetla, što održava toleranciju prema intestinalnim mikroorganizmima. Kolon (no ne i tanko crijevo) GF miša sadržava smanjen broj T_{reg} stanica, što se može normalizirati standardnom kolonizacijom i monokolonizacijom s određenim *Clostridium* vrstama ili raznolikim intestinalnim mikroorganizmima, neovisno o dobi (79).

B-LIMFOCITI I IgE

B-limfociti su od esencijale važnosti imunološkom sustavu kao izvor pet izotipova funkcionalno različitih protutijela: IgA, IgE, IgG, IgD te IgM. GF miševi ispoljavaju normalan broj i fenotipsko sazrijevanje B-limfocita. Međutim, oni ispoljavaju generalne nedostatke u produkciji IgA i IgG1 protutijela u mukoznim i nemukoznim organima, što se može normalizirati kolonizacijom mikrobiotama. GF miševi posjeduju manji broj B-limfocita s IgA ekspresijom u tankom crijevu. Ovo smanjenje u IgA vjerojatno potječe od ILF deficijencije. Kolonizacija odraslog GF miša obnavlja ILF broj i povisuje B-staničnu IgA produkciju u tankom crijevu. Hipotetski, dendritične stanice (koje ne migriraju izvan intestinalnih tkiva i sadržavaju žive mikroorganizme kroz dulji vremenski period) omogućuju indukciju IgA ekspresije u crijevu odraslog miša (82).

IgE su protutijela koja produciraju B-limfociti i igraju značajnu ulogu u odgovoru na alergene i patogene. Dok je razina IgA i IgG snižena u GF miševa, nedavna je studija pokazala kako GF miševi imaju povišenu razinu serumskog IgE (produkcija u Peyerovim pločama i mezenteričnim limfnim čvorevima). Povišene razine IgE u GF životinja su

povezane s pretjeranim odgovorom na oralno induciranu anafilaksu. Visoke IgE serumske razine u GF miševa povezane su s konkomitantnim porastom produkcije IL u Peyerovim pločama i mezenteričkim limfnim čvorevima. Kolonizacija GF miševa standardnom mikrobiotom od rođenja sve do četvrtog tjedna starosti, ali ne i kasnije, normalizira IgE razine u odraslih miševa, što je konzistentno s regulacijom IgE produkcije od strane mikrobiote koja je specifična za ovo vremensko razdoblje (Slika 10). IgE produkcija u odraslih miševa je više ovisna o intestinalnoj bakterijskoj raznolikosti u novorođenih, nego ovisna o kolonizaciji specifičnim bakterijskim vrstama: niska raznolikost mikrobiota nije dovoljna da normalizira IgE razine tijekom ranog života (79).



Slika 10. Izlaganje mikrobioti tijekom ranog života regulira IgE serumske razine u odraslih miševa i njihovu osjetljivost na oralno induciranu anafilaksu.
IgE se nakuplja u serumu GF miševa četiri tjedna nakon rođenja zbog izotipskog prijelaza u IgE u mukoznim B stanicama. Visoke IgE razine dovode do pretjerane osjetljivosti na oralno induciranu anafilaksu koja se može otkloniti kolonizacijom sa standardnom mikrobiotom tijekom ranog života, no ne i kasnije. Kolonizacija GF miševa s mikrobiotom niske raznolikosti tijekom tog kratkog vremenskog razdoblja neće normalizirati visoke IgE razine u odrasloj dobi. Prilagođeno prema (79).

LIMFOIDNE STANICE URAĐENOG IMUNOLOŠKOG SUSTAVA

Urođene limfoidne stanice (od eng. *innate lymphoid cells*, ILCs) predstavljaju limfocite s funkcijom urođenog imunog odgovora kojima nedostaje B- ili T-stanični receptor, što znači da ne prezentiraju antigen-specifičan odgovor. U razumijevanju ILC-regulacije mikrobiotom postoje konfliktni rezultati. Prirodnoubilačke stanice (od eng. *natural killer*, NK) spadaju u ILC skupinu 1 i ispoljavaju smanjen fenotipski dokaz aktivacije u nemukoznim organima GF miševa, što je proces kojeg predvode mononuklearni fagociti na *toll-like* receptor (TLR)-ovisan način koji se može preokrenuti kolonizacijom odraslih miševa standardnom mikrobiotom. Također je pokazano da GF miševi pokazuju oslabljen razvoj $Nkp46^+$ RAR-srodni orfan receptor-γt (od eng. *related orphan receptor*, ROR)-ovisne skupine 3 ILC stanica i smanjenu ekspresiju IL-22 od tih stanica. IL-22 je važan citokin u epitelnom odgovoru na mikroorganizme u tankom crijevu. Nasuprot tome, drugo istraživanje je pokazalo kako GF miševi ne pokazuju promjene u broju $Nkp46^+$ RORγt–ovisnih ILC-ova i povišenu IL-22 ekspresiju zbog IEC produkcije IL-25 (79).

U svakom slučaju, disregulacija IL-22 ekspresije u GF miševa se može normalizirati kolonizacijom standardnom mikrobiotom u odraslog miša. Bez obzira na ove nekonzistentnosti, uočljivo je kako mikrobiota regulira ILC bez obzira na starost jedinke (79).

EPITELNE STANICE

Urođene epitelne stanice (od eng. *innate epithelial cells*, IEC) posreduju u komunikaciji između luminalne mikrobiote i imunološkog sustava mukoze. Jedna od njihovih funkcija jest produkcija antimikrobnih peptida. Jedan od takvih antimikrobnih peptida je i RegIIIγ: C-tip lektina koji regulira interakciju mikrobiote i nositelja svojom antibakterijskom aktivnošću na gram-pozitivne mikroorganizme (glavnina ekspresije je u Panethovim stanicama Lieberkuhnovih kripti u tankom crijevu). U GF miševa, IEC iskazuje smanjenu ekspresiju RegIIIγ što se može ispraviti kolonizacijom miša standardnom mikrobiotom ili monokolonizacijom s vrstom *Bacteroides thetaiotaomicron* u tankom crijevu i kolonu (79).

RegIIIγ ekspresija se također regulira IL-22 podrijetlom iz Nkp46+ RORγt–ovisnih ILC3. Molekula slična rezistinu β (od eng. *resistin-like molecule β,* RELMβ) je sekrecijski protein visoko eksprimiran u intestinalnom traktu i vrčastim stanicama. U GF miševa, RELMβ ekspresija u vrčastim stanicama je jako snižena u usporedbi sa SPF miševima, no može se ojačati kolonizacijom sa standardnom mikrobiotom. RELMβ može regulirati ekspresiju upalnih citokina kroz intestinalne makrofage tako da utječe na odgovor nositelja na umjetno inducirani kolitis. GF miševi ispoljavaju nižu ekspresiju glavnog sustava tkivne kompatibilnosti (od eng. *major histocompatibility complex*, MHC) klase II na IEC, što se isto može spasiti kolonizacijom mikrobiotom. Također je uočeno kako čimbenici mikrobnog podrijetla poput acetata iz *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) može pojačati protektivne funkcije IEC u odgovoru na infekciju. Novija saznanja upućuju na značajne promjene genske ekspresije povezano s IEC pri konvencionalizaciji GF odraslih miševa. U budućim studijama bilo bi interesantno ispitati dobnu ovisnost ovih odgovora i način na koji mijenjaju epitelnu ekspresiju čimbenika sa poznatom važnom funkcijom u imunološkim interakcijama poput IL-25, transformirajućeg faktora rasta-β (od eng. *transforming growth factor–β*, TGF-β), B staničnog aktivirajućeg faktora (od eng. *B cell activating factor*, BAFF), proliferator inducirajućeg liganda (od eng. *proliferator-inducing ligand*, APRIL) i limfopoetina strome timusa (od eng. *thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) (79).

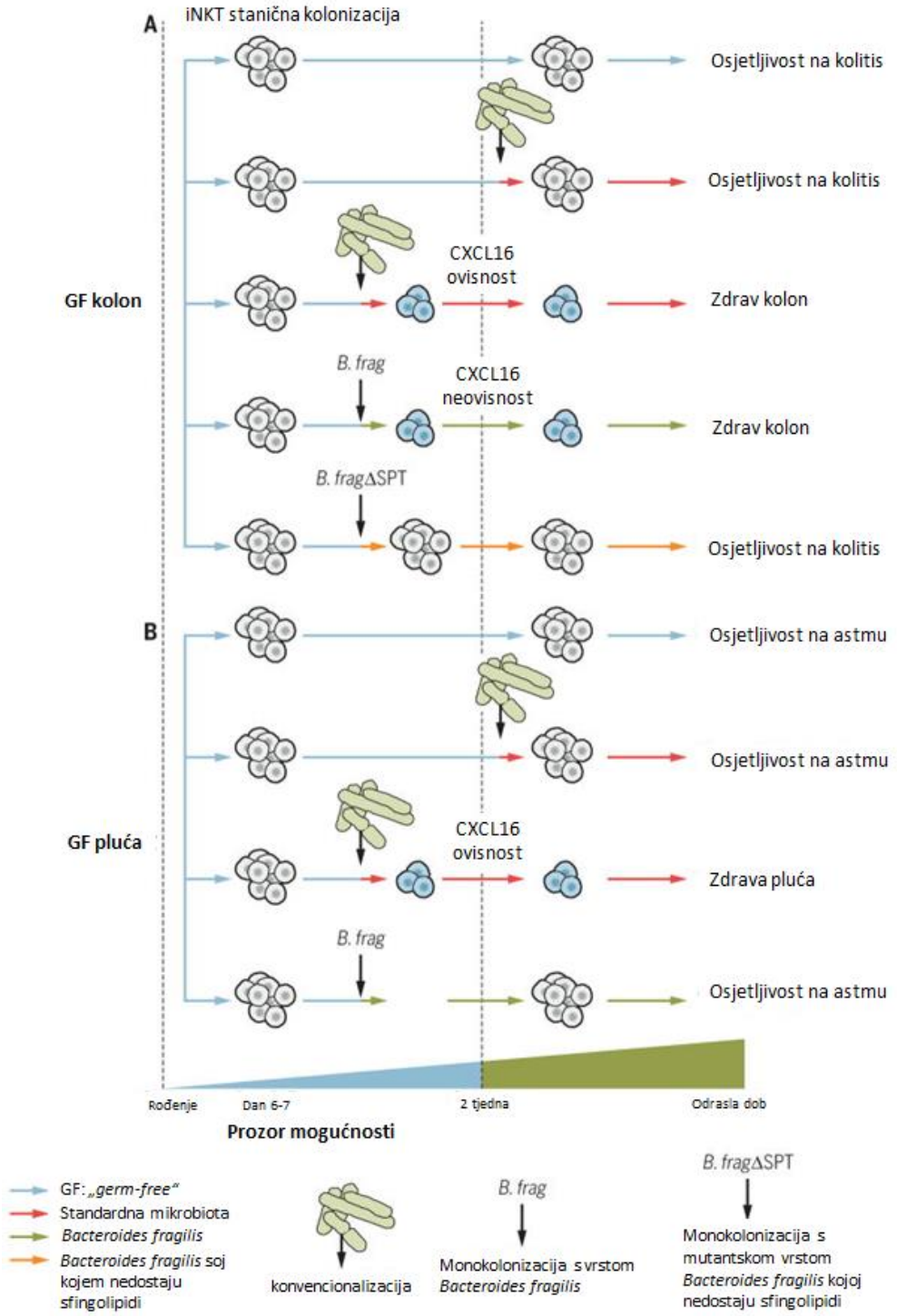
Uspostavljanje tolerancije tijekom neonatalnog peroda može biti regulirano i ne-imunološkim stanicama. *Toll-like* receptor (TLR) signalizacija je podregulirana tijekom prva dva tjedna života u mišjim IEC stanicama, ali ne i kasnije. Ovo čini epitelne stanice hiporesponsivnim prema TLR stimulansima poput lipopolisaharida podrijetlom iz gram-negativnih bakterija. Ova neonatalna tolerancija je ovisna od TLR4 i tipu porođaja. IEC neonatalnih miševa rođenih carskim rezom nemaju podregulaciju TLR signalizacije i više su skloni epitelnoj ozljedi, što sugerira važnu ulogu specifičnih vrsta mikrobnog izlaganja u razvoju epitelne tolerancije tijekom ranog života (79).

iNKT STANICE U KOLONU I PLUĆIMA

Invarijantne T stanice ubojice (iNKT) imaju ekspresiju invarijantnog TCR-α lanca i raznolik niz TCR-β lanaca te prepoznaju endogene i egzogene (bakterijske) lipidne antigene kada su prezentirani na CD1d (MHC klasa I molekula). U GF životnija, iNKT

stanice su manje izražene u perifernim tkivima poput slezene i jetre i hipoosjetljive su na lipidnu antigenu stimulaciju, što se pak normalizira monokolonizacijom odraslih miševa s bakterijama koje izražavaju iNKT antigene. Suprotno tome, mukozna tkiva poput pluća i kolona sadržavaju značajno viši broj iNKT stanica u GF miševa u usporedbi sa SPF miševima – ova opservacija je povezana s pojačanim upalnim odgovorima u eksperimentalnim modelima kolitisa i preosjetljivosti dišnih puteva. Ova pretjerana akumulacija iNKT stanica i hiperreaktivnost na okolišne okidače koji dovode do razvoja kolitisa može se normalizirati kolonizacijom GF miševa standardnom mikrobiotom (konvencionalizacija), monokolonizacijom *B. fragilis* ili intervencijom sa sfingolipidnim antigenima *B. fragilis*-podrijetla tijekom prva dva tjedna života, ali ne kasnije (Slika 11A). iNKT stanična akumulacija u plućima i osjetljivost na astmu u GF miševa se može spasiti kolonizacijom standardnom mikrobiotom, ali ne i monokolonizacijom s *B. fragilis* vrstom tijekom prva dva tjedna života (Slika 11Slika 11B).

Nadalje pokazano je kako postoje barem dva mehanizma kojima mikrobiote moduliraju iNKT frekvenciju u kolonu i crijevima. Akumulacija iNKT stanica u kolonu u GF životinja povezana je s povišenim razinama kemokinskog liganda CXCL16, čija se ekspresija normalizira nakon konvencionalizacije tijekom kritičnog dvotjednog perioda (prozor mogućnosti). S druge strane, normalizacija iNKT stanične frekvencije humanim komenzalom *B. fragilis* ovisi o inhibiciji proliferacije iNKT stanica tijekom ranog života pomoću sfingolipida *B. fragilis*-podrijetla koji djeluju inhibitorno. Zanimljivo je da su utjecaji stanične kolonizacije *B. fragilis* vrstom ovisni o tkivima – utjecaji su ograničeni na kolon (79).



Slika 11. iNKT stanična kolonizacija je regulirana mikrobiotom tijekom ranog života i utječe na osjetljivost na kolitis i astmu kasnije u životu.

(A) iNKT stanice migriraju iz timusa prema kolonu tijekom prvih nekoliko tjedana života. Njihova abnormalna akumulacija u kolonu GF miševa dovodi do osjetljivosti na oksazolon-inducirani kolitis u starijoj životnoj dobi. Konvencionalizacija standardnom mikrobiotom ili monokolonizacija s *B. fragilis* (*B. frag*) vrstom, ali ne i s *B. fragilis* deficijentnim sfingolipidima (*B. frag*ΔSPT) tijekom prozora mogućnosti (kratak vremenski period) obnoviti će brojnost iNKT stanica u kolonu te poništava povećanje osjetljivosti na kolitis. U kontrastu s konvencionalizacijom sa standardnom mikrobiotom tijekom prva dva tjedna života koja smanjuje broj iNKT stanica mehanizmom koji je ovisan o CXCL16, monokolonizacija s *B. fragillis* vrstom regulira broj iNKT stanica u kolonu neovisno o CXCL16 i ovisi pak o inhibitornim sfingolipidima podrijetlom iz *B. fragilis* vrste koji ometaju iNKT staničnu proliferaciju.

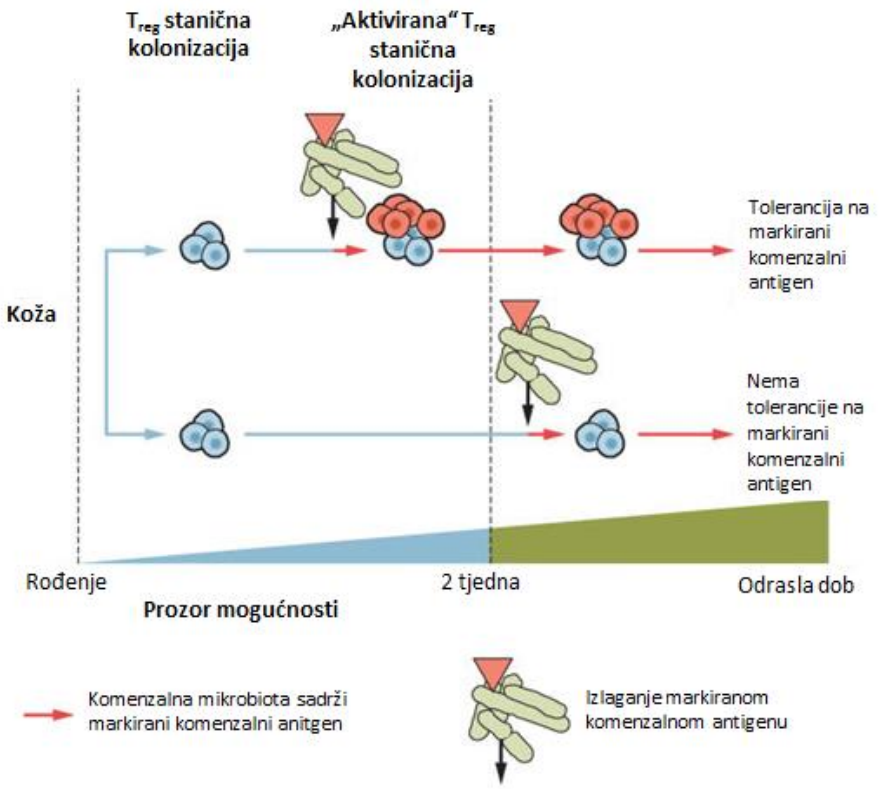
(B) iNKT stanična akumulacija u plućima GF miševa dovodi do predipozicije za astmu kasnije u životu. Konvencionalizacija sa standardnom mikrobiotom, ali ne i monokolonizacija s *B. fragilis* vrstom tijekom prozora

mogućnosti obnavlja iNKT stanični broj ovisno o CXCL16 i poništava povećanju osjetljivost na astmu. Prilagođeno prema (79).

T_{reg} STANICE U PLUĆIMA I KOŽI

Izlaganje antigenu kućnih grinja tijekom prva dva tjedna života, ali ne i kasnije, inducira razvoj subpopulacije helios-negativnih T_{reg} stanica iz konvencionalnih $CD4^+$ T stanica u plućima. Posljedično, inicijalno izlaganje antigenu kućnih grinja tijekom odrasle dobi rezultira povišenom osjetljivošću dišnih puteva u usporedbi s izlaganjem antigenu u ranjoj dobi. Alergenom induciran razvoj helios-negativnih T_{reg} stanica u ranom životu ovisan je o mikrobioti i uključuje ekspresiju imunološke molekule proteina programirane stanične smrti 1 (od eng. *programmed cell death protein 1*, PD1) na površini T-limfocita i PD-L1 (od eng. *programmed death-ligand 1,* ligand programirane stanične smrti 1) na dendritičkim stanicama. Rano-životna blokada PD-L1 sprječava širenje helios-negativnih T_{reg} stanica i dovodi do razvoja astme nakon izlaganja alegernu kućnih grinja. Postoji dvotjedni prozor mogućnosti tijekom kojeg izlaganje alergenu može inducirati specifičnu skupinu T_{reg} stanica i štititi od razvoja astme. Isto tako, izlaganje miševa antibioticima tijekom mlade životne dobi povećava osjetljivost prema razvoju astme, što je konzistentno s ulogom mikrobiote u regulaciji plućnih alergijskih bolesti (79).

Slična dobno ovisna regulacija T_{reg} stanica postoji i u koži. Kolonizacija miševa s bakterijskim sojem kožnog komenzala tijekom prva dva tjedna života, ali ne i kasnije, inducira akumulaciju aktiviranih T_{reg} stanica u koži koji su podrijetlom iz timusa i koji održavaju toleranciju na komenzalne antigene u odrasloj dobi. Kada je kolonizacija započeta u odraslog miša, takva vrsta specifične tolerancije na komenzalne antigene nije stvorena (Slika 12). Štoviše akumulacija aktiviranih T_{reg} stanica u ranom životu specifična je za kožu i nije uočena u lamini propriji. Antibiotsko izlaganje neonatalnih miševa inducira dugoročnu modifikaciju mikrobnog sastava i dovodi do osjetljivosti na razvoj psorijaze u odrasloj dobi što se povezuje s IL-22 producirajućim γδT stanicama (79).



Slika 12. T_{reg} stanice koloniziraju kožu neonatalnih miševa i induciraju toleranciju na komenzalne bakterije. Kolonizacija neonatalne kože s komenzalnom mikrobiotom dovodi do akumulacije aktiviranih T_{reg} stanica (označene crveno na slici) koje specifično prepoznaju umjetno označeni antigen, s posljedičnom tolerancijom na isti antigen kasnije u životu. Kolonizacija odraslog miša istom mikrobiotom koja sadržava označenu populaciju (označeni antigen, označen kao trokut na slici) neće dovesti do akumulacije T_{reg} stanica u koži niti do razvoja imune tolerancije. Prilagođeno prema(79).

ERITROCITI U SLEZENI

Mala podskupina eritrocita iskazuje ekspresiju transferin receptora CD71. $CD71^+$ eritrocita ima više u slezeni po rođenju do drugog tjedna života nego u odrasloj dobi. Njihov je razvoj neovistan o mikrobiotama, jer je jednaka brojnost uočena u GF i SPF miševa. Njihova je funkcija suprimiranje odgovora mijeloidnih stanica na patogene (poput primjerice *Listeria monocytogenes*) i komenzale. U potonjem slučaju, inhibicijom CD71 povećava se bazalna ekspresija razine upalnih citokina u SPF uvijetima (79).

RANO-ŽIVOTNE DISBIOZE MIKROBIOTA I NJIHOVA VEZA S LJUDSKOM BOLESTI

Čini se kako interakcija mikrobiota i imunološkog sustava igra važnu ulogu u razvoju imunološkog sustava u ranoj dobi te ometanje te interakcije rezultira potencijalno stalnim imunološkim poremećajima. Obzirom na navedeno, vrijedi pretpostaviti kako rano-životno izlaganje mikroorganizmima ima utjecaj na osjetljivost na bolesti u starijoj životnoj dobi. Postoji sve više dokaza koji idu u prilog ovoj hipotezi (79).

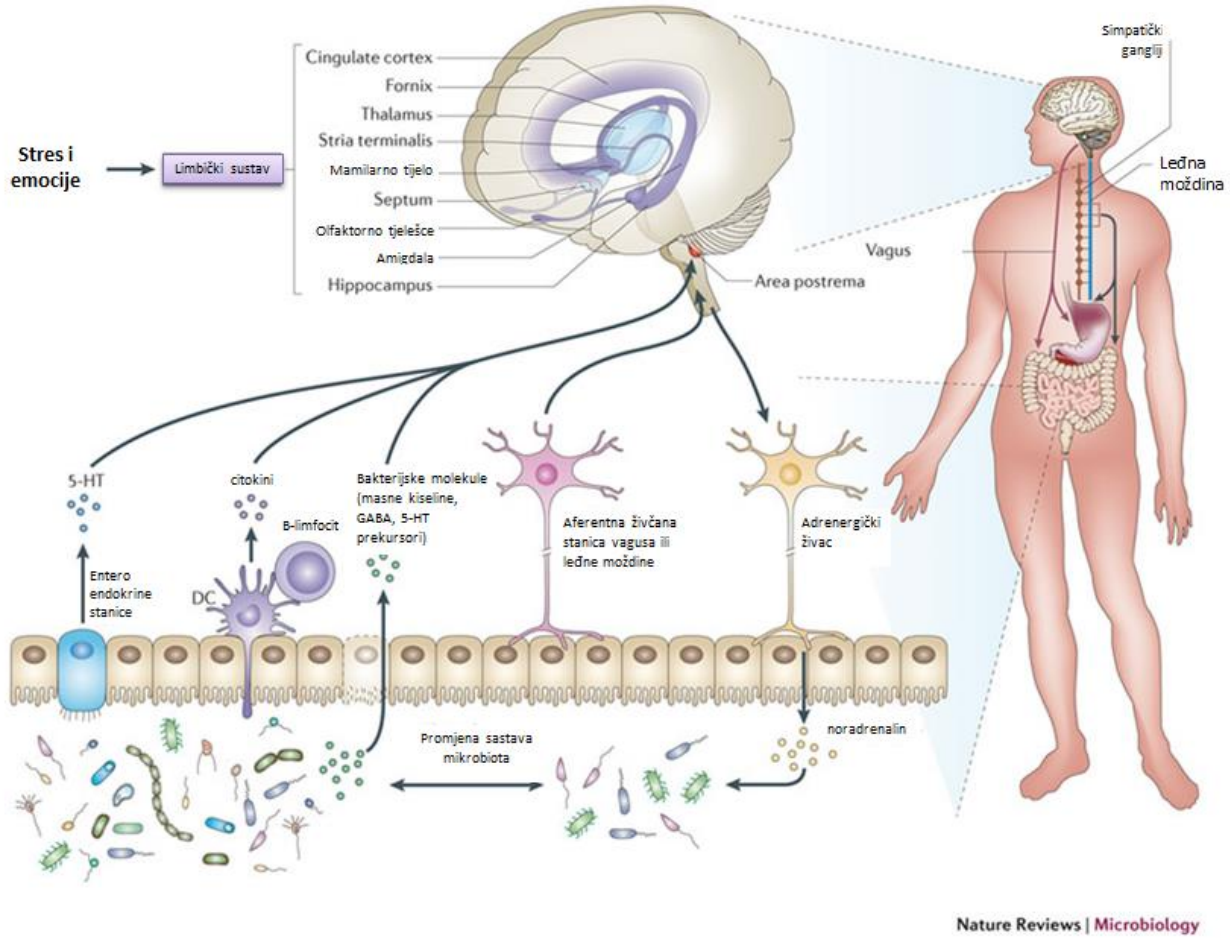
Djeca izložena seoskom okolišu imaju manji rizik razvoju alergijskih bolesti. Izlaganje seoskom okolišu tijekom trudnoće modulira imunološki odgovor i smanjuje rizik od astme u novorođenčeta. Ovaj protektivni utjecaj se povezuje s povećanom aktivnošću T_{reg} stanica. Iako ne čvrsto dokazan, jedan od vjerojatnih objašnjenja protektivnog utjecaja izlaganju seoskom okolišu u ranoj dobi jest uloga mikrobiote - pojedinci izloženi ovom okolišu imaju veći mikrobnu raznolikost u usporedbi s drugim životnim stilovima (79).

Suprotno tome, izlaganje antibioticima je povezano s stalnim promjenama mikrobnog sastava. Primjerice, primjena antibiotika u prvih 6 mjeseci života je povezana s povećanom osjetljivošću na alergije i astmu u šestoj godini života. Također je pokazano kako je izlaganje antibioticima tijekom prve godine života povezano s razvojem teškog disanja i egzema u osmoj godini života, čak kad uzimamo u obzir liječenje rano-životnih respiratornih infekcija. Izlaganje antibiotiku tijekom prve godine života je također povezano s povećanom osjetljivošću na povećanu tjelesnu težinu i razvoj centralnog adipoziteta što povisuje rizik za razvoj diabetesa mellitusa tipa 2 kasnije u životu. Vezano za diabetes mellitus tipa 1, uočeno je da se sastav mikrobiota mijenja u djece *prije* samog razvoja bolesti (79).

Djeca rođena carskim rezom imaju drugačiji sastav mikrobiote i osjetljivija su prema razvoju pretilosti, diabetes mellitus tipu 1, alergijama i astmi tijekom djetinjstva i odrasle dobi (79).

3.2.7.2. Crijevno-moždana os

Crijevno-moždana os (od eng. *gut-brain axis,* GBA) je dvosmjerna komunikacijska mreža koja uključuje centralni živčani sustav (CNS), uključujući mozak i leđnu moždinu, autonomni živčani sustav (ANS), enterički živčani sustav (ENS) te hipotalamičko-pituitarno adrenalnu (HPA) os (55). Autonomni sustav (simpatikus i parasimpatikus) stvara aferentne i eferentne signale. Aferentni signali imaju početak u lumenu i transmitirani su kroz enteričke, spinalne i vagalne puteve u CNS, dok je put eferentnih signala od CNS-a prema intestinalnom zidu (77).



Slika 13. ***Gut-brain axis.***
Mehanizmi kojima bakterije utječu na mozak i ponašanje uključuje bakterijske produkte koji ulaze u mozak krvotokom, preko *area postrema,* citokinskim otpuštanjem preko mukoznih imunoloških stanica, otpuštanjem intestinalnih hormona poput 5-hidsroksitriptamina (5-HT) iz enteroendokrinih stanica ili pak putem aferentnih neuralnih puteva, uključujući i vagus. Stres i emocije mogu utjecati na sastav GIT-mikrobiota otpuštanjem hormona stresa ili simpatičkim neurotransmiterima koji utječu na fiziologiju crijeva i mijenjaju stanište mikrobiota. Alternativno, hormoni stresa poput noradrenalina mogu utjecati na bakterijsku gensku ekspresiju ili signaliziranje među bakterijama, što opet mijenja sastav mikrobiota i njihove aktivnosti. DC-od eng. *dendritic cell*, dendritička stanica; GABA-od eng. *γ-aminobutyric acid*, γ-aminomaslačna kiselina; 5-HT – 5-hidroksitriptamin, serotonin. Prilagođeno prema (80).

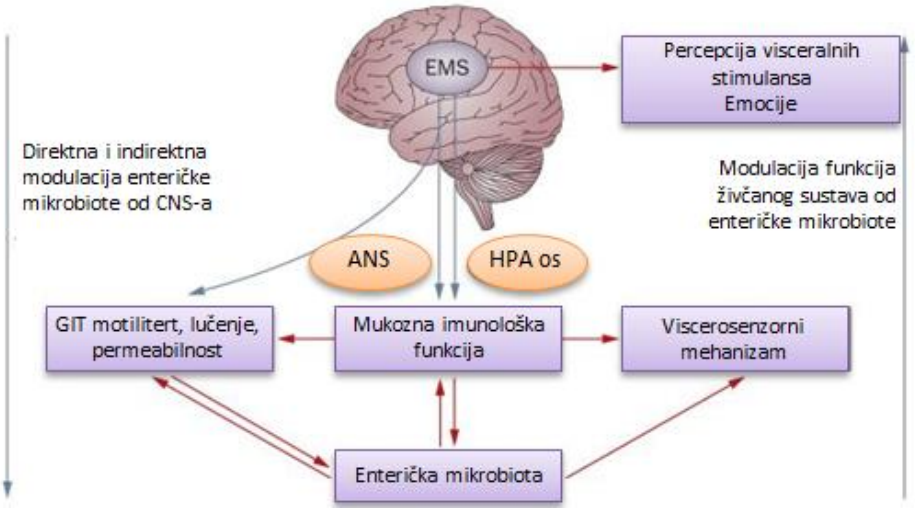
Os HPA se smatra jezgrom stresne eferentne osi koja koordinira adaptivnim odgovorom organizma na stres. Dio je limbičkog sustava, zone mozga uključene u pamćenju i emotivnom odgovoru. Okolišni stres te povišeni sistemski proupalni citokini aktiviraju ovaj sustav koji putem izlučivanja kortikotropin-oslobađajućeg faktora (CRF) iz hipotalamusa stimuliraju izlučivanje adrenokortikotrponog hormona (ACTH) iz pituitarne žlijezde, koji pak dovodi do oslobađanja kortizola iz adrenalnih žlijezda. Kortizol je glavni hormon stresa koji utječe na brojne organe, uključujući mozak. Mozak tako putem neuralnih i hormonalnih puteva komunikacije utječe na aktivnost funkcionalnih intestinalnih efektorskih stanica, poput imunoloških stanica, epitelskih

stanica, enteričkih neurona, glatkih mišićnih stanica, intestinalnih Cajalovih stanica i enterokromafinih stanica. Te su pak iste stanice pod utjecajem GIT-mikrobiota (80).

Enteričke mikrobiote su raspoređene kroz gastrointestinalni trakt te iako je profil mikrobiota različit od osobe do osobe, relativna brojnost bakterijskih vrsta i distribucija duž crijeva je slična u zdravih osoba. Dva dominantna bakterijska odjela čine koljeno *Firmicutes* i rod *Bacteroides* sa udjelom od ¾ u mikrobiomu crijeva. Ova mikrobna zajednica ima važne metaboličke i fiziološke funkcije za nositelja i doprinosi homeostazi tijekom života (80). Enteričke mikrobiote mogu direktno utjecati na homeostazu probavnog sustava regulacijom motiliteta crijeva, modulacijom intestinalne boli, imunološkim odgovorom i procesuiranjem nutrijenata. (81).

SIGNALIZACIJA OD MOZGA DO GIT-MIKROBIOTA

Kako bi se konceptualizirao utjecaj CNS-a na tjelesne funkcije, uključujući i imunološki odgovor probavnog sustava, uveden je pojam „emotivnog motoričkog sustava“. Takozvani „emotivni motorički sustav“ (EMS) čine eferentni neuralni putevi, povezani s endogenim putevima modulatora boli. Utjecaj emotivnog motoričkog sustava je posredovan kroz autnomni živčani sustav (simpatkus i parasimpatikus) i HPA os i to direktno preko nositelj-mikrobiota signalizacije i indirektno kroz promjene u intestinalnom miljeu. Različiti fiziološki stresori moduliraju sastav i ukupnu biomasu enteričke mikrobiote, neovisno o vremenu izlaganja. Čak i kratkotrajno izlaganje stresorima utječe na mikrobiote, primjerice izlaganje socijalnom stresoru u periodu od samo 2 sata značajno mijenja profil zajednice i smanjuje relativne proporcije glavnih koljena mikrobiota (77).

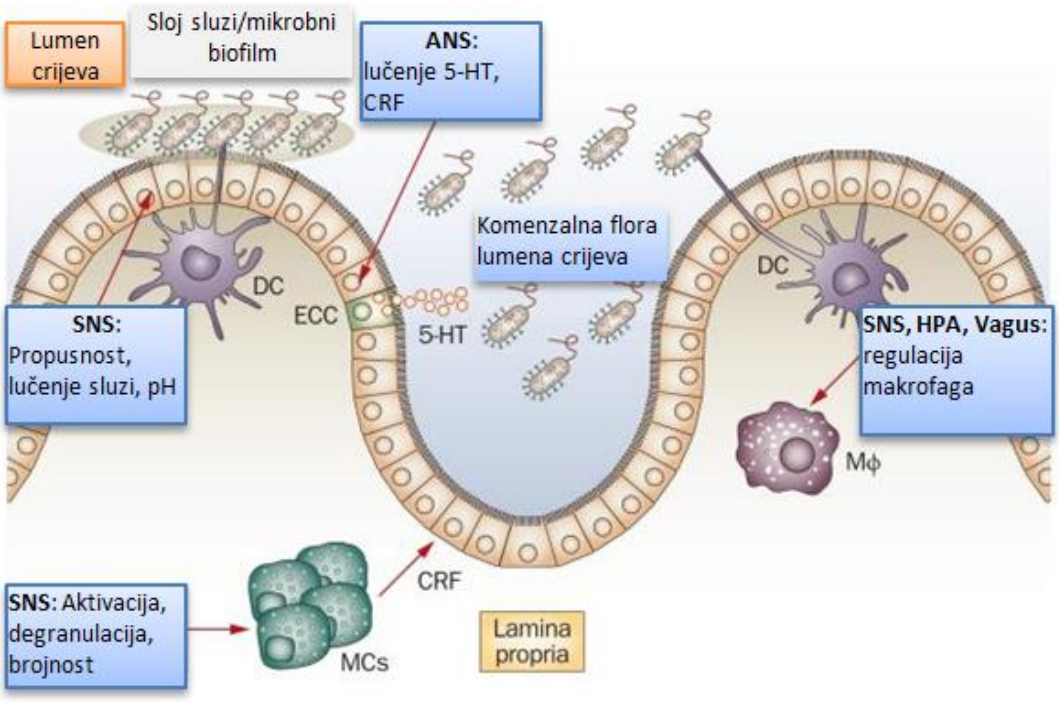


Slika 14. Utjecaj emotivnog motoričkog sustava na GIT-mikrobiotu.
Mozak može modulirati funkcije probavnog sustava i mijenjati percepciju crijevnih stimulansa putem emotivnog motoričkog sustava (EMS) koji uključuje autonomni živčani sustav (ANS od eng. *autonomus nervous system*), HPA os te endogene sustave modulacije boli. Enterička mikrobiota stupa u interakciju s efektorskim sustavima u crijevu te visceralnim aferentnim putevima koji uspostavljaju dvosmjernu os mozak-crijeva-mikrobiota. Prilagođeno prema (81).

Autonomni živčani sustav posreduje u komunikaciji između CNS-a i viscere. Simpatikus i parasimpatikus kao dio ANS-a imaju značajnu ulogu u modulaciji funkcija probavnog sustava kao što su motilitet, izlučivanje kiseline, bikarbonata i mukusa, lučenje intestinalnih tekućina i imunološki odgovor mukoze. Sve su to bitni čimbenici u održavanju mukoznog sloja i biofilma kao staništa mikrobiota. Disregulacija GBA utječe na GIT-mikrobiote preko promjena normalnog mukoznog staništa. (80). Regionalne i globalne promjene u gastro-sustavu (primjerice promjene u motilitetu crijeva) imaju utjecaj na dostavu nutrijenata GIT-mikrobioti (poput prebiotika, škroba i prehrambenih vlakana). Poremećen intestinalni prolazak (tranzit) uzrokovan poremećenim motoričkim peristaltičkim uzorkom natašte (pod utjecajem parasimpatikusa) je povezan s bakterijskim preraštanjem (od eng. *overgrowth*) u tankom crijevu. Smanjen broj velikih kontrakcija kolona je uočen u konstipaciji s prethodno spomenutim tipom poremećene peristaltike, dok je kod ubrzanog intestinalong prolaza/tranzita s povećanim brojem velikih migrirajućih kontrakcija uočen u raznim stanjima dijareje, uključujući dijarealni tip IBS-a (81).

Modulacija lučenja mukusa (sluzi) je pod kontrolom ANS-a te ima bitan utjecaj na količinu i kvalitetu intestinalnog mukoznog sloja koji čini stanište biofilma gdje većina enteričkih mikrobiota obitava. Autonomni živčani sustav utječe na epitelijalne mehanizme uključene u imunološku aktivaciju probavnog sustava direktnim i

indirektnim putem. Direktni utjecaj je putem modulacije odgovora imunoloških stanica GIT-a (makrofazi i mastociti) prema luminalnim bakterijama dok je indirektni utjecaj preko promjene pristupanja luminalnih bakterija imunocitima GIT-a (Slika 15).



Slika 15. Interakcija GIT-mikrobiote, imunoloških stanica lamine proprije i ANS-a.
Vagalne i simpatičke grane ANS-a (uključujući HPA) moduliraju aktivnost Mφ. SNS može modulirati aktivnost MC-a regulirajući njihov broj, potičući otpuštanje pojedinačnih stanica iz MC klastera (degranulacija) te regulirajući njihovu aktivost (povišenu ili sniženu). MC produkti, poput CRF-a, mogu povećati epitelnu permeabilnost prema bakterijama, što bakterijama omogućava pristup imunološkim stanicama u lamini propriji. ANS može direktno modificirati ponašanje luminalne komenzalne flore preko ECC-posredovanog lučenja signalnih molekula, poput serotonina u intestinalnom lumenu. SNS može utjecati na promjene u kvaliteti i volumenu intestinalnog mukoznog sloja, što pak utječe na okoliš u kojem mikrobni biofilm uspjeva. Kratice: ANS, autonomni živčani sustav, od eng. *autonomic nervous system*; CRF, kortikotropin otpuštajući faktor, od eng. *corticotropin-releasing factor*; DC, dendritička stanica, od eng. *dendric cell*; ECC, enterokromafina stanica, od eng. *enterochromaffin cell*; MC, mastocit, od eng. *mast cell*; Mφ, makrofag; SNS, simpatički živčani sustav, od eng. *sympathetic nervous system*; 5-HT, serotonin. Prilagođeno prema (81).

Mozak utječe na sastav i funkciju mikrobiota mijenjanjem intestinalne permeabilnosti (propusnosti), čime dopušta penetraciju bakterijskih antigena kroz epitel i time stimulira imunološki odgovor u mukozi. Promjene u permeabilnosti inducirane stresom uključuju aktivaciju glija stanica i mastocita, hiperprodukciju interferona-γ i promjene u morfologiji epitela kolona: akutni stres je povisio paracelularnu permeablnost kolona uz uočenu hiperprodukciju interferona-γ i smanjenja mRNA ekspresije zone occludens 2 (ZO-2) (82). Također je uočeno da stres utječe na varijacije u količini i kvaliteti mukoznog lučenja.

Direktni utjecaj je posredovan lučenjem (pod regulacijom mozga) signalnih molekula iz neurona, imunoloških stanica i enterokromafinih stanica koje utječu na mikrobiote. Komunikacija između CNS-a i bakterija se oslanja na prisustvo receptora za neurotransmitere na bakterijama. Vezna mjesta za enteričke neurotransmitere koje proizvodi nositelj su također prisutna i na bakterijama i mogu utjecati na funkcije mikrobiota, doprinoseći osjetljivosti na upalne i infekcijske čimbenike. Primjerice *Pseudomonas fluorescens* ima visok afinitet za GABA sustav s veznim svojstvima sličnim receptorima u mozgu (83). *Escherichia coli* O157:H7 ima receptor za adrenalin i noradrenalin kojeg je moguće blokirati adrenergičkim antagonistima (84).

Mozak putem ANS-a modulira imunološku funkciju. Simpatikus modulira broj, degranulaciju i aktivnost mastocita s posljedičnom neravnotežom u oslobađanju triptaza i histamina izazvano fizičkim stresom. Drugi produkti mastocita, poput CRF-a, povećavaju epitelnu permeabilnost za bakterije koje potom imaju pristup imunološkim stanicama lociranim u lamini propriji. Drugi su primjeri povišena razina serotonina koji utječe na motilitet i mikrobni profil crijeva te lučenje peptida a-defenzina iz Panethovih stanica koji ima antimikrobno djelovanje (77).

Promjene povezane sa stresom mogu povećati ekspresiju virulentnih bakterija. Primjerice noradrenalin koji se otpušta tijekom operacije inducira ekspresiju *Pseudomonas aeruginosa* što može dovesti do sepse crijeva (85). Između ostalog, noradrenalin stimulira proliferaciju nekoliko sojeva enteričkih patogena i povisuje virulentna svojstva *Campylobacter jejuni* te dovodi do pojačanog rasta nepatogene *E. coli,* ali i patogene *E. coli* 0157:H7:3 (86, 87).

SIGNALIZACIJA OD MIKROBIOTA DO MOZGA

Komunikacija mikrobiota s mozgom uključuje vagalni živac koji transmitira informacije iz luminalnog okoliša u CNS. Mikrobiote mogu stupati u interakciju s GBA različitim mehanizmima (Tablica 2).

Tablica 2. Mehanizmi interakcije mikrobiota-GBA.
Prilagođeno prema (77).

Signalizacija od GIT-mikrobiota prema mozgu	Signalizacija od mozga prema GIT-mikrobiotama
Produkcija, ekspresija i *turnover* neurotransmitera i neurotropnih čimbenika	Promjena u sluzi i produkciji biofilma
Zaštita intestinalne barijere i integritet čvrstih veza (*tight junction,* TJ)	Promjena u motilitetu
Modulacija enteričkih senzornih aferentnih puteva	Promjena u intestinalnoj permeabilnosti
Bakterijski metaboliti	Promjena imune funkcije
Mukozna imuna regulacija	

Glavni mehanizam interakcije mikrobiota-GBA je putem modulacije intestinalne barijere. Uočen je utjecaj probiotika na obnavljanje integriteta međustaničnih veza i zaštite intestinalne barijere na animalnim modelima. Izlaganje životinja formulacijom *Lactobacillus helveticus* R0052 i *B. longum* R0175 dovelo je do obnavljanja integriteta barijere međustaničnih veza i utišalo HPA os i aktivnost ANS-a (mjereno kao plazma kortizol i katekolamini) (88).

Poput živčanog sustava, GIT-mikrobiote isto tako mogu modulirati motilitet crijeva. *Bifidobacterium bifidum (B. bifidum)* i *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) mogu povećati motilitet, dok *Escherichia* vrste mogu smanjiti motilitet crijeva (89). Metabolički produkti GIT-mikrobiota poput kratko-lančanih masnih kiselina i nekih peptida (npr. *N*-formilmetionil–leucin–fenilalanin) mogu stimulitati ENS i utjecati na peristaltiku. Mikrobiote stupaju u interakciju s GBA modulacijom aferentnih senzornih živaca (*Lactobacillus reuteri, L. reuteri*) koji povećavaju ekscitaciju putem inhibicije otvaranja kalcij-ovisnih kalijevih kanala i tako moduliraju motilitet crijeva i percepciju boli. Promjene u ravnoteži između različitih bakterijskih populacija u GIT-u mogu dovesti do promjena u motilitetu i izlučivanju te posljedično voditi do dijareje ili konstipacije. Zbog dvosmjerne komunikacije, dijareja ili konstipacija mogu utjecati na ravnotežu GIT-mikrobiota (81).

Nadalje, mikrobiote utječu na ENS aktivnost produciranjem molekula koje djeluju kao lokalni neurotransmiteri, poput GABA-e, 5-HT, melatonina, histamina i acetilkolina te generirajući biološki aktivne katekolamine u lumenu crijeva. Laktobacili koriste nitrate i nitrite za sintezu dušikovog oksida i stvaranje sumporovodika (H_2S) koji moduliraju motilitet crijeva interakcijom s vaniloidnim receptorom na kapsaicin-osjetljivim živčanim vlaknima (77).

Enterički živčani sustav predstavlja metu bakterijskih metabolita. Glavni produkt bakterijskog metabolizma čine kratkolančane masne kiseline poput maslačne ($CH_3CH_2CH_2COOH$), propionske (CH_3CH_2COOH) i acetatne kiseline (CH_3COOH), koje stimuliraju simpatički živčani sustav, otpuštanje mukoznog serotonina te utječu na pamćenje i proces učenja (77).

Interakcija mikrobiota-GBA se također dešava kroz otpuštanje biološki aktivnih peptida iz enteroendokrinih stanica koje utječu na GBA. Primjerice galanin stimulira aktivnost centralne grane HPA osi (otpuštanje CRF i ACTH), posljedično pojačavajući glukokortikoidno izlučivanje iz kore nedbubrežne žlijezde. Galanin također direktno stimulira lučenje kortizola iz stanica kore nadbubrežne žlijezde i otpuštanje noradrenalina iz medule nadbubrežne žlijezde. Grelin također posjeduje ACTH/kortizol-otpuštajuća svojstva te je vjerojatno uključen u modulaciju HPA odgovora na stres i prehrambene/metaboličnе varijacije (77).

Posljednji mehanizam utjecaja mikrobiota je kroz mukozalnu imunu aktivaciju. Mukozalna upala u miševa inducirana nakon izlaganja oralnim antibioticima, povisila je ekspresiju supstancije P u ENS-u; ta se posljedica normalizirala primjenom *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) koji je umanjio i visceralnu preosjetljivost induciranu antibiotikom (90).

Utjecaj mikrobiota na aktivaciju upale može biti posredovan proteazama. Proteaze imaju pojačanu ekspresiju u imuno-posredovanim intestinalnim poremećajima i posljednji su u nizu efektora mukozalne i ozljede enteričkih živaca. Povišena koncentracija proteaza je detektirana u fekalnim uzorcima pacijanata s iritabilnim sindromom kolona (IBS). Jedna od hipoteza IBS-a jest da abnormalne mikrobiote aktiviraju urođene imunološke odgovore kojima se povisuje permeabilnost epitela, aktiviraju nociceptivni senzorički putevi uključujući visceralnu bol te disregulira enterički živčani sustav (77).

DVOSMJERNA KOMUNIKACIJA

Slično eukarijama, prokarioti komuniciraju jedni s drugima putem hormona i hormonima sličnim spojevima. Mehanizam bakterijske interakcije (komunikacije) se naziva međustanična komunikacija (od eng. *quorum sensing*) (81). Kvorum je, prema

definiciji, minimalan broj prisutnih članova neke skupine potrebnih da se prihvati određena odluka (81). Bakterijski kvorum podrazumijeva minimalnu, kritičnu koncentraciju bakterijskih stanica u populaciji potrebnih da se dogodi zajednička genska ekspresija i koordinirani odgovor na promjene u njihovu okolišu. *Quorum sensing* tako se može definirati kao regulacija genske ekspresije sukladna gustoći bakterijske populacije. Bakterije proizvode i ispuštaju kemijske signalne molekule, tzv. autoinduktore. Izvanstanična koncentracija tih molekula raste kao funkcija gustoće bakterijskih stanica. Kada koncentracija tih signalnih molekula dosegne minimalni stimulatorni prag, bakterije usklađeno odgovaraju genskom ekspresijom i mijenjaju svoje ponašanje (81). Quorum sensing radi lakšeg razumijevanja možemo podijeliti u četiri koraka (81):

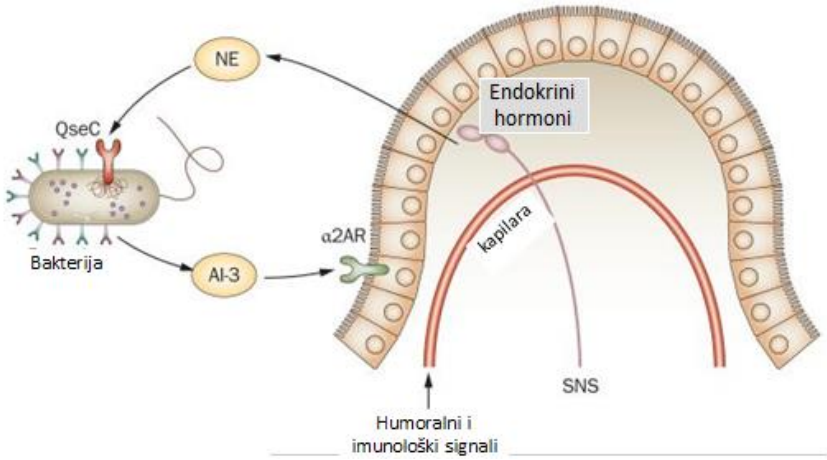
1) sinteza malih biokemijskih signalnih molekula unutar stanice,
2) otpuštanje signalnih molekula iz bakterijske stanice, bilo aktivnim transportom ili pasivno,
3) prepoznavanje signalnih molekula specifičnim receptorima te
4) promjene u genskoj regulaciji i transkripcija gena.

Signalne molekule koje se koriste u komunikaciji kralježnjaka, bezkralježnjaka i mikroorganizama imaju strukturne sličnosti. Mikroorganizmi mogu komunicirati sa stanicama sisavaca putem takozvanog *interkingdom signaling*-a, koji koristi hormone, hormonima slične spojeve: peptide, monoamine- epidermalni faktor rasta, inzulin i autoinduktore. Signalne molekule podrijetlom od sisavaca su dobro okarakterizirane i poznate, no njihovi prokariotski analozi nisu dovoljno poznati (81).

Bakterije koriste *quorum sensing* za regulaciju vlastite genske ekspresije, ne samo kao odgovor na signale drugih bakterija nego i kao odgovor na signale nositelja. Enterička mikrobiota koristi takve signalne mehanizme u modulaciji fizioloških funkcija, uključujući produkciju sekundarnih metabolita, bakterijsku pokretljivost i patogenost (81).

Najbolje okarakteriziran mikrobni signalni sustav analogan eukariotskom noradrenergičkom signalnom putu uključuje autoinduktor-3 molekulu koju proizvodi mikrobiota te stupa u interakciju s bakterijskim QseC receptorom. Interakcijom

autoinduktora-3 i QseC receptora započinje autofosforilacija i kompleksna signalna kaskada koja aktivira ekspresiju bakterijskih gena povezanih s virulencijom i pokretljivošću (uključujući gen koji regulira razvoj flagela). Ova signalna molekula se najviše proučavala u enterohemoragičnoj *E. coli* (81).



Slika 16. Sistematska prezentacija *interkingdom* adrenergičke signalizacije između nositelja i GIT-mikrobiota. NE ispušten u lumen crijeva može aktivirati QseC receptore slične adrenergičkim na površini bakterija u lumenu te tako modulirati virulenciju mikroorganizama (tzv. AI-3 posredovana signalizacija). Slično tomu, NE-slične signalne molekule poput AI-3 kojeg ispuštaju bakterije u intestinalni lumen mogu aktivirati adrenergičke receptore izražene na luminalnoj strani epitela crijeva (poput α2AR). Aktivacijom α2AR smanjuje se lučenje epitelnih stanica. Kratice: α2AR, α2 adrenergički receptor; AI-3, autoinduktor-3; NE noradrenalin, od eng. *norepinephrine*; SNS simpatički živčani sustav, od eng. *sympathetic nervous system.* Prilagođeno prema (81).

Sličnost signalnog sustava autoinduktor-3 – QseC i noradrenergičkog signalnog puta sisavaca uzrokuje aktivaciju QseC receptora noradrenalinom, što omogućuje *interkingdom signaling* i ukazuje na važnost interakcije crijeva – mozak tijekom stresa (Slika 16). Primjerice enterohemoragična *E. coli* može osjetiti luminalni adrenalin i noradrenalin i povećati ekspresiju svojih virulentnih osobina (81).

3.3. UTJECAJ RAZVOJA MIKROBIOTA NA LJUDSKO ZDRAVLJE

U svijetu se uočava progresivan porast metaboličkih i imunoposredujućih bolesti, s dramatičnim porastom u dječjoj populaciji. Taj porast može biti povezan s paralelnim porastom broja carskih rezova u svijetu koji je eksponencijalno porastao i premašio preporučenih 15% od Svjetske zdravstvene organizacije (od eng. *World Health Organisation*, WHO) (21). Rođenje carskim rezom je povezan s razvojem alergija i astme, diabetes mellitus tipom 1, celijakije i pretilosti (91-94).

Disbioza mikrobiota može utjecati na razvoj patoloških probavnih stanja poput pretilosti (95, 96) i malnutricije (97), sistematskih bolesti poput dijabetesa (98) te kroničnih upalnih bolesti poput kronične upalne bolesti crijeva, ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti (99).

3.3.1. Alergijske bolesti i astma

Alergijske bolesti predstavljaju sve veći zdravstveni problem u razvijenom svijetu, a njihov nagli porast sredinom prošlog stoljeća može biti objašnjen promjenama u genotipu te u gubitku protektivnih čimbenika i razvoju novih okolišnih rizičnih čimbenika (100).

Bakterijski mikrobiom ima važnu ulogu u održavanju bazalne imunološke homeostaze, koja modulira imunološki odgovor prema mikrobnim patogenima (100) kao što je opisano u prethodnim poglavljima.

Respiratorna mukoza jest glavno područje kontakta s mikroorganizmima, gdje epitelne i dendritičke stanice stupaju u interakciju s funkcionalno različitim limfocitima. Limfoidne stanice kontroliraju potom niz imunoloških puteva: specifičnu i nespecifičnu imunost koja potom dovodi do imunološkog odgovora nositelja. Nespecifični imunološki odgovor na mikroorganizme se oslanja na interakcije patogen-receptor te je povezan s produkcijom interferona tipa I, proinflamatornih citokina te T2-pomočničkih stanica. Ovaj koordinirani dinamički imunološki odgovor može biti podloga raznim fenotipovima astme (100).

Smanjen intezitet i raznolikost mikrobne stimulacije može rezultirati abnormalnim sazrijevanjem imunološkog sustava u ranom djetinjstvu (101, 102). „Sindrom deprivacije mikrobnog pritjecanja/obilja (od eng. *microbial deprivation syndromes of affluence*)“ jest jedna od teorija koja objašnjava imuno-posredovane bolesti poput multiple skeroze, diabetes mellitusa tipa 1 te Crohnove bolesti: nedostatno izlaganje mikrobima rezultira nedostatnom indukcijom T-limfocita koje imaju regulatorna i/ili T_H1-slična svojstva (nedostatnom demetilacijom/aktivacijom IFNγ gena) kojima se suprostavljaju T_H2-alergijskim odgovorima (102, 103).

Neuspjeh u utišavanju T_H2 odgovora tijekom sazrijevanja imunološkog sustava može dovesti do T_H2-posredovane alergijske bolesti (101, 104, 105). Prikladna pre- i postnatalna mikrobna stimulacija može biti potrebna u izbjegavanju ovog patofiziološkog procesa (106, 107). S time u vezi, GIT-mikrobiota može biti kvantitativno najznačajniji izvor mikrobne stimulacije i služiti kao primarni signal u sazrijevanju dobro uravnoteženog postnatalnog specifičnog i nespecifičnog imunološkog odgovora (101, 102, 108-112).

Uočene su razlike u GIT-mikrobioti zdrave djece i djece koja su razvila alergijske bolesti (113-119). No uočene su velike nedosljednosti u rezultatima različitih studija te velike razlike u korištenju mikrobnih tehnika (112, 114-119). Važno je napomenuti da korištenje fekalnih uzoraka dobro reflektira mikrobiote luminalnog kolona, ali ne nužno i mikrobiote tankog crijeva koje su također značajan čimbenik probavnog imunološkog sustava (120). Specifični mikroorganizmi s dokazanom štetnom ili protektivnom funkcijom u razvoju alergije nisu nađeni, ali neke studije su pokazale povezanost između niske zastupljenosti bifidobakterija (113, 114, 118) ili laktobacila (118) tijekom djetinjstva te razvoja alergije kasnije u životu. Dodatno, neke studije su pokazale kako rana kolonizacija s *Clostridium difficile* (*C. difficile*) može predstavljati čimbenik rizika za razvoj alergije (113, 115, 121, 122). *C. difficile* je oportunistički patogen koji se umnožava kada se stvore prazne niše u GIT-mikrobiotama (52). Iz toga je lako zaključiti kako detekcija povišenih razina *C. difficile* vrste kao posljedica narušenih GIT-mikrobiota prethodi razvoju bolesti u djece koja su razvila alergiju kasnije u životu.

Postoje dokazi da uspostava raznolikih GIT-mikrobiota može biti važniji čimbenik od kasnije disbioze u formiranju normalnog imunog sazrijevanja i odgovora, pri čemu se učestalim izlaganjem novim bakterijskim antigenima pojačava razvoj imune regulacije (52, 101, 102, 123).

Pokazano je da djeca koja su razvila astmu tijekom školske dobi imaju nižu raznolikost ukupnih mikrobiota od djece koja nemaju astmu (uzorci prikupljani pri djetetovoj starosti od 1 tjedna do 1 mjeseca) (124) što dodatno ide u prilog konceptu važnosti ranog razvoja raznolikih mikrobiota.

Poznato je kako porod carskim rezom predstavlja rizik kasnijem razvoju alergijskih bolesti (94, 102). Carski rez je povezan sa smanjenom raznolikošću i smanjenim relativnim obiljem unutar koljena *Bacteroidetes* tijekom prve godine života, ali i čitavog roda *Bacteroides* (51).

Zapadnjački način života s prehranom siromašnom vlaknima je također povezan s mikrobiotama siromašnim *Bacteroidetes* koljenom (125). Na miševima hranjenim dijetom bogatom vlaknima je pokazan porast u brojnosti *Bacteroidetes* koljena te posljedično povišena razina cirkulirajućih kratkolančanih masnih kiselina i pojačane zaštite protiv alergijske upale u plućima (126).

Virusne infekcije donjeg respiratornog trakta su povezane s razvojem astme u atopijske djece (100), što može biti posljedica smanjene funkcije mukozne barijere zbog stimulacije neraznolikim mikrobiotama. Neraznolike mikrobiote mogu biti povezane s visokom predispozicijom prema infekciji donjeg respiratornog trakta, pojačanim T_H2 odgovorom i posljedičnim razvojem astme (100).

3.3.2. Metabolički i imunološki poremećaji

3.3.2.1. Pretilost

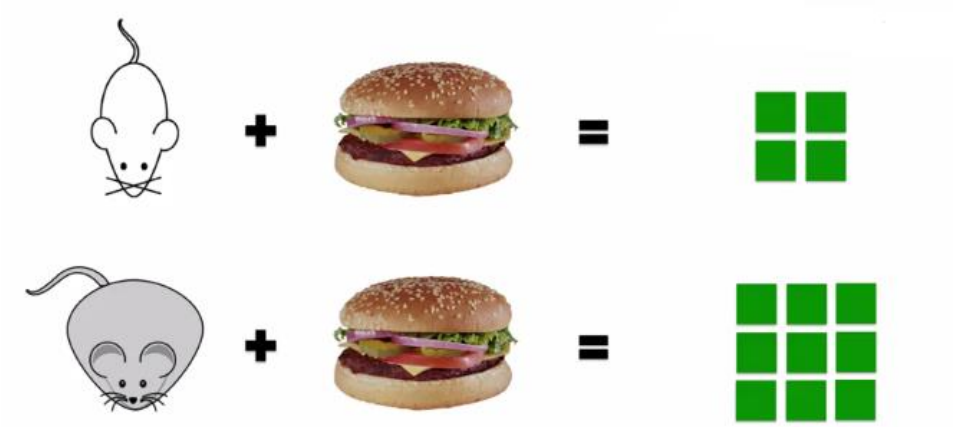
Pretilost je kompleksni sindrom koji uključuje dugotrajnu neravnotežu unosa energije i njenog trošenja. Iako životne navike, prehrana i tjelovježba značajno doprinose ovoj modernoj epidemiji, pokazan je bitan utjecaj mikrobnih zajednica GIT-a u njezinom razvoju (127-130).

Iako autori sugeriraju da određene mikrobne populacije doprinose povećanju stvaranja energije iz hrane (128, 130), to nije pokazao Murphy (131). Prema najnovijim saznanjima (132) mikrobiom ima brojne utjecaje na razvoj pretilosti i to ne samo preko povišenja ekstrakcije energije iz hrane.

Suptilnije promjene u sastavu intestinalnih mikrobiota su opisane u pretilih pojedinaca sa smanjenom mikrobnom raznolikošću u usporedbi s osobama normalne tjelesne težine (5).

Dodatni dokazi koji ukazuju na povezanost GIT-mikrobiota i pretilosti dolaze iz pretilih (*ob/ob*) miševa kojima nedostaje ekspresija gena koji kodira leptin (leptin *knock-out* miševi), tvar koja potiče osjet sitosti. Jedan eksperiment (133) je pokazao sudjelovanje mikrobiota u razvoju pretilosti u tih miševa: izlaganje antibioticima dovelo je do promjena u GIT-mikrobiotama vodeći do smanjenja metaboličke endotoksemije, upale i drugih parametara vezanih uz pretilost.

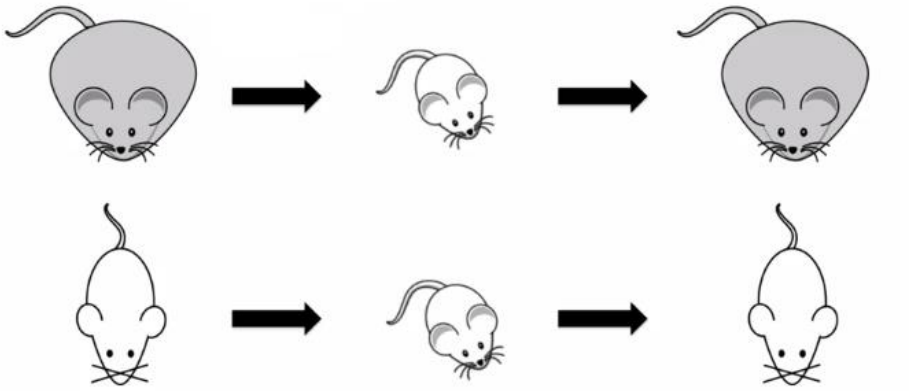
Drugo istraživanje je pokazalo da u usporedbi s *wild type* miševima, leptin *knock-out* miševi razvijaju pretilost ne samo kao posljedicu izostanka osjećaja sitosti, već zbog sposobnosti vlastitih mikroorganizama da ekstrahiraju više energije iz pojedene hrane što je dodatno doprinjelo povećanju tjelesne težine (130).



Slika 17. Prikaz ukupne ekstrahirane energije leptin knock-out miševa i wild type-a.
Leptin knock-out miševi imaju veću sposobnost ekstrahiranja energije iz hrane što posljedično dovodi do većeg dobitka na težini u usporedbi s wild type miševima kada im je dana jednaka količina hrane. Preuzeto iz (134).

Turnbaugh je potom modificirao istraživanje (135) koristeći fekalni transplantat *wild type* i leptin *knock-out* miša te je inokulirao akseničnog miša (miševi rođeni i uzgajani u sterilnim uvjetima, od eng. *germ free, GF mice*). Uzorkom distalnog kraja GIT-a pretilog miša (leptin *knock-out* miš) i uzorakom ne-pretilog miša (*wild type* miš) su inokulirani GF miševi te su praćeni i davana im je jednaka količina hrane. Uočeno je da miševi inokulirani fekalnim transplantatom pretilog miša su dobili značajno više na težini u usporedbi s miševima inokuliranim fekalnim transplantatom ne-pretilog miša (

Slika 18). To je objašnjeno time da su mikroorganizmi petilog miša imali veću sposobnost ekstrakcije energije iz ingestirane hrane, u usporedbi s ne-pretilim miševima.



Slika 18. Utjecaj mikrobiote na razvoj pretilosti
Inokulacijom GF miša fekalnim uzorkom leptin *knock-out* miša, oni dobivaju značajno više na težini nego u slučaju kada su inokulirani fekalnim uzorkom *wild type* miša. Preuzeto iz (134).

Pokazana je povezanost između relativnog mnoštva *Firmicutes* (*Clostridium* klaster XIVa i *Eubacterium eligens* čine oko 75% sekvenci) i smanjene razine *Bacteroidetes* (*Bacteroidetes* 4b čini više od 88% sekvenci) koljena i pretilosti miševa (128) i ljudi (136), iako ova saznanja nisu mogla biti replicirana u svim studijama (96, 137-142).

Ley i suradnici su pokazali smanjenje u omjeru *Firmicutes: Bacteroidetes* koji je bio praćen gubitkom težine u ljudi (143). Dalje je pokazano kako u pretiloj populaciji postoji niža razina *Bacteroidetes*, povišena razina *Actinobacteria* dok je razina *Firmicutes* koljena ostala nepromjenjena (5). Međutim, važnost *Firmicutes* i *Bacteroidetes* omjera u pretilosti još nije u potpunosti razjašnjena s objavom konfliktnih podataka (142, 144).

Akkermansia muciniphila (*A. muciniphila*) jest mucin-razgrađujuća bakterija koja živi u mukoznom sloju i dominira u tom staništu. U zdravih osoba, ova bakterija predstavlja 3-5% mikrobne zajednice te njezina brojnost obrnuto korelira s tjelesnom težinom i diabetesom tipa 2 u miševa i ljudi. *A. muciniphila* jest povezana sa zdravijim metaboličkim statusom i boljim kliničkim ishodima nakon kalorijske restrikcije u pretilih osoba (145).

3.3.2.2. Diabetes mellitus tip I (T1DM)

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) je autoimuna bolest sa subkliničkim prodromalnim/odgođenim periodom karakterizirana nedovoljnom produkcijom inzulina zahvaljujući uništenju inzulin-producirajućih β-stanica Langerhansovih otočića. Incidencija T1DM se povećala nekoliko puta u razvijenom svijetu nakon Drugog

svjetskog rata, zajedno s drugim imuno-posredovanim bolestima. Brojni čimbenici su predloženi kao rizični u razvoju T1DM, uključujući kemikalije, viruse, komenzalne bakterije i prehranu. Brze okolišne promjene i moderan način života vjerojatno su glavni čimbenici koji su doprinjeli porastu incidencije T1DM. Poslijednjih godina, GIT-mikrobiote su predložene kao glavni čimbenik u T1DM patogenezi. U životinjskom i humanom modelu, opisano je nekoliko promjena u sastavu mikrobiota (146).

Istraživanja GIT-mikrobioma u rizičnih pojedinaca za razvoj T1DM i u pacijenata s T1DM su tek u začetku, ali ti inicijalni rezultati pokazuju kako se intestinalni mikrobiom predijabetičara i dijabetičara razlikuje od zdravih osoba.

U prethodnim poglavljima je spomenuto kako je uočena disbioza mikrobiote prije samog kliničkog nastupa T1DM, te kako veću predispoziciju imaju djeca rođena carskim rezom.

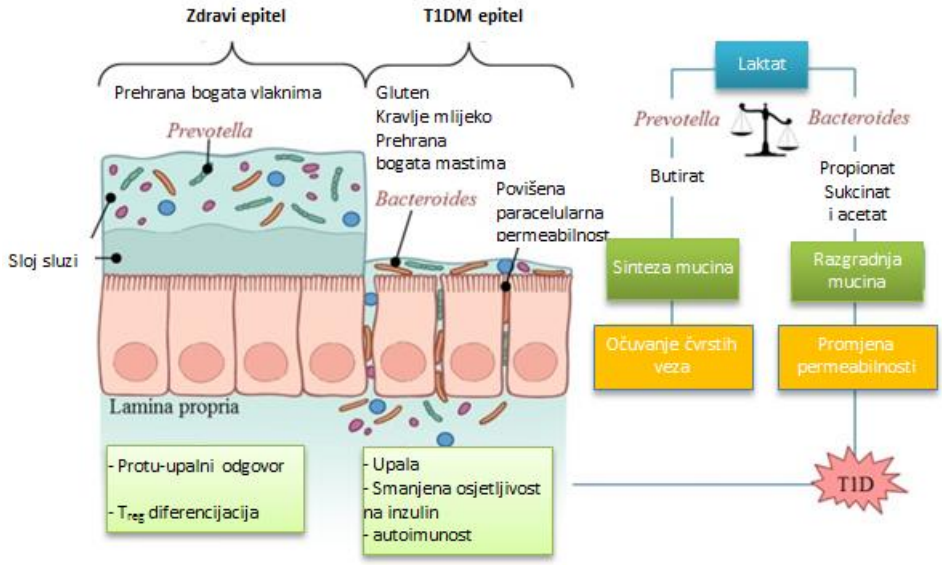
GIT-mikrobiote pojedinaca s T1DM su karakterizirane s *Bacteroidetes* kao dominantnim koljenom, nestašicom butirat-producirajućih bakterija, smanjenom bakterijskom i funkcionalnom raznolikosti te slabom stabilnosti mikrobnih zajednica. Ipak, ove promjene su uočene *nakon* pojave autoprotutijela koja su prediktivni čimbenik T1DM, što predlaže kako su intestinalne mikrobiote uključene u progresiju iz β-stanične autoimunosti u kliničku bolest radje nego u inicijaciju procesa bolesti (146).

Najčešće uočen i opisan u humanim studijama je smanjeni omjer *Firmicutes/Bacteroides.* Štoviše, relativna brojnost *Bacteroides*, *Clostridium* klastera XIVa, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Prevotella* bila je različita u zdravih i bolesnih pacijenata. Uočeno je kako disbioza povisuje intestinalnu permeabilnost i tako promovira razvoj proupalne niše koja stimulira β-staničnu autoimunost u subjekata s predispozicijom (147). Jedan od mehanizama promjene intestinalne permeabilnosti opisan je dalje u tekstu.

Prehrambeni sastojci sadržavaju supstrate koji tijekom fermentacije mogu rezultirati različitim produktima. Promjene u mikrobnoj strukturi zbog prehrambenih modifikacija rezutat su sposobnosti određene bakterijske zajednice da bolje metabolizira ponuđene supstrate jer su „gentski bolje opremljene“. Štoviše, isti supstrat može se koristiti u više

metaboličkih puteva, obzirom na tip bakterije koji kolonizira intestinalnu nišu. Jedan od takvih primjera je laktat. Laktat se može transformirati u butirat ili u kratko lančane masne kiseline poput acetata, sukcinata i propionata tijekom anaerobne bakterijske fermentacije, ovisno o tipu mikrobiote (148).

Model laktata daje najbolje objašnjenje za razumijevanje spone između T1DM i disbioze (Slika 19). Prema ovom modelu, prisutnost laktat- i butirat-producirajućih bakterija poput *Prevotella* i *Akkermansia* rodova pomaže očuvanju zdravog epitela. Razlog tome je što butirat doprinosi sintezi mucina i sklapanju čvrstih veza (od eng. *tight junction*, TJ). Te bakterije su uobičajene u mikrobiotama zdrave djece diljem svijeta. Nasuprot tome, kada su brojni mikroorganizmi poput *Bacteroides* i *Veillonella* rodova, laktat prati razgradni put u sukcinat, acetat i propionat. Ovi produkti kompromitiraju sintezu mucina i povećavaju paracelularnu permeabilnost promjenom u čvrstim vezama (148).



Slika 19. Prehrana i mikrobiota povezani mehanizmi u autoimunosti i T1DM razvoju.
U usporedbi sa zdravim pojedincima, osobe s T1DM imaju tanki mukozni sloj kao posljedicu neravnoteže vrsta iz rodova *Prevotella* i *Bacteroides* što dovodi do povećane razgradnje mucina i čini ih podložnima povećanoj paracelularnoj permeabilnosti i posljedičnom razvitku upale i autoimunosti. Prilagođeno prema (148).

Štoviše, butirat može doprinjeti održavanju protuupalnih odgovora u zdravim crijevima inhibirajući aktivaciju NF-κB, signalizacijom preko G-spregnutog receptora, i dovesti do modulacije antioksidativnih obrambenih sustava, produkcije dušikovog oksida i ekspresije upalnih citokina. Također, butirat pojačava diferencijaciju T_{reg} stanica, dok ih acetat blokira. T_{reg} stanična diferencijacija je povezana s histonskom

acetilacijom u promotorskom lokusu Foxp3, što je također regulirano butiratom. Derivati mikrobiota funkcioniraju kao medijatori u komunikaciji između bakterija i imunološkog sustava nositelja, što dovodi do pro- ili anti-upalnih odgovora (prethodno spomenut GBA), što može biti čimbenik u β-staničnoj autoimunosti i T1DM.

Sistemske posljedice intestinalnog butirata u regulatornom imunološkom odgovoru se također dešavaju na razini gušterače. Butirat je povezan s ekspresijom katelicidin-srodnim antimikrobnim peptidom (od eng. *cathelicidin-related antimicrobial peptide*, CRAMP) u β-stanicama ne-pretilih dijabetičkih (od eng. *non-obese diabetic*, NOD) miševa. CRAMP je pokazao protektivni učinak u razvoju T1DM indukcijom regulatornog odgovora i supresijom inflamatornih procesa u pankeatičnim otočićima predijabetičkih miševa (148).

3.3.2.3. Diabetes mellitus tip II (T2DM)

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) postaje sve veći zdravstveni problem u svijetu te je generalno povezan s pretilošću induciranom inzulinskom rezistencijom. I ovdje su međutim pokazane promjene u sastavu GIT-mikrobiota pacijenata s T2DM u usporedbi sa zdravim pojedincima. Larsen i suradnici su pokazali 16S rRNA sekvenciranjem da su relativne proporcije koljena *Firmicutes* (specifično *Clostridia*) bile smanjene, dok su *Bacteroidetes* koljeno *i* razred *Betaproteobacteria* bili povišeni u T2DM skupini u usporedbi s kontrolom (149).

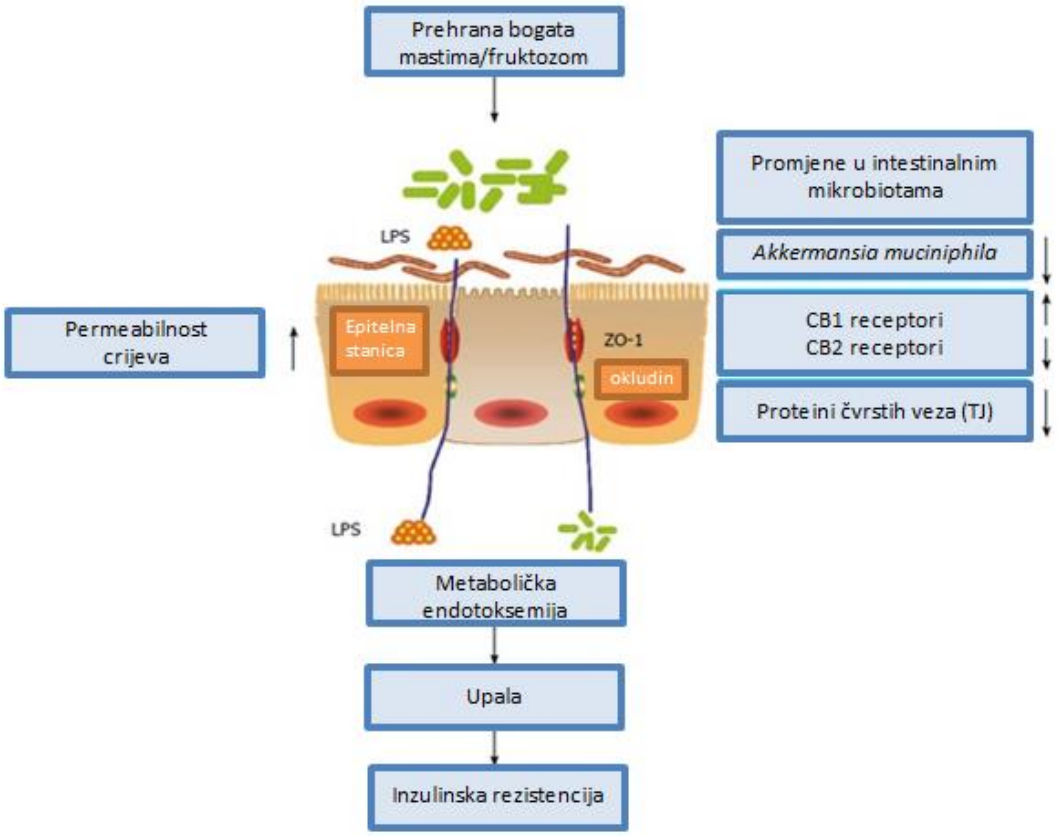
Metagenomska analiza (98) je pokazala umjeren stupanj disbioze GIT-a u pacijenata s T2DM. Njihovi uzorci su bili bogati oportunističkim bakterijama poput *Clostridium* spp. uz prisustvo *A. muciniphila, Bacteroides* spp. i *Desulfovibrio* spp. u usporedbi s kontrolom koja je bila bogata butirat-producirajućim bakterijama (98).

Jedan od mogućih mehanizama inzulinske rezistencije i posljedično T2DM opisali su Han i Lin (150) a uključuje brojne čimbenike poput endotoksemije praćene niskim stupnjem upale, utjecaja na permeabilnost crijeva i endokanabinoidni sustav.

ENDOTOKSEMIJA I NISKI STUPANJ UPALE

Pretilost, inzulinska rezistencija i T2DM su usko povezani s niskim stupnjem upale karakteriziranim poremećajem produkcije citokina i aktivacije mreže signalnih puteva.

Niski stupanj upale induciran je promjenom u sastavu GIT-mikrobiota koje promoviraju metaboličku endotoksemiju i potiču razvoj upale putem lipopolisaharida (LPS) i CD14/TLR4-ovisnog mehanizma (Slika 20). Intestinalne mikrobiote su obogaćene molekulama poput LPS-a i peptidoglikana koje mogu uzrokaovati upalu. Lipopolisaharid, kojeg proizvode GIT-mikrobiote, uključen je u začetak i razvoj upale i metaboličke bolesti. Povišene koncentracije LPS-a u miševa inducirane prehranom bogatom mastima definiraju se kao metabolička endotoksemija. Štoviše, prehrana bogata mastima u miševa značajno mijenja sastav intestinalnih mikrobiota. Metabolička endotoksemija se inducira u miševa kontinuiranom subkutanom infuzijom LPS-a tijekom 4 tjedna te glikemija natašte, inzulinemija, dobivanje na težini i ekspresija upalnih citokina se povisuju slično onim miševima na visoko-masnoj prehrani. CD14 *knock-out* miševi odupiru se većini karakteristika metaboličkih boleseti induciranih LPS-om i visoko-masnom prehranom. CD14 igra važnu ulogu u urođenoj imunosti. Vezanje LPS-a na kompleks mCD14 i TLR4 na površini urođenih imunoloških stanica aktivira kaskadu reakcija upale. Brojni tipični proupalni stimulansi, uključujući LPS, lipide, masne kiseline i kemokine intracelularno aktiviraju c-Jun N-terminalnu kinazne (JNK) i IκB kinazne (IKK)-β puteve. IKKβ aktivacija stimulira obitelj nuklearni faktor (NF)-κB transkripcijskih čimbenika i povisuje ekspresiju brojnih medijatora upale koji uzrokuju inzulinsku rezistenciju. Aktivacija JNK promovira fosforilaciju inzulin-receptor-supstrata (IRS)-1 na mjestu serina, što inhibira normalni signal transdukcije preko inzulinskog receptora/IRS-1 osi, što također rezultira inzulinskom rezistencijom. Radi gore navedenih mehanizama, metabolička endotoksemija inducirana LPS-om kojeg su proizvele mikrobiote je povezana s upalom i inzulinskom rezistencijom (150).



Slika 20. Utjecaj intestinalne mikrobiote u promociji permeabilnosti GIT-a i inzulinskoj rezistenciji. Promjene u intestinalnoj mikrobioti smanjuju TJ proteine epitelnih stanica crijeva i povećavaju permeabilnost, što potiče metaboličku endotoksemiju. Prilagođeno prema (150).

PERMEABILNOST CRIJEVA

Povećana endotoksemija korelira s povišenom permeabilnošću crijeva. Visoko-masna prehrana u miševa dramatično povisuje permeabilnost crijeva i smanjuje ekspresiju TJ-proteina poput zonula occludens (ZO)-1 i okludina u intestinalnim epitelnim stanicama. Izlaganje antibioticima smanjuje metaboličku endotoksemiju u miševa s visoko-masnom prehranom, što je povezano sa smanjenom permeabilnošću crijeva, sniženim upalnim markerima i poboljšanim metaboličkim značajkama dijabetesa i pretilosti. Također deficijencija CD14 (u *ob*/*ob* CD14 *knock-out* miševa) demonstrira kako su metaboličke i upalne posljedice slične onima pri primjeni antibiotika. Primjenom probiotika u svrhu modulacije sastava GIT-mikrobiota, poboljšava se permeabilnost crijeva (postaju manje permeabilna), smanjuje se metabolička endotoksemija, smanjuje se upala i ublažuje netolerancija na glukozu (150).

ENDOKANABINOIDNI SUSTAV

Danas se vjeruje kako je endokanabinoidni (eCB) sustav povezan s upalom i dijabetesom. Intestinalne mikrobiote moduliraju ekspresiju eCB u GIT-u, što kontrolira intestinalnu permeabilnost i plazma LPS razine preko kanabinoidnog (CB)-1 receptora. Kao posljedica primjene prebiotika, permeabilnost crijeva u pretilih miševa se smanjuje zbog promjena u GIT-mikrobiotama. Blokiranje CB1 receptora u pretilih miševa također poboljšava barijernu funkciju crijeva preko povećanja distribucije i lokalizacije TJ-proteina (ZO-1 i okludina). Ovo pokazuje kako eCB sustav modulira permeabilnost crijeva preko distribucije i lokalizacije TJ-proteina. Bermudez-Silva i suradnici su pokazali kako je aktivacija CB2 receptora poboljšala glukoza-toleranciju u štakora i da blokada CB1 receptora oponaša učinke agonista CB2 receptora (151). Ovi podaci ukazuju kako eCB sustav modulira homeostazu glukoze preko CB1 i CB2 receptora (150).

AKKERMANSIA MUCINIPHILA

A. muciniphila je mukoprotein-razgrađujuća bakterija koja kolonizira mukozni sloj, i njena brojnost negativno korelira s tjelesnom težinom u ljudi; brojnost *A. muciniphila* se smanjuje u pretilih i T2DM miševa. Dodatkom živućih *A. muciniphila* poboljšavaju se metabolički učinci visoko-masne prehrane, uključujući smanjenje adipoznosti, metaboličke endotoksemije, niskog stupnja upale i inzulinske rezistencije. Također, dodatkom živućih *A. muciniphila* promovira se intestinalna ekspresija eCB koji kontroliraju upalu, intestinalnu barijeru i intestinalno hormonsko izlučivanje. Međutim isti učinci nisu uočeni u istom mišjem modelu pri primjeni toplinom-ubijenih *A. muciniphila* (145).

3.3.3. Bolesti probavnog sustava

3.3.3.1. Sindrom iritabilnog kolona (eng. irritable bowel syndrome, IBS)

Iako je etiologija sindroma iritabilnog kolona (IBS) povezana s više čimbenika, najnovija saznanja otkrivaju povezanost varijacija u GIT-mikrobiotama s blagom intestinalnom upalom povezanom s patofiziologijom IBS-a (152, 153).

Smatra se da mikrobna disbioza u GIT-u pogoduje adheziji patogena na crijevni zid i tako sudjeluje u patogenezi IBS-a (154). Također su uočene jasne razlike u sastavu

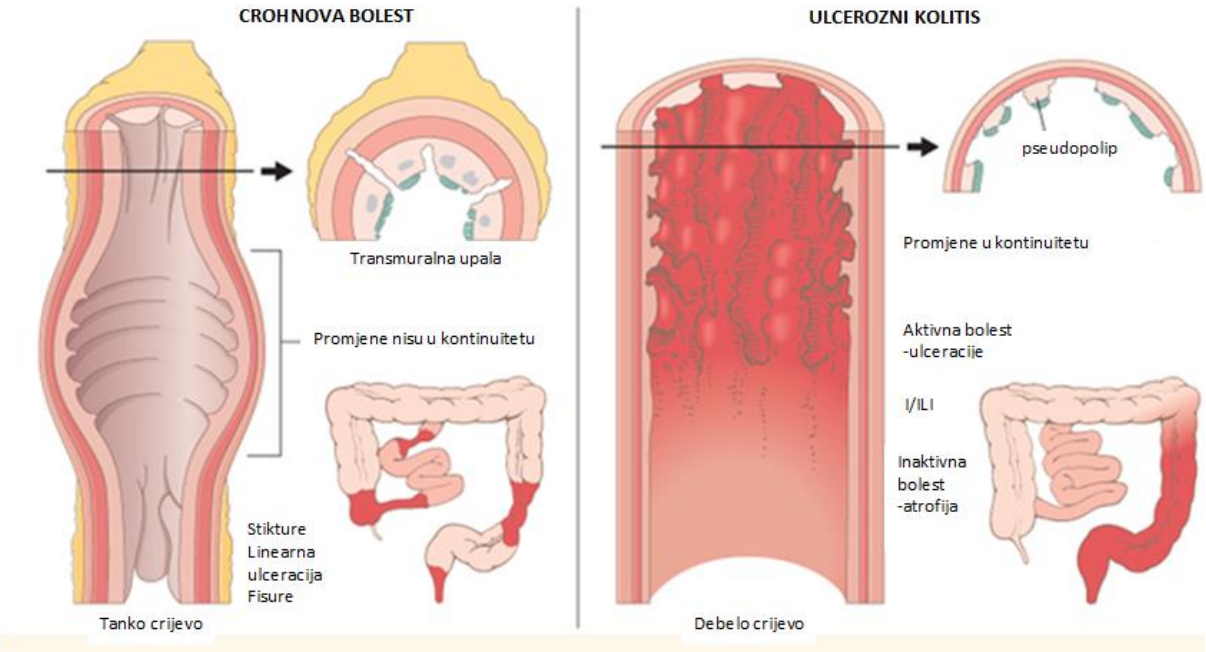
mikrobiota kontrole i oboljelih od IBS-a: mikrobiote IBS-pacijenata su karakterizirane povišenim brojem koljena *Firmicutes*, rodova *Ruminococcus, Clostridium* i *Dorea* uz smanjen broj *Bifidobacterium* spp. i *Faecalibacterium* spp. (155). U vrlo sličnoj studiji s pedijatrijskim IBS pacijentima je pokazana promjena u broju *Firmicutes* i *Proteobacteria* koljena uz porast *Dorea* i *Ruminococcus* rodova te vrste *Haemophilus parainfluenzae.* Štoviše, članovi roda *Bacteroides* su pronađeni u manjem obilju u usporedbi s kontrolom, dok je porast u broju *Alistipes* bila povezana s većom učestalosti boli (156).

Također su pokazane podgrupe IBS-pacijenata obzirom na varijacije u mikrobiotama s generalnim povišenjem *Firmicutes* : *Bacteroidetes* omjera kao zajedničkim nazivnikom (157, 158) što predstavlja mogućnost razvoja novih terapijskih tehnika prilagođenih pojedinoj skupini IBS-pacijenata.

U IBS pacijenata je otkrivena povišena koncentracija proteaza u fekalnim uzorcima povezana sa specifičnim bakterijskim vrstama. Trenutna hipoteza IBSa jest da abnormalne mikrobiote aktiviraju mukozni urođeni imunološki odgovor, koji povisuje epitelnu permeabilnost, aktivira nociceptivne senzorne puteve (uključujući visceralnu bol) i disregulira enterički živčani sustav (77).

3.3.3.2. Upalne bolesti crijeva (Inflammatory bowel disease, IBD)

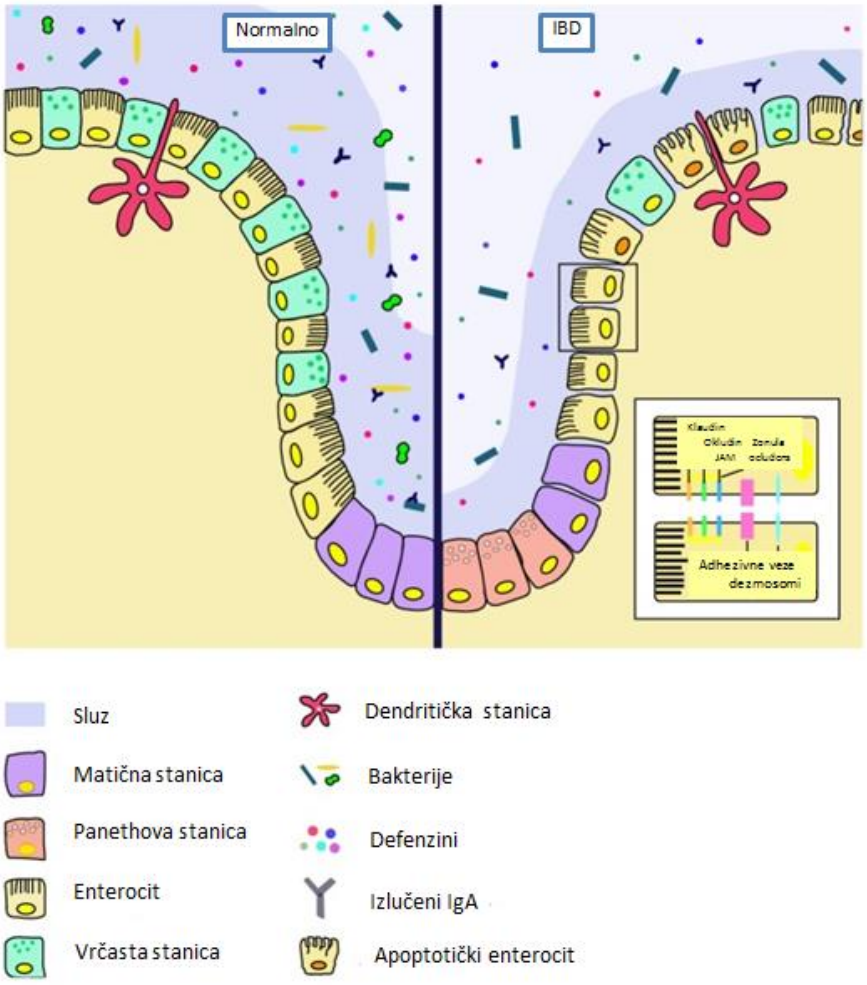
Crohnova bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UC) su najčešći oblici upalne bolest crijeva (od eng. *inflammatory bowel disease*, IBD). Iako je etiologija tih bolesti nepoznata i smatra se posljedicom brojnih čimbenika, sve je više dokaza da disbioza GIT-mikrobiote ima utjecaja u patogenezi IBD-a (159). Općenito, pacijenti pokazuju smanjenu mikrobnu populaciju, funkcionalnu raznolikost i stabilnost GIT-mikrobiota, pad u specifičnim vrstama *Firmicutes* te rast *Bacteroidetes* koljena i fakultativnih anaeroba poput porodice *Enterobacteriaceae* (160).



Slika 21. Usporedba patologije UC-a i CD-a
Ulcerozni kolitis je oblik upalne bolesti crijeva koja zahvaća debelo crijevo (kolon), karakterizirana ulceracijama sluznice kolona. Vodeći simptom aktivne bolesti je proljev pomješan s krvi. Ulcerozni kolitis je sustavna bolest koja zahvaća mnoge dijelove tijela osim kolona (ekstraintestinalne manifestacije).
U usporedbi s ulceroznim kolitisom, Cronhova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, a promjene nisu u kontinuitetu već se između zona s jakom upalom nalazi normalna sluznica, no najčešće se javlja u terminalnom ileumu, potom u kolonu. Cronhova bolest zahvaća sve slojeve stijenke crijeva. Prilagođeno prema(161).

„Mukozna barijera“ predstavlja funkcionalnu interakciju između GIT-mikrobiota i crijeva. Permeabilnost te barijere omogućava koegzistenciju s bakterijskim simbiontima koji su potrebni našem organizmu, a na drugu ruku onemogućava luminalnu penetraciju makromolekula i patogena (162). Oštećena mukozna barijera može pak rezultirati povećanom intestinalnom permeabilnošću (eng. *leaky gut*) koja dovodi do izlaganja luminalnom sadržaju i potiče imunološki odgovor koji dovodi do intestinalne upale. IBD pacijenti ispoljavaju nekoliko oštećenja u komponentama mukozne barijere, počevši od sastava mukoznog sloja do adhezijskih molekula koje reguliraju paracelularnu permeabilnost (162).

Smatra se da je intestinalna upala povezana s prethodno spomenutom smanjenom bakterijskom raznolikošću, specifično smanjenom raznolikošću i brojnošću *Bacteroidetes* i *Firmicutes* koljena i specifičnom redukcijom u brojnosti *Clostridium leptum* i *Clostridium coccoides* (163, 164). Poremećaj u sastavu mikrobiota možemo povezati s disfunkcijom mukozne barijere, specifično uočenom kod čvrstih veza (TJ) (prethodno spomenuti *leaky gut*), Slika 22.



Slika 22. Usporedba zdrave barijere s onom narušenog integriteta.
Mehanička kohezija ovih stanica i regulacija paracelularne permeabilnosti iona i malih molekula je osigurana putem tri tipa međustaničnih kompleksa - čvrste veze (*tight junctions*, TJ), adherentne/pojasne veze i dezmosomi. IBD pacijenti iskazuju povišenu paracelularnu permeabilnost sa dokumentiranim poremećajem TJ-ova. Prelagođeno prema (162).

Uočene su također značajne razlike u mikrobioti CB i UC pacijenata (99, 165).

U **Crohnovoj bolesti**, disbioza je povezana sa specifičnim bakterijskim vrstama među kojima je brojnost *Faecalibacterium prausnitzii* povezana s produljenjem remisije (165, 166). Disbioza u CB pacijenata je dobro okarakterizirana, s gubitkom bakterija iz *Firmicutes* koljena uključujući *Faecalibacterium prausnitzii,* butirat-proizvodeće bakterije u *Clostridium* klasteru IV (znan kao *Clostridium leptum* klaster). Butirat, kao glavni izvor energije za epitelne stanice kolona, smanjuje produkciju proupalnih citokina intestinalne mukoze. Smanjenje *F. prausnitzii* u mukoznim i fekalnim uzorcima jest najznačajniji pronalazak u CB-u (165, 166).

Još uvijek nije jasno da li je disbioza GIT-mikrobiota direktan uzrok upale u IBD-u ili je rezultat poremećenog okoliša GIT-a. Jedna studija je nastojala odrediti status mikrobiota u rano dijagnosticiranim CB slučajevima (167). Pokazane su jasne razlike u bakterijskim populacijama između zdrave kontrole i CB-pacijenata. Pacijenti s CB-om su imali povišenu brojnost *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, i *Fusobacteriaceae* porodica, te smanjenu brojnost redova *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* i *Clostridiales* u usporedbi s kontrolom. Ove razlike su uočene analizom uzoraka mukoze (a ne fecesa!) što može ukazati na veću važnost bakterija koje obitavaju u mukoznom sloju u etiologiji ove bolesti.

U **ulceroznom kolitisu** (UC) također je opisan pad raznolikosti enteričkih mikrobiota. Pronađeno je značajno smanjenje u *Bacteroides* i *Clostridium* (*C. coccoides* i *C. leptum*) rodovima u fekalnim uzorcima UC pacijenata. S druge strane, uočen je povećan broj *Enterococcus* roda i *Gammaproteobacteria* razreda. Od butirat-proizvodećih bakterija, uočen je pad u brojnosti *Firmicutes* koljena, *Roseburia hominis* i *F. prausnitzii* vrsta. Različite studije pak pokazuju različite rezultate u sastavu mikrobiota za vrijeme aktivne bolesti i remisije, no pokazano jest da se sastav fekalnih i mukoznih mikrobiota mijenja kroz progresiju UC-a (168). Također, mukolitička bakterija *A. muciniphila* jest imala smanjenu brojnost u UC-u i CB-u.

Još uvijek je nejasno da li uočeni rezultati vezano za disbiozu doprinose razvoju ili su pak posljedica UC-a. Studije pak ukazuju na ulogu mikrobiote u protuupalnim i imunoregulirajućim svojstvima koja mogu pomoći UC-pacijentima (168).

3.3.3.3. Kolorektani karcinom

Kolorektalni karcinom (CRC) je drugi najučestaliji karcinom u SAD-u koji sa javlja kod 140 000 ljudi godišnje i uzrokuje smrt kod 60 000 ljudi. Brojne publikacije predlažu ulogu GIT-mikrobioma u patogenezi kolorektalnog carcinoma (169-171). Jedinstveni uzročnik nije identificiran, ali brojne studije su ukazale na povezanost *Fusobacterium* roda sa CRC-om (170, 172, 173).

Kostic i suradnici (170) su koristili fluorescentu *in situ* hibridizacijsku analizu kojom su doveli u vezu *Fusobacteria* koljeno i CRC, identificirajući više tumora u ispitivanoj skupini od kontrolne. 16S rDNA sekvencirajuća analiza kolorektalnog mikrobioma je

identificirala tumorsko tkivo obogaćeno članovima *Fusobacterium* roda (*Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium mortiferum* i *Fusobacterium necrophorum*). Ove promjene su bile praćene širokim promjenama na razini bakterijskih koljena, uključujući značajnu redukciju u *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koljenima. Kostic i suradnici smatraju kako *Fusobacterium* spp. pridonosi tumorigenezi putem upalnog mehanizma. Kronična upala predstavlja čimbenik rizika za karcinogenezu, čime razvoj CRC-a čini mogućim. Druga studija (172) je koristila metagenomsko sekvenciranje i qPCR čime je potvrdila povezanost *Fusobacterium* roda i CRC-a: u usporedbi s normalnom kontrolom, ispitivana skupina je imala povećanu brojnost *Fusobacterium* sekvenci.

Fusobacterium je već prethodno spomenut u intestinalnoj patologiji IBD-a, a uočen je i u akutnom apendicitisu (174).

Chen i suradnici su uočili smanjenu brojnost *Clostridium* spp., *Roseburia* spp., *Eubacterium* spp. i drugih butirat producirajućih bakterija u fekalnim uzorcima adenoma subjekata u usporedbi s kontrolom (175). Butirat utječe na funkcije debelog crijeva poput modulacije motiliteta crijeva, povećava visceralni protok krvi, prevenira prerastanje patogenih bakterija, smanjuje upalu kolona, inducira apoptozu, inhibira progresiju tumorskih stanica i štiti od razvoja CRC-a.

Weir i suradnici potvrdili su smanjenu brojnost butirat producirajućih bakterija uočenih u Chenovom istraživanju i još dodatno uočili kako su određene bakterijske vrste prezastupljene u populaciji s CRC-om u usporedbi s kontrolom (176). Bakterije značajno zastupljenije u CRC pacijenata su one iz rodova *Acidaminobacter* (7.7 puta više u CRC pacijenata), *Phascolarctobacterium* (3.2 puta više u CRC pacijenata), vrste *Citrobacter farmeri* (4.6 puta više u CRC pacijenata) i *A. muciniphila* (3.6 puta više u CRC pacijenata). Također je uočeno kako su dva tipa mucina, MUC1 i MUC5AC prekomjerno izraženi u karcinomima kolona, što može objasniti pojačanu zastupljenost *A. muciniphila* kao posljedicu pojačane dostupnosti supstrata. *Citrobacter farmeri,* koji može koristiti citrat kao jedini izvor ugljika, spada u skupinu patogena poput *Salmonella* i *Shigella* koje imaju arilamin N-acetiltransferaznu aktivnost koja može biti uključena u aktivaciju kancerogena i metabolizam ksenobiotika (176).

Osim promjena u sastavu mikrobiota, predložen je drugi mehanizam ubrzanja razvoja tumora (177). Mikrobni produkti mogu penetrirati kroz oštećene barijere kolonskih tumora i time potaknuti upalu kroz imunološki odgovor nositelja čime se posljedično dovodi do većeg rasta tumora.

Iako spomenute studije ukazuju na doprinos kombinacije upalnog odgovora nositelja i utjecaja specfičnih mikroorganizama CRC-tumorigenezi, potrebno je još istraživanja u ovom polju.

3.3.4. Psihijatrijski poremećaji

Sve je više dokaza o ulozi mikrobioma u imunološkim, neuralnim i endokrinim putevima te „crijevno-moždana os“ sve više dobiva na značajnosti iako točni komunikacijski putevi nisu utvrđeni.

Disbioza i posljedična promjena u intestinalnoj permeabilnosti dovodi do stvaranja potentnih proupalnih endotoksina i njihovog širenja krvotokom. Lipopolisaharid (LPS) je jedna od takvih molekula i ima važan utjecaj u modulaciji CNS-a, povisujući aktivnost područja kontrole emocija poput amigdale (178). Također LPS dovodi do stvaranja upalnih citokina koji mijenjaju fiziološku aktivnost mozga, moduliranjem sinteze neuropeptida (179).

Prema postojećim dokazima (178-180), bakterijska infekcija perifernih tkiva potiče stanice urođene imunosti na lučenje proupalnih citokina koji djeluju na mozak na način da uzrokuju molekularne i bihevioralne poremećaje. Imunološki sustav prepoznaje bakterije pomoću receptora za prepoznavanje uzorka (od eng. *pattern recognition receptor*, PRR) koji prepoznaju evolucijski visoko konzervirane strukture patogena, tzv. molekularne uzorke povezane s patogenima (od eng. *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). TLR su najbolje okarakterizirana porodica PRR-ova koji su izraženi na površini stanice i ispoljavaju odgovor na patogene. Receptor odgovoran za prepoznavanje LPS-a na staničnom zidu gram-negativnih bakterija jest TLR4. Po vezivanju LPS-a za TLR4, započinje signalna kaskada koja rezultira otpuštanjem proupalnih citokina. U slučaju endocitoze LPS-a, dolazi do oslobađanja interferona tipa 1. Preko ovih imunoloških medijatora, LPS dovodi do znakova anksioznog i depresivnog ponašanja u glodavaca. U ljudi, simptomi anksioznosti i

depresije koreliraju s LPS izlaganjem i posljedičnim otpuštanjem citokina, a povišene razine IL-6 i INF-α koreliraju sa težinom simptoma depresije i anksioznosti (180).

Rhee i suradnici su naglasili važnost dvosmjerne komunikacije između probavnog sustava i mozga koja se odvija u zdravih i bolesnih pojedinaca s naglaskom na enterokromafine stanice. Signali generirani ovim putevima kao odgovor na intraluminalne stimulanse dolaze do živčanog sustava i snažno moduliraju moždanu aktivnost, uključujući percepciju boli, imunološki odgovor, kontrolu emocija i druge homeostatke funkcije (81).

Ova komunikacija je dvosmjerna i kontinuirana; CNS tako može utjecati na sastav mikrobiota i tako mijenjati permeabilnost crijeva, mijenjati motilitet i lučenje putem aktivacije HPA osi, autonomnog i neuroendokrinog sustava s dirketnim ujecajem na GIT-mikrobiote (81).

U nastavku ovog rada će se proučiti hipoteza utjecaja mikrobiote na razvoj psihijatrijskih poremećaja poput depresije i autizma.

3.3.4.1. Depresija

Depresija je poremećaj raspoloženja kojeg karakterizira skup raznih vrsta simptoma: kognitivnih (negativne misli i očekivanja, ponekad i misli samoubojstva, pad koncentracije, neodlučnost, mozganje, samokritičnost, beznadnost), ponašajnih (manjak aktivnosti, povlačenje), tjelesnih (gubitak apetita, ili pretjerani apetit, nesanica) i afektivnih (osjećaji: žalost, krivnja, anksioznost) i motivacijskih (gubitak interesa, tromost, sve je napor, odgađanje) koji svi skupa mogu sniziti manje ili više stupanj raspoloženja, ugrožavajući funkcioniranje pojedinca, odnosno njegovu sposobnost prilagodbe životu društva (181).

Depresija rezultira iz neuro-psihijatrijskih smetnji, imunološkog poremećaja, genetskih čimbenika i okolišnih čimbenika; također povezanost s GIT-mikrobiotama se ne može isključiti (181). Pomoću humoralnih puteva, mikrobiote mogu utjecati na CNS neurotransmisiju (*gut-brain axis*): demonstrirano je u GF miševa da se anksiozno ponašanje može umanjiti i modulirati nakon ponovnog uspostavljanja GIT-mikrobiota (182). Primjena *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus helvetucys*,

B. longum, *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) i *Lactobacillus farciminis* u miševa dovela je do poboljšanja u simptomima anksioznosti i depresije (183).

Promjena intestinalne permeabilnosti dovodi do povišenih razina LPS-a u krvi i aktivacije upale i imunog odgovora- pretpostavlja se da su ovi procesi uzročni čimbenik psihijatrijskih poremećaja poput depresije (184, 185). U prilog ovoj hipotezi ide studija Grigoleit i suradnika gdje je primjena LPS-a u zdravih osoba dovela do povišenih razina proupalnih citokina i plazma noradrenalina te više ekspresije depresije. (186).

Od provedenih kliničkih studija gdje se radila karakterizacija mikrobiote, uočena je povišena ekspresija *Alistipes* roda u pacijenata s depresivnim poremećajem (187).

3.3.4.2. Autizam i poremećaji ponašanja

Autizam je neurobiološki razvojni poremećaj mozga koje obilježavaju teškoće u socijalnim interakcijama, teškoće verbalne i neverbalne komunikacije, neuobičajeno ponašanje, ograničene aktivnosti i interesi te različite motoričke smetnje i stereotipije (181).

Već je 1998. godine Bolte uočio da je značajan postotak osoba s autizmom imao povijest ekstenzivne upotrebe antibiotika koji dovode do poremećaja u protektivnoj funkciji intestinalne mikrobiote. Obzirom na to, Bolte je pretpostavio postojanje subakutne, kronične infekcije intestinalnog trakta tetanusom kao moguće patogeneze autizma u određenih pacijenata (188).

Uzimajući u obzir hipotezu os mikrobiota-crijeva-mozak, Sandler i suradnici su smatrali kako promjena autohtonih GIT-mikrobiota dovodi do kolonizacije neurotoksin-producirajućih bakterija koje dijelom doprinose autističnoj simpatologiji (189).

Brojne studije (190-192) su uočile kako brojne vrste roda *Clostridium* (10 puta više) karakteriziraju kvalitativni sastav fekalnih uzoraka autistične djece. Karakterizacijom sastava mikrobiota, uočena je neravnoteža *Bacteroidetes* i *Firmicutes* koljena, s povišenom prisutnošću *Bacteroidetes* i drugih komenzala poput *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella, Ruminococcus* rodova i *Alcaligenaceae* porodice (193-197).

Tablica 4 (preuzeto iz 181) prikazuje usporedbu uočenih promjena GIT-mikrobiota u autizmu i depresiji.

Tablica 3. Usporedba promjena mikrobiote u psihijatrijskim poremećajima

Bolest	Promjene u mikrobioti
Autizam	Neravnoteža *Bacteroidetes*/*Firmicutes* omjera
	Povećanje *Bacteroidetes* koljena; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella, Ruminococcus* rodova i *Alcaligenaceae* porodice
Depresija	Povećanje u *Alistipes* rodu
	Negativna korelacija između brojnosti *Faecalibacterium* roda i težine bolesti

3.4. MODULACIJA MIKROBIOTE

Kako je već prikazano, sve je više dokaza koji ukazuju na ulogu mikrobiote u ljudskom zdravlju i bolesti. Iz toga možemo zaključiti da je modulacija mikrobiote jedna od strategija u liječenju kroničnih bolesti. Istraživani pristupi uključuju upotrebu prebiotika, suplementaciju probioticima, rekonstituciju bakterijske populacije fekalnim transplantatima ili upotrebu antimikrobnih lijekova u svrhu eliminacije patogena ili drugih vrsta manipulacije mikrobiotama na način da pomaže zdravlju nositelja.

3.4.1. Modulacija mikrobiote kroz probiotike i prebiotike

Prebiotici i probiotici postaju sve više popularni dodaci prehrani. **Prebiotici** su nutrijenti koji se koriste u poticanju rasta korisnih komenzala te imaju potencijal poboljšanja GI-zdravlja. **Probiotici** se definiraju kao živi mikroorganizmi, preferencijalno ljudskog podrijetla, koji po ingestiji u specifičnom i dovoljnom broju doprinose zdravlju nositelja nespecifičnim korisnim učincima. **Simbiotik** čini kombinacija probiotika i prebiotika (198).

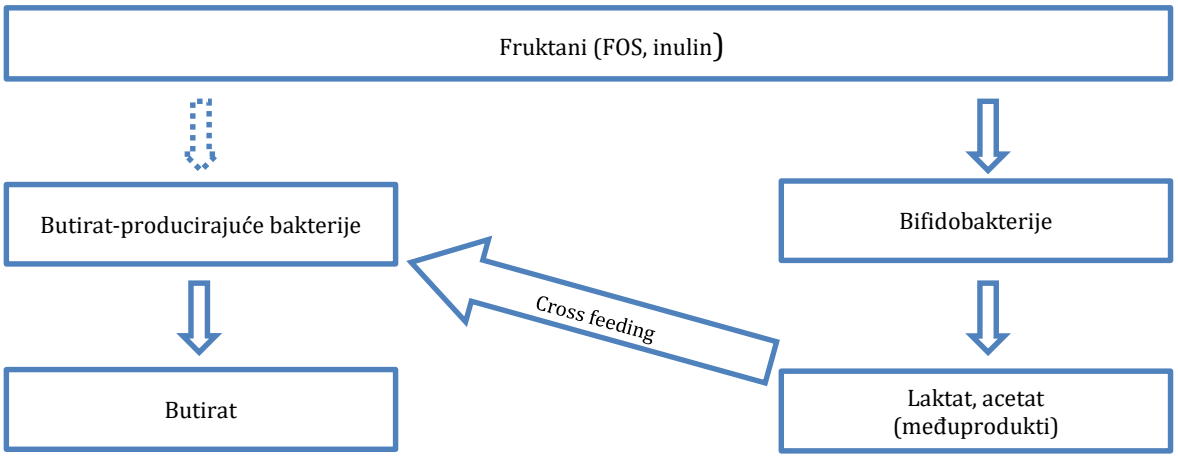
Trenutno široko korišteni u GIT poremećajima, probiotici ispoljavaju svoje terapijske učinke interakcijom na različitim razinama u rekonstituciji gastrointestinalne barijere. Uz direktni učinak na sastav GIT-mikrobiota, probiotici moduliraju GIT barijeru povećanjem produkcije mucina u vrčastim stanicama (*goblet cell*), ojačanjem međustaničnih veza (čvrste veze, TJ) i apikalne intercelularne adhezije (181) te drugim mehanizmima obrađenim u ranijim poglavljima.

Probiotici su također uključeni u modulaciju imunološkog i upalnog odgovora poticanjem stvaranja regulatornih T-limfocita. Mogu regulirati T_H1 odgovor inhibicijom produkcije pro-inflamatornih citokina u dendritičkim stanicama (IL-12, TNF-α, INF-α) ili povećanom ekspresijom anti-inflamatornih medijatora poput IL-10 ili β-TFGF (181).

PREBIOTICI

Sva hrana koja je neprobavljiva u gornjem dijelu GIT-a postaje dostupna za fermentaciju anaerobima u kolonu. Supstrati koji se široko primjenjuju u sastavu prebiotika čine inulin, frukto-oligosaharidi (FOS), galakto-oligosaharidi (GOS) te laktuloza. Brojni drugi prebiotici na bazi škroba i oligosaharida s raznolikošću monomernih jedinica su trenutno u istraživanju i razvoju. Anaerobne bakterije kolona selektivno fermentiraju ove spojeve, tj. mogu koristiti samo specifične prebiotike za svoj rast stoga ne postoji univerzalni prebiotik koji se može koristiti (198).

Brojne publikacije demonstriraju povećanje u broju bifidobakterija nakon suplementacije fruktanima varirajućih duljina lanaca. Također je pokazan rast u količini fekalnog butirata nakon FOS suplementacije. Bifidobakterije produciraju laktat, a ne butirat kao fermentacijski produkt, što ukazuje na kompleksnost ovakve intervencije. Mogući mehanizmi uključuju interakciju bifidobakterija s drugim članovima mikrobiota. Smatra se kako se laktat kojeg su proizvele bifidobakterije koristi za prehranu drugih, butirat-producirajućih bakterija. Također, neke butriat-producirajuće bakterije mogu koristiti fruktane za rast. Ovakva interakcija se naziva ukrižano hranjenje (od eng. *cross feeding*, Slika 23, prilagođeno prema [198]).



Slika 23. Ukriženo hranjenje (cross feeding)

Druga važna činjenica jest da nemaju sve vrste i sojevi bifidobakterija jednaku sposobnost razgradnje prebiotičkih supstrata. Iako govorimo o suptilnim razlikama, one dobivaju na važnosti činjenicom da većina je dječjih nadomjesnih mliječnih formula suplementirana GOS-om, a i istraživanja su pokazala kako ovo povisuje brojnost bifidobakterija u usporedbi s djecom koja su hranjena formulama bez ovog prebiotika (198).

Znanje o disbiozi i poremećaju brojnosti specifičnih bakterijskih vrsta u određenoj bolesti otvara mogućnost ciljane primjene prebiotika. Da bi se mogao iskoristiti ovaj potencijal, potrebno je razjasniti ulogu mikrobioma u razvoju bolesti te razumjeti posljedice povećanja određene bakterijske populacije ovakvom intervencijom.

Potencijalne bakterijske mete prema autorima uključuju (198):

Akkermansia muciniphila (*A. muciniphila*): smanjena brojnost je uočena u diabetesu, pretilosti i IBDu (vidi prethodna poglavlja) te je u miševa moguće povisiti brojnost u fekalnom uzorku suplementacijom bezglutenskom dijetom. No visoka razina *A. muciniphila* (4 puta viša razina) je pronađena u pacijenata s kolorektalnim karcinomom u usporedbi sa zdravom kontrolom. Iz tog razloga je još nejasno koje bi bile posljedice za zdravlje u slučaju poticanja rasta ove mucin-producirajuće bakterije(198).

Ruminococcus bromii (*R. bromii*) je ključna vrsta u razgradnji nerazgradivog škroba (*resistent starch,* RS). Pokazano je da *R. bromii* radi inicijalnu razgradnju škroba, otpuštajući mono- i oligosaharide koji djeluju kao supstrati za druge bakterije. Poticanje rasta ovakvih primarnih razgrađivača polisaharida tako može utjecati na čitav sastav mikrobiota zbog već opisanog *cross-feeding*-a. No kako postoje 4 vrste nerazgradivog škroba (RS1-RS4), koji su strukturno i kemijski različiti, različite bakterije mogu u različitoj mjeri koristiti pojedine vrste škroba kao supstrat. Iz tog razloga potrebno je pomno odabrati vrstu škroba za selektivan rast bakterijskih vrsta jer su primjerice, RS2 i RS4 imali različit utjecaj na sastav mikrobiota u istoj studiji (198).

Roseburia/*Eubacterium rectale* (*E. rectale*) skupina butirat producirajućih bakterija su također bile značajno povišene na RS3 prehrani. Dokazano je da smanjenjem udjela ugljikohidrata u prehrani se može značajno utjecati na smanjenje brojnosti

Roseburia/*E. rectale* skupine te posljedično dovesti do niže produkcije butirata. Ova poveznica bakterijske produkcije metabolita i bakterijskog sastava je važna u razmatranju potencijalnih zdravstvenih učinaka prebiotika. Butirat-producirajuće bakterije su potencijalne mete u primjeni prebiotika s učinkom rasta ciljanih bakterija i porasta koncentracije butirata. Jedan od pronalazaka jest da butirat sudjeluje u poticanju apoptoze stanica karcinoma. Butirat producirajuće bakterije su pronađene u manjem broju u fekalnom uzorku pacijenata s kolorektalnim karcinomom, u usporedbi sa zdravom kontrolom (Poglavlje 3.3.3.3: Kolorektani karcinom) (198).

F. prausnitzii pokazuje odgovor na prebiotike koristeći fruktanske suplemente različitih duljina lanaca. *F. prausnitzii* također može koristiti pektin za rast što omogućava ciljanu primjenu pektina u poticanju rasta ove vrste. Kako je već prethodno spomenuto, brojnost *F. prausnitzii* je smanjena u Crohnovoj bolesti, a kako je pokazano da ova bakterija ima protuupalna svojstva (posljedica stvaranja butirata), možemo ju smatrati jakom metom za terapiju CB-a (198).

Oxalobacter formigenes (*O. formigens*) jest ključna bakterija u degradaciji oksalata u ljudi. Akumulacija oksalata je glavni čimbenik u formaciji bubrežnog kamenca. Pacijenti koji pate od bubrežnih kamenaca sastavljenih od kalcijevog oksalata (CaC_2O_4) su u manjoj mjeri kolonizirani *O. formigenes* vrstom. Ova bakterija pokazuje pojačanu osjetljivost na brojne antibiotike, stoga je manje brojna u ljudi koji su se podvrgnuli antibiotskoj terapiji tijekom života. Još uvijek nisu identificirani specifični supstrati koji bi se mogli ciljano primjeniti u poticanju rasta ove vrste iako čini zanimljivu potencijalnu metu (198).

Postoje i druge potencijalne bakterijske mete (198) koje su pokazale smanjenu brojnost u određenim bolesnim stanjima te nude ciljanu metu za probiotičku primjenu. Možemo izdvojiti smanjenu brojnost vrsta unutar roda *Bacteroides*, uključujući *B. vulgatus* u pedijatrijskih IBS pacijenata, te smanjenje butirat-producirajućih bakterija povezanih sa dijabetesom tipa II.

PROBIOTICI

Bakterije laktatne kiseline su se inicijalno koristile u konzerviranju mlijeka zbog njihove dostupnosti. Dodatna prednost je bila povećana probavljivost kao posljedica fermentacije mlijeka u jogurt laktobacilima. Jogurt je tako predstavljao oblik konzervirane i probavljive prehrane. Jogurt je također korišten u liječenju proljeva. Prema legendi, francuski kralj François Prvi, je izliječen od kroničnog proljeva upotrebom turskog jogurta. Taj koncept da neke bakterije mogu pružiti određene pogodnosti za zdravlje i liječiti bolesti doveo je do razvoja probiotika (198).

Trenutno najšire korištene skupine probiotika korištenih u ljudskoj prehrani i suplementaciji te životinjskim napojima predstavljaju lakobacili, streptokoki i bifidobakterije. Štoviše, kvasac *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) te specifičan soj *E. coli*, soj Nissle, su često korišteni. Europska agencija za sigurnost hrane (od eng. *European Food Safety Authority*, EFSA) je prepoznala pozitivne učinke različitih probiotika korištenih kao komponenti životinjskih napoja za brojne bakterije, no za primjenu u ljudi, jedino je prihvaćen učinak na probavu laktoze. Ipak, raste broj dokaza o pozitivnim učincima specifičnih probiotika ili kombinacije sojeva u primjeni kod različitih bolesti. Ti pozitivni učinci mogu biti ili direktna posljedica djelovanja probiotičke bakterije ili indirekni učinak zbog interakcije s komenzalnom mikrobiotom (198).

Mehanizmi kojima probiotici mogu pozitivno utjecati na zdravlje nisu potpuno razjašnjeni, ali su opisane četiri generalne prednosti primjene (198):

- Supresija rasta ili epitelnog vezanja/invazije patogenim bakterijama
- Poboljšanje intestinalne barijerne funkcije
- Modulacija imunološkog sustava. Nekoliko probiotičkih vrsta i njihovi produkti induciraju protektivne citokine (IL-10 i TGF-β, transformirajući faktor rasta-β) te suprimiraju proupalne citokine (TNF, tumor nekrotizirajući faktor) u mukozi pacijenata s upalom ilealnog spremnika (pouchitis), UC-om, CB-om
- Modulacija percepcije boli. Neki *Lactobacillus* sojevi induciraju ekspresiju mikro-opioidnih i kanabinoidnih receptora u intestinalnim epitelnim stanicama i posreduju analgetskim funkcijama u probavnom traktu slično djelovanju morfina.

Probiotici se razlikuju u svojoj sposobnosti rezistencije na želučanu kiselinu i žućne kiseline, kolonizaciji intestinalnog trakta i utjecaju na lučenje citokina od intestinalnih epitelnih stanica. Nisu svi probiotici slični te pogodnosti uočene u jednoj bakterijskoj vrsti ili kombinacijama vrsta se ne može generalizirati na druge (198).

Prva znanstvena studija koja je izvijestila o kapacitetu pozitivnih učinaka na zdravlje živućih bakterija još je iz 1980tih i vezana za probavu laktoze. Izdisajni test je jednostavna metoda u praćenju neprobavljivosti laktoze te su Levitt, Savaiano i njihov tim demonstrali kako živuće bakterije u jogurtu (*Lactobacillus bulgaricus* [*L. bulgaricus*] i *Streptococcus thermophilus* [*S. thermophilus*]) mogu kompenzirati nedostatak laktaze u odraslih (199). Ovaj učinak je potvrđen od drugih grupa u brojnim zemljama koje su reportirale varijabilno, ali značajno smanjenje laktoza malabsorpcije u osoba koje konzumiraju jogurt. Bakterije same posjeduju enzimatsku aktivnost probavljanja laktoze. Ipak, laktaza nije jedini enzim koji sudjeluje u razgradnji što potvrđuje činjenica kako učinkovitost različitih sojeva laktobacila (mjereno izdisajnim testom) nije proporcionalna njihovoj laktoza-aktivnosti prema broju jedinica za formiranje kolonija (od eng. *colony forming unit*, CFU). Vjerojatno i drugi enzimi igraju ulogu, poput permeaze koja je uključena u influks laktoze u bakterije (198).

Još jedna enzimatska aktivnost bakterija koja može doprinjeti ljudskom zdravlju jest razgradnja oksalata. Već spomenuta bakterija *O. formigenes* ima mogućnost razgradnje oksalata u lumenu crijeva čime smanjuje apsorpciju oksalata, izlučivanje oksalata u urinu i time i rizik formiranja bubrežnih kamenaca. *O. formigenes* je primjer mogućeg probiotika sljedeće generacije – ovo je komenzalna bakterija koja živi u crijevu te ima definirane učinke na zdravlje. Drugi primjeri uključuju *A. muciniphila, R. bromii te F. prausnitzii* vrste. Kultiviranje ovih anaerobnih bakterija na industijskoj razini još uvijek predstavlja tehnološki izazov, te nedostaju daljnja istraživanja koja bi potvrdila sigurnu primjenu u ljudi stoga je još uvijek potebno uložiti napore u razvoj specifičnih probiotika (198).

Već je dulje vremena poznato da brojni mikrobni sojevi, uključujući komezale GIT-a, mogu producirati neurotransmitere te je postojanje crijevno-moždane osi dokazano. Brojni GIT-komenzali (klostridije, *Desulfovibrio*, *Sutterella*, *B. fragilis*, te metabolički

produkti poput propionske kiseline) su povezani s promjenama u ponašanju, uključujući poremećaje iz autističnog spektra. Naziv „psihobiotik“ je predložen da opiše klasu probiotika važnih u psihijatriji (200).

Drugi mehanizam djelovanja nekih probiotika jest utjecanjem na postojeće mikrobiote na sljedeće načine (201):

1) Privremeno zamjenjujući dio mikrobiota koje nedostaju
2) Suplementiranje endogene populacije
3) Stimuliranjem (dijela) postojećih mikrobiota.

Određeni sojevi probiotika mogu lučiti antibiotiku-slične čimbenike koji preveniraju lokalizirani rast potencijalnih konkurenata. Sposobnost probiotika da učinkovito koriste niše u probavnom traktu za rast i koriste dostupne izvore energije mogu spriječiti rast egzogenih mikroorganizama i smanjiti dostupnost supstrata patogenima. Ovaj mehanizam je vjerojatno uključen u prevenciji ponavljajućeg proljeva uzrokovanog *C. difficile* infekcijom tijekom ili nakon primjene antibiotika. Korištenje antibiotika ostavlja dugoročne posljedice na mikrobiotu te je pokazano kako primjena probiotika tijekom terapije antibioticima smanjuje stupanj poremećaja u mikrobiotama (198).

Probiotici stupaju u interakciju s epitelnim stanicama i drugim stanicama u ljudskom tijelu na isti način kao i komenzalne mikrobiote- fizičko-kemijskim i imunološkim signalima. Na taj način moguće je promjeniti sastav mukusa kojeg luče kolonociti ili promijeniti njihovu gensku ekspresiju, ili pak ojačati međustanične veze između epitelnih stanica i tako smanjiti permeabilnost patogena. Isto tako moguća je modulacija direktnih i indirektnih učinaka GIT-mikrobiote na lokalne imunološke i upalne sustave, utišavanjem stimulacije upalnih ili imunoloških odgovora (198).

Dodatni mehanizam kojim probiotici djeluju na ljudsko zdravlje je modifikacijom ekspresije funkcija već postojećih mikrobiota (ili njihovih djelova). Neki probiotici mogu promijeniti enzimatsku aktivnost GIT-mikrobiota: primjerice dušićni metabolizam koji se reflektira kroz urinarnu koncentraciju p-krezola, ili utjecaj na glukozidaze, žućne hidrolaze, ili azoreduktaze. Čak i bez ikakvih detektiranih promjena u sastavu fekalnih mikrobiota na njihove metaboličke aktivnosti se može utjecati probiotikom na što

ukazuju alati koji se koriste u proučavanju mikrobiota, poput genomike i metabolomike, koji mogu identificirati takve specifične promjene (198).

Potrebno je naglasiti kako većina studija mikrobiota koristi fekalni materijal kao izvor. Vjerojatno je da probiotici uglavnom djeluju u tankom crijevu gdje je niska koncentracija mikrobiota i gdje unošenje 10^8 probiotičkih bakterija po gramu (prosječna koncentracija probiotika u fermentiranom mlijeku i dodacim prehrani) predstavlja značajan porast. Probiotici će vjerojatno utjecati na raznolikost i bogatstvo mikrobiota tijekom svog prolaska GIT-om. U debelom crijevu, probiotičke bakterije će biti brojčano nadmašene od strane endogenih bakterija, ali i dalje mogu ispoljiti direktni i indirektni utjecaj na zdravlje (198).

3.4.1.1. Modulacija mikrobiote u alergijskih bolesti probioticima

Probiotici imaju potencijal smanjenja intestinalne permeabilnosti i smanjenja stvaranja proupalnih citokina koji su povišeni u pacijenata s alergijskim poremećajima. Ipak, definitivna uloga probiotika u alergijskim stanjima ostaje nedokazanom jer su primjerice probiotičke intervencije bile neuspješne u prevenciji astme, no obećavajući rezulatati su pokazani kod prevencije atopijskog dermatitisa (egzem). Preventivni učinci kod egzema su primarno uočeni u studijama gdje je kombinirana pre- i postnatalna primjena probiotičkih laktobacila, ali prenatalna probiotička suplementacija nije dana sve do trećeg trimestra trudnoće. No, sigurnost u dokaze jest niska po gradaciji (*Grading of Recommendation Assessment Development and Evaluation approach*). Ako je prenatalna izloženost mikroorganizmima potrebna za preventini utjecaj, korištenje probiotika tijekom zadnjeg trimestra (kada se razvijaju cirkulirajući fetalni T-limfociti) može imati važan utjecaj u prevenciji alergije i astme (21).

Rezultati nedavne meta-analize indiciraju kako je prenatalna i postnatalna primjena probiotika (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) djelotvorna u smanjenju rizika od atopije, pogotovo u obitelji s visokim alergijskim rizikom, te rizikom preosjetljivosti u male djece. Prema analizi podskupina (*subgroup analysis*), probiotici primjenjeni majci i djetetu ili pak dulje trajanje intervencije se pokazalo učinkovitijim u prevenciji atopije (201). Obzirom na rezultate analize, buduća ispitivanja bi trebalo usmjeriti na optimalno doziranje, trajanje terapije i optimiziranje probiotičkih sojeva.

3.4.1.2. Modulacije mikrobiote u metaboličkih poremećaja probioticima

Meta analiza provedena u 2015. godini pokazala je ograničene pogodnosti primjene probiotika na gubitak težine u pretilih osoba te je primjena probiotika ocijenjena kao neučinkovita u gubitku težine (202).

Meta-analiza iz 2015. godine vezana za dijabetes tipa 2 i primjenu probiotika pokazala je značajno smanjenje HbA1c razina i *homoeostasis model assessment-estimated insulin* (HOMA-IR). Suplementacija probiotikom pak nije imala značajan utjecaj na glukozu u krvi natašte, inzulin, C-reaktivni protein (CRP) razine ili lipidni profil. Ova meta-analiza pokazuje kako probiotička suplementacija može donekle poboljšati metaboličku kontrolu u pacijenata s dijabetesom tipa 2 (203).

Kliničke studije obuhvaćene meta-analizom iz 2016. godine vezano za uprotebu probiotika i dijabetes, pratile su promjene u glukozi, HbA1c, inzlinu i HOMA-IR. Meta-analiza nije pokazala značajnu skupnu srednju razliku (*pooled mean difference*) između probiotika i placebo skupine na redukciju inzulina i HOMA-IR. Meta-regresijska analiza je identificirala značajne učinke probiotika na smanjenje glukoze, HbA1c, inzulina i HOMA-IR u pacijenata s dijabetesom, ali ne i u pacijenata s drugim rizičnim čimbenicima. Zaključno, autori predlažu upotrebu probiotika kao važnog prehrambenog dodatka s učinkom na snižavanje glukoze i metaboličkih čimbenika vezanih uz dijabetes (204).

Pretilost i T2DM su karakterizirani promijenjenim GIT-mikrobiotama, upalom i poremećajem intestinalne barijere. *A. muciniphila* je bakterija koja razgrađuje mucin i obitava u mukoznom sloju GIT-a. Prisustvo ove bakterije inverzno korelira s tjelesnom težinom u glodavaca i ljudi. Međutim, precizna fiziološka uloga ove bakterije u pretilosti i metaboličkih poremećaja je nepoznata (145). Studija Everard i suradnika (145) je uočila da je brojnost *A. muciniphila* vrste smanjena u pretilih i T2DM miševa. Također je uočeno kako prebiotički suplementi normaliziraju brojnost *A. muciniphila* vrste što korelira s poboljšanjem metaboličkog profila. Također probiotička suplementacija *A. muciniphila* vrstom povoljno je utjecala na metaboličke poremećaje inducirane visoko-masnom dijetom, uključujući dobivanje na težini (masti), metaboličku endotoksemiju, upalu adipoznog tkiva i inzulinsku rezistenciju. Primjena *A. muciniphila*

vrste povisuje razinu intestinalnih endokanabinoida koji kontroliraju upalu, GIT barijeru i lučenje GIT peptida. Studija je također demostrirala kako su za sve te pozitivne učinke potrebne živuće *A. muciniphila* stanice, jer toplinom-ubijene stanice ne utječu na metabolički profil niti na debljinu mukoznog sloja. Rezultati ove studije idu u prilog hipotetskom razvoju terapije koji koristi *A. muciniphila* vrstu u prevenciji ili liječenju pretilosti te pretilošću-povezanih metaboličkih poremećaja (145).

3.4.1.3. Modulacija mikrobiote u konstipacije i dijareje probioticima

Upotreba probiotika kod proljeva je opisana u smjernicama Svjetske organizacije za gastroenterologiju (od eng. *World Gastroenterology Organisation*, WGO). Njihove preporuke po pitanju proljeva različite etiologije su sljedeće (205):

PROBIOTICI ZA LIJEČENJE AKUTNOG PROLJEVA

Potvrđeno je da različiti su probiotički sojevi, uključujući *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii* CNCM I-745, *L. reuteri* DSM 17938 (razina dokaza Ia i IIa), korisni u smanjenju ozbiljnosti i skraćivanju trajanja akutnog infektivnog proljeva u djece. Oralna primjena probiotika skraćuje trajanje akutnog proljeva u djece za otprilike jedan dan (205).

Nekoliko meta-analiza kontroliranih kliničkih ispitivanja je objavilo rezultate koji utvrđuju sigurnost primjene i učinkovitost probiotika. Dokazi vezano za viralni gastroenteritis su jači nego za bakterijske i parazitske infekcije. Mehanizmi djelovanja su specifični za svaki soj: postoje dokazi o učinkovitosti nekih sojeva laktobacila (*Lactobacillus casei* GG [*L. casei* GG], *L. reuteri* ATCC 55730) te za *S. boulardii.* Također je važno obratiti pozornost na vrijeme primjene probiotika (205).

Prema Cochrane dokazima (iz 2010. godine), probiotička terapija (u kombinaciji s rehidracijskom otopinom) pokazala se sigurnom i korisnom u skraćivanju trajanja i smanjenju frekvencije stolica u akutnom infektivnom proljevu. Probiotici su skratili trajanje proljeva za 25 sati, smanjili rizik za proljevom trajanja četiri ili više dana za 59% i rezultirali jednom dijarealnom stolicom manje na dan 2 intervencije. Ipak potrebno je još istraživanja za razvoj ciljane probiotičke terapije za specifične grupe pacijenata.

PREVENCIJA AKUTNOG PROLJEVA

U prevenciji proljeva u djece i odraslih, postoje nagovještaji da su *Lactobacillus* GG, *L. casei* GN-114 001 i *S. boulardii* učinkoviti u određenim uvjetima (205).

ANTIBIOTIKOM UZROKOVAN PROLJEV

Postoje jaki dokazi o učinkovitosti *L. casei* DN-114 001, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* CL1285, *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii* CNCM I-745, *L. acidophillus* NCFM, *L. paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium lactis* (*B. lactis*) Bi-07, *B. lactis* BI-04, Ecologic® AAD (*B. bifidum* W23, *B. lactis* W18, *B. longum* W51, *Enterococcus faecium* [*E. faecium*] W54, *L. acidophilus* W37 i W55, *L. paracasei* W72, *L. plantarum* W62, *L. rhamnosus* W71 i *L. salivarius* W24) i *L. reuteri* DM 17938 u odraslih i djece koji primaju antibiotsku terapiju. Studije su pokazale kako su *L. acidophillus* CL1285, *L. casei* LBC80R, *L. casei* DN-114, *L. bulgaricus* i *S. thermophilus* učinkoviti u hospitaliziranih odraslih pacijenata u prevenciji *C. difficile* proljeva. (205).

Kod liječenja *C. difficile* kolitisa, Cochrane napominje kako još nema dovoljno dokaza koji bi preporučili probiotičku terapiju umjesto antibiotske u liječenju *C. difficile.*

RADIJACIJOM UZROKOVAN PROLJEV

Probiotici mogu biti korisni u prevenciji i potencijalno korišteni u liječenju radijacijom uzrokovanog proljeva. GIT-mikrobiote vjerojatno igraju važnu ulogu u ovoj vrsti proljeva, jačajući barijernu funkciju crijeva, utjecajem na urođenu imunost i stimulacijom mehanizama intestinalnog cijeljenja (205).

KONSTIPACIJA I OPSTIPACIJA

Dokazi skupljeni do sada kod konstipacije i opstipacije ukazuju na povišenje frekvencije stolica, konzistencije stolice i peristaltike crijeva nakon primjene probiotika. *B. bifidum* (KCTC 12199BP), *B. lactis* (KCTC 11904BP), *B. longum* (KCTC 12200BP), *L. acidophilus* (KCTC 11906BP), *L. rhamnosus* (KCTC 12202BP) i *S. thermophilus* (KCTC 11870BP) pokazali su pozitivne učinke. Da bi se probiotici mogli preporučiti kod konstipacije i opstipacije, potrebno je provesti više većih kliničkih ispitivanja. Od prebiotika, učinkovitima su se pokazali laktuloza, olgofruktoza te FOS. (205).

3.4.1.4. Modulacija mikrobiote u netoleranciji laktoze probioticima

Prema smjernicama WGO-a u primjeni prebiotika i probiotika (205), *S. thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pospješuju probavu laktoze i ublažavaju simptome laktoza netolerancije. Ovo je također potvrđeno brojnim kontroliranim studijama konzumacije jogurta sa živućim kulturama.

3.4.1.5. Modulacija mikrobiote u IBD-a probioticima

Prema smjernicama WGO-a u primjeni prebiotika i probiotika (205), dokazi su sljedeći za upalne bolesti crijeva:

UPALA ILEALNOG SPREMNIKA (POUCHITIS)

Postoje dobri dokazi o korisnosti probotika u prevenciji inicijalnog napadaja upale ilealnog spremnika (upotrebom VSL#3; probiotičke mješavine registrirane pod zaštićenim nazivom Vivomixx® sastava: *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis* i *Streptococcus thermophilus*) i u prevenciji daljnjih relapsa nakon indukcije remisije antibioticima. Probiotici mogu biti preporučani u pacijenata s blagom upalom ilealnog spremnika ili kao terapija održavanja u pacijenata u remisiji (205).

ULCEROZNI KOLITIS

Prema Cochrane sistematskom pregledu iz 2007. godine, kod aktivne bolesti konvencionalna terapija kombinirana s probiotikom ne poboljšava izglede ulaska u remisiju u pacijenata s blagim do umjerenim UC-om. Ipak postoje ograničeni dokazi vezano za aktivnu bolest koji tvrde kako dodatak probiotika standardnoj terapiji može dovesti do umjerenih pogodnosti poput smanjenja aktivnosti bolesti u pacijenata s blagim do umjerenim UC-om. No jesu li probiotici učinkoviti u pacijenata s teškom i proširenijim oblikom bolesti te da li se mogu koristiti kao alternativa standardnoj terapiji još nije poznato zaključuje Cochrane.

Cochrane dokazi također ne idu u prilog održavanju remisije probioticima (pregled iz 2011. godine). Zaključuju kako nema dovoljno dobro dizajniranih studija, a trenutni pregled pokazuje kako primjena probiotika primjenjen uz terapiju mesalazinom je jednako učinkovit kao placebo.

Nasuprot tomu, prema novim WGO smjernicama (205), određeni probiotici su pokazani kao sigurni i jednako učinkoviti poput konvencionalne terapije u blagom i umjerenom UC-u. Probiotik *E. coli* Nissle 1917 soja mogao bi se smatrati ekvivalentom mesalazinu u održavanju remisije UC-a. Probiotička mješavina VSL#3 (Vivomixx®) je pokazala učinkovitost u indukciji i održavanju remisije u djece i odraslih s blagim do umjerenim UC-om (205).

Probiotici za koje ima najviše dokaza su *E. coli* Nissle 1917, *Bifidobacterium*, *L. rhamnosus* GG te VSL#3 (205).

Vjerojatan mehanizam djelovanja probiotika u UC-u jest direktan protuupalni učinak, te jačanje mukozalne barijere i smanjenje intestinalne permeabilnosti jačanjem međustaničnih veza. Drugi potencijalni mehanizam jest obnavljanje butirat-producirajućih bakterija: UC pacijenti imaju smanjenu brojnost vrsta poput *F. prausnitzii* te suplementacija butirat-producirajućim probioticima se pokazala učinkovitom u eksperimentalnim modelima (205).

CROHNOVA BOLEST

Studije s probioticima su bile razočaravajuće te do je sada na Cochrane sistematičnim pregledima zaključak bio kako nema dovoljno dokaza koji podkrepljuju pozitivan učinak primjene probiotika u aktivnom CB-u kao ni u održavanju remisije (205).

3.4.1.6. Modulacija mikrobiote u sindroma iritabilnog kolona (IBS) probioticima

Prema smjernicama WGO-a u primjeni prebiotika i probiotika (205), nekoliko je studija pokazalo značajan terapeutski učinak probiotika u usporedbi s placebom. U studijama je primjećeno smanjenje flatulencije i nadutosti kao rezultat primjene probiotika, a neki sojevi su imali i učinak na smanjenje boli i pružili su dodatno olakšanje (*B. bifidum* MIMBb75, *L. plantarum* 299v (DSM 9843), *L. rhamnosus* NCIMB 30174, *L. plantarum* NCIMB 30173, *L. acidophilus* NCIMB 30175, *E. faecium* NCIMB 30176, *B. infantis* 35624, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 i drugi). *L. reuteri* može olakšati simptome kolika unutar jednog tjedna primjene probiotika u djece. Zaključno, smatra se kako određeni probiotici mogu olakšati simptome osoba s funkcionalnom abdominalnom boli.

3.4.1.7. Modulacija mikrobiote u psihijatrijskih poremećaja probioticima

Pod pojmom psihobiotik smatramo korisne bakterije (probiotik) ili prebiotike koji utječu na komunikaciju bakterija-mozak. Psihobiotici iskazuju anksiolitički i antidepresivni učinak koji je karakteriziran promjenama u emotivnim, kognitivnim, sistematskim i neuralnim indikatorima. Bakterija-mozak komunikacijski kanali kojima psihobiotici iskazuju učinke obuhvaćaju enterički živčani sustav i imunološki sustav. Još uvijek nisu poznati odgovori doze i učinka te dugotrajne posljedice uzimanja psihobiotika (200).

Većina istraživanja na psihobioticima potječe od animalnih modela (glodavci) koji koriste induktore stresa i bihevioralne testove za procjenu motivacije, anksioznosti i depresije. Primjena psihobiotika na animalnim modelima bolesti, infekcije i neurodegeneracije može dati klinički uvid na ljudske bolesti. Translacija rezultata ispitivanja s glodavaca na ljude je robusna iako je potrebno još mnogo ispitivanja da bi se veze potvrdile i bolje objasnile. Dolje su navedeni rezultati sistematskog pregleda Sarkar i suradnika (211).

Jedna studija (206) je pokazala poboljšanje raspoloženja u generalno zdravom uzorku. Dvostruko slijepo istraživanje na zdravim ženama i muškarcima ispitivao se učinak konzumacije mješavine probiotika (*Lactobacillus helveticus* R0052 i *B. longum*) ili placeba tijekom 30 dana nakon čega se promatrao utjecaj na raspoloženje te se sakupljao 24-satni urin prije i nakon intervencije zbog procjene razine kortizola. U usporedbi na placebo, ispitanici tretirani probiotikom pokazali su pokazali značajan pad u samoprocjeni negativnog raspoloženja i tjeskobe. Također, razina slobodnog kortizola je bila niža od kontrolne skupine.

U drugom nedavnom ispitivanju (207), ispitanici su konzumirali placebo ili mješavinu probiotika (*Bifidobacterium bifidum* W23, *B. lactis* W52, *Lactobacillus acidophilus* W37, *L. brevis* W63, *L. casei* W56, *L. salivarius* W24 i *Lactococcus lactis* W19 i W58) tijekom četiri tjedna. U usporedbi s placebom, ispitanici tretirani probiotikom bili su manje skloni tužnom raspoloženju asesiranom Leiden indeksom skale osjetljivosti na depresiju.

L. casei Shirota je nedavno korišten u studiji akademskog stresa (208) gdje su ženski i muški studenti konzumirali probiotik ili placebo tijekom osam tjedana prije ispita. Probiotička skupina je pokazala značajno niži plazmatski kortizol u usporedbi s placebo skupinom dan prije ispita. Dva tijedna nakon ispita, probiotička je skupina pokazala značajno viši fekalni serotonin (psihološke implikacije ove promjene nisu jasne). Jedna druga studija (209) je pokazala kako u usporedbi s placebom, studenti atleti koji su uzimali *Lactobacillus gasseri* OLL2809 (LG2809) su pokazali bolje raspoloženje i smanjenu aktivnost NK stanica nakon vježbanja, s dodatnim pogodnostima smanjenog umora u slučaju konzumacije probiotika i α-laktalbumina. Ovi rezultati upućuju kako probiotici mogu poboljšati performanse u nekim životnim aktivnostima.

Koje su to neuralne i promjene procesuiranja informacija koje opisuju probiotikom inducirane prednosti na emotivnoj razini? Dokazi dolaze iz *neuroimaging* studije modulacije pozornosti i budnosti (vigilancije) na negativne emocionalne stimulanse. Tijekom četiri tjedna, zdravi ženski sudionici su konzumirali placebo ili mješavinu probiotika (*Bifidobacterium animalis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*, i *Lactococcus lactis*) ili pak nisu konzumirali ništa kao dio pasivne kontrole. Svi ispitanici su bili podvrgnuti funkcionalnoj magnetskoj rezonanciji (fMRI) da bi se odredilo kako konzumacija probiotika utječe na neuropsihološku aktinost. Tijekom snimanja, ispitanicima su pokazivane slike emotivnih lica (uglavnom slike straha) da bi se procijenila aktivnost mozga. U usporedbi s placebom, probiotička skupina je pokazala smanjenu aktivnost funkcionalne mreže povezane s emotivnim, somatosenzornim i interoceptivnim procesuiranjem, uključujući somatosenzorni korteks, *insula*-u i *substantia grisea centralis* (*periaqueductal gray*). Placebo skupina pokazala je povećanu aktivnost ovih regija kao odgovor na prikaz emotivnih lica (210). Ovo se može interpretirati kao probiotikom inducirano smanjenje reaktivnosti na emotivnu informaciju na neuralnoj razini.

Induktivni dokaz da psihobiotici moduliraju emocionalnu procjenu dobiven je od prve ljudske studije koja je ispitala psihofiziološke učinke prebiotika. Zdravi muški i ženski sudionici (n = 45) konzumirali su Bimuno® formulaciju galakto-oligosaharida (B-GOS), FOS, ili placebo. U usporedbi s drugim skupinama, B-GOS je pokazao značajno niži *cortisol waking response.* Povišene razine kortizola prilikom buđenja biomarker su

emocionalnih poremećaja poput depresije. Štoviše, ispitanici su bili podvrgnuti emotivnom *dot-probe* zadatku koji mjeri tzv. budnost (vigilancija), tj. pažnju na negativne podražaje koja se smatra bihevioralnim markerom anksioznosti i depresije. B-GOS je utišavao budnost, što se tumači smanjenom pozornošću i reaktivnošću prema negativnim emocijama. Utišana budnost smatra se posljedicom anksiolitičkiog i antidepresivnog utjecaja (211).

Psihobiotici mogu ispoljiti svoj pozitivan učinak na raspoloženje preko modulacije neuralne mreže povezane s emotivnom pažnjom. Smanjena pozornost prema negativnim stimulansima može biti jedan od neurokognitivnih kanala kroz koje psihobiotici poboljšavaju raspoloženje. Na sistematskoj razini, smanjenje kortizola i proupalnih citokina ide u prilogu tim procesima, obzirom da je povišena razina kortizola uočena kod lošeg raspoloženja (211). Ipak, dugoročna primjena psihobiotika nije istraživana isto kao ni posljedice takve primjene.

3.4.2. Modulacija mikrobiote kroz fekalne transplantate

Korištenje fecesa u lječenju bolesti je star koncept, prema nekima seže i do četvrtog stoljeća poslije Krista gdje su Beduini koristili zagrijani feces deve u liječenju dijareje (198).

Fekalna mikrobna transplantacija (FMT) postaje sve češći pristup u obnavljanju GIT-mikrobiota. Cilj FMT-a jest uvođenje stabilnih GIT-mikrobnih zajednica zdravoga donora i zamjena poremećene mikrobne populacije u bolesnog pojedinca. Opisane su četiri različite vrste fekalnih transplantata korištenih u medicini (198):

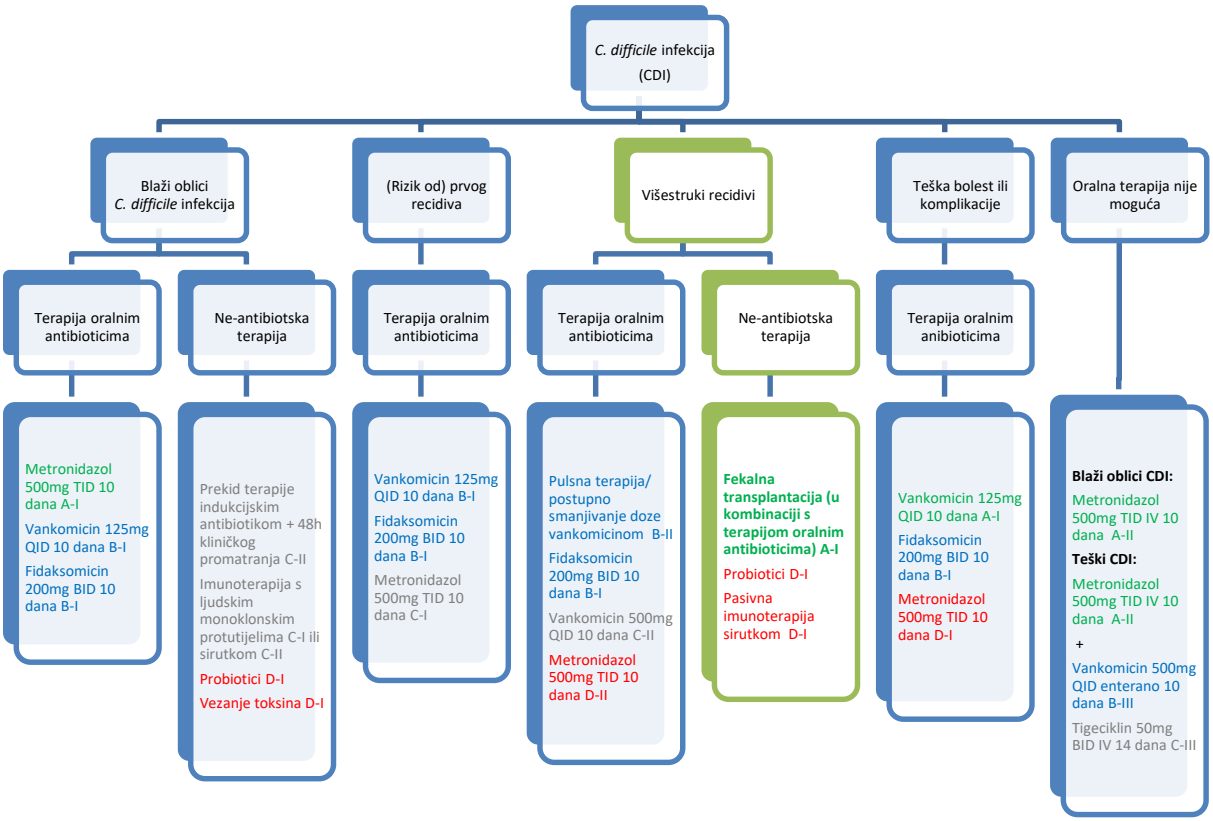
1) *Jedan donor* – najčešći pristup, donor je bliski rod ili prijatelj. Donor mora biti testiran na patogene i specifične bolesti.
2) *Više donora* – također je potrebno provesti ista testiranja kao i za jednog donora.
3) *Autologna fekalna transplatacija* – za ovu metodu, potrebno je sakupiti fekalni uzorak prije terapijske intervencije, idealno tijekom zdravog stanja te pravilno skladištiti do primjene. U većini slučajeva govorimo o pacijentima kojima je potrebna antibiotska terapija i pacijenata kojima je potrebna transplantacija matičnih stanica autologne koštane srži.

4) *Anaerobno kultivirani feces zdravog(ih) donora* – prednost ove metode jest što je testiranja potrebno provesti samo jednom, na početku ispitivanja te je moguće standardizirati uzorke do visokog stupnja.

Primjena FMT-a moguća je rektalno, putem kolonoskopskog katetera potom oro/nazalno, različitim protokolima koristeći duodenoskop ili nazo-duodenalnu sondu (198).

Najčešća upotreba FMT-a jest u liječenju antibiotikom uzrokovanog proljeva i *Clostridium difficile* infekcija pri neuspjehu stadnardnog liječenja (antibiotici). Uspješnost se pokazala uspostavljanjem remisije u do 92% slučajeva (212). Do danas, objavljeno je nekoliko preglednih radova i meta-analiza te randomiziranih kliničkih ispitivanja na ovu temu. Zaključci meta-analiza idu u prilog učinkovitosti primjene FMT-a u liječenju *C. difficile* infekcije, pokazujući visoku učinkovitost (uspješnost liječenja od 91.2% do 95%) i sigurnim, no istaknuta je potreba za daljnja istraživanja potvrde dugoročne učinkovitosti i sigurnosti ovog liječenja (213-216).

U svojim smjernicama (217), Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (od eng. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,* ESCMID) snažno preporučuje korištenje FMT-a u višestruko ponavljajućoj infekciji *C. difficile* (Slika 24, prilagođeno prema [217]).



Slika 24. Smjernice ESCMID-a u liječenju *C. difficile* infekcije.
BID-*bis in die* (lat.), dva puta dnevno; TID-*ter in die* (lat.), tri puta dnevno; QID-*quater in die* (lat.), četiri puta dnevno; IV-intravenozno. Prilagođeno prema (217).

Vezano za upalne bolesti crijeva (IBD) publikacije pokazuju dobre kratkotrajne rezultate, ali ne idu u prilog izlječenju (ulcerozni kolitis). Nekoliko studija vezano za ulcerozni kolitis (UC) ide u prilog uspostavljanju remisije, čak i u djece. Istraživanja koja bi pokazala učinak u Crohnovoj bolesti nema- nedavna studija je pokazala da u CB-u nedostaju određeni mikroorganizmi te da izostanak njihove funkcije doprinosi razvoju bolesti (198), stoga razvoj individualnih/specifičnih fekalnih transplantata otvara nove mogućnosti istraživanja terapije Crohnove bolesti. Trenutno nedostaje istraživanja (randomiziranih) na polju IBD-a koja bi doprinjela korištenju FMT-a u terapiji ovih bolesti.

Polje gdje bi FMT mogao imati potencijal razvoja jest na području metaboličkih bolesti i kardiovaskularnih poremećaja. Ako uzmemo u obzir da je moguće promijeniti sastav mikrobiota životnim navikama i prehranom, FMT možemo gledati kao terapijsku alternativu. No potrebna su kontrolirana istraživanja na ovom području. Jedna placebom-kontrolirana studija je pokazala kratkotrajne pozitivne učinke (povećanje

inzulinske osjetljivosti) nakon FMT intervencije u muškaraca s metaboličkim sindromom (218).

Uspješnost FMT terapije je ispitivana i na autoimunim i alergijskim bolestima, neurodegenerativnim poremećajima i kroničnom sindromu umora, te većina izvještaja pokazuje obećavajuće rezultate iako govorimo o malom broju ispitivanih pacijenata. Potrebna su daljna ispitivanja i randomizirane kliničke studije koje bi ispitale učinkovitost FMT-a u ovih bolesti (218).

Da bi se bolje razumjeli mehanizmi FMT-a, potrebno je više studija koje bi analizirale sastav mikrobiota prije i poslije FMT terapije. Ovakav dizajn studije bi pomogao u identifikaciji mikroorganizama (i njihovih produkata) povezanih s patogenezom bolesti. Podaci bi također pokazali da li FMT ima optimalan uspjeh u slučaju kada su mikrobiote desetkovane (kao što je slučaj u pseudomembranoznom kolitisu) te da li FMT ima pun potencijal zamjene već postojećih brojnih mikrobiota u disbiozi sa zdravim mikrobiotama (iz FMT uzorka) (198).

Pokazalo se kako je FMT generalno siguran s blagim i prolaznim nuspojavama te vrlo rijetkim ozbiljnim nuspojavama. Teorijski problem u primjeni FMT-a može biti u sadržavanju mikroorganizama koji mogu biti povezani s razvojem kroničnih bolesti, radi čega je potrebno dugotrajno praćenje svih subjekata u FTM studijama. Trenutno nema rezultata praćenja (198).

Regulatorne agencije trenutno imaju problema u klasifikaciji FMT-a. U Sjedinjenima Američkim Državama, Agencija za hranu i lijekove (od eng. *Food and Drug Administration*, FDA) klasificira fekalne mikrobiote kao lijek, radi čega je potrebno predati *investigational new drug* (IND) aplikaciju, no iznimka je napravljena za *C. difficile* infekcije. Za razliku od FDA, EMA nije učinila nikakvu klasifikaciju po tom pitanju. U međuvremenu, poštuju se smjernice ESCMID-a koji smatra kako je ljudsko biće superorganizam, a njegov mikrobiom integrirani dio tijela koji treba slijediti ista pravila kao primjerice kod krvne transfuzije (198).

3.4.3. Modulacija mikrobiote antimikrobnim lijekovima

Antibiotici su najstariji lijekovi korišteni u liječenju bolesti GIT-a. Široka uporaba antibiotika u posljednjih 80 godina spasila je milijune ljudskih života. No, mikroorganizmi simbionti obavljaju niz važnih funkcija i tek sada počinjemo shvaćati kako su antibiotici preoblikovali njihovu ekologiju i doveli do funkcionalnih posljedica. Postoji sve više dokaza koji ukazuju kako su antibiotici utjecali na funkciju imunog sustava, sposobnost odupiranju infekciji i našoj sposobnosti u procesuiranju hrane (219).

Njihova uporaba, pogotovo u infektivnim bolestima, dovodi do promjene u sastavu GIT-mikrobiota što kao posljedicu ima značajne nuspojave uzrokovane disbiozom poput pseudomembranoznog kolitisa ili povećane osjetljivosti na bolesti. Unatoč tim „kolateralnim žrtvama“, antibiotska terapija se potiče u liječenju iritabilnog sindroma kolona (IBS), upalnih bolesti crijeva u kojima modulacija GIT-mikrobiote dovodi do kliničkog poboljšanja (219).

Uz postojeće probleme sve većeg razvoja rezistencije, upotreba antibiotika značajno ometa ekologiju ljudskog mikrobioma. Disbioza mikrobioma onemogućuje mikrobiotama da obavljaju vitalne funkcije poput proizvodnje nutrijenata, vitamina i zaštitu od patogena (219). Disbioza je povezana s velikim brojem zdravstvenih problema od kojih su neki opisani u prethodnim poglavljima. Kako su brojni organski sustavi obuhvaćeni posljedicama disbioze, potrebno je preispitati nehotične posljedice upotrebe antibiotika, ali i uzeti u obzir ciljanu primjenu antibiotika kao sredstva u modulaciji mikrobiota. Nadalje su opisani neželjeni učinci primjene antibiotika na mikrobiote kroz različite razvojne faze ljudskog organizma.

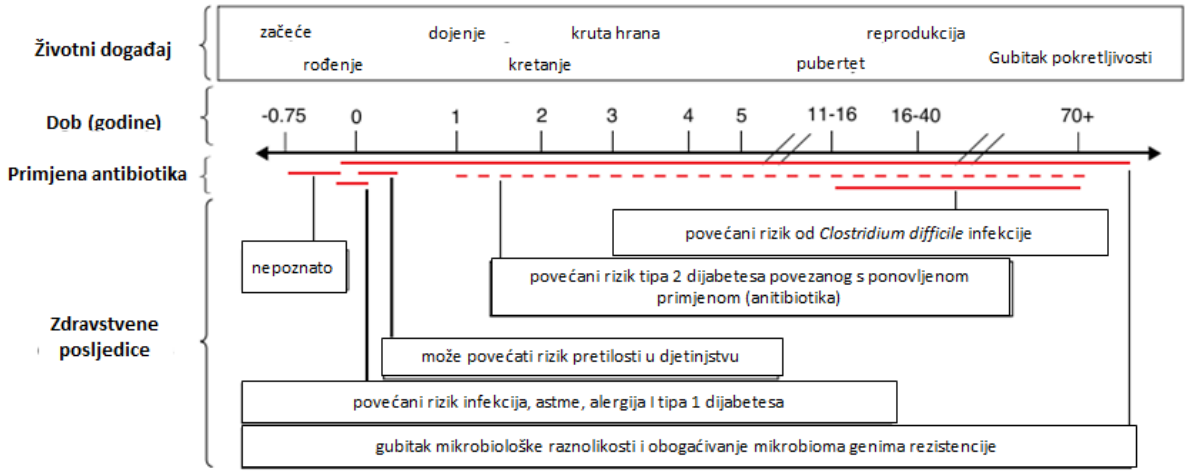
Kao što je već spomenuto u ranijim poglavljima, kritični period za sazrijevanje mikrobiota (i djeteta) dešava se tijekom djetinjstva te medikacijska intervencija i izostanak iste u tom periodu može dovesti do doživotnih posljedica po sastav i funkciju ekosustava crijeva (Slika 25).

Poznato je da mikroorganizmi koji koloniziraju dijete po porodu imaju važnu ulogu u daljnjem razvoju mikrobioma. U tome ključnu ulogu ima tip poroda koji utječe na sastav mikrobiota (vaginalni naspram carskog reza). Pritom treba uzeti u obzir i primjenu

antibiotika prilikom carskog reza koji se rutinski daju perinatalno. Utjecaj perinatalno primjenjenih antibiotika na novorođenče će dodatno promijeniti sastav mikrobiota u usporedi s novorođenčadi rođenih vaginalno. Prerani porod (<33 tjedana gestacije) također je važan čimbenik u sastavu GIT-mikrobiota s povećanom prevalencijom *Proteobacteria*. Ovakav trend je dodatno ojačan agresivnom primjenom široko-spektralnih antibiotika koji se daju nedonoščadi (ampicilin i gentamicin). Primjena antibiotika u nedonoščadi dodatno pomiče sastav mikrobiota prema povišenoj brojnosti *Proteobacteria* na način da se osiromašuje *Bifidobacterium* populacija. Generalno, bakteriocidni lijekovi smanjuju ukupnu raznolikost djetetovih GIT-mikrobiota i selektiraju rezistentne mikroorganizme (219).

Utjecaj antibiotika na mikrobnu raznolikost, rezistenciju i sazrijevanje može trajati dugo nakon dječje dobi. Tijekom prve dvije do tri godine života, zdrav dječji mikrobiom postaje sve raznolikiji i sve više sliči mikrobiomu odraslih. Tijekom ovog perioda, izlaganje mikroorganizmima dolazi od majčinog mlijeka, hrane i okoliša (219).

Zahvaljujući *Human Microbiome Project*-u određeno je kako mikrobna populacija odraslih varira od osobe do osobe. Generalni trendovi ukazuju na smanjenu mikrobnu raznolikost u razvijenom svijetu naspram nerazvijenog svijeta i lovačko-sakupljačkih društava. Ta se razlika često objašnjava higijenskom hipotezom u kojoj pojačana higijena zajedno s pretjeranom primjenom antibiotika dovodi do smanjene raznolikosti mikrobiota u razvijenim zemljama. Za širok spektar antibiotika je pokazano kako mijenjaju sastav zdravih mikrobiota osiromašivanjem jedne ili nekoliko taksa (1).



Slika 25. Posljedice po zdravlje povezane s disbiozom komenzalne mikrobiote zbog primjene antibiotika tijekom razvoja i odrasle dobi.
Kritične točke razvoja za mikrobiote (i nositelja) dešavaju se tijekom djetinjstva te primjerice, antibiotska terapija ili izostanak primjene antibiotika u tom periodu može imati dugoročne posljedice na sastav i funkciju ekosustava crijeva. Crvene pune linije pokazuju povezanost sa zdravstvenim posljedicama primjene jedne doze antibiotika unutar određenog vremenskog perioda, a crvene isprekidane linije pokazuju kako su potrebne brojne/višestruke doze antibiotika unutar određenog vremenskog perioda da bi se uočila povezanost sa zdravstvenim posljedicama. Zdravstvene posljedice u ovom primjeru uključuju gubitak mikrobne raznolikosti i obogaćivanje mikrobioma genima [antibiotske] rezistencije (dovoljna jedna doza antibiotika primjenjena u bilo kojem životnom periodu); povišeni rizik od infekcija, astme, alergija i T1DM (jedna doza antibiotika po rođenju); pretilosti u djetinjstvu (jedna doza antibiotika po rođenju/nedugo nakon poroda); rizika razvoja T2DM (višestruke doze); povišenog rizika preraštanja vrste *Clostridium difficile* (posljedica primjene jedne doze).
Prilagođeno prema (219).

Primjerom gore (Slika 25) je pokazano kako pretjerana primjena antibiotika može dovesti do negativnih posljedica po nositelja preko kolateralne štete učinjene komenzalnoj mikrobioti. Kao alternativa široko-spektralnim antibioticima, pažnja se sve više usmjerava prema razvoju lijekova uskog spektra koji bi specifično reducirali kapacitet patogena za razvoj bolesti dok bi komenzali ostali neozlijeđenima (219).

Izlaganje oralnom amoksicilinu uzrokovalo je promjene u sastavu mikrobioma koje su trajale prosječno 30 dana i bile viđene dulje od dva mjeseca u nekih pojedinaca. Velike promjene su također uočene pri primjeni oralnog ciprofloksacina, s promjenama koje ustraju nekoliko tjedana, a brzina obnove prvotnog sastava se pokazala individualnom. Utjecaj antibiotika će se također razlikovati po mjestu primjene; pri čemu će grlo i slina brže obnoviti prvotnu mikrobnu raznolikost od ostatka probavnog sustava. Osim svog utjecaja na sastav mikrobioma, antibiotici selektiraju preživjele mikrobiote na rezistenciju putem stimulacije ekspresije antibiotske rezistencije, odgovora na stres te povišenjem brojnosti samih gena za rezistenciju (218).

Većina studija koje istražuju utjecaj antibiotika na GIT-metabolom, bile su fokusirane na podložnost infekciji, posebice vrsta *C. difficile* i *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). Inficirani pacijenti većinom primaju produljenu terapiju s visokom dozom antibiotika, ipak do 65% pacijenata ima relaps. Recidiv *C. difficile* uzrokovanog proljeva povezan je s niskom raznolikosti mikrobioma. Stoga izlaganje klindamicinu ili tigeciklinu smanjuje mikrobnu raznolikost i povisuje osjetljivost prema *C. difficile* infekciji. Slično tomu, pokazano je kako streptomicin i vankomicin dovode do povišene osjetljivosti prema *S. typhimurium* infekciji. Jedan od predloženih mehanizama za ovo uočeno djelovanje jest otpuštanje šećera i žućnih kiselina kao posljedice antibiotikom inducirane deplecije metaboličkih aktivnosti GIT-komezala. Ovi nutrijenti su potom iskorišteni od strane patogenih bakterija. Brojni metabolički putevi se otvaraju za *C. difficile* nakon primjene antibiotika. Primjerice, antibiotici smanjuju aktivnost hidroksilacije kiselina vrste *Clostridium scindens*, koja je potrebna kao zaštita od *C. difficile* infekcije (219). Kao dodatan mehanizam u poticanju infekcije, antibiotici mogu pojačati bakterijsku translokaciju iz crijeva (*leaky gut*). Ova saznanja pokazuju kako primjena široko-spektralnih antibiotika može biti kontraproduktivna u liječenju antibiotski rezistentnih infekcija. Kao alternativna strategija, predloženi su fekalni mikrobni transplantati koji imaju preko 90%-tnu uspješnost liječenja *C. difficile* infekcija (spomenuto u prethodnim poglavljima) (219).

Osim korištenja antibiotika u kontroli patogena koji koloniziraju GIT, postoji potencijal upotrebe antibiotika u modulaciji mikrobiote u liječenju drugih GIT-poremećaja, poput pretilosti. Murphy i suradnici su istraživali koncept ciljanja GIT-mikrobiota u prehranom induciranoj pretilosti miševa. Intervencija se sastojala od primjene antibiotika vankomicina te od Abp 118 bakteriocin-producirajućeg probiotika *L. salivarius* UCC 118. Obje intervencije su dovele do drastičnog povećanja *Proteobacteria* te smanjenja *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koljena, no samo je vankomicin rezultirao u poboljšanju metaboličkih abnormalnosti uzrokovanih pretilošću (220, 221).

Također napori su uloženi i u pojašnjavanje poveznice modulacije GIT-mikrobiota i psihijatrijskih poremećaja. Pokazano je kako smanjenje LPS koncentracije zbog primjene antibiotika dovodi do utišavanja stresnog odgovora HPA osi i povišenja ekspresije hipotalamičkih proupalnih citokina (181).

4. RASPRAVA

Postoji ogroman potencijal u manipulaciji mikrobioma s ciljem održavanja, poboljšanja i obnove mikrobiota u bolesnih pojedinaca i rizičnih skupina.

Mikrobiota čini sastavni funkcionalni dio organizma s brojnim funkcijama uključujući metabolizam, razvoj i sazrijevanje imunološkog sustava, utjecaj na dvosmjernu komunikaciju enteričkog i centralnog živčanog sustava te djeluje kao prirodna obrambena barijera i zaslužna je za integritet enteričkog epitela. Iz funkcije različitih mikrobiota proizlazi kako disbioza može imati značajne posljedice na prethodno navedene funkcije čime se oslabljuje organizam nositelja i on postaje podložniji razvoju bolesti.

Posljednjih godina je povećano nastojanje razumijevanja kompleksnosti ljudskog mikrobioma, uključujući probavni okoliš. MetaHIT (*Metagenomics of the human intestinal tract*) (2) i američki projekt ljudskog mikrobioma (*Human Microbiome Project*, HMP) (222) oboje rade na utvrđivanju bazalne zdrave intestinalne mikrobiote i utjecaja bolesti na promjene u sastavu iste.

MetaHIT se fokusira na korelaciju između GIT mikrobioma i intestinalne patologije, specifično pretilosti i upalne bolesti crijeva (2).

Američki Nacionalni institut za zdravlje (*National Institutes of Health*, NIH) je 2008. godine osnovao projekt ljudskog mikrobioma (HMP) čija je misija sakupljanje resursa koji će omogućiti razumljivu karakterizaciju ljudskog mikrobioma te analizu njegove uloge u ljudskom zdravlju i bolesti (29, 222). HMP određuje raznolikost mikrobiote sakupljajući uzorke s različitih dijelova tijela u zdravih pojedinaca čime se želi odrediti zdrav ljudski mikrobiom. HMP je također stvorio katalog mikrobnog genoma proučavajući ljudski mikrobiom (222).

Najranije studije na temu mikrobioma otkrile su samo vrh ledenjaka oslanjajući se na tehnike poput kultiviranja mikroorganizama i time dale nepotpune i pogrešne informacije. Danas, korištenjem molekularnih metoda sparenim s DNA sekvenciranjem možemo dublje istraživati mikrobiom. DNA sekvenciranje je samo početak, sve više se

naglasak daje studijama genskih markera i metagenomici. Sekvenciranjem RNA s metatranskriptomikom možemo imati bolju uvid u gene koje naši mikroorganizminajviše koriste. Proteomika i metabolomika nam mogu pokazati koje protene i metabolite naši mikroorganizmi proizvode (31).

U ovom preglednom radu prikazani su rezultati istraživanja koji sugeriraju dvosmjernu komunikaciju nositelj-mikrobiota s posljedicama na zdravlje jedinke. Stres i emocije mogu utjecati na sastav GIT-mikrobiota otpuštanjem hormona stresa ili simpatičkim neurotransmiterima koji utječu na fiziologiju crijeva i mijenjaju stanište mikrobiote. Hormoni stresa (među njima i noradrenalin) utječu na bakterijsku gensku ekspresiju ili signalizaciju među bakterijama. Kako je komunikacija dvosmjerna, mikrobiote isto tako utječu na nositelja i njegov ENS sintezom lokalnih neurotransmitera i biološki aktivnih katekolamina, kratkolančanih masnih kiselina, biološki aktivnih peptida i drugima, čime se utječe na peristaltiku, stres, emocionalno stanje nositelja i modulira bol (77, 80, 81).

Mikrobiom igra važnu ulogu u razvoju i sazrijevanju imunološkog sustava. Ponovno, većina zapažanja se temelje na murinom modelu. Većina abnormalnosti u GF životinja je ovisna o dobi i može se korigirati uvođenjem komenzala tijekom bilo koje dobi životinje, no mogućnost obnove staničnih defekata koji se dešavaju kao posljedica nedostatka mikrobiota je ograničena na kratko vremensko razdoblje ranog života i stoga jest ovisna o dobi. Možemo pretpostaviti kako u humanom modelu vrijede slična pravila (79).

Interakcija mikrobiota i imunološkog sustava igra važnu ulogu u razvoju imunološkog sustava u ranoj dobi pa ometanje te interakcije rezultira potencijalno stalnim imunološkim poremećajima. Obzirom na navedeno, vrijedi pretpostaviti kako rano-životno izlaganje mikroorganizmima ima utjecaj na osjetljivost na bolesti u starijoj životnoj dobi. Također, postoje dokazi da uspostava raznolikih GIT-mikrobiota može biti važniji čimbenik od kasnije disbioze u formiranju normalnog imunološkog sazrijevanja i odgovora, pri čemu se učestalim izlaganjem novim bakterijskim antigenima pojačava razvoj imunološke regulacije (79).

Teorija crijevno-moždane osi dala je maha brojnim istraživanjima na temu upalnih bolesti crijeva u kombinaciji s prethodno opisanim imunološkim aspektima. Iako njeni

točni mehanizmi nisu poznati i postoji više teorija, dvosmjerna komunikacija jest priznata, no rezultati modulacije mikrobiote u upalnim bolestima crijeva pokazali su dvojbene rezultate iako je potencijal uočen u ulceroznom kolitisu i upali ilealnog spremnika (205).

Sve nedavne studije na temu Crohnove bolesti potvrđuju poveznicu s disbiozom. Uočena je smanjena brojnost *Firmicutes* koljena, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* rodova te povišena brojnost *Escherichia coli* i drugih *Enterobacteriaceae* sojeva (223). Međutim, primjena probiotičkih bakterija poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* rodova tijekom aktivne bolesti ili remisije nije dala pozitivne rezulatate. Iz tog razloga, probiotici se ne preporučaju u Crohnovoj bolesti. Ovaj specifičan primjer pokazuje da je korelacija mikrobiotskog sastava i fenotipa bolesti zapravo može biti rezultat genetičkog profila nositelja te da nisu nužno direktno povezani.

Također postoje dvojbeni rezultati o modulaciji mikrobiote u ulceroznom kolitisu.

S jedne strane prema Cochrane-ovom pregledu iz 2011. godine rezultati ne idu u prilog održavanju remisije probioticima. Nasuprot tome, pregledni rad WGO smjernica iz 2017. čak je naveo značajne učinkovite rezultate primjene probiotika u UC-u s učinkovitošću jednakoj standardnoj terapiji (razina dokaza II i III). Ipak oba pregledna rada se slažu da postoje ograničeni dokazi da probiotici dodani standardoj terapiji mogu pružiti skromni utjecaj na smanjenje aktivnosti bolesti u pacijenta s blagim do umjereno teškim UC-om. Ipak nedovoljno kvalitetnih istraživanja je provedeno da bi se moglo išta zaključiti o primjeni probiotika u održavanju remisije (205).

U upali ilealnog spremnika (pouchitis) neki probiotici mogu prevenirati inicijalni napad pouchitisa te prevenirati daljnji relaps nakon antibiotske indukcije remisije (205).

S druge strane postoje dokazi utjecaja disbioze mikrobiote nositelja na njegovo zdravlje. Transfer mikrobiote između miševa rezultirao je transferom fenotipa bolesti. Gacias i suradnici (224) pokazali su nedavno (2016. godine) da depresiji-slični poremećaji i obrazac ponašanja se može prenijeti između dva genetski različita soja miševa jednostavnim transferom fekalne mikrobiote. Intestinalni mikroorganizmi, uključujući članove *Clostridiales* razreda, *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* porodica

su prenijeti iz crijeva depresivnog miša na one koji koji to nisu - ova intervencija je bila dovoljna da uzrokuje promjene u ponašanju prethodno „zdravih“ miševa. Mehanizam ove promjene je bio povezan s povišenim razinama krezola u miševa depresivnog fenotipa (224).

Sličnu intervenciju je primjenio Turnbaugh i sur. u istraživanju pretilosti na murinom modelu. GF miš je inokuliran fekalnim tranplatatom *wild type* i leptin *knock-out* miša. Uočeno je da miševi inokulirani fekalnim transplantatom pretilog miša dobivaju značajno više na težini u usporedbi s miševima inokuliranim fekalnim transplantatom ne-pretilog miša (Slika 18). Objašnjenje jest da mikroorganizmi pretilog miša imaju veću sposobnost ekstrakcije energije iz probavljene hrane, u usporedbi s ne-pretilim miševima (135).

Ove dvije intervencije uzete kao primjer (Gacias i Turnbaugh) pokazuju značajnost stabilnosti mikrobiote i njezinu ulogu u očuvanju zdravlja te doprinos disbioze u razvoju bolesti.

Vjerojatno je da bolest posljedično uzrokuje i promjene na mikrobiomu, zbog nekoliko čimbenika koji utječu na mikrobiote: promjene intestinalnog motiliteta, promjene apetita i posljedično prehrane, medicinska/medikacijska intervencija (kirurški zahvat, antibiotici), promjena životnog stila i dr. Ta činjenica dodatno otežava utvrđivanje same uzročno-posljedične veze između disbioze i bolesti.

Najveći izazov koji preostaje jest odgovor na pitanje: da li sastav mikrobioma uzrokuje poremećaje zdravlja ili poremećaj zdravlja uzrokuje disbiozu *ili* su poremećaj zdravlja *i* promjenjen sastav mikrobioma oboje rezultat istog genetskog čimbenika. Vjerojatno je moguće da govorimo o međuzavisnosti sva tri odnosa, no to još uvijek nije potvrđeno kliničkim ispitivanjima na ljudima.

Važan preduvijet za bakterijski-osnovanom terapijom (bakterioterapija) jest definiranje sastava „zdravih“ mikrobiota tijekom života, čija definicija može varirati obzirom na populaciju i na razini pojedinca.

U prilog bakterioterapiji ide meta analiza iz 2016. godine koja je kao zaključak navela važnost upotrebe probiotika u osoba s dijabetesom kao čimbenika koji može utjecati na smanjenje glukoze, HbA1c, inzulina i HOMA-IR u pacijenata s dijabetesom (204) te nadu za daljnji razvoj bekterioterapije daje uspješnost liječenja *C. difficile* infekcija FMT-om.

Potrebna su daljnja istraživanja raznolikosti vrsta i sojeva GIT-a, te raznolikosti mikrobnih gena (metagenoma) i njihove uloge u GIT-u tijekom ljudskog života. Terapijski gledano, primjena probiotika poznata je stoljećima kao i drastičniji pristup obnove/zamjene mikrobiote fekalnim transplantatima. Razvoj i upotreba ovakvih pristupa u kliničkoj praksi zahtjeva poznavanje i razumijevanje molekularnih mehanizama interakcije mikrobiota-nositelj te personalizaciju terapije radi ostvarivanja punog potencijala u liječenju i održavanju ljudskog zdravlja.

Ograničenje istraživanja dolazi iz relatvno male veličine uzoraka, koje se u mikrobiomnim studijama uglavnom kreću od oko 100 do 200 pojedinaca ili manje. Veličina uzorka potrebna da se detektiraju značajne poveznice u nekoj bolesti jest oko tisuću do deset tisuća pojedinaca. Također, brojne patofiziološke teorije se oslanjaju većinom na životinjske modele. Stoga se veliki napori ulažu u inicijativu *Human Microbiome Project* (eng.)(222), inspiriranu potrebom razumijevanja *cross-talk*-a između mikrobiote i nositelja. Jedan od glavnih ciljeva inicijative jest identificirati tzv. jezgreni mikrobiom (od eng. *core microbiome*) koji se sastoji od zajedničkih organizama, gena i funkconalnih kapaciteta koje je moguće pronaći u svim ljudskim jedinkama (1).

5. ZAKLJUČAK

Organizmi koji sačinjavaju mikrobiote su arheje, bakterije, i eukarije te čine ljudsko biće mnogo više od zbroja svojih djelova. Mi sadržavamo 10 puta više mikrobnih stanica nego ljudskih, 100 do 1000 puta više mikrobnih gena od ljudskih, a naš individualni mikrobiom dijeli samo 10% sličnosti s drugim čovjekom. Probavni sustav je centar mikrobnih aktivnosti u ljudskom tijelu (1, 2).

Human microbiome project izvršio je opsežno uzorkovanje brojnih subjekata (tjelesnih lokacija) s ciljem početne karakterizacije normalnih mikrobiota zdravih odraslih subjekata. Veliki uzorak i konzistentnost uzorkovanja s brojnih tjelesnih lokacija istog subjekta omogućilo je razumjevanje odnosa između mikroorganizama, te između mikrobioma i kliničkih parametara. Ovo je pak dovelo do proučavanja osnova indivudualnih varijacija (mikrobioma) – s ciljem razumijevanja poremećaja uzrokovanih disbiozom (29). U projektu ljudskog mikrobioma rabe se ponajprije metode za karakterizaciju koje ne zahtijevaju kultivaciju, kao što su metagenomika (za dobivanje širokog uvida u genetiku jedne mikrobne zajednice) i opsežno sekvencioniranje cijeloga genoma (čime se otkrivaju detaljne informacije o pojedinim aspektima individualnih bakterijskih vrsta). Temeljni cilj projekta jest otkrivanje jesu li promjene unutar pojedinih mikrobioma povezane s pojavom određenih bolesti ili sindroma (30).

Ljudske mikrobiote pokazuju značajnu raznolikost kao funkciju vremena obzirom na tjelesnu lokaciju na kojoj obitavaju i to unutar pojedinca i između različitih pojedinaca. Raznolikost ovih populacija ovisi o intraspecijskim i interspecijskim interakcijama (mikroorganizama međusobno, pa sve do hijerarhijski višeg organizma-čovjeka): čimbenicima neovisnim o nositelju (poput biokemijskih procesa i metaboličkih puteva mikroorganizama) te čimbenicima specifičnim za nositelja - čovjeka, u slučaju ljudskog mikrobioma (poput genetike nositelja, tipa poroda, unosa nutrijenata, životnog stila i drugih) (7, 8). Svi ti čimbenici utječu na formiranje našeg mikrobioma.

Ljudski organizam i mikrobiota su u simbiontskom odnosu, stoga je nedavno predložena hipoteza tzv. „super-organizma“ sastavljenih od ljudskog organizma i mikroorganizama (225, 226). GIT-mikrobiota ispunjava važnu metaboličku i imunološku ulogu, a promjene u sastavu mogu utjecati na homeostazu i dovesti do disbioze i razvoja

mikrobiotom-povezanih bolesti. Bolesti kod kojih je uočena disbioza mikrobiote uključuju upalne bolesti crijeva, iritabilni sindrom kolona, kolorektalni karcinom, metabolički sindrom, pretilost, alergijske bolesti i neurološke poremećaje poput autizma (95-100, 127-130, 146-150, 152-160,169-171, 178-180).

Kako je i prikazano, brojne studije koje su pokušale manupulirati mikrobiotama s ciljem liječenja bolesti nisu dobile identične rezultate za svaku bolest. Iako su antibiotici i probiotici poznati već dulje vrijeme, fekalni mikrobni transplantanti, poznati od davnina, tek su nedavno ponovno procijenjeni i prepoznati kao obećavajuć terapijski pristup kod disbioze, čija primjena u *C. difficile* infekciji postiže uspješnost izlječenja u preko 90 % (217). FMT u terapiji *C. difficile* infekcije jest pristup bakterioterapije koji najviše obećava prema trenutnim saznanjima kliničkih ispitivanja.

Iako su brojna trenutna saznanja o mikrobioti izložena u ovom radu, rezultati ispitivanja ne idu u prilog primjeni batkerioterapije u većini bolesti kod kojih je uočena disbioza. Potrebno je naglasiti da se većinom radi o bolestima koje je teško kontrolirati postojećom farmakoterapijom i čija patofiziologija nije do kraja objašnjena (Cronhova bolest, ulcerozni kolitis, kolorektalni karcinom, autizam). Da bi se bakterioterapija pokazala uspješnom u tim slučajevima potrebno je prvo razjasniti patofiziologiju bolesti i podlogu disbioze mikrobiota - potrebno je razjasniti da li je disbioza mikrobiota uzrok neke bolesti ili njena posljedica da bi se istraživanja mogla usmjeriti ili na određenu bakterijsku metu ili na kombinaciju bakterijskih sojeva zajedno sa primjenom farmakoterapije.

Potencijal bakterioterapije je vidljiv u dokazima iz kliničkih studija akutnih stanja poput primjerice akutnog infektivnog proljeva, radijacijom uzrokovanog proljeva te pseudomembranoznog kolitisa (prednost probiotika i FMT-a), dok intervencija u bolestima čiji je razvoj posljedica disbioze od najranijeg djetinjstva neće pokazati zadovoljavajuć učinak (imunološke bolesti). U ovom slučaju treba uzeti u obzir da disbioza od najranije dobi dovodi do ireverzibilnih učinaka na imunološki sustav te da u takvim slučajevima ne možemo očekivati pozitivne rezultate bakterioterapije u bolesti s imunološkom podlogom zbog disfunkcionalnog razvoja imunosti (82). Ovdje se uočava

preventivni aspekt bakterioterapije s ciljem obnove mikrobiota i održavanja eubioze, koji je primjerice potvrđen kod egzema, ali se nije pokazao preventivnim u astme (21).

Potrebno je naglasiti održavanje mikrobne raznolikosti, brojnosti i eubioze. Postojeći dokazi idu u prilog preventivnom djelovanju mikrobiota kao funkcionalnih jedinica s utjecajem na metabolizam, imunološki sustav i svojstvom dvosmjerne komunikacije s CNS-om (77-88). Mikrobiom ima značajnu ulogu u razvoju funkcionalnog imunološkog sustava i za svoje korisno djelovanje u poticanju sazrijevanja ima kratak vremenski period. U slučaju izostanka djelovanja funkcionalnih mikrobiota (zbog disbioze, smanjene raznolikosti), imunološki odgovor se pomiče prema hiperreaktivnom T_H2 odgovoru s posljedicama na zdravlje uočenim i karakterističnim za razvijeni svijet (79).

Potreban je cjelovit uvid u sastav mikrobiota i mikrobioma te njihovim funkcijama u stanju zdravlja i bolesti, za razvoj budućih pristupa modulaciji mikrobiota i potencijalan razvoj ciljane terapije.

6. LITERATURA

(1) Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI: The human microbiome project. Nature 2007; 449: 804–810.

(2) Qin J, Li R, Raes J, i sur. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2010; 464: 59–65.

(3) Sczesnak A, Segata N, Qin X, et al. The genome of Th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. Cell host & microbe. 2011;10(3):260-272. doi:10.1016/j.chom.2011.08.005.

(4) 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: 976–986.

(5) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, i sur.: A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature 2009; 457: 480–484.

(6) Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, i sur.: Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 2005; 308: 1635–8.

(7) Jašarević E, Howard CD, Misic AM, Beiting DP, Bale TL. Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner. Scientific Reports. 2017 (7) 44182 doi:10.1038/srep44182

(8) Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. Head I, ed. Fems Microbiology Ecology. 2007;62(2):142-160. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.

(9) Usporedba arheja, bakterija i eukarija. Dostupno na: http://www.easybiologyclass.com/compare-archaebacteria-bacteria-and-eukaryotes-similarities-and-differences-table/ Pristupljeno 18 Siječnja 2016.

(10) http://www.yellowstonepark.com/grand-prismatic-midway-geyser-basin/ Pristupljeno 20 Siječnja 2016.

(11) http://1.bp.blogspot.com/-AERMpGNb21U/TWSGuwrHPMI/AAAAAAAAADw/SUuEAMSq6I8/s1600/Grand

-Prismatic-Spring-hot-springs-and-geysers-in-Yellowstone-Park-random-10489040-800-600.jpeg. Pristupljeno 18 Siječnja 2016.

(12) http://graphics8.nytimes.com/images/2010/05/19/opinion/19judson/19judson-custom1.jpg. Pristupljeno 18 Siječnja 2016.

(13) https://schoolworkhelper.net/bacteria-bacilli-spirilla-cocci/. Pristupljeno 18 Siječnja 2016.

(14) Pace NR. Mapping the tree of life: progress and prospects. Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(4):565–76.

(15) Lederberg J, McCray AT. 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. Scientist. 2001;15(7):8–8.

(16) Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome. 2015;3:31. doi:10.1186/s40168-015-0094-5.

(17) Konopka A. What is microbial community ecology? ISME J. 2009;3:1223–30.

(18) Online riječnik biologije. Dostupno na: http://www.biology-online.org/dictionary/Environment. Pristupljeno 10-Lipnja-2017.

(19) Habdija I, Primc-Habdija B. Biološki leksikon. Prvo izdanje. Zagreb: Profil International, 1999.

(20) Iebba V, Totino V, Gagliardi A i sur. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. New Microbiologica. 2016;39: 1-12.

(21) Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, i sur. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microbial Ecology in Health and Disease. 2015;26:10.3402/mehd.v26.26050. doi:10.3402/mehd.v26.26050.

(22) Schommer NN, Gallo RL. Structure and function of the human skin microbiome. Trends in microbiology. 2013;21(12):660-668. doi:10.1016/j.tim.2013.10.001.

(23) Grice EA. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. Seminars in cutaneous medicine and surgery. 2014;33(2):98-103.

(24) Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. Annual review of physiology. 2016;78:481-504. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105238.

(25) Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. Clinics in laboratory medicine. 2014;34(4):747-761. doi:10.1016/j.cll.2014.08.006.

(26) Nelson DE, Dong Q, Van Der Pol B, et al. Bacterial Communities of the Coronal Sulcus and Distal Urethra of Adolescent Males. Ravel J, ed. PLoS ONE. 2012;7(5):e36298. doi:10.1371/journal.pone.0036298.

(27) Price, L. B. et al. The effects of circumcision on the penis microbiome. PLoS ONE 5, e8422 (2010).

(28) O'Hara A, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO 2006; Rep 7: 688–693.

(29) Human Microbiome Project (HMP) Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 2012; 486: 207–214.

(30) Meštrović T. Uloga mikrobioma rodnice u spolno prenosivim infekcijama. Medicus 2012:21(1):117-121.

(31) Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature. 2012;489(7415):250-256. doi:10.1038/nature11553.

(32) Tissier H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: G. Carre and C. Tissier H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: G. Carre and C. Naud; 1900.

(33) Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 2008; 371: 75–84.

(34) DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, i sur. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. PLoS One 2008; 3: e3056.

(35) Jiménez E, Fernández L, Marín ML, i sur. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Curr Microbiol 2005; 51: 270–4.

(36) Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. BJOG 2002; 109: 527–33.

(37) Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. Pediatr Res 2005; 57: 404–11.

(38) Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. PLoS One 2013; 8: e66986.

(39) Hu J, Nomura Y, Bashir A, i sur. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. PLoS One 2013; 8: e78257.

(40) Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, i sur. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. MBio 2011; 2: e00280–10. PubMed Abstract | PubMed Central Full Text

(41) Avershina E, Storrø O, Øien T, Johnsen R, Pope P, Rudi K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. FEMS Microbiol Ecol 2014; 87: 280–90.

(42) Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald G, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. Curr Opin Biotechnol 2010; 21: 149–56.

(43) Spor A, Koren O, Ley R. Nature Reviews Microbiology 2011; 9: 279-290. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome.

(44) Gonzalez A, Clemente JC, Shade A, Metcalf JM, Song S, Prithiviraj B, Palmer BE, Knight R. Our microbial selves: what ecology can teach us. EMBO reports 2011; 12 (8): 743-870.

(45) Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM i Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. Front. Immunol. 2014; 5: 1-18. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427

(46) Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, i sur. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 2012; 486: 222–7.

(47) Bashan A, Gibson TE, Friedman J, et al. Universality of Human Microbial Dynamics. Nature. 2016;534(7606):259-262. doi:10.1038/nature18301.

(48) Nicholson JK, Holmes1 E, Kinross1 J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. Science 2012; 336: 1262-1267. DOI: 10.1126/science.1223813

(49) Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, i sur. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 11971–5.

(50) de Muinck EJ, Øien T, Storrø O, i sur. Diversity, transmission and persistence of Escherichia coli in a cohort of mothers and their infants. Environ Microbiol Rep 2011; 3: 352–9.

(51) Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, i sur. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. Gut 2014; 63: 559–66.

(52) Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science 2009; 326: 1694–7.

(53) Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. Am J Clin Nutr 2012; 96: 544–51.

(54) Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. Microb Ecol Health Dis. 2015; 26: 26164. doi: 10.3402/mehd.v26.26164. eCollection 2015.

(55) Barrett E, Kerr C, Murphy K, i sur. The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2013; 98: F334–40.

(56) Fallani M, Young D, Scott J, i sur. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2010; 51: 77–84.

(57) Penders J, Thijs C, Vink C, i sur. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics 2006; 118: 511–21.

(58) Org E, Parks BW, Joo JWJ i sur. Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. Genome Res. 2015; 25: 1558-1569.

(59) Shan M, Gentile M, Yeiser JR, i sur. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. Science 2013; 342: 447–53.

(60) Kleerebezem M, Vaughan EE. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. Annu Rev Microbiol 2009; 63: 269–90.

(61) van Tassell ML, Miller MJ. Lactobacillus adhesion to mucus. Nutrients 2011; 3: 613–36.

(62) Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. Trends Microbiol 2012; 20: 30–9.

(63) Kayama H, Takeda K. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. Int Immunol 2012; 24: 673–80.

(64) Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, i sur. The long-term stability of the human gut microbiota. Science 2013; 341: 1237439.

(65) Leimena MM, Ramiro-Garcia J, Davids M, i sur. A comprehensive metatranscriptome analysis pipeline and its validation using human small intestine microbiota datasets. BMC Genomics 2013; 14: 530.

(66) Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, i sur. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. ISME J 2012; 6: 1415–26.

(67) Booijink CC, El-Aidy S, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Troost FJ, Smidt H, et al. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. Environ Microbiol 2010; 12: 3213–3227.

(68) Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Nature 2012; 488: 178–84.

(69) Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. PLoS One 2010; 5: e10667.

(70) Drago L, Toscano M, Rodighiero V, de Vecchi E, Mogna G. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects. J Clin Gastroenterol 2012; 46: S81–4.

(71) ELDERMET. Dostupno na: http://eldermet.ucc.ie/. Pristupljeno 11-Lipnja-2017

(72) Sekirov I., Russell S., Antunes L., Finlay B. Gut microbiota in health and disease.Physiol Rev. 2010;90: 859–904

(73) Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role.Perspect Biol Med 1992;35: 251–260

(74) Shanahan F. The host–microbe interface within the gut. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 915–931

(75) Weinstein PD, Cebra JJ. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. J Immunol 1991; 147: 4126–4135

(76) Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am J Clin Nutr 1999; 69: 1046S–1051S

(77) Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Annals of Gastroenterology : Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology. 2015;28(2):203-209.

(78) DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. Inflammatory bowel diseases. 2016;22(5):1137-1150. doi:10.1097/MIB.0000000000000750

(79) Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. Science (New York, NY). 2016;352(6285):539-544. doi:10.1126/science.aad9378.

(80) Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Nature Reviews Microbiology 10, 735-742 (November 2012). doi:10.1038/nrmicro2876

(81) Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. Nature reviews Gastroenterology & hepatology.2009;6(5):10.1038/nrgastro.2009.35. doi:10.1038/nrgastro.2009.35.

(82) Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. Gut. 2006;55:655–661.

(83) Guthrie GD, Nicholson-Guthrie CS. Gamma-Aminobutyric acid uptake by a bacterial system with neurotransmitter binding characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A.1989;86:7378–7381.

(84) Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:10420–10425.

(85) Alverdy J, Holbrook C, Rocha F, i sur. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for in vivovirulence expression in Pseudomonas aeruginosa. Ann Surg. 2000;232:480–489.

(86) Freestone PP, Williams PH, Haigh RD, Maggs AF, Neal CP, Lyte M. Growth stimulation of intestinal commensal Escherichia coli by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. Shock. 2002;18:465–470.

(87) Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M. Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic Escherichia coli. FEMS Microbiol Lett. 2003;222:39–43.

(88) Ait-Belgnaoui A, Colom A, Braniste V, et al. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. Neurogastroenterol Motil. 2014;26:510–520.

(89) Mazmanian SK, et al. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 2008;453:620–625.

(90) Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, i sur. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. Gut 2006;55:182–190.

(91) Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between caesarean section and childhood asthma. Clin Exp Allergy 2008; 38: 629–33.

(92) Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. Pediatrics 2010; 125: e1433–40.

(93) Barros FC, Matijasevich A, Hallal PC, i sur. Cesarean section and risk of obesity in childhood, adolescence, and early adulthood: evidence from 3 Brazilian birth cohorts. Am J Clin Nutr 2012; 95: 465–70.

(94) Cho CE, Norman M. Cesarean section and development of the immune system in the offspring. Am J Obstet Gynecol 2013; 208: 249–54.

(95) Lei R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 2006; 444: 1022–1023

(96) Zhang H, DiBaise J, Zuccolo A, i sur. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 2365–2370

(97) Kau A, Ahern P, Griffin N, Goodman A, Gordon J. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. Nature 2011; 474: 327–336

(98) Qin J, Li Y, Cai Z, i sur. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature 2012; 490: 55–60

(99) Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13780–5.

(100) Hansel TT, Johnston SL, Openshaw PJ. Microbes and mucosal immune responses in asthma. Lancet 2013; 381: 861–73.

(101) Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. Nat Rev Immunol 2012; 12: 9–23.

(102) West CE, Jenmalm MC, Prescott SL. The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: a wider perspective. Clin Exp Allergy 2014; doi: 10.1111/cea.12332.

(103) Vuillermin PJ, Ponsonby AL, Saffery R, i sur. Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. Allergy 2009; 64: 348–53.

(104) Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol 2012; 129: 434–40.e2.

(105) Böttcher MF, Jenmalm MC, Björkstén B. Immune responses to birch in young children during their first 7 years of life. Clin Exp Allergy 2002; 32: 1690–8.

(106) Douwes J, Cheng S, Travier N, i sur. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. Eur Respir J 2008; 32: 603–11.

(107) Jenmalm MC, Duchén K. Timing of allergy-preventive and immunomodulatory dietary interventions – are prenatal, perinatal or postnatal strategies optimal? Clin Exp Allergy 2013; 43: 273–8.

(108) Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, i sur. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. Clin Exp Allergy 2009; 39: 1842–51.

(109) Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 2012; 336: 1268–73.

(110) Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. Nat Rev Microbiol 2013; 11: 227–38.

(111) Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. J Dev Orig Health Dis 2013; 4: 203–14.

(112) Forsberg A, Abrahamsson TR, Björkstén B, Jenmalm MC. Pre- and postnatal Lactobacillus reuterisupplementation decreases allergen responsiveness in infancy. Clin Exp Allergy 2013; 43: 434–42.

(113) Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 516–20.

(114) Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 129–34.

(115) Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, i sur. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. Gut 2007; 56: 661–7.

(116) Wang M, Karlsson C, Olsson C, i sur. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 129–34.

(117) Forno E, Onderdonk AB, McCracken J, i sur. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. Clin Mol Allergy 2008; 6: 11.

(118) Sjögren YM, Jenmalm MC, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. Clin Exp Allergy 2009; 39: 518–26.

(119) Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, i sur. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. J Allergy Clin Immunol 2011; 128: 646–52.e1–5.

(120) Travis J. On the origin of the immune system. Science 2009; 324: 580–2.

(121) Böttcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T, Björkstén B. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. Clin Exp Allergy 2000; 30: 1590–6.

(122) van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, i sur. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. J Allergy Clin Immunol 2011; 128: 948–55.e1–3.

(123) Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? Allergy 1998; 53: 20–5.

(124) Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. Clin Exp Allergy 2014; 44: 842–50.

(125) De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, i sur. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 14691–6.

(126) Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, i sur. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nat Med 2014; 20: 159–66.

(127) Ley R. Obesity and the human microbiome. Curr Opin Gastroenterol 2010; 26: 5–11.

(128) Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 11070–5.

(129) Tilg H., Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. J Clin Invest 2011; 121: 2126–2132.

(130) 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: 1027–31.

(131) Murphy E, Cotter P, Healy S, i sur. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. Gut 2010; 59: 1635–1642.

(132) Clarke S, Murphy E, Nilaweera K, i sur. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. Gut Microbes 2012; 3: 186–202.

(133) Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, i sur. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes 2008; 57: 1470–81.

(134) Pretilost i GIT-mikrobiota. Dostupno na: https://www.coursera.org/learn/microbiome/lecture/acv9q/obesity-and-the-gut-microbiota. Pristupljeno 20-Svibnja-2017.

(135) Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe. 2008; Apr 17;3(4):213-23.

(136) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 2006; 444: 1022–3.

(137) 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: 894–9.

(138) Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, i sur. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. Int J Obes 2008; 32: 1720–4.

(139) 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: 534–8.

(140) Nadal I, Santacruz A, Marcos A, i sur. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. Int J Obes 2009; 33: 758–67.

(141) Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, i sur. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. Obesity 2009; 17: 1906–15.

(142) Schwiertz A, Taras D, Schafer K, i sur. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity (Silver Spring) 2009; 18: 190–195[PubMed]

(143) Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 2006; 444: 1022–1023.

(144) Duncan S, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone A, Flint H, Lobley G. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 1073–1078.

(145) Everard A, Belzer C, Geurts L, i sur. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:9066–9071.

(146) Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol 2016; Mar;12(3):154-67. doi: 10.1038/nrendo.2015.218. Epub 2016 Jan 4.

(147) Bibbò S, Pina Dore M, Pes MG, Delitala G, Delitala AP. Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? Ann Med 2016; Nov 29:1-12.

(148) Mejía-León ME i Calderón de la Barca AM. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. Nutrients 2015; Nov; 7(11): 9171–9184. Published online 2015 Nov 6. doi: 10.3390/nu7115461

(149) Larsen N, Vogensen F, van den Berg F, i sur. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS One 2010; 5: e9085.

(150) Han JL i Lin HL. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: From mechanism insights to therapeutic perspective. World J Gastroenterol 2014; Dec 21; 20(47): 17737–17745. Published online 2014 Dec 21. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17737

(151) Bermudez-Silva FJ, Sanchez-Vera I, Suárez J, i sur. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. Eur J Pharmacol. 2007; 565:207–211.

(152) Brint E, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley E. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol 2011; 106: 329–336.

(153) Ponnusamy K, Choi J, Kim J, Lee S, Lee C. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. J Med Microbiol 2011; 60: 817–827.

(154) Ghoshal U, Shukla R, Ghoshal U, Gwee K, Ng S, Quigley E. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? Int J Inflam 2012; 151085.

(155) Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig H, i sur. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2011; 141: 1792–1801.

(156) Saulnier D, Riehle K, Mistretta T, i sur. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2011; 141: 1782–1791.

(157) Jeffery I, Claesson M, O'Toole P, Shanahan F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? Nat Rev Microbiol 2012; 10: 591–592.

(158) Jeffery I, O'Toole P, Ohman L, i sur. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. Gut 2012; 61: 997–1006.

(159) Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet 2007; 369: 1627–40.

(160) Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. Curr Opin Gastroenterol 2010; 26: 564–71.

(161) Farmakologija upalnih bolesti crijeva. Dostupno na: http://pharmafactz.com/pharmacology-of-inflammatory-bowel-disease/ Pristupljeno 11-Lipnja-2017.

(162) Michielan A, D'Incà R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. Mediators of Inflammation. 2015; 2015:628157. doi:10.1155/2015/628157.

(163) Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, i sur. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut 2006; 55: 205–211.

(164) Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, i sur. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 106–111.

(165) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, i sur. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 16731–6.

(166) Joossens M, Huys G, Cnockaert M, i sur. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. Gut 2011; 60: 631–7.

(167) Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, i sur. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. Cell Host Microbe 2014; 15: 382–92.PubMed Abstract | Publisher Full Text

(168) Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. Gut Pathogens 2013; 5:23. doi:10.1186/1757-4749-5-23.

(169) Arthur J, Perez-Chanona E, Muhlbauer M, i sur. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. Science 2012; 338: 120–123.

(170) Kostic A, Gevers D, Pedamallu C, i sur. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. Genome Res 2012; 22: 292–298.

(171) Plottel C, Blaser M. Microbiome and malignancy. Cell Host Microbe 2011; 10: 324–335.

(172) Castellarin M, Warren R, Freeman J, i sur. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res 2012; 22: 299–306.

(173) McCoy A, Araujo-Perez F, Azcarate-Peril A, Yeh J, Sandler R, Keku T. Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. PLoS One 2013; 8: e53653.

(174) Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. Therapeutic Advances in Gastroenterology. 2013;6(4):295-308. doi:10.1177/1756283X13482996.

(175) Chen HM, Yu YN, Wang JL, i sur. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. Am J Clin Nutr 2013; 97: 1044–1052.

(176) Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. PLoS ONE 2013; 8(8): e70803. doi:10.1371/journal.pone.0070803

(177) Grivennikov S, Greten F, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 2010; 140: 883–899

(178) Haba R, Shintani N, Onaka Y, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Baba A, Hashimoto H. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by

impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. Behav Brain Res 2012;228:423–431.

(179) Kastin AJ, Pan W. Concepts for biologically active peptides. Curr Pharm Des 2010;16:3390–3400.

(180) Mayerhofer R, Fröhlich EE, Reichmann F, et al. Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. Brain, behavior, and immunity. 2017;60:174-187. doi:10.1016/j.bbi.2016.10.011.

(181) Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Fagiuoli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. World Journal of Gastroenterology 2016;22(1):361-368. doi:10.3748/wjg.v22.i1.361.

(182) Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. Neurogastroenterol Motil 2011;23:255–264, e119.

(183) Luna RA, Foster JA. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. Curr Opin Biotechnol 2015;32:35–41.

(184) Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Glia 2007;55:453–462.

(185) Berk M, Williams LJ, Jacka FN, i sur. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? BMC Med. 2013;11:200.

(186) Grigoleit JS, Kullmann JS, Wolf OT, i sur. Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. PLoS One 2011;6:e28330.

(187) Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. Neurogastroenterol Motil. 2014;26:1155–1162.

(188) Bolte ER. Autism and Clostridium tetani. Med Hypotheses 1998;51:133–144.

(189) Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, i sur. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. J Child Neurol. 2000;15:429–435.

(190) Finegold SM, Molitoris D, Song Y, i sur. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. Clin Infect Dis 2002;35:S6–S16.

(191) Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. Appl Environ Microbiol 2004;70:6459–6465.

(192) Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. J Med Microbiol 2005;54:987–991.

(193) Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, i sur. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. Anaerobe 2010;16:444–453.

(194) Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation with autism severity. BMC Gastroenterol 2011;11:22.

(195) Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R. Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. PLoS One. 2013;8:e68322.

(196) Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with autism spectrum disorder. Mol Autism 2013;4:42.

(197) Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. Mbio 2012;3:pii: e00261–11.

(198) Scott K, Antoine J, Midtvedt T, van Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. Microbial Ecology In Health And Disease. 2015 Feb 2;26:25877. doi: 10.3402/mehd.v26.25877. eCollection 2015.

(199) Savaiano DA, Abou El, Anouar A, Smith DE, Levitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. Am J Clin Nutr 1984; 40: 1219–23.

(200) Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. Biol Psychiatry. 2013;74:720–6.

(201) Zhang GQ, Hu HJ, Liu CY, Zhang Q, Shakya S, Li ZY. Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.

Shoenfeld. Y, ed. Medicine. 2016;95(8): e2562. doi:10.1097/MD.0000000000002562.

(202) Park S, Bae JH. Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. Nutr Res. 2015 Jul;35(7):566-75.

(203) Kasińska MA, Drzewoski J. Effectiveness of probiotics in type 2 diabetes: a meta-analysis. Pol Arch Med Wewn. 2015;125(11):803-13. Epub 2015 Oct 2.

(204) Sun J, Buys NJ. Glucose- and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. Br J Nutr. 2016; Apr 14;115(7):1167-77. doi: 10.1017/S0007114516000076. Epub 2016 Feb 22.

(205) Guarner F i sur. Probiotics and Prebiotics. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. 2017.

(206) Messaoudi M. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. Br. J. Nutr. 2011;105:755–764.

(207) Steenbergen L. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. Brain Behav. Immun. 2015;48:258–264.

(208) Kato-Kataoka A. Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. Appl. Environ. Microbiol. 2016;82:3649–3658.

(209) Sashihara T. Effects of Lactobacillus gasseri OLL2809 and α-lactalbumin on university-student athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2013;38:1228–1235.

(210) Britton J.C. Facial expressions and complex IAPS pictures: common and differential networks. Neuroimage. 2006;31:906–919.

(211) Sarkar A, Letho SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. Trends in Neurosciences. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002

(212) Gough E, Shaikh H, Manges A. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis 2011;53: 994–1002

(213) Li YT, Cai HF, Wang ZH, Xu J, Fang JY. Systematic review with meta-analysis: long-term outcomes of faecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection. Aliment Pharmacol Ther. 2016; Feb;43(4):445-57. doi: 10.1111/apt.13492. Epub 2015 Dec 14. Review.

(214) Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2013; Apr;108(4):500-8. doi: 10.1038/ajg.2013.59. Epub 2013 Mar 19. Review.

(215) Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, D'Haens GR, de Vos WM, Zoetendal EG, Ponsioen CY. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review. World J Gastroenterol. 2015; May 7;21(17):5359-71. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5359. Review.

(216) Sofi AA, Silverman AL, Khuder S, Garborg K, Westerink JM, Nawras A. Relationship of symptom duration and fecal bacteriotherapy in Clostridium difficile infection-pooled data analysis and a systematic review. Scand J Gastroenterol. 2013; Mar;48(3):266-73. doi: 10.3109/00365521.2012.743585. Epub 2012 Nov 19. Review.

(217) Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for Clostridium difficile Infection. Clin Microbiol Infect. 2014;20(s2):1–26.

(218) Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, i sur. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. Gastroenterology 2012; 143: 913–16–e7.

(219) Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. Genome Medicine. 2016;8:39. doi:10.1186/s13073-016-0294-z.

(220) Murphy E, Cotter P, Hogan A, i sur. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. Gut 2013a; 62: 220–226

(221) Murphy E, Clarke S, Marques T, i sur. Antimicrobials: strategies for targeting obesity and metabolic health? Gut Microbes 2013b; 4: 48–53

(222) Human Microbiome Project. Dostupno na: http://hmpdacc.org/ Pristupljeno 20-Svibnja-2017.

(223) Manuc T-EM, Manuc MM, Diculescu MM. Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets.Clinical and Experimental Gastroenterology. 2016;9:59-70. doi:10.2147/CEG.S53381.

(224) Gacias M, Gaspari S, Mae-Santos P, i sur. Microbiota-driven transcriptional changes in prefrontal cortex override genetic differences in social behavior. Elife 2016; 5 e13442 10.7554/eLife.13442

(225) Goodacre R. Metabolomics of a Superorganism. The Journal of Nutrition. 2007; 137: 259S-266S

(226) Sleator RD. The human superorganism ? Of microbes and men. Med Hypotheses. 2010; 74(2):214–215.