

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonija Mahmutović

**Crijevna mikrobiota u pacijenata s
poremećajima probavnog trakta**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Diplomski rad izrađen je u Odjelu za međustaničnu komunikaciju Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentorice doc.dr.sc. Donatelle Verbanac i predan je na ocjenu u akademskoj ocjeni 2014./2015.

POPIS KRATICA

ADD	antibiotikom inducirana dijareja
CB	Crohnova bolest
CD	celijakija (eng. Celiac disease)
CFU	koloniformne jedinice (eng. Colony forming units)
CRC	kolorektalni karcinom
FOS	galaktooligosaharidi
GALT	limfni sustav crijeva (eng. Gut-associated lymphoid tissue)
GOS	fruktooligosaharidi
IBD	upalne bolesti crijeva (eng. Inflammatory bowel disease)
IBS	sindrom iritabilnog kolona (eng. Irritable bowel syndrome)
INF- γ	interferon gama
iNKT	invariant Natural killer T cells
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG
NAFLD	nealkoholna masna bolest jetre (eng. Non-alcoholic fatty liver disease)
PRR	receptori na koje se vežu PAMP-ovi (eng. Pattern Recognition Receptors)
RELM- β	Resistin like molecule - beta
SCFA	kratkolančana masna kiselina (eng. Short chain fatty acid)
SIBO	prekomjeran rast bakterija u tankom crijevu (eng. Small bowel bacterial overgrowth)
TLR	receptori na površini stanica imunološkog sustava (eng. Tool-like receptor)
TNF α	tumor necrosis factor alfa
TREG	T regulatorne stanice
UC	ulcerozni kolitis (eng. Ulcerative colitis)

SADRŽAJ

1.	SAŽETAK.....	5
2.	SUMMARY	6
3.	UVOD	1
	CRIJEVNA MIKROBIOTA	1
	RAZVOJ I SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE	2
	ULOGA CRIJEVNE FLORE	4
4.	PROMJENE CRIJEVNE MIKROBIOTE	5
	4.1 OPĆENITO O DISBIOZI.....	5
	4.2 SPECIFIČNE DISBIOZE.....	11
5.	PROBIOTICI I PREBIOTICI	20
	5.1 PROBIOTICI	20
	5.2 PREBIOTICI	21
	5.3 MEHANIZAM DJELOVANJA	22
	5.4 UČINCI PRIMJENE PROBIOTIKA I PREBIOTIKA	25
6.	UTJECAJ PREHRANE NA MIKROBITU	28
7.	ZAKLJUČAK.....	31
8.	ZAHVALE	32
9.	LITERATURA.....	33
10.	ŽIVOTOPIS.....	38

1. SAŽETAK

U ljudskom probavnom sustavu nalazi se više od 100 trilijuna mikroorganizama koji čine crijevnu mikrobiotu što je 10 puta više nego broj svih ljudskih stanica u organizmu.

Uspostava i razvoj ekološkog sustava crijevne mikrobiote počinje s rođenjem, a uspostavljena crijevna mikroflora tijekom života je relativno stabilna, no podložna utjecajima egzogenih i endogenih faktora (prehrana, korištenje lijekova, bolesti, starenje).

Sastav crijevne mikrobiote je specifičan za svaku osobu i teško je definirati što je zdrava mikrobiota. Crijevna mikrobiota ima značajnu ulogu u čovjekom zdravlju i bolesti. Važnost crijevne mikrobiote se očituje kroz njihove utjecaje na čovjekovu fiziologiju, metabolizam, prehranu i imunosnu funkciju.

Disbioza ili poremećaj crijevne mikroflore je pojam koji označava narušavane prirodne ravnoteže mikroorganizama u probavnom traktu. Poremećaj može nastati zbog smanjenja povoljnih mikroorganizama, prerastanja potencijalno štetnih mikroorganizama ili zbog smanjenja cjelokupne mikrobiološke raznovrsnosti.

Poremećaji crijevne mikrobiote su povezani s brojnim stanjima i sindromima, uključujući upalne bolesti crijeva, kolorektalni karcinom, sindrom iritabilnog kolona, alergijske bolesti, pretilost, metabolički sindrom, celijakija.

Danas se sve više proučava odnos prehrane i mikrobiote te učinak prehrambenih intervencija. U kliničkoj praksi je sve prisutnija upotreba nutritivne sastavnice poput probiotika, prebiotika i simbiotika.

Probiotici su živi mikroorganizmi s pozitivnim utjecajem na ravnotežu u crijevu, dok su prebiotici nerazgradive sastavnice hrane bazirane na selektivnoj stimulaciji povoljnih crijevnih bakterija. I probioticima i prebioticima se pripisuju brojna pozitivna djelovanja na čovjekovo zdravlje.

Također pronalaze se drugi načini manipulacije crijevnom mikrobiotom u želji za prevencijom ili potencijalnom tretiranjem bolesti povezanih s poremećajima mikrobiote (poput fekalne transplantacije mikrobiote).

Ključne riječi – mikrobiota, disbioza, prehrana, probiotici

2. SUMMARY

The human gut microbiota harbours over 100 trillion microorganisms that form the intestinal microbiota which is 10 times more than the number of all human cells in the organism.

The development of the ecosystem of the intestinal microbiota begins with birth and established intestinal microflora during life is relatively stable, but susceptible to the influences of exogenous and endogenous factors (diet, use of medications, disease, ageing).

The composition of the intestinal microbiota is unique for each person and it is difficult to define what the healthy microbiota is.

The intestinal microbiota plays an important role in human health and disease. The importance of intestinal microbiota is manifested through their impacts on human physiology, metabolism, diet and immune function.

Dysbiosis or disorder of intestinal microflora is a term describing the disruption of the natural balance of microorganisms in the digestive tract. The disorder may occur due to loss of beneficial microbial organisms, expansion of pathobionts or potentially harmful microorganisms and loss of overall microbial diversity.

Disorders of gut microbiota are associated with a variety of conditions and syndromes, as well as diseases including inflammatory bowel disease, colorectal cancer, irritable bowel syndrome, allergic diseases, obesity, metabolic syndrome, celiac disease.

Today, there is great interest in observing the relationship between diet and microbiota and impact of food interventions. In clinical practice is an increased use of nutritional components such as probiotics, prebiotics and synbiotics with the aim to restore balance in the composition of microbiota. Probiotics are live microorganisms with a positive impact on the balance in the intestine, while prebiotics are degradable components of foods based on selective stimulation of favourable intestinal bacteria. To the probiotics and prebiotics are attributed a number of positive effects on human health. Also, other ways are today investigated and applied such as intestinal manipulation with microbiome to restore the desired potential of our “bacterial alliance” for the prevention and/or treatment of diseases associated with disorders of the microbiota (such it is a faecal microbiota transplantation measure).

Keywords - microbiota, dysbiosis, nutrition, probiotics

3. UVOD

CRIJEVNA MIKROBIOTA

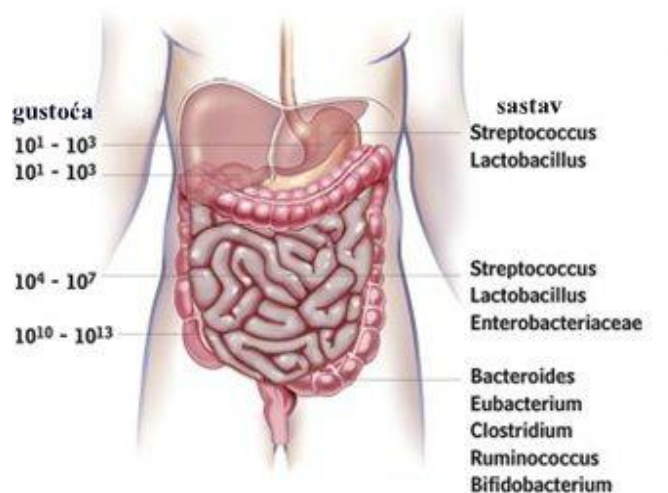
Davno je prepoznata uloga i važnost probavnog sustava - „Sve bolesti kreću od crijeva“ (Hipokrat) Iako je dugo vremena fokus proučavanja bio utjecaj GI patogena i način na koji uzrokuju bolest, nedavno se znatna pažnja posvećuje učinku komenzalnih mikroorganizama.

Ljudski organizam nastanjuje veliki broj bakterija koje čine fiziološku floru i povezane su s brojnim tkivima, uključujući kožu, vaginalni trakt, dišni sustav, gastrointestinalni trakt. Sveukupni mikroorganizmi prisutni u/naljudskom organizmu nazivaju se *ljudski mikrobiom*.

Crijevna mikrobiota je pojam koji se odnosi na skup živih mikroorganizama koji koloniziraju probavni trakt. Ljudski probavni sustav je prirodno stanište za brojne, različite vrste mikroorganizama, većinom bakterija (90%).

Mikroorganizmi se pojavljuju duž cijelog GI trakta. Broj bakterija se povećava prema distalnom dijelu probavnog sustava, tako da želudac i dvanaesnik nastanjuje mali broj mikroorganizama, manje od 10^3 koloniformnih jedinica (eng. Number of colony-forming units – (CFU)) na gram crijevnog sadržaja jer kiselina, žuč i probavni enzimi nepogodno djeluju na bakterije i smanjena je mogućnost njihovog prijanjanja za epitel. Broj bakterija se od jejunuma prema ileumu proporcionalno povećava, od 10^4 do 10^7 CFU na gram sadržaja. Debelo je crijevo gusto naseljeno mikroorganizmima, a broj se penje i do 10^{12} CFU s 500-1000 različitih vrsta bakterija, od čega tek 30-40 vrsta čini 99% ukupne populacije.

Brojna istraživanja su pokazala da su bakterije daleko od pasivnih stanovnika GI trakta, te da ulaze u interakcije sa svojim domaćinom. One mogu modulirati učinak potencijalno štetnih bakterija, utjecati na domaćinov gastrointestinalni trakt, probavu, metabolizam i imunološki sustav, čak i na funkcije izvan crijeva (Binns, 2013). Normalna interakcija između bakterija koje se nalaze u crijevu i njihovog domaćina predstavlja simbiotski odnos koji donosi korist bakterijama i domaćinu.

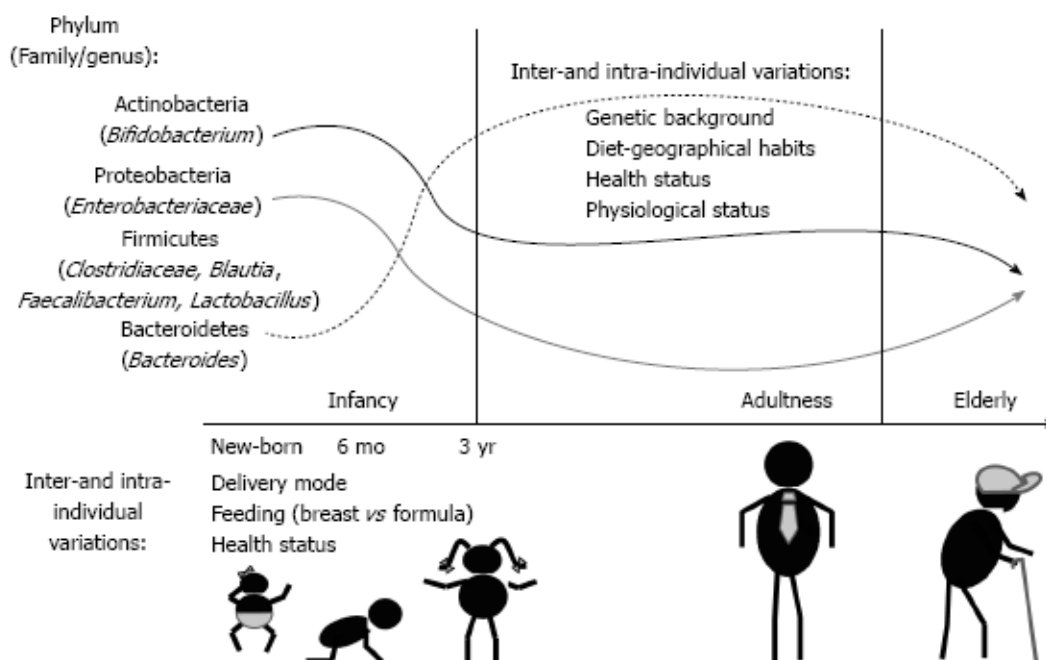


Slika 1 – Raspodjela podjedinih bakterijskih vrsta u GI traktu

(prilagođeno prema Magnus S et al.2012)

RAZVOJ I SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Prije rođenja, mikroorganizmi nisu prisutni u gastrointestinalnom traktu, ali ga ubrzo koloniziraju tijekom i nakon rođenja. Fakultativni anaerobi su prvi kolonizatori i oni stvaraju okolinu pogodnu za naseljavanje striktnih anaeroba poput *Clostridium* i *Bifidobacterium spp.* Crijevna mikrobiota novorođenčadi karakterizirana je niskim stupnjem raznolikosti i relativnom dominacijom skupina *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Kako odmiče vrijeme nakon rođenja, dolazi do povećanja raznolikosti mikrobiote s pojavom i prevladavanjem *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. U dobi 2-5 godina crijevna mikrobiota doseže sastav i raznovrsnost sličnu odraslima (Rodríguez, 2015). Uspostavljena mikrobiota ostaje relativno stabilna, no ipak podložna utjecaju prehrane, bolesti, korištenja lijekova (posebice antibiotici) i starenja.



Slika 2– Promjene mikrobiote prema dobi

(prilagođeno prema Tojo R et al., 2014)

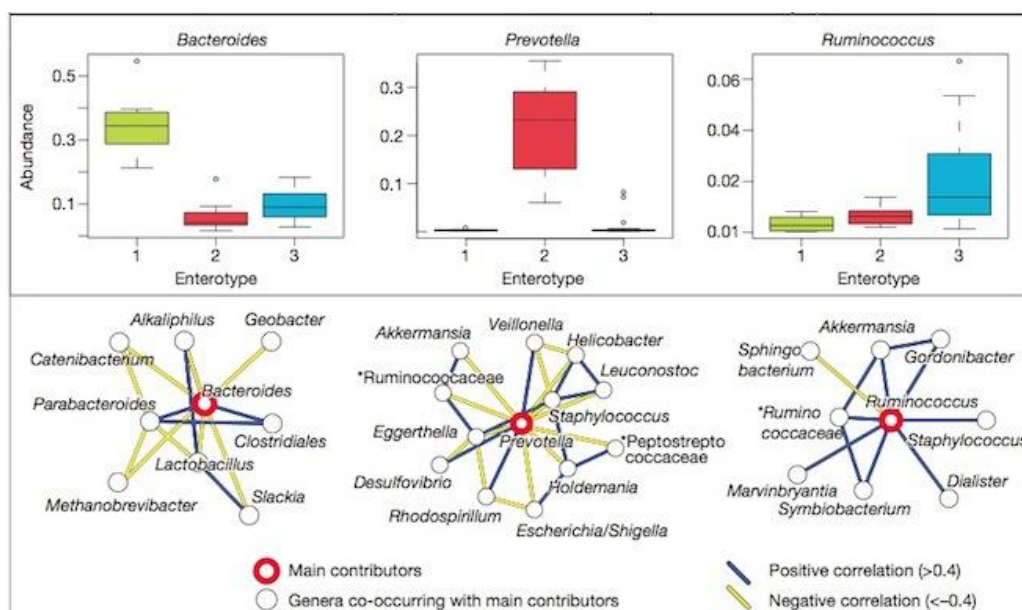
Dinamičan razvoj mikrobiote ovisi o raznim čimbenicima u okolišu i djetinjstvu. Faktori koji će pozitivno modulirati crijevnu mikrobiotu jesu vaginalni porod, dojenje i izlaganje mikroorganizmima, dok negativan učinak ima porod na carski rez, prijevremeni porod, dohrana, terapija antibioticima. Istraživanja su pokazala da djeca rođena carskim rezom imaju manje „dobročudnih“ anaeroba kao što su *Bacteroides* i *Bifidobacterium*, a više *Clostridium sp* u odnosu na djecu rođenu vaginalnim putem. Također, dojena djeca osim što dobivaju imunoregulatorne tvari iz majčinog mlijeka, imaju korist i od metaboličke i prebiotičke funkcije mlijeka, što modificira crijevnu floru – kod dojene dojenčadi

dominiraju *Bifidobacterium*, dok kod djece hranjene dohranom se nalazi širi spektar mikroorganizama, uključujući *Bifidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Enterobacteria* i *Streptococci*. Promjene su zamijećene i ovisno o uporabi antibiotika tijekom dojenačkog razdoblja. Dojenčad koja je primala antibiotike ima više vrsta bakterija roda *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter*, a manji broj *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. Osim toga, antibiotici uništavaju vlastitu floru te time omogućuju kolonizaciju i proširenje manje poželjnih vrsta.

U probavnom sustavu odrasle osobe zastupljeno je nekoliko bakterijskih supercarstava (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*). Članovi *Firmicutes* i *Bacteroidetes* prevladavaju u debelom crijevu (čine >90% bakterijske populacije), dok su *Actinobacteria* i *Proteobacteria* manje zastupljeni. Anaerobnih bakterija ima 100-1000 puta više od aerobnih bakterija.

Pokazano je da se intestinalna mikrobiota razlikuje bitno među pojedincima. Koristeći metagenomičke analize za istraživanje funkcionalne sposobnosti genoma mikrobiote pokazano je da ~40% mikrobionalnih gena prisutno u svakom individualcu nalazi u bar polovini opće populacije pružajući dokaze o postojanju funkcionalne jezgre ili jezge mikrobioma (Qin J, 2010)

Nedavna istraživanja pokazuju da se na temelju mikrobiote ljudi mogu kategorizirati u jedan od tri osnovna enterotipa neovisno o dobi, spolu, geografskom podrijetlu, tjelesnoj masi. Enterotipovi se međusobno razlikuju po sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih vrsta – *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* (Arumugan et al., 2011). Smatra se da će postojanje različitih enterotipova omogućiti bolje razumijevanje različitih reakcija ljudi na prehranu, lijekove i slično zbog pretpostavke da bi različiti enterotipovi mogli utjecati na različite odgovore ljudi na navedeno.



Slika 3 – Enterotipovi bakterijskih carstava I, II, III najčešće zastupljenih kod čovjeka

(prilagođeno prema Arumugan, 2011)

ULOGA CRIJEVNE FLORE - „mikrobiota, virtualni organ“

Crijevne bakterije imaju važnu i specifičnu ulogu u domaćinu koja se pretežito odnosi na imunološki i metabolički sustav domaćina.

Metabolička uloga

Crijevna flora sudjeluje u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, aminokiselina, lipida, fermentaciji neprobavljenih sastojaka hrane, iskorištavanju i regulaciji pohrane energije, biosintezi esencijalnih vitamina (K, B1, B2, B3, B6, B12), konverziji prolijekova u aktivnu formu, transformaciji žučnih kiselina i ksenobiotika.

Trofička uloga

Crijevne bakterije imaju utjecaja na proliferaciju i diferencijaciju epitelnih stanica. U prilog tome govori činjenica da je obnavljanje epitelnih stanica smanjeno u kriptama kolona životinja koje su uzgojene u sterilnim uvjetima u usporedbi s kontrolnim životinjama uzgojenim u normalnom okolišu (Guarner F, 2003).

Zaštitna uloga – „čuvari crijeva“

Mikrobiota funkcionira u tandemu s domaćinovom obranom i imunološkim sustavom u zaštiti od kolonizacije i invazije patogenih mikroorganizama. Crijevna flora na nekoliko načina sprječava kolonizaciju patogenih bakterija; kompeticijom za stanište i nutrijente, osiguravanjem funkcioniranja crijevne barijere, stvaranjem mukoidnog sloja i antimikrobnih supstanci – bakteriocina i bakteriocinima slične molekule čime se aktivno zaustavlja upala.

Regulacija i razvoj imunosti

Bakterije imaju ključnu ulogu u regulaciji i razvoju crijevne i sustavne imunosti.

Studije na životinjama koje su odrasle u sterilnim uvjetima su pokazale da je imunološki sustav u takvih životinja slabo razvijen (imaju manju gustoću limfnih stanica u crijevnoj sluznici, limfni folikuli su mali) i da imaju nižu razinu imunoglobulina. Također je poznato iz ovih studija da antigeni iz intestinalne mikrobiote kao i iz okoliša igraju ključnu ulogu u sazrijevanju GALT-a i normalne otpornost na bolesti.

Smatra se da mikroorganizmi koji se nalaze u GI traktu podučavaju naš imunološki sustav na toleraciju benignih, bezopasnih antigena, uz istodobno razvijanje brzog odgovora u prisutnosti patogenih antigena. S druge strane, tzv. "higijenska hipoteza" pretpostavlja da je smanjena izloženost egzogenim mikrobima u razvijenim industrijskim zemljama dovela do povećane incidencije atopijskih (alergijskih) i autoimunoloških poremećaja zbog promjena u načinu sazrijevanja imunološkog sustava

Mehanizmi djelovanja crijevne flore na sustavnu imunost nisu poznati, no smatra se da učinak na sustavnu imunost nastaje zbog prisutnosti topivih produkata mikroorganizama u krvi koji aktiviraju TLR sustav perifernih imunoloških stanica što posljedično modificira sustavni imunološki odgovor.

Sposobnost kojom se razlikuju patogene bakterije od komenzala dijelom je posredovana PRR, međutim točan način na koji naš imunološki sustav prepoznaje da se ne radi o patološkim bakterijama se još nezna.

4. PROMJENE CRIJEVNE MIKROBIOTE

4.1 OPĆENITO O DISBIOZI

Bakterijske vrste koje borave u probavnom traktu, direktnim kontaktom s domaćinovim stanicama ili indirektnom komunikacijom preko bakterijskih metabolita mogu utjecati bilo na održavanje homeostaze bilo na trigeriranje upalnih mehanizama.

Promjene crijevne mikrobiote mogu direktno biti povezane s nekolicinom gastrointestinalnih bolesti poput upalnih bolesti crijeva, kolorektalnog karcinoma, sindroma iritabilnog kolona. Smatra se da su promjene mikrobiote povezane i s nekim ekstraintestinalnim poremećajima poput bolesti jetre (NAFLD) ili respiratornog trakta (alergije, bronhalna astma). U mnogim ovim stanjima, mehanizmi koji dovode do razvoja bolesti uključuju uzajamni odnos između crijevne mikrobiote, njezinih metaboličkih produkata i domaćinovog imunostustava.

Proučavanje promjena intestinalne mikrobiote u odnosu na bolest je bazirano na odlikama mikrobiote prisutne u bolesnih individualaca u usporedbi sa zdravim individualcima. S obzirom da postoje bitne interindividualne i intraindividualne varijacije te o dobi ovisne promjene u sastavu intestinalne mikrobiote, teško je precizno utvrditi odnos između ljudskog zdravlja i prisutnosti i/ili relativnog broja specifičnih mikrobionalnih zajednica. Možda će u budućnosti biti moguće koristiti specifične promjene u raznovrsnosti sastava ili funkcije kao biomarker za zdravlje ili specifične bolesti. Također bitno je naglasiti da u nekim slučajevima promijenjena mikrobiota može biti prikladan odgovor na promjenu u domaćinu pa je upitno kada su promjene u sastavu mikrobiote uzrok, a kada posljedica dane bolesti. Dokaz koji potvrđuje direktnu uključenost intestinalne mikrobiote u patogenezi bolesti dolazi iz studija na germ-free miševima na modelu humanih autoimunih bolesti. U većini, ali ne na svim modelima bolesti (tablela 1), intezitet i /ili incidencija bolesti je smanjena kod germ-free uvijeta.

Tabela 1 – Intestinalna mikrobiota i autoimunost (prilagođeno prema Cardling S et al., 2015)

Bolest	Microbiota status	Utjecaj na bolest
Upalne bolesti crijeva	Germ free, antibiotici ili probioiotici	Nema bolesti /reducirana težina bolesti
Autoimuni artritis	Germ free	Nema bolesti
Autoimuni encefalomijelitis	Germ free	reducirana težina bolesti
Sistemski eritematozni lupus	Germ-free	Nema utjecaja
Dijabetes tip 1	Germ free	Nema bolesti

Mnogo je faktora koji mogu utjecati na strukturu mikrobiote, uključujući genetiku domaćina, prehranu, infekcije, primjenu lijekova.

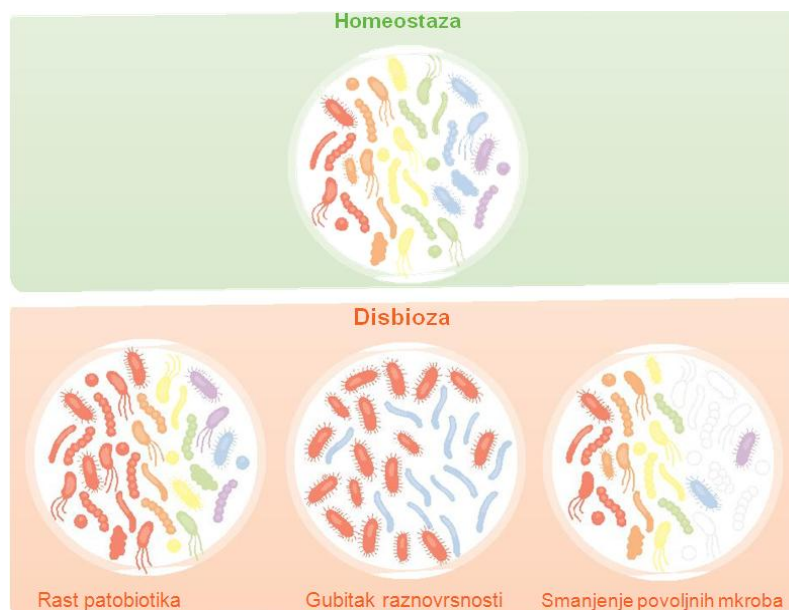
„Hipoteza higijene“ pretpostavlja da upotreba antibiotika i životni stil mijenjaju limit mikrobiološkog izlaganja stvarajući predispoziciju za razvoj autoimunih bolesti u razvijenim zemljama (Strachan, 2000). Antibiotici koji se često koriste u klinikama imaju značajne utjecaje na našu mikrobiotu. Neki antibiotici imaju dugodjelujuće efekte na mikrobiotu, koji dovode do trajnog gubitka nekih organizama, odnosno prerastanja i perzistiranja drugih .

Također, zapaženo je da se kod ljudi s imunosno podredovanim bolestima nalaze razlike u mikrobiološkim zajednicama u usporedbi sa zdravim individualcima što može sugerirati da patogeneza proizlazi iz neadekvatne “ poduke“ imunološkog sustava od mikrobiote. Sastav cijele zajednice rezidentne mikrobiote utječe na uravnoteženi imunološki odgovor. Tako, narušavanje strukture komenzalne zajednice može voditi do oskudne „obuke“ imunološkog sustava i posljedično do razvoja imunosno posredovanih bolesti (Petersen C, 2014)

Promjene u sastavu crijevne mikrobiote možemo razvrstati u tri tipa:

- Smanjenje povoljnih mikroorganizama
- Širenje patobionata ili potencijalno štetnih mikroorganizama
- Smanjenje cjeloukupne mikrobiološke raznovrsnosti

Ova tri tipa nisu međusobno isključiva i vjerojatno je da disbioza obuhvaća sve tri manifestacije istovremeno u razvoju bolesti.



Slika 4 – Kategorije disbioze (prilagođeno prema Petersen C et al., 2014)

Smanjenje povoljnih mikroorganizama

Mikrobiota je važna za sazrijevanje, razvoj i funkcioniranje odgovarajućeg intestinalnog imunog odgovora (Cho and Blaaser, 2012). Imunosni odgovor treba biti pažljivo uravnotežen između upale potrebne za patogenu eradikaciju i tolerantnih reakcija koje preveniraju neželjene imunostne odgovore prema vlastitom tkivu i komenzalima.

Stoga smanjenje određenih „povoljnih“ mikroorganizama može dovesti do slabog i neadekvatnog odgovora imunološkog sustava s jedne strane, odnosno autoimunosti s druge strane.

Zanimljivo je da su identificirani članovi mikrobiote koji mogu direktno kordinirati mnoge aspekte domaćinovog imunološkog odgovora. Toleracija na vlastita tkiva i komenzale je dijelom upravljana sa specijaliziranim podtipovima T limfocita nazvanim T regulatornim stanicama (Treg). Ove stanice su označene ekspresijom transkripcijskog faktora Foxp3 (Fontenot et al, 2003). Mutacije u Foxp3 genu rezultiraju gubitkom razvoja T regulatornih stanica što i kod miševa i ljudi posljedično dovodi do upale i autoimunosti u mnogim organima, ukazujući na važnost Treg populacije za domaćinovo zdravlje. Identificirano je nekoliko komenzalnih mikroorganizama koji su u mogućnosti inducirati ove stanice u crijevu domaćina. Eksperimenti su pokazali da je Treg funkcija ugrožena u GF miševa i može biti obnovljena s humanim komenzalima *Bacteroides fragilis* ili s kombinacijom *Clostridium* sojeva. Kolonizacija životinja s nekim od navedenih sojeva štiti životinje od kolitisa u Treg-ovisnim mehanizmima djelujući različitim mehanizmima na T regulatorne stanice.

Clostridium sojevi induciraju ekspresiju TGF β iz intestinalnih epitelnih stanica koji povećava diferencijaciju pobuđenih crijevnih Treg stanica (Atarashi et al., 2013) dok *B.fragilis* koristi kapsularni polisaharid kojim se veže na TLR2 receptore na dentritičnim stanicama i T stanicama i inducira IL-10 te povećava sposobnost Treg stanica. Za ostale *Bacteroides* sojeve je također priopćeno da povećavaju ukupni broj Treg u kolonu (*B. caccae*, *B.thetaiotaomicron*, *B.vulgaris*).

I nekoliko drugih sojeva komenzalnih bakterija su razvili svojstvo da induciraju Treg i da pruže zaštitu od upalnih bolesti – sojevi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, vjerojatno koristeći mehanizme za indukciju tolerancije u crijevu. Mehanizmi još nisu ispitani, ali vjerojatno uključuju bakterijske produkte poput SCFA. SCFA je produkt mikrobialne fermentacije iz prehrambenih vlakana i uključuje: propionat, acetat, butirat i format. Za ove produkte pokazano je da su odgovorni za regulaciju Treg stanica u crijevu pružajući zaštitu od eksperimentalnog kolitisa (Smith, 2013). Butirat i propionat su najistaknutiji SCFA sposobni da utječu na Treg odgovor. Butirat je također sposoban blokirati histon deacetylaze koje provode DNA kondenzaciju i time mogu regulirati ekspresiju gena. Nakon tretiranja T stanica s butiratom in vitro, zabilježeno je povećanje u acetilaciji Foxp3 promotorske regije čime se pojačava ekspresija Foxp3.

Nedavno su nađeni mehanizmi kojima komenzalne bakterije mogu direktno reducirati upalu. *Lactobacillus paracasei* i *L.casei* kodiraju proteze koje smanjuju koncentraciju IP-10. Na taj način mikrobiota direktno antagonizira učinke domaćinovog imunskog sustava i pomaže u održavanju intestinalne homeostaze.

Za razliku od T stanica, NK tip 1 ('invariant' or 'type 1' or iNKT) stanice prepoznaju lipidne antigene i igraju važnu ulogu u urođenoj imunosti. Razvoj ovih stanica je dinamično reguliran mikrobitom tako da GF miševi imaju povećan broj NK stanica u crijevu (Olszak et al., 2012). Životinje koje imaju povećan broj Nk stanica su osjetljivije za razvoj kolitisa. Nedavno istraživanje u kojem je primijenjen *B.fragilis* u GF miševa je dovoljan da suprimira razvoj ove populacije stanica (An et al., 2014). Smatra se da *B.fragilis* koristi singolipide (ima gene za vrlo homogene enzime koji su uključeni u biosintezu sfingolipida. Delecija tih gena onemogućavala je supresiju NKt staničnog razvoja sugerirajući da *B.fragilis* koristi te lipide kako bi utjecao na iNKT stanice. No, samo rana ekspozicija *B.Fragilisu* dovodi do inhibicije, dok kod odraslih GF miševa je nedostatna u zaštiti protiv kolitisa. Kao što je ranije navedeno *B.fragilis* također može utjecati na modulaciju Treg odgovora. Ove studije pokazuju da jedan jedini komenzalni organizam može posjedovati nekoliko mehanizama kojima pozitivno utječe na domaćina te ističe kompleksnost i prisnost domaćin-komenzal odnosa.

Rast patobiotika

Mikrobiota također sadrži članove koji imaju sposobnost uzrokovati štetne učinke domaćinu. Ovi organizmi su nazvani patobioticima da nagovjeste njihov potencijal da uzrokuju patologiju (Chow and Mazmanian, 2010). Patobiotici se održavaju na niskim razinama u zdravom crijevu i ne uzrokuju probleme u imunokompetentnih domaćina. Međutim postoji nekoliko primjera koji pokazuju da prerastanje ovih mikroorganizama u određenim uvjetima može doprinijeti razvoju bolesti, iako ekspanzija patobiote sama po sebi neće uzrokovati bolest. Najčešće izviještena incidencija patobiotičke ekspanzije je *Proteobacteria* i posebice *Enterobacteriaceae* (sadrže članove poput *Escherichia coli*, *Shigella* i *Kelbsiella*).

Delecija TLR receptora (odgovorni za prepoznavanje flagelarnih proteina bakterija) rezultira niskim stupnjem upale, kolitisa i metaboličkog sindroma. Za identifikaciju mikrobiotičkih zajednica povezanih s kolitisom u životinja s manjkavim TLR5, mikrobiota je bila uspoređena među životinjama koje su razvile i koje nisu razvile kolitis (obe skupine su TLR5-). Životinje koje su spontalno razvile kolitis imale su trostruko povećanje roda *Proteobacteria* (Vijay-Kumar et al. 2010)

Kako bi pokazali ulogu *E.coli* u indukciji kolitisa u TRL5-životinja, proveden je tretman antibioticima u TRL5- i WT (wild-type) životinjama, nakon čega su obje skupine tretirane adherentnom-invazivnom *E.coli* sojem. TRL5- životinje nisu bile u mogućnosti održati razine ovih flageliranih bakterija i nađeno je 10 x više bakterija. Sve TRL5- životinje primivši ovaj soj su podlegle kolitisu, ukazavši da je *E.coli* bila dovoljna da uzrokuje kolitis u odsutstvu TLR5. Današnje studije bave se novim otkrićima patobiotika, sposobnim za poticanje štetnih efekata na domaćina kada dobije priliku za širenjem.

Gubitak raznovrsnosti: više je bolje

Članovi mikrobiote na različite načine i u različitoj mjeri doprinose domaćinovom zdravlju. Neki organizmi potiču razvoj protuupalnih puteva dok drugi induciraju protektivne upalne odgovore. Dok su neke domaćin-mikrobiota interakcije pokrenute s više vrsta, druge uključuju odnose s „ekskluzivnim“ članovima zajednice. Dakle, da bi mikrobiota mogla pružiti maksimalnu korist domaćinu potrebne su složene i različite skupine mikroorganizama. Zbog toga, važan aspekt disbioze može također uključivati smanjenje ukupne mikrobiološke raznovrsnosti.

IgE protutijela se povezuju s alergijskim odgovorom i životinje s povećanim koncentracijama IgE razvijaju teže alergijske bolesti. Bezobzira na smanjenje ostalih izotipova protutijela, IgE je veoma povećan u serumu kod GF miševa, upućujući na specifičnu ulogu mikrobiote u potiskivanju ovih

protutijela (Cahenzli et al., 2013). U provedenoj studiji kolonizacija GF miševa rano u životu sa složenom mikrobiotom reducira Ige razine i prevenira nastanak alergija. GF miševi su prvo kolonizirani s pojedinačnim vrstama. *E.Coli* nije bila sposobna suprimirati Ige razinu. Kolonizacija s dvije vrste također nije dovela do supresije. Kada su GF životinje kolonizirane sa 8 različitih vrsta 50 % životinja je i dalje imalo povećanu produkciju IgE. Supresija IgE je bila evidentna tek kada su životinje bile kolonizirane sa 40 različitih sojeva bakterija što sugerira da je veća raznolikost mikrobiotnih organizama nužna za veće koristi domaćina. Također je uočeno da se kod GF životinja koloniziranih kasnije, u odrasloj dobi, ne pojavljuje supresija IgE razine.

Nedavna studija je promatrala ulogu raznovrsnosti mikrobiote u ranom životu u korelaciji s razvojem bolesti kasnije. Sakupljani su uzorci mikrobiote od djece tijekom 1.tj, nakon 1mj, te nakon 1.g. života (Abrahamsson et al., 2013). Kod ove iste djece, u dobi od 7.g je procjenjena pojavnost alergijskih bolesti. Djeca koja su razvila astmu, sva su imala nižu mikrobiotnu raznolikost u ranom životu u usporedbi s ne-astmatičnom djecom, sugerirajući da ranoživotna mikrobiotna raznovrsnost može štititi od bolesti kasnije u razvoju.

Iako dosadašnje studije ukazuju na važnost raznovrsnosti mikrobiote, potrebno je provesti još studijama kojima bi se uloga raznovrsnosti potvrdila.

4.2 SPECIFIČNE DISBIOZE

UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (eng. Inflammatory bowel diseases– IBD) su idiopatske, upalne, kronične bolesti, u čijoj je osnovi imunosni poremećaj. Skupina upalnih bolesti crijeva uključuje ulcerozni kolitis (UC) i Crohnovu bolest (CB), a obje su obilježene naizmjeničnim epizodama relapsa i remisija. Smatra se da su u bolest uključene interakcije između domaćinove genetike, okolišnih faktora, disreguliranog imunosnog odgovora i promjena u intestinalnoj mikrobiološkoj kompoziciji.

Patogena upletenost domaćinove mikrobiote u upalnim bolestima crijeva se može shvatiti kao dvosmjerni odnos između promijenjene imuno funkcije (mukozalna barijera, imunosna regulacija) i promijenjene bakterijske zajednice (njezinih značajki, funkcija, metabolita) (Knights D, 2013). Nereguliran imunosni odgovor protiv komenzala crijeva (oštećeni lokalni mehanizmi tolerancije prema komenzalima) može doprinijeti nastupu ili trajanju IBD.

Pokazane su kvantitativne i kvalitativne promjene u sastavu i funkciji mikrobiote povezane sa IBD. Pacijenti pokazuju smanjenu mikrobialnu populaciju, funkcionalnu raznovrsnost i stabilnost, uz smanjenje određenih vrsta. Reducirani su *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, te *Clostridium leptum* i *Clostridium coccoides* grupe (Manichanh et al., 2006). Nasuprot teoriji generalne disbioze mikrobiote, postoji mogućnost da je involviranost specifičnih vrsta povezana s mikrobiotom pacijenata sa UC i CD (npr. *Enterobacteriaceae*, adherentna invazivna *E.Coli*). Nekolicina studija su utvrdile smanjenu zastupljenost *F. prausnitzii* (član *C.leptum* grupe) u pacijenata sa CD i UC koja je poznata po protuupalnim svojstvima i to je povezano s višim rizikom postoperativne rekurentne ilealne bolesti i s pratećim povećanjem količine *E.coli* (Sokol H, 2008).

Jedna studija je proučavala status mikrobiote kod velikog broja novodijagnosticiranih CD pedijatrijskih pacijenata i utvrdila je jasne razlike u bakterijskim populacijama između CD i zdravih kontrolnih pacijenata. CD pacijenti su imali povećanu količinu *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae*, and *Fusobacteriaceae* i smanjenu količinu *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* i *Clostridiales* u usporedbi za zdravom kontrolom. (Gevers D, 2014)

Zasad još uvijek nije jasna uzročno-posljedična veza abnormalne mikrobiote, tj. je li crijevna mikrobna disbioza direktni uzrok za upalu u IBD ili samo rezultat poremećenog okoliša u GI traktu.

Razlike u mikrobioti između aktivne i pasivne faze IBD

IBD, pogotovo u aktivnoj fazi bolesti, je povezan sa smanjenom kvalitetom života i visokim troškovima zdravstvene njege. Liječenje je uglavnom bazirano na redukciji simptoma s nespecifičnim imunomodulatornim lijekovima i može biti povezana s ozbiljnim nuspojavama. Daljnji uvid u uzročne faktore povezane s razvojem egzacerbacija može doprijeti novim terapijskim opcijama. Provedene su studije u kojima se ispitivao sastav intestinalne mikrobiote u odnosu na promjene tijekom bolesti IBD-a (sastav mikrobiote u remisiji i sljedećoj egzacerbaciji).

S jedne strane nedavno provedena studija je dovela do zaključka da su promjene u mikrobialnoj kompoziciji u IBD pacijenata s promjenom aktivnosti bolesti pacijent-specifične. Nisu identificirani uniformni obrasci u mikrobialnim promjenama povezani s pojavom egzacerbacije. IBD se treba smatrati grupom poremećaja s preklapajućim fenotipovima, i ta heterogenost bolesti može doprinosti pacijent-specifičnoj promjeni mikrobiotnog sastava i izostanku istog na grupnoj razini (Willis, 2014)

Druge studije su utvrdile razlike u mikrobioti uspoređujući aktivnu i inaktivnu fazu bolesti. Tako je utvrđeno da kombinacija leukocita u fekalnoj mukozalnoj prijelaznoj zoni i koncentracija *F. prausnitzii* su pronađene kao snažni prediktori aktivne bolesti CD i UC (Swidsinski A, 2008). Smanjenje *F. prausnitzii* i *Firmicutes/Bacteroidetes* omjera također je povezano s aktivnom bolesti. (Sokol H, 2009)

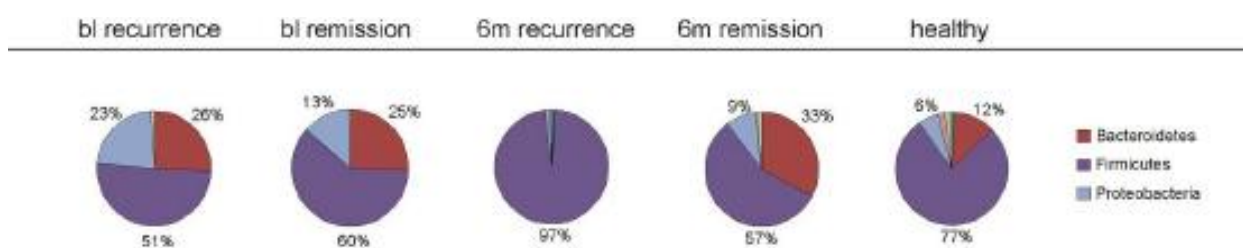
Utjecaj mikrobiote na recidiv ili remisiju CD?

Provedena je studija s ciljem utvrđivanja specifičnog profila mikrobiote kako bi se identificirale bakterije povezane s ranim povratkom bolesti nakon resekcije (unutar 6 mjeseci postoperativno) u odnosu na one pacijente koji ostaju u remisiji (De Cruz P, 2014). Šest mjeseci nakon operacije postoje razlike između CD pacijenata s različitim kliničkim ishodima (recidiv/remisija) i u odnosu na zdrave pojedince.

Pokazano je da kod pacijenta s rekurentnom bolesti prevladavaju bakterije uključene u proteolitičku fermentaciju i produkciju laktične kiseline (*Enterococcus* i *Veillonella*). Proteolitičke vrste povezane su s akumulacijom produkata koji mogu djelovati enterotoksično. Suprotno kod pacijenta koji su održavali remisiju prevladavaju saharolitička i butiririrajuća mikrobiota (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* spp, *Firmicutes*). Produkti koji nastaju su SCFA (butirat) te se smatra da su uključeni u prevenciju kolitisa i jačanje te održavanje mukozalne barijerne funkcije.

Nađena je redukcija u mikrobiolnoj raznovrsnosti i postojanost *Firmicutes* uslijed resekcije. Također je primijećen relativni manjak *Bacteroidetes* kod pacijenata koji su imali recidiv 6 mj postoperativno. Odsutstvo *Bacteroidetes* kao dominantnog reda može predstavljati marker disbioze povezan s postoperativnim recidivom odnosno prisutnost *Bacteroidetes* se može smatrati potencijalnim zaštitnim efektom protiv recidiva.

Mikrobiota profili identificirani za vrijeme operacije mogu biti povezane s uzrokom CD postoperativne rekurencije i od prognostičke vrijednosti u identifikaciji tko od pacijenata je u većem riziku za rani razvoj recidiva. Osim toga, možda u budućnosti mogu biti potencijalne mete za razvoj bakterija-specifičnih tretmana za CD.



Slika 5. – Profili mikrobiote kod pacijenata s recidivom i u remisiji (prilagođeno prema De Cruz P et al., 2014)

SINDROM IRITABILNOG KOLONA

Sindrom iritabilnog kolona (engl. Irritable bowel syndrome - IBS) je funkcionalni poremećaj u kojem je funkcija crijeva abnormalna, dok strukturalnih anomalija nema. U industrijaliziranim zemljama, IBS pogađa oko 5-20% odrasle populacije. Uzrok je nepoznat, a patofiziologija nedovoljno jasna. Sastoji od ponavljajuće simptomatologije gornjeg i donjeg GI trakta, uključujući i različite stupnjeve abdominalnih bolova, zatvor ili proljev i nadutost. Uobičajeno simptomi su intermitentnog tijeka no u nekih bolesnika oni su gotovo kontinuirano prisutni te je kvaliteta života značajno poremećena.

Smatra se da u patofiziologiji bolesti ulogu ima promjenjena os mozak-crijevo koja je povezana s disfunkcijom GI autonomnog živčanog sustava, a dovodi do pojačane osjetljivosti crijeva i poremećaja u motilitetu. Po nedavnim studijama, navodi se da bi dodatni mehanizmi uključujući promjene

crijevne mikrobiote, niski stupanj upale te promjene u imunološkom sustavu crijeva također mogli imati važnu ulogu u bolesti.

Uočene su kvantitativne i kvalitativne razlike u crijevnoj mikrobioti između pacijenata koji boluju od IBS-a i zdravih kontrola. Studije provedene do sada ukazale su da u dva velika reda crijevne mikrobiote, *Firmicutes* i *Bacteroides*, postoje kvantitativne razlike i razlike u omjeru između IBS pacijenata i zdravih kontrola. Značajno povećana gustoća *Gamaproteobacteria* i *Enterobacteria* u zdravih kontrola su pozitivno korelirane s upalnim markerima IL-6 i IL-8. Povećane razine ovih citokina su zabilježene u IBS pacijenata (D. M. Saulnier et al., 2011). Uočene su također snižene razine *Bacteroides* i *Bifidobacteria* u IBS u odnosu na zdrave pojedince.

SIBO (eng. Small bowel bacterial overgrowth - prekomjeran rast bakterija u tankom crijevu) bi mogao imati ulogu u dijelu IBS simptoma – što je indirektni dokaz da promjene mikrobiote mogu imati ulogu u bolesti. SIBO može voditi povećanoj fermentaciji, stvaranju plina i promijenjenom crijevnom motilitetu. No, ne postoji konzistentnost u pojavnosti SIBO u IBS u studijama i prevalencija znatno varira. Neke studije su pokazale da je SIBO uočen u svega 4% pacijenata s IBS-om. Smatra se da bi kod pacijenata s IBS mogle postojati kvantitativne promjene crijevne mikrobiote, ali ne tolike da zadovoljavaju kriterije SIBO. Također, provedene su studije u kojima su pacijenti oboljeli od IBS-a tretirani antibioticima s ciljem djelovanja na mikrobiotu. Uočeno je da korištenje antibiotika rifaximina tijekom 3 tjedna znatno pridonosi olakšavanju simptoma IBS poput nadutosti i abdominalne boli (Pimentel M et al., 2011).

Moguće objašnjenje ovog učinka antibiotika se pripisuje redukciji bakterija i bakterijskih produkata poput SCFA koji bi mogli imati učinka na crijevni motilitet i simptome.

Kliničke studije pokazuju da <20% IBS se pojavljuje nakon infekcije probavnog sustava. Postinfektivni IBS bi mogao biti povezan s određenim promjenama u domaćinovoju mikrobioti (inducirane infekcijom ili korištenjem antibiotika). Točni mehanizmi kojima te promjene utječu na postojanost IBS simptoma nakon akutne epizode nisu posve jasni, no mogu doprinosti genetička podložnost, abnormalni integritet mukozne barijere, varijacije u SCFA stvaranju i povećanje broja mukozalnih entero-endokrinih stanica (Spiller R, 2009).

KOLOREKTALNI KARCINOM

Kolorektalni karcinom je treći najčešći karcinom i četvrti uzrok smrti od karcinom diljem svijeta, s incidencijom oko 1.2 milijuna novih slučajeva i 600000 smrti na godinu. Mnogi okolišni rizični čimbenici su povezani sa CRC, uključujući upalne bolesti crijeva, pušenje, konzumiranje alkohola, pretilost...

Danas postoje dokazi koji ukazuju da okolišni faktori primjetno utječu na sastav intestinalne mikrobiote. Osim toga, postoje nedvojbeni dokazi povezanosti crijevne disbioze sa CRC razvojem (Schwabe and Jobin, 2013). Utjecajem na domaćinov organizam kroz metabolizam, intestinalna mikrobiota može imati i korisne i štetne uloge kontrolirajući crijevnu proliferaciju i diferencijaciju.

Kronična intestinalna upala je povezana sa razvojem CRC i može biti rezultat nenormalnog omjera protektivne (tolerantne) u odnosu na agresivnu (proupalnu, protumorsku) mikrobiotu. U tom pogledu *Bacteroides fragilis* i *Streptococcus bovis* bi mogli biti povezani sa razvojem CRC aktivirajući imune stanice da otpuštaju promotogene i proangiogene citokine, pretežito IL 17. *Streptococcus bovis* je prisutan u oko 20-50% karcinoma kolona, dok je u normalnim crijevima prisutan u <5% (Srikanth and McCormick, 2008).

Također, pretpostavlja se da neke biološke aktivnosti intestinalne mikrobiote mogu dovesti do nakupljanja određenih metabolita uključenih u CRC karcinogenezu poput sekundarne transformacije žučnih soli, desulfuracija žučnih kiselina, produkcija hidrogen sulfata, produkcija aglikona iz neaktivnih štetnih komponenti, produkcija aromatičnih amina, nakupljanje acetaldehida, reaktivnih kisikovih radikala (Azcárate-Peril MA, 2011).

Animalni eksperimenti su pokazali da mutirani miševi koji su genetički osjetljiviji za razvoj CRC, razvijaju značajno manje tumora u germ-free uvjetima nego kada je prisutna konvencionalna mikrobiota (Uronis et al., 2009). Osim toga ekstracelularni genotoksini i DNA oštećenje superoksidnim radikalima produciranim od *Enterococcus faecalis* mogu doprinijeti CRC razvoju. DNA oštećenje može biti inducirano i s genotoksinima *E.Coli* koji se nazivaju colibactin (Cuevas-Ramos et al., 2010).

Dramatične fiziološke i metaboličke promjene koje se pojavljuju za vrijeme karcinogeneze mogu poremetiti sastav domaćih bakterijskih zajednica. Neke vrste koje rijetko koloniziraju kolon će se adaptirati na novi okoliš. Prethodne studije ukazuju na to da različite bakterijske vrste povlašteno naseljavaju tumorske predjele. Nije još jasno je li povećana/smanjena zastupljenost određenih bakterijskih vrsta u tumorskom mikrookolišu indikator njihovog doprinosa u razvoju CRC-a. Iako uzročna uloga intestinalne mikroflore u CRC razvoju nije dokazana, dokazi bazirani na bakterijskim kulturama naznačuju da neki potencijalni proonkogeni patogeni, koji mogu biti komenzali, doprinose tumorskoj inicijaciji i razvoju.

Tako prema *driver-passenger* teoriji za razvoj kolorektalnog karcinoma (Tjalsma et.al, 2012) pretpostavlja da postoje dvije vrste funkcionalno različitih bakterija prisutnih u tumorskom mikrookolišu tijekom procesa tumorogeneze. Jedne su potencijalni proonkogeni patogeni poput *Escherichia/Shigella*, koja može potaknuti tumorogenezu kao driver bakterija. Dok se promijenjeni tumorski mikrookoliš razvija s progresijom bolesti, druga vrsta bakterija („passenger„ bakterija), može imati ulogu promicanja ili supresije tumora, te može biti adaptiranija na nove uvijete nego driver bakterija i preživjeti.

Naprimjer, *Shigella* koja je prepoznata kao uzročni agens dijareje, preko CRC-driving mehanizma može prolongirati upalni odgovor i povećati osjetljivost na CRC. Pronađeno je da je *Shigella* povećano zastupljena u sastavu mikrobiote kod pacijenata s adenomom (Shen et.al, 2010) kao i određeni sojevi *E.Coli* koji imaju mogućnost proizvodnje genotoksina. No u mikrobioti CRC pacijenata su reducirani. Ove vrste bi mogle biti povezane s ranim stadijima CRC, uključujući adenome i onda nestaju iz tumorskog tkiva kako bolest progredira. No, potrebne su daljnje studije na većem uzorku da se identificira uloga promijenjene mikrobiote.

Upravo ta dinamička povezanost mikrobiote sa CRC pruža dokaze za mikrobiota-povezanom dijagnostikom, prognostikom, preventivnim i terapijskim strategijama u tretiranju CRC-a u budućnosti.

Promjene u mikrobioti kod pacijenata s CRC u odnosu na zdrave osobe

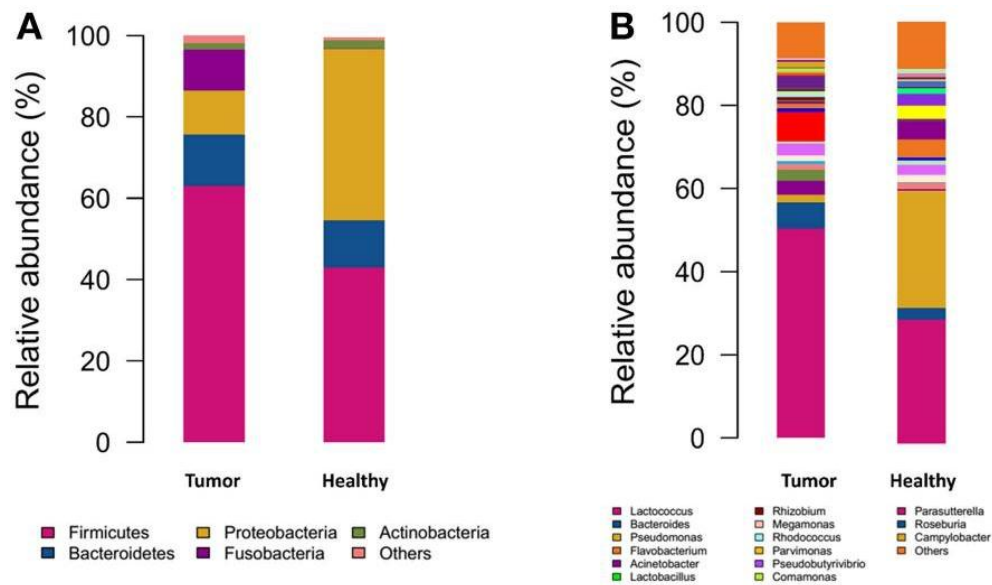
Nedavno je provedena studija (Gao et al., 2015) u kojoj su analizirane bakterijske zajednice mukoze zdravih pojedinaca i CRC pacijenata te dokazana je statistički značajna razlika u raznovrsnosti, ukazujući na signifikantno manju raznovrsnost prisutnu u CRC pacijenata.

U kanceroznom tkivu nađena je signifikantno veća zastupljenost *Firmicutes* i *Fusobacteria* u odnosu na zdrave pojedince, dok je *Proteobacteria* bila manje zastupljena u CRC pacijentima.

Videno je da *Fusobacterium* može biti povezan s upalnim bolestima crijeva (i UC i CD) (Strauss et al., 2011), a te dvije bolesti su zabilježene kao rizični faktor za kolorektalni karcinom. Također, *Fusobacterium* može poticati domaćinov pro-upalni odgovor i posjedovati virulentnost koja im omogućava adheziju na domaćinove epitelne stanice i daje im mogućnost invadiranja u zdravo tkivo.

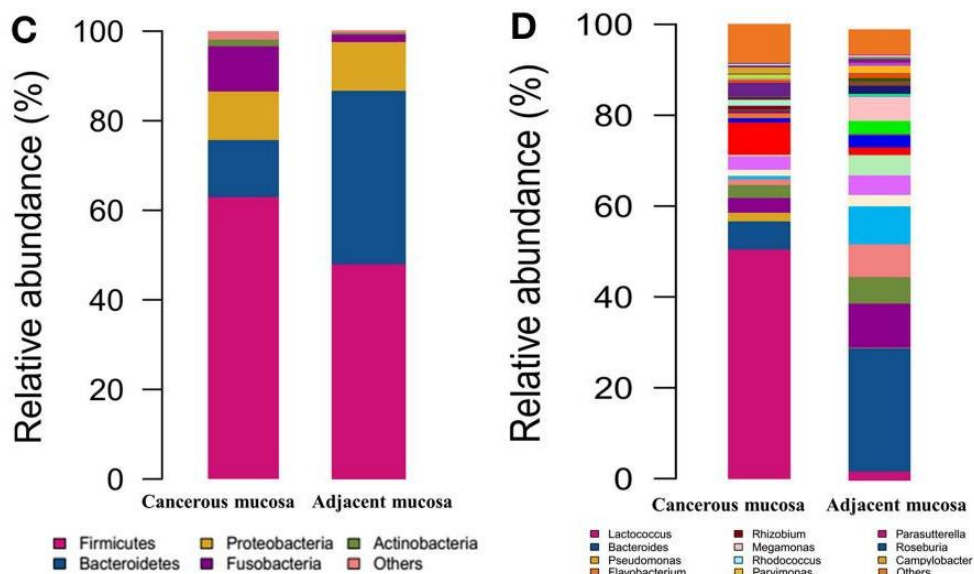
Lactococcus, koji je generalno označen kao crijevni komezal s probiotičkim svojstvima, je povećano zastupljen u CRC pacijentima, što upućuje da je promjena mikrobiote uzrokovana dramatičnim fiziološkim i metaboličkim promjenama koje su rezultat same karcinogeneze (Hirayama et al., 2009).

Cjelokupni sastav mikrobiote za svaku grupu na razini reda (slika 6.A) Vidljivo je da *Firmicutes* je najdominantniji rod u CRC pacijenata u odnosu na *Proteobacteria* kod zdravih. Na razini roda, pokazana je također značajna razlika (slika 6.B). Rod *Lactococcus*, *Fusobacterium*, *Eschericia-Shigella* i *Peptostreptococcus* su izraženi u CRC pacijenata.



Slika 6 – Različnost u sastavu mikrobiote između zdravih individualaca i CRC pacijenata (prilagođeno prema Gao et al., 2015)

Osim toga utvrđene su razlike u mikrobioti tumorskog tkiva i okolnog netumorskog kolorektalnog tkiva u uzorcima CRC. *Firmicutes* je bio značajno zastupljeniji u crijevnoj mikrobioti tumorskog tkiva, dok je *Proteobacteria* bila značajno manje izražena u odnosu na okolno netumorsko tkivo. Na razini roda su također utvrđene razlike (slika 7. C i D)



Slika 7 – Sastav mikrobiote tumorskog tkiva i okolnog netumorskog tkiva mukoze u pacijenata sa CRC (prilagođeno prema Gao et al., 2015)

CELIJAKIJA (glutenska enteropatija)

Celijakija je imunološki posredovana sistemska bolest koja se javlja u genetski predisponiranih osoba i za čiji nastanak je neophodan gluten ili srodni prolilamini, koji se nalaze u pšeničnom, raženom i ječmenom brašnu. Unošenje glutena u oboljelih rezultira upalnim promjenama i atrofijom crijevne sluznice te posljedičnom malapsorpcijom. Prema podacima svjetskih istraživanja od celijakije boluje 1 % stanovništva, obično se manifestira u djetinjstvu, ali može nastati i u odrasloj dobi.

Etiologija je poremećaja kompleksna, uključujući genske i okolišne faktora. Epidemiološki i klinički podaci ukazuju da bi u razvoju bolesti, mogle biti uključene i promjene sastava crijevne mikrobiote.

Nedavne studije ukazale su na interakcije između genetike domaćina i sastava mikrobiote u odnosu na razvoj bolesti. Ekspresija leukocitnog antigen DQ2 je jaki rizični faktor za razvoj celijačne bolesti. Djeca s tim haplotipom imaju promijenjen sastav mikrobiote (u usporedbi s non-HLA Q2 pojedincima) i prije klinički vidljive bolesti (Olivares M, 2014).

Nije još jasno je li promijenjena mikrobiota u CD pacijenata uzrok ili posljedica ove bolesti. Pretpostavlja se da gram negativne bakterije u genetički podložnih pojedinaca mogu doprinijeti gubitku tolerancije na gluten. Ako je promijenjena mikrobiota rezultat bolesti, poremećena sluznica obložena s nezrelim enterocitima bi mogla doprinositi kolonizaciji gram negativnih bakterija umjesto pozitivnih. Duodenalna biopsija neliječene CD djece pokazala je više gram negativnih populacija nego tretirani CD i zdrave kontrolne skupine. Broj gram pozitivnih bakterija je bio reduciran u CD djece (tretirane i netretirane) u odnosu na kontrole skupine (Nadal I, 2007) upućujući da omjer gram negativnih i gram pozitivnih bakterija ima određenu ulogu.

Usporedba CD djece i kontrola je pokazala da se njihovi profili mikrobiota razlikuju. Povećan broj *Bacteroidesa* je zabilježen u CD u odnosu na kontrole (Nadal I, 2007). Osobito, *Bacteroides* bakterije su važan dio crijevne mikrobiote i nekim vrstama poput *B. Vulgatus* i *B. Fragilis* je pridodan proinflatorni učinak. *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su povezane sa zaštitnim učincima za domaćina i antiupalnim efektima – uviđeno je da imaju tendenciju biti u nižim razinama u CD djece nego u zdravim kontrolama (Collado M, 2007). Značajno veći udio korisnih *Lactobacili* i *Bifidobacteria* u odnosu na potencijalno štetne gram-negativne bakterije, poput *Bacteroides*, *Prevotella* i *E. Coli* je pronađen u kontrolnim skupinama u odnosu na CD.

Zbog povezanosti CD s crijevnom mikrobiotom, te zbog mogućnosti da određeni probiotici razgrađuju ili mijenjaju gluten polipeptide i zbog učinaka nekih vrsta poput *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koje imaju zaštitna svojstva na epitelne stanice oštećene gliadinom, probiotici su se pojavili kao zanimljiv dodatak u prehrani CD. Zbog pronađenih nižih razina *Bifidobacteria* i *Lactobacili* u CD pacijenata, ove bakterije se čine obećavajuće mete za probiotičku terapiju.

PRETILOST

Pretilost je jedan od većih zdravstvenih problema današnjice koji je poprimio epidemijske razmjere. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 1,5 milijarda ljudi ima pretjeranu tjelesnu težinu od čega se više od 500 milijuna ljudi smatra pretilima. Pretilost zbog svojih implikacija na zdravlje pojedinca predstavlja veliku opasnost, povećava se rizik od mnogih bolesti i narušavanje zdravstvenog stanja. Pretilost utječe na rad i funkciju više organskih sustava pa se tako povezuje s nastankom bolesti kardiovaskularnog, lokomotornog, endokrinog, gastro-intestinalnog sustava i drugih. U razvoju pretilosti značajnu ulogu imaju crijevne mikrobiote zbog njihovog utjecaja na raspoloživost i apsorpciju hranjivih te regulaciju energetske ravnoteže organizma.

Backhead i suradnici su uočili su da GF miševi imaju manje ukupne masti u tijelu u usporedbi s miševima koji su imali normalnu crijevu mikrofloru, iako su potonji unosili manje kalorija. GF miševi su bili zaštićeni od pretilosti uzrokovane unosom hrane.

Nadalje, GF miševima je transplantirana mikrobiota iz mršavih i iz debelih miševa. Miševi kolonizirani s mikrobiotom pretilih miševa su imali povećano odlaganje masti u usporedbi s miševima koloniziranih mikrobiotom mršavih. Prijenosom mikrobiote iz mršavih i pretilih miševa u GF miševima pokazuje da pretili fenotip može biti prenesen mikrobiotom, sugerirajući tako uzročnu vezu između promijenjene mikrobiote i razvoja pretilosti. Osim toga pretilost je povezana s promjenama u sastavu i metaboličkoj funkciji crijevne mikrobiote; posebno se povezuje sa smanjenim udjelima *Bacteroidetes* prema *Firmicutes*.

Brojne studije na mršavim i pretilim miševima su pokazale da genetski (ob^{-}/ob^{-}) i prehranom-inducirani pretili miševi imaju veći udio *Firmicutes* i manje razine *Bacteroidetes* nego njihove mršave kontrole ($ob^{+}/+, +/+$) (Ley et al., 2005). Pokazano je da crijevne mikrobiote pretilih miševa (ob^{-}/ob^{-}), u odnosu na mršave, imaju pojačanu ekspresiju gena koji kodiraju enzime uključene u razgradnju polisaharida iz hrane. Zbog toga, manje količine energije ostaje u fecesu pretilih miševa, ukazujući na povećani kapacitet mikrobiote pretilih za ekstrakcijom energije iz hrane što posljedično dovodi do povećanog stvaranja zaliha masti.

Rezultati studija provedenih kod ljudi u pravilu su u suglasju s rezultatima dobivenim na životinjskim modelima. Istraživanja su pokazala da se udio bakterija u crijevu mijenja promjenom tjelesne mase. Gubitkom tjelesne težine dolazi do porasta udjela bakterija iz roda *Bacteroides*, te smanjenje bakterija iz roda *Firmicutes* (Nadal, 2008).

Zasada se ne zna još dovoljno o mehanizmima preko kojih crijevna mikrobiota modulira pretilost izuzev uloge u iskorištavanju energije iz hrane. Iako je potrebno još studija i dokaza o konkretnom djelovanju, izvjesno je da crijevna mikrobiota može biti potencijalna meta za prehrambene i farmakološke intervencije u terapiji pretilosti.

5. PROBIOTICI I PREBIOTICI

5.1 PROBIOTICI

Probiotici su subjekt interesa znanstvene zajednice od početka 20.st. (njihova karakterizacija, djelovanje i učinci), no terapeutsku upotrebu probiotika, i prije nego što su prepoznata uloga bakterija u njima datira iz davne povijesti. Plinijus, rimski povjesničar iz 76. godine prije Krista preporučuje uporabu fermentiranih mliječnih pripravaka za liječenje crijevnih problema. Kulture bliskog istoka i Azije također su od davnine smatrali kisele mliječne proizvode korisnima u intestinalnim bolestima.

Znanstveni interes za jogurt kao namirnicu i pretpostavka da određene bakterije mogu doprinijeti zdravlju pripisuje se Elie Metchnikoff, ruskom znanstveniku i dobitniku Nobelove nagrade, koji je 1908. godine predložio tezu da konzumacija jogurta koji sadržavaju *Lactobacillus*, smanjuje broj patogenih bakterija stvarajući kiseli milje („Autointoksikacijska teorija“).

Početakom 20. st. Henry Tissier je otkrio *Bifidobakterije*. Uvidio je da se kod djece s proljevom nalazi manje tih Y-oblikovanih bakterija nego u stolici njihovih zdravih vršnjaka te je ukazao na to da bi pacijenti s dijarejom mogli biti tretirani s tim „bifid“ bakterijama kako bi obnovili crijevnu mikrobiotu.

Alfred Nissle je 1917. godine izolirao soj *Escherichia coli* iz stolice vojnika koji nije obolio od enterokolitisa tijekom epidemije šigeloze. Kasnije je taj soj korišten s određenim uspjehom u akutnim infektivnim intestinalnim bolestima.

Ranih 20-tih godina 20-tog stoljeća Rettger objavljuje da mlijeko koje sadržava *L.acidophilus* ima terapijski učinak. Smatrao je da je njihov pozitivan učinak vezan uz kolonizaciju crijeva i prerastanje navedenih bakterija. Napokon, 1930. godine Shirota je prvi izolirao soj “dobrih” crijevnih bakterija koje su nakon ingestije uspjele žive doći do crijeva, te su bakterije nazvane *Lactobacillus casei Shirota* i prvi je soj koji se od 1935. godine koristi u komercijalne svrhe. Nakon toga uslijedio je razvoj velikog broja bakterija za koje se tvrdilo da imaju pozitivan učinak na zdravlje.

Riječ probiotik (lat. pro – za, grč. bios – život) je prvi puta korištena 1954.g da naznači tvari potrebne za zdravi život. Iako se Metchnikoff općenito smatra "ocem probiotika," brojni drugi znanstvenici sudjelovali su u kovanju same riječi i svatko od njih je imao vlastitu definiciju termina. Konačno, WHO i FAO 2001.g su razvili definiciju koja je danas rasprostranjena.

Prema toj definiciji probiotici su "živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u odgovarajućoj dozi kao dodatak hrani, imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina "

Najčešće korišteni probiotici u hrani su bakterijske vrste iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (LAB bakterije – bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu). Ne-LAB bakterije najčešće iz roda *Escherichia*, *Bacillus* te kvasac *Saccharomyces spp.* također imaju probiotička svojstva.

Osim sigurnosti, izbor soja probiotika ovisi o njegovom potencijalu da doprinosi zdravlju ljudi. Probiotici moraju biti rezistentni na probavljanje tijekom prolaska kroz probavni trakt do dijela u kojem polučuju učinak (kolon). Također, oni moraju konkurirati s rezidentnom mikrobiotom. Na kraju, izabrani soj treba ispuniti određene tehnološke zahtjeve poput kultiviranja na veliko, genetsku stabilnost i održivost u prehrambenim proizvodima ili suplementima. Tako da identifikacija prikladnog probiotičkog soja je vrlo složen i detaljan proces.

Dokazano je da učinak probiotika ne ovisi samo o njegovoj vrsti već i o upotrebljavanoj dozi. Pripravak probiotika mora sadržavati određeni minimum kolonija po dozi (eng. Number of colony-forming units (CFU)) da postigne učinak. Smatra se da pozitivni učinak probiotika nije moguć bez dnevnog unosa od 10⁶ do 10¹⁰ CFU; ovisno je li riječ o terapijskoj ili preventivnoj primjeni (Coeuret V, 2004).

5.2 PREBIOTICI

Pojam prebiotika definirali su 1995.g M.Roberfroid i G.Gibson kao:

“Neprobavljive sastojke hrane koji selektivno u kolonu stimuliraju rast i/ili aktivnost ograničenog broja vrsta bakterija te time u organizmu domaćina dovode do povoljnih djelovanja na zdravlje.“

Definicija je revidirana 2011.g prema kojoj se prebiotici definiraju kao:

"Selektivno fermentirani sastojci hrane koji mijenjaju sastav i / ili aktivnosti probavne mikrobiote na specifični način i s povoljnim djelovanjem na specifični način i s povoljnim djelovanjima na zdravlje domaćina"(Gibson et al., 2011)

Do danas su s obzirom na prebiotičku aktivnost proučavani samo ugljikohidrati spojevi. Mnogo je istraživanja provedeno na polisaharidu inulinu, frukto-oligosaharidima i galaktooligosaharidima (GOS). Za navedene spojeve, učinak je potvrđen u humanim studijama i oni su povezani s potencijalnim zdravstvenim koristima. Kandidati prebiotika poput disaharida laktuloze, drugih oligosaharida, dekstrina, polisaharidi poput polidekstroze, arabinoksilana i škroba, polioili (laktitol, izomalt) zahtijevaju dodatne studije i dokaze.

Neki prebiotici se pojavljuju prirodno u hrani poput cikorije, žitarica, mlijeka. Međutim, u hrani se prebiotici nalaze u u tragovima, pa da bi se postigle vrijednosti prebiotika pri kojima se javljaju učinci trebaju se provesti postupci poput počišćivanja aktivnih sastojaka iz takve hrane ili sinteza istih.

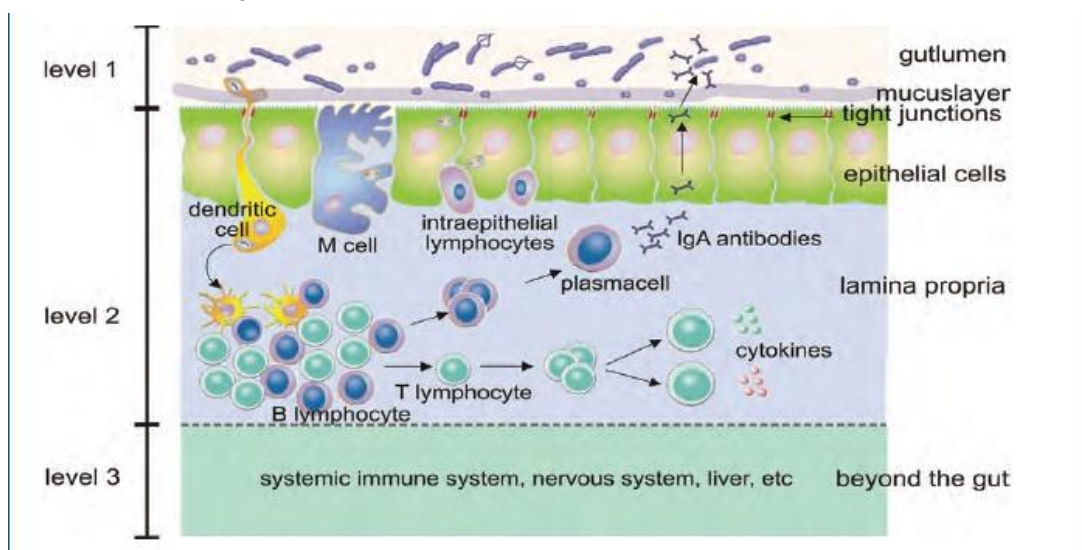
Prebiotici su bazirani na selektivnoj stimulaciji domaćinove korisne mikrobiote, odnosno ostvaruju svoje učinke stimulirajući rast i/ili metaboličku aktivnost bakterija koje ih fermentiraju . Najistaknutija meta djelovanja prebiotika jesu rodovi *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.

SINBIOTICI

- Uključuje kombinaciju prebiotika i probiotika, pri čemu , učinci tih dviju komponenta su sinergistički. Probiotici mogu biti stimulirani u crijevu fermentirajući prebiotike i/ili prebiotici mogu poticati povoljniju crijevnu floru u kojoj probiotici mogu bolje konkurirati.

5.3 MEHANIZAM DJELOVANJA

- Probiotici i prebiotici djeluju i uzrokuju interakciju s domaćinom preko dva modela djelovanja, ili njihovom kombinacijom:
 - o Utjecaj mikroorganizama ili njihovih metabolita na domaćinov GI trakt i mikrobiotu
 - o Interakcijom s domaćinovim stanicama i imunološkim sustavom



Slika 8 – Tri razine djelovanja probiotika (prilagođeno prema Rijkers 2010)

Tri nivoa djelovanja probiotika:

1. Crijevni lumen – probiotičke bakterije mogu interferirati s rastom i preživljenjem patogenih mikroorganizama u crijevnom lumenu
2. Epitel i lamina propria – mogu poboljšati mukozalnu barijernu funkciju i mukozalni imunološki sustav
3. Izvan crijeva – ima učinke na sistemski imunološki sustav, kao i na druge stanice i organe

Utjecaj na GI trakt i mikrobiotu

a) Stvaranje fermentacijskih produkata s inhibitornim svojstvima

Bifidobacterium i *Lactobacillus* u kolonu fermentiraju ugljikohidrate koji izbjegnu probavu u gornjem GI traktu (npr. prebiotik fruktan), rezultirajući smanjenjem pH kolona zbog nastanka kiselih spojeva poput acetata, laktata, butirata ili propionata. Prisutnost enzima koje druge bakterije nemaju ili imaju u jako niskoj aktivnosti (*Bifidobacterium* - B-fruktofuranozidaze, *Lactobacillus* - B-galaktozidaze) daju im kompetitivnu prednost kada su izloženi dotičnim spojevima. Prednost niskog pH u kolonu proizlazi iz stimuliranja multifikacije i preživljenja komenzalnih organizama koji preferiraju kisele uvjete i općenito onemogućavanje nekim patogenim bakterijama da prijanju, rastu ili koloniziraju GI trakt. Također, za butirata je na temelju in vitro studija utvrđeno da poboljšava diferencijaciju stanica mukoze kao i funkciju epitela kao barijere. Saharolitična fermentacija istodobno smanjuje potencijalno štetan učinak proteinske fermentacije i drugih procesa, koji dovode do spojeva koji sadrže dušik i sumpor poput amonijak, sulfide, azo spojeve.

b) Lučenje antibakterijskih supstanci

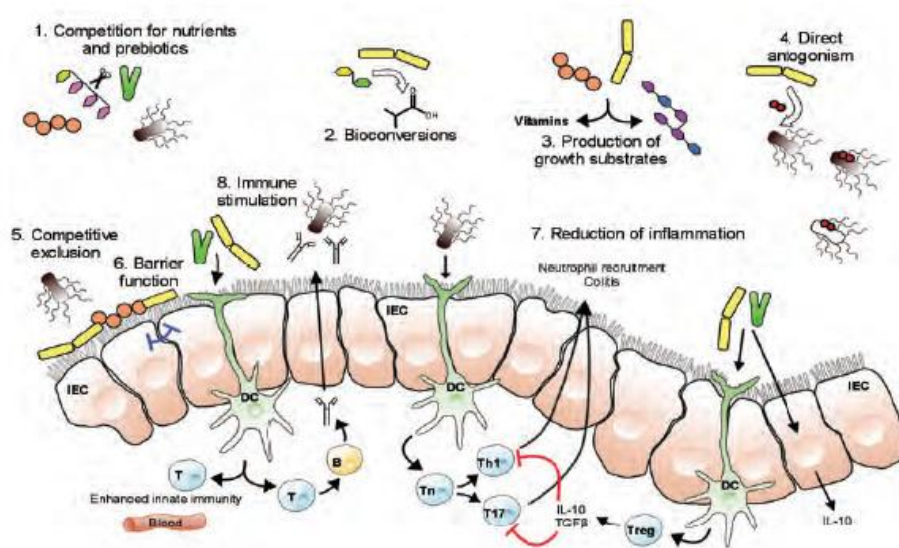
Probiotici imaju direktan učinak na patogene bakterije produkcijom bakteriocina i bakteriocinu sličnih tvari. In vitro studijama uočeno je da bakteriocini dovode do smanjenja sposobnosti patogena poput *E.Coli* da prijanja i invadira kultivirane crijevne stanice. Ovo je jedan od mogućih mehanizama kojim probiotici i prebiotici smanjuju postotak infekcije kod ljudi i životinja. Dodatni dokazi proizlaze iz studija u kojima su probiotičke bakterije modificirane na takav način da više nisu mogle producirati bakteriokine. U takvom slučaju, mikroorganizmi izgube mogućnost da preveniraju prijanjanje i translokaciju patogena tijekom in vitro studija i/ili reduciraju postotak infekcija/preživljenje kod zaraženih životinja. Utvrđeno je studijama in vitro da probiotici mogu mijenjati gensku ekspresiju određenih patogena smanjujući njihovu virulenciju.

c) Utjecaj na funkciju barijere mukoznog sloja ili epitelnih stanica

U studijama staničnih kultura utvrđen je porast u produkciji mucina, koji pomaže u zaštiti epitelnih stanica od patogena. Također pretpostavlja se da probiotici i prebiotici mogu utjecati na crijevnu

barijeru povećavajući otpornost čvrstih spojeva . Povećana ekspresija gena koji kodiraju čvrste spojeve utvrđena je u nedavnoj studiji primjenom specifičnog soja *Lactobacilusa*.

d) Studije su pokazale da se specifični probiotici mogu natjecati s patogenima za receptorsko mjesto na epitelnim tanicama ili na mukoznom sloju, prevenirajući time patogenu adheziju ili translokaciju. Nasuprot tome, drugi probiotici mogu direktno vezati za patogene, smanjujući time sposobnost da koloniziraju crijevo. Utjecaj na translokaciju nekih patogena u zaraženih životinja također je dokazan kod nekih prebiotika.



Slika 9 - Mehanizmi potencijalnog ili poznatog djelovanja probiotika (prilagođeno prema O'Toole and Cooney 2008)

Interakcije s imunološkim sustavom (eng. *Cross-talk* s domaćinom)

Najsloženiji pretpostavljeni mehanizmi preko kojih probiotici mogu djelovati su interakcije s GI imunološkim stanicama i limfoidnim tkivom modulirajući imunosni i upalni odgovor domaćina.

Interakcija između mikroorganizama (komezali, probiotičke ili patogene bakterije), i domaćinovih stanica posredovana je preko specifičnih receptora poput Tool-like receptora (TLR) koji su povezani s mukoznim stanicama u GI traktu. Aktivacija ovih receptora potiče kaskadu složenih imunosnih signala koji vode do različitih odgovora.

Npr. može osigurati uravnoteženo sazrijevanje T stanica, koje omogućuje prikladni odgovor na potencijalne patogene i antigene iz hrane, s druge strane može dovesti do neprikladnog T staničnog odgovora kao jedne od značajki alergijskih stanja. Iako i patogene bakterije i probiotici djeluju na TLR, probiotici ne započinju patogeni imunološki odgovor. Smatra se da je to posljedica djelovanja

probiotika na TLR-ove na određenim dijelovima stanice i u sadržavanju jedinstvenih dijelova u odnosu na patogene bakterije koji djeluju na različitu aktivaciju TLR.

Uporaba određenih probiotika može rezultirati B staničnom diferencijacijom i produkcijom obrambenih protutijela, poput IgA (koja se luče u lumen crijeva). Provedenim studijama dokazano je da *B. Animalis* podiže koncentraciju fekalnog sIgA u dojenčadi.

Učinak probiotika očituje se djelovanjem na ravnotežu pro i antiinflamatornih citokina, smanjujući na taj način pretjerani imunološki odgovor. U provedenim studijama unos specifičnih probiotičkih sojeva ili prebiotika doveo je do povećanja protuupalnih citokina, poput IL-10 i TGF β , i snižavanje u ekspresiji pro-upalnih citokina poput TNF α i IFN γ . Smatra se da bi ovo mogao biti mehanizam kojim su prebiotici i probiotici u mogućnosti ublažiti kroničnu intestinalnu upalu.

Aktivnost fagocita i NK stanica također može biti modulirana s različitim probioticima. Animalne studije su pokazale da tzv. G-protein receptori u određenim bijelim krvnim stanicama može ponašati kao receptor za SCFA (čije povećane razine su rezultat uzimanja prebiotika) te tako otvaraju mogućnost alternativnih mehanizama djelovanja na imunološki sustav.

5.4 UČINCI PRIMJENE PROBIOTIKA I PREBIOTIKA

A. Upalne bolesti crijeva

Poznato je ravnoteža različitih komenzalnih bakterija može biti promijenjena kod IBD pacijenata. Brojne studije probiotika i prebiotika na animalnim modelima su pokazale pozitivan utjecaj na prevenciju ili tretman IBD. Kliničke studije nisu pokazale djelotvornost u produživanju remisije kod Crohnove bolesti, ali postoje obećavajući podaci koji upućuju da su neki probiotici korisni u održavanju remisije kod UC. U ostalim upalnim crijevnim stanjima poput pouchitisa, koja se mogu pojaviti nakon operacijskog tretmana UC, određena kombinacija probiotika je djelotvorna za prevenciju i održavanje remisije. Potencijal prebiotika i sinbiotika da pomognu u upravljanju IBD je pokazan u nekoliko manjih studija s fruktanima, većinom u redukciji upalnih markera, ali dokazi još nisu dovoljni za konačne zaključke.

B. Sindrom iritabilnog kolona

Zbog nedostatka uspješne terapije za IBS i identifikacije abnormalne mikrobiote kod pacijenata, probiotici i prebiotici istraživani su vezano za njihovu sposobnost da pomognu pojedincima s ovom bolesti. Skupina probiotičkih preparata pokazala je smanjenje u globalnoj ocjeni simptoma (zbroj

različitih rezultata simptoma) i smanjenje abdominalne boli; promjene u dijareji, konstipaciji ili nadutosti nisu potvrđene. U drugim studijama, određene skupine preparata pokazale su se bezuspješnim ili su rezultirali pogoršanjem simptoma.

Za neke prebiotike, studije su pokazale da niska doza vodi do poboljšanja stanja, dok veća doza rezultira povećanjem simptoma. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se odredili dosljedni korisni učinci kod pacijenata sa IBS ako koriste prebiotike i probiotike.

C. Utjecaj na imunološki odgovor

Potencijal probiotika i prebiotika da utječu na imunološki odgovor i smanjenje rizika od infekcija proizlazi iz činjenice da su komenzalni organizmi bitni za sazrijevanje i funkciju imunskog sustava. Smatra se da kontinuirana uporaba probiotika modificira imuni odgovor. No, iako su provedene brojne studije, definitivni dokazi su još nedostatni.

Gastrointestinalna infekcija - tanko crijevo je glavna meta mnogih GI infekcija. Probiotici su dugo bili povezivani s navodnom sposobnošću da neutraliziraju patogene bakterije. Rezultati kliničkih studija pokazuju poboljšanje u liječenju akutnog, vodenog, u prvom redu rotavirusnog proljeva kod djece. Učinak se vidi kroz skraćivanje proljeva, a ovisan je o soju (LGG je najučinkovitiji), dozi te o primjeni u ranoj fazi bolesti.

Antibiotikom inducirana dijareja (ADD) - Neki antibiotici mogu znatno poremetiti komenzalne bakterije što dovodi do ADD (incidencija ADD kod nekih antibiotika iznosi do 25%). Metaanalize randomiziranih kontrolnih studija potvrdile su učinkovitost specifičnih probiotika u prevenciji ADD u djece i odraslih.

Mikrobiota u prerano rođene djece se razlikuje u sastavu u odnosu na djecu rođenu na vrijeme. Osim toga bakterije iz hospitalnog miljea i korištenje antibiotika, svrstava tu populaciju u povećani rizik za razvoj **nekrotizirajućeg enterokolitisa**. Iako korištenje probiotika nije još osnovano u kliničkoj praksi, nekolicina ispitivanja je pokazala da specifični probiotici mogu reducirati rizik pojave nekrotizirajućeg enterokolitisa. Dodatnim studijama potrebno je utvrditi preferirane sojeve i preporučene doze.

Respiratorne infekcije

Nekoliko provedenih studija na različitim dobnim skupinama istraživalo je utjecaj probiotika na osjetljivost na infekcije gornjeg respiratornog trakta, na trajanje i simptome. Neki sojevi doveli su do smanjene incidencije, neki do kraćeg trajanja, a većina je imala učinke na simptome. Dokazi su obećavajući, no zasad nema čvrstih zaključaka. Dokazi za učinak prebiotika proizlaze iz nedavne studije u kojoj je dojenčad koja je konzumirala formulu obogaćenu sa specifičnim GOS/dugolančanim

FOS kombinacijama bila manje sklona gornjim respiratornim infekcijama nego dojenčad hranjena s formulom bez prebiotika.

Alergijska stanja

Smatra se da atopična djeca imaju određen stupanj disbioze, s većim brojem *Clostridija* i manje *Bifidobakterija* nego neatopični individualci što dovodi do pretpostavke da bi primjena prebiotika mogla pomoći u smanjenju rizika za razvoj atopičnog ekcema ili alergijskog rinitisa. Nadalje, studije na dojenčadi koja je bila visokorizična za alergije, primjenom suplementiranih formula kroz 6 mjeseci došlo je da pada u razinama IgE i nekih IgG. Promatran je i utjecaj probiotika na razvoj alergijskih simptoma u dojenčadi visokorizične za atopijske bolesti. Provedene studije su pokazale da primjena LGG u trudnica i majki dojilja te njihove djece tijekom prvih nekoliko mjeseci sprječava nastajanje alergije u rizične djece.

D. Utjecaj na GI trakt specifičan za prebiotike

Karcinom debelog crijeva

Smatra se da jedan od rizičnih čimbenika za karcinom debelog crijeva može biti prehrana s niskim udjelom prehrambenih vlakana. Vođeni tom idejom provedena su istraživanja, kako bi se utvrdilo imaju li prebiotici potencijal da smanje rizik za karcinom kolona. Potencijalni mehanizam za prebiotični učinak uočen je na životinjskim studijama i uključuje promjene u aktivnosti crijevnih bakterijskih enzima, koje modificiraju fermentacijske produkte, i povećanje apoptoze (programirane stanične smrti – u ovom slučaju prekanceroznih stanica). Međutim, definitivni dokazi da određeni prebiotici mogu reducirati rizik nastanka karcinom kolona u ljudi su manjkavi i potrebna su daljnja istraživanja.

Prebiotici u prehrani rane životne dobi – oligosaharidi poput fukoziola, galaktoziola i sialila su pronađene su u majčinom mlijeku i smatra se da promoviraju zdravu mikrobiotu. Studije su pokazale da dojenačka formula dopunjena s GOS i/ili fruktanima, pomaže stimulirati *Bifidobakterije* koje su karakteristične kod dojene djece. Nadalje, dojenčad hranjena formulom s oligosaharidima, imaju mikrobiotu, pH stolice i SCFA uzorak nalik djeci dojenoj majčinim mlijekom.

Mineralna apsorpcija – Postoje opsežni podaci iz animalnih studija koji pokazuju da prebiotici povećavaju apsorpciju kalcija te povećavaju rast i koštanu masu. Humane studije također su utvrdile povećanje u apsorpciji kalcija. Studija provedena na adolescentima u kojoj je korištena kombinacija FOS i dugolančanog inulina tijekom godine dana, pokazala je da mineralna gustoća i mineralni sastav kosti su bili značajno veći kod grupe u kojoj se primjenjivao suplement.

Utjecaj na unos hrane – studije provedene na glodavcima, uglavnom s fruktanima pokazale su učinke konzumiranja prebiotika u smanjenom unosu hrane i smanjenju masnog tkiva, iako ne nužno

tjelesne težine. Mehanizmi odgovorni za to su najvjerojatnije SCFA stimulirana sekrecija crijevnih peptida poput glukagon-nalik peptida (GLP1), peptid YY i oksintomodulin te smanjena sekrecija grelina, koje izlučuju endokrine stanice u mukozi. Za ove peptide se zna da imaju utjecaja na unos hrane u životinja i ljudi. Postoji mogućnost da utjecaj SCFA na metabolizam glukoze i lipida također ima ulogu. Studije na ljudima s fruktanima podupiru navedene učinke - dnevna konzumacija prebiotika smanjuje apetit, smanjuje tjelesnu težinu ili masno tkivo, mijenja razinu crijevnih peptida u krvi i poboljšava intoleranciju glukoze.

E. Utjecaj na GI trakt specifičan za probiotike

Malapsorpcija laktoze

Vrijednosti laktaze su visoke u novorođenčadi što omogućava probavu mlijeka, dok je ekspresija enzima laktaze kod odraslih uglavnom smanjena. Crijevna fermentacija neprobavljene laktoze rezultira simptomima poput abdominalne boli, nadutosti, proljeva, mučnine. Postoje dokazi da su bakterije iz jogurta sposobne kompenzirati manjak endogene laktaze u crijevima, što povećava probavljivost te reducira simptome povezane s intolerancijom laktoze u nekih ljudi.

6. UTJECAJ PREHRANE NA MIKROBITU

Crijevna mikrobiota je pod utjecajem mnogih faktora. Od okolišnih faktora smatra se da vrlo važnu ulogu ima prehrana. Količina, tip i ravnoteža glavnih prehrambenih makronutrijenata (ugljikohidrata, proteina i masnoća) utječu na mikrobiotu. Nedavni dokazi upućuju da određeni tip prehrane može dovesti do poremećaja crijevne mikrobiote. Smatra se da određena prehrana može promovirati rast mikroba koji imaju štetne učinke na domaćina dok drugi prehrambeni faktori mogu promovirati benefičijalne mikrobe. S druge strane, prehrana i povezani životni stil imaju ulogu u patofiziologiji određenih bolesti. Primjerice Zapadnjačka prehrana s viskim unosom mesa i ugljikohidrata i niskim unosom povrća povezana je s bolestima poput metaboličkog sindroma, ateroskleroze, IBS i CRC.

Bacteroidetes, *Firmicutes* i *Actinobacteria* su glavni rodovi u crijevu i ove bakterije posjeduju spektar enzima koji razgrađuju složene prehrambene supstrate. Dok određene crijevne bakterije su u mogućnosti metabolizirati cijeli spektar različitih supstrata, druge vrste su specijalizirane u

fermentaciji određenih supstrata, tako da određena prehrana može pružiti niz rastućih ili inhibirajućih faktora za specifične filotipove. Dok kratkoročne promjene u prehranbenim uzorcima vjerojatno nemaju velike utjecaje, dugoročna prehrana može utjecati značajno na mikrobiotu.

Utjecaj prehrane na sastav mikrobiote vidljiv je tijekom kolonizacije gastrointestinalnog sustava u dojenačko doba. Dojena djeca imaju veće razine *Bifidobacteria spp.*, dok djeca hranjena formulama imaju povećane razine *Bacteroides spp.*, kao i *Clostridium coccoides* i *Lactobacillus spp.* (Fallani M., 2010). Nedavno provedena studija je dovela do zaključaka da visoki unos masnoća utječe na sastav mikrobiote u miševa neovisno o pretilosti. Uspoređen je divlji tip i RELM-beta (Resistin-Like Molecule-beta) /FIZZ2 insuficijentni miševi i procjenjivao se utjecaj prehrane, genotipa i pretilosti na sastav mikrobiote. Nađene su bitne razlike u crijevnoj mikrobioti kada se promijenila prehrana na visoki unos masnoća. Došlo je do smanjenja *Bacteroidetes* i povećanja *Firmicutes* i *Proteobacteria*, a promatrane promjene su bile neovisne o pretilosti (Hildebrandt et al., 2009).

U drugoj studiji, U GF miševima je transplantirana humana fekalna mikrobiota. Promjena u prehrani (prehrana s niskim udjelom masnoća zamjenjena je prehranom s visokim udjelom masnoća i šećera) rezultirala je promjenom strukture mikrobiote mijenjajući metaboličke puteve mikrobiote i gensku ekspresiju. Miševi su pojačano izražavali pretilost i ova crta je također prenesena preko mikrobialne transplantacije (Turnbaugh et al., 2009).

Osim toga, proučavane su interakcije između prehrane i mikrobiote. Procjenjivala se mikrobiota u pojedinaca na različitim prehranbenim režimima. Kratkoročna prehrana nije imala utjecaja na njihov enterotip, dok je dugoročna prehrana dovela do promjena. Dok je prehrana obogaćena proteinima i mastima ispojavala „*Bacteroides*“ enterotip, ugljikohidratima obogaćena prehrana je podržavala „*Prevotella*“ enterotip. Je li to klinički značajno ili ne, još nije poznato, kao što i navedeni enterotipovi zasad nisu povezani s određenim bolesnim stanjima.

Rodovi povezani s povećanim unosom vlakana su *Bacteroidetes* i *Actinobacteria* dok je pokazano da su *Firmicutes* i *Proteobacteria* u suprotnoj korelaciji. Važno je naglasiti da kratkotrajne prehranbene intervencije preko 24h s povećanim udjelom masti/niskim vlakana ili niskim udjelom masti /visokim vlakana može utjecati na mikrobiotu, makar na umjereni način, a pogođena taksonomska grupa se razlikuje među individualcima. Također, ne može se isključiti da čak i male promjene mogu imati određene posljedice za ljudsko zdravlje i bolesti.

U usporedbi europske i afričke djece, pronađeno je da europska djeca imaju smanjene razine *Bacteroidetes* i povećanja *Enterobacteriaceae* u usporedbi s ruralnom afričkom djecom što autori pridodaju niskom udjelu vlakana u prehrani kod Europljana (De Filippo C., 2010).

Tabela 2 – Utjecaj vrste prehrane na crijevnu mikrobiotu (prilagođeno prema Verbanac D i sur., 2013)

Prehrana	Populacije u porastu	Populacije u padu
Ograničen unos masti	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>
Ograničen unos ugljikohidrata	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>
Niski unos UH/visoki proteina	<i>Oscillibacter valerigens</i>	<i>Roseburia, E. rectale, Bifidobacterium</i>
Ograničenje kalorija i tjelovježba	<i>B. fragilis, Lactobacillus, Bacteroides</i>	<i>C. coccoides, C. histolyticum, E. rectale-C. coccoides</i>
Visoki unos vlakana	<i>Bifidobacterium, Ruminococcus, E. rectale-C. coccoides</i>	

Prehrana svakako ima važan utjecaj na sastav crijevne mikrobiote. No puno je neodgovorenih pitanja i nejasnoća koje zahtijevaju daljnja istraživanja i kliničke studije. Napredak u razumijevanju kako se prehrana može koristiti za modulaciju sastava i metabolizama crijevne mikrobiote te povećavajući naše znanje o interakciji između hranjivih tvari i mikrobiote može rezultirati boljim razumijevanjem bolesti koje su dovode u vezu s prehrambenim navikama, i na kraju dovesti do bolje preventivne i terapijske strategije.

7. ZAKLJUČAK

Crijevna mikrobiota utječe na ljudski organizam na raznim razinama i djeluje na veliki broj organskih sustava, od utjecaja na imunost do stimulacije centara mozga odgovornih za apetit i kontrolu unosa hrane. Štoviše, zbog brojnih funkcija i utjecaja na čovjekovo zdravlje, crijevna flora postaje predmet interesa sve većeg broja stručnjaka i znanstvenika koji je počinju smatrati „organom unutar organa“

Dokazano je da postoji povezanost između crijevne mikrobiote i određenih bolesnih stanja, no još nije jasno jesu li promjene u mikrobioti uzrok ili posljedica tih bolesti, i može li manipulacija crijevnom mikrobiotom pomoći u prevenciji ili tretiranju tih stanja.

Utvrđivanje detalja umješanosti crijevne mikrobiote u naš razvoj i funkciju u zdravlju i bolesti pruža nam nove mogućnosti u razvoju rješenja za održavanje, poboljšavanje i obnovu mikrobiote kod rizičnih ili bolesnih pojedinaca.

Nadalje, nedavne studije sugeriraju da se na crijevnu mikrobiotu može djelovati prehranom, prebiotcima i probiotcima. Koncept probiotika i prebiotika u znanosti se nastavlja razvijati. Uloga probiotika i prebiotika koja se tek ispituje u kontroli apetita i upravljanju težine bi mogla biti vrlo važna, a rastuće područje interesa su istraživanja njihovog potencijala u protuupalnoj ulozi u stanjima izvan crijeva poput kardiovaskularne bolesti, pretilost i metaboličkog sindroma .

Nastavak istraživanja mikrobite će bez dvojbe pomoći dovesti do boljeg uvida u učinke probiotika i prebiotika na ljudsko zdravlje, te dodatno unaprijedi terapijske mogućnosti.

8. ZAHVALE

Hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Donatelli Verbanac na intrigantnoj temi, stručnim savjetima, pomoći i susretljivosti.

Hvala mojim prijateljima i kolegama na potpori i prijateljstvu.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i konstantnoj potpori.

U Zagrebu, lipanj 2015.

Antonija Mahmutović

9. LITERATURA

1. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF et al.(2013) Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy* doi:10.1111/cea.12253
2. An D , Oh SF, Olszak T et al. (2014) Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* 156: 123–133.
3. Arumugam M, Raes J , Pelletier E et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180.
4. Azcarate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM (2011)The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: A putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 301(3):G401-24
5. Bäckhed F, Ding H, Wang T et al.(2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15718–15723
6. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Hostbacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915–1920
7. Binns N (2013) Probiotics, Prebiotics and the gut Microbiota. Brussels: ILSI Europe a.i.s.b.l.
8. Cahenzli J, Koller Y, Wyss M., Geuking MB, McCoy KD (2013) Intestinal microbial diversity during early-lifecolonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 14: 559–570.
9. Carding S et al. (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26: 26191
10. Cheng J, Kalliomäki M et al. (2013) Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC Gastroenterology* 13:113
11. Cho I, Blaser MJ (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13:260–270.
12. Chow J, Mazmanian SK (2010) A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* 7: 265–276.
13. Chuan Sheng L, Chih Jung C et al. (2014) Impact of the Gut Microbiota, Prebiotics, and Probiotics on Human Health and Disease. *Biomed J* 37:259-268
14. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP (2004) Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int J Food Microbiol* 97:147-56.

15. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C et al. (2008) Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiology* 8: 232.
16. Cuevas-Ramos G, Petit CR et al.(2010) Escherichiacoli induces DNA damage in vivo and triggersgenomic instabilityin mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107: 11537–11542.
17. David LA, Maurice CF et al (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505: 559–563
18. De Filippo C, Cavalieri D et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from europe and rural africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:14691–14696.
20. DeCruz P, Kang S et al. (2014) Specific Mucosa-Associated Microbiota in Crohn's Disease at the Time of Resection are Associated with Early Disease Recurrence: A Pilot Study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* doi: 10.1111/jgh.12694
21. Fallani M, Young et al. (2010) Intestinal microbiota of 6-week-old infants across europe:Geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J. Pediatr.Gastroenterol. Nutr.* 51:77–84
22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330–336.
23. Gao Z, Guo B et al. (2015) Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 6: 20
24. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA et al.(2014) The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15:382-92.
25. Gibson GR et al. (2011) Dietary prebiotics: current status and new definition. *IFIS Functional Foods Bulletin* 7:1–19.
26. Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512–519.
27. Guinane C, Cotter PD (2013) Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *TherAdv Gastroenterol.* 6(4): 295-308
28. Hildebrandt M.A., Hoffmann C et al. (2009) High-Fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 137:1716–1724.
29. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M et al.(2009) Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresistime-of-flightmass spectrometry. *Cancer Res.* 69:4918–4925

30. Kabat AM, Srinivasan N, Maloy KJ (2014) Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. *Treimm* 35 (11): 503-580
31. Karlsson F, Tremaroli V et al. (2013) Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes* 62:3341–3349
32. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ (2013) Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* 62:1505-1510.
33. Lan A, Blachier F et al. (2014) Mucosal Healing in Inflammatory Bowel Diseases: Is There a Place for Nutritional Supplementation? *Inflammatory Bowel Diseases*. 21(1): 198-207
34. Lee BJ, Bak YT (2011) Irritable Bowel Syndrome, Gut Microbiota and Probiotics. *J Neurogastroenterol Motil* 17:252-266
35. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11070–11075
36. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E et al. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55: 205–211.
37. Moraes LFS, Grzeskowiak LM, Teixeira TFS, Peluzio MCG (2014) Intestinal Microbiota and Probiotics in Celiac Disease *Clin. Microbiol. Rev.* 27(3):482-489
38. Musso G, Gambino R et al (2010) Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. *Diabetes Care* 33:2277–2284
39. Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C et al. (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology* 56:1669–1674.
40. Nadal I, Santacruz A et al.(2009) Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulincoating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes* 33:758–767.
41. Olivares M , Neef A , Castillejo G et al. (2015) The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut* 64(3):406-17 .
42. Olle B (2013) Medicines from microbiota *Nat Biotechnol.* 31(4):309-315
43. Olszak T, An D, Zeissig S et al. (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336: 489–493.
44. Petersen C, Round JL (2014) Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology* 16(7): 1024–1033
45. Pimentel M, Lembo A, Chey WD et al. (2011) Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *New England Journal of Medicine* 364:22–32.

46. Pozo-Rubio T, Olivares M et al. (2012) Immune Development and Intestinal Microbiota in Celiac Disease *Clin Dev Immunol.* 2012:654143
47. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65.
48. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C et al. (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26: 26050
49. Saulnier DM, Riehle K et al.(2011) Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141:1782–1791.
50. Schwabe RF , Jobin C (2013).Themicrobiomeandcancer. *Nat.Rev.Cancer* 13: 800–812.
51. Scott KP, Antoine JM et al. (2015) Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26: 25877
52. Sekirov I, Shannon L et al. (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90: 859–904
53. Shen XJ, Rawls JF, Randall T et al. (2010) Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *GutMicrobes* 1:138–147.
54. Simrén M, Barbara Get al (2013) Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 62(1): 159–176
55. Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al.(2013)The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341: 569–573.
56. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al.(2008) Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16731-6.
57. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I et al. (2009) Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1183–1189.
58. Spiller R, Garsed K. (2009) Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136(6):1979-88.
59. Srikanth CV, McCormick BA (2008).Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota:athree-waycrosstalk. *Interdiscip.Perspect.Infect.Dis.* doi:10.1155/2008/626827
60. Strachan DP (2000) Family size, infection and atopy: the first decade of the ‘hygiene hypothesis’. *Thorax* 55:2–10.
61. Strauss J, Kaplan GG et al.(2011) Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm.BowelDis.* 17:1971–1978.

62. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y (2008) Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 14:147–161.
63. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE (2012) A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 575–582.
64. Tojo R, Suarez A et al. (2014) Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol.* 20(41): 15163-15176
65. Turnbaugh P.J., Ridaura et al. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1 doi:10.1126/scitranslmed.3000322.
66. Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH et al (2009) Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0006026
67. Verbanac D, Perić M, Čipčić Paljetak H (2011) Debljina, mikrobiote i imunomodulacija. *Croatian Journal of Infection* 31:1, 49–58
68. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA et al. (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328: 228–231.
69. Wellsa JM et al (2011) Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface 108 (1): 4607-4614
70. Wills ES, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, Masclee AA, Pierik MJ et al. (2014) Fecal Microbial Composition of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Patients in Remission and Subsequent Exacerbation. *PLoS ONE* 9(3): e90981

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. Studenog 1990. u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu Tituš Brezovački završila sam u Zagrebu s odličnim uspjehom. Za vrijeme školovanja pohađala sam i završila osnovnu glazbenu školu smjer klavir. Aktivno sam trenirala i postigla uspjehe u karateu i košarci. Godine 2009. upisala sam Medicinski fakultet na Sveučilištu u Osijeku, a 2010 sam prešla na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Članica sam studentske udruge CroMSIC i EMSA. Tijekom studija bila sam demonstrator iz predmeta anatomije, te sam bila aktivni član kardiosekcije u sklopu koje sam pohađala nekolicinu tečajeva. Područja interesa su mi prehrana, imunologija te interna medicina.