

# HUMANI MIKROBIOM I KRONIČNE BOLESTI U DJECE

---

**Madunić, Mateo**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:750316>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Mateo Madunić

HUMANI MIKROBIOM I KRONIČNE BOLESTI U DJECE

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Mateo Madunić

HUMANI MIKROBIOM I KRONIČNE BOLESTI U DJECE

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

Mentor: Prof.dr.sc. Vojko Rožmanić, dr.med.

Diplomski rad ocjenjen je dana 25. lipnja 2015. godine s izvrstan (5) na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Srđan Banac
2. Prof. dr. sc. Mladen Peršić
3. Prof. dr. sc. Brigita Tićac

Rad sadrži 48 stranica i 69 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i podržavali me tijekom cijelog studija. Također, zahvaljujem se Profesoru Rožmaniću na pomoći i suradnji pri pisanju diplomskog rada.

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	SVRHA RADA .....	2
3.	MIKROBIOTA .....	3
<b>3.1</b>	<b>Funkcija i sastav mikrobiote .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Razvoj imunosti i mikrobiota .....</b>	<b>5</b>
<b>3.3</b>	<b>Karakteriziranje mikrobiote .....</b>	<b>6</b>
<b>3.4</b>	<b>Vanjski utjecaji na mikrobiotu .....</b>	<b>6</b>
3.4.1	Prenatalni utjecaji .....	7
3.4.2	Način poroda .....	8
3.4.3	Dojenačka prehrana .....	9
3.4.4	Prehrana nakon dojenačke dobi .....	10
3.4.5	Antibiotici .....	11
3.4.6	Gestacijska dob .....	12
3.4.7	Stres .....	12
<b>3.5</b>	<b>Terapijske mogućnosti .....</b>	<b>13</b>
3.5.1	Probiotici i prebiotici .....	13
3.5.2	Transplantacija mikrobiote .....	15
4.	DISBIOZA MIKROBIOTE I KRONIČNE BOLESTI U DJECE .....	16
<b>4.1</b>	<b>Atopijske bolesti .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2</b>	<b>Gastrointestinalne bolesti .....</b>	<b>19</b>
4.2.1	Nekrotizirajući enterokolitis .....	19
4.2.2	Rekurentna infekcija C.difficile .....	20
4.2.3	Upalne bolesti crijeva .....	20
4.2.4	Sindrom iritabilnog kolona .....	21
<b>4.3</b>	<b>Dijabetes mellitus tipa 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Pretilost .....</b>	<b>24</b>
4.4.1	Mehanizmi djelovanja mikrobiote na pretilost .....	26
4.4.2	Antibiotici i pretilost .....	28
4.4.3	Mogućnosti djelovanja .....	29
<b>4.5</b>	<b>Spektar autističnih poremećaja .....</b>	<b>31</b>
5.	RASPRAVA .....	35
6.	ZAKLJUČAK .....	38
7.	SAŽETAK .....	39
8.	SUMMARY .....	40
9.	LITERATURA .....	41

10.	ŽIVOTOPIS .....	48
-----	-----------------	----

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

NIH- National Institutes of Health

HMP- Human microbiome project

TLR- Toll like receptor

TH- T helper cell

RNA- Ribonukleinska kiselina

rRNA- Ribosomalna ribonukleinska kiselina

BMI- Body mass indeks

KLMK- Kratkolančane masne kiseline

IL- Interleukin

CCL-Chemokine ligand

MCP-Monocyte chemotactic protein

WAO- World Allergy Organization

DNA- Deoksiribonukleinska kiselina

NEC- Necrotizing enterocolitis

IBD- Inflammatory bowel disease

IBS- Irritable bowel syndrome

T1DM- Dijabetes mellitus tip 1

HLA- Human leukocyte antigen

NOD- Non obese diabetic



MyD88- myeloid differentiation primary response gene 88

SAD- Sjedinjene Američke Države

LPS- Lipopolisaharid

CD14- Clusters of differentiation 14

TNF- Tumor necrosis factor

LPB- Lipopolysaccharide binding protein

NF- $\kappa$ B- Nuclear factor kappa- light-chain-enhancer of activated B cells

PPAR $\gamma$ - Peroxisome proliferator activated receptor gamma

GLUT4- Glucose transporter 4

GLP- Glucagon like peptide

FDA- Food and Drug Administration

SŽS- Središnji živčani sustav

SAP- Spektar autističnih poremećaja

## 1. UVOD

Još od davno je poznato je da su mikroorganizmi uzročnici infektivnih bolesti, stoga je uvijek postojao obrambeni stav prema mikroorganizmima i stalno se pokušavalo pronaći načine kojima ih se može uništiti. Tako je izum antibiotika jedno od najvećih otkrića u povijesti medicine. Međutim, još 1907. godine, nobelovac Elie Metchnikoff opisuje potencijalne koristi od konzumacije velikih količina mikroba u produženju života i poboljšanju zdravlja. Nažalost, ovakav pogled na mikroorganizme u to doba je bio podređen mišljenju da se mikroorganizmi trebaju shvatiti kao infektivni agensi, te se znanost usmjerila na otkrivanje antimikrobnih lijekova i cijepiva.<sup>1</sup>

Termin probiotik prvi put su upotrijebili Lilly i Stillwell, koji su predložili da su probiotici mikrobi koji luče tvari koje potiču druge mikroorganizme na rast. Parker je prvi upotrijebio ovaj izraz kako bi opisao mikrobe koji imaju povoljan učinak na životinju domaćina. Današnja definicija probiotika je nastala 2001. godine od strane Organizacije za hranu i agrikulturu i Svjetske zdravstvene organizacije, a prema ovoj definiciji probiotici su „živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina.“<sup>1</sup>

Mikrobiota predstavlja složeni ekosustav mikroorganizama, čiji broj stanica premašuje broj čovjekovih stanica u tijelu za deset puta. S druge strane mikrobiom je termin koji označava sveukupni genom mikroorganizma, a sa svojih 3.3 milijuna gena, za više od sto puta je veći od ljudskog genoma i stoga se često naziva „zaboravljeni organ“ ili „superorgan“.<sup>2</sup> Sastav mikrobiote jedinstven je za svaku osobu, a njegovo formiranje započinje već u intrauterinom razdoblju.<sup>3</sup>

Prekretnicu razumijevanja utjecaja komenzalnih bakterija na bolesti predstavlja „Human microbiome project“ (HMP) koji je 2005. godine pokrenut od Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH), a cilj mu je prikupiti uzorke mikrobiote iz što više ljudi, kako bi se otkrilo što

više o normalnom sastavu mikrobiote. Ovaj projekt omogućio je da donekle proučimo sastav normalne mikrobiote, te promjene u sastavu koje odstupaju od normalne mikrobiote, što nazivamo disbioza, a koje mogu pridonijeti nastanku različitih bolesti.<sup>4</sup>

## 2. SVRHA RADA

Napretkom tehnologije istraživanja mikrobioma otkriva se kako mikrobiom ima ulogu u sve većem broju bolesti. Važnost poznavanja uloge mikrobiote u razvoju bolesti jest mogućnost prevencije bolesti djelovanjem na mikrobiotu prije pojave simptoma.

Svrha ovog rada je prikazati dosadašnja saznanja o mikrobioti, te će prvi dio biti usmjeren na funkciju i sastav mikrobiote osobito funkciju u razvoju imunskog sustava, tehnike kojima karakteriziramo mikrobiotu, vanjske utjecaje na promijene u kompoziciji, te probiotike i transplantaciju mikrobiote kao mogućnosti djelovanja na mikrobiom. Dok će drugi dio prikazati neke od bolesti na koje mikrobiom utječe, sa naglaskom na šećernu bolest tipa 1, pretilost, razvoj mozga i spektar autističnih poremećaja, te mogućnosti prevencije tih bolesti.

### 3. MIKROBIOTA

#### 3.1 Funkcija i sastav mikrobiote

Čovjek živi u zajednici sa velikim brojem različitih mikroorganizama koji čine dio njegovog organizma. Mikrobiom ima utjecaj na različite fiziološke funkcije ljudskog organizma. Neke od tih funkcija su iskoristivost prehranbenih tvari, pojačanje funkcije crijevne barijere i stimulacija razvoja imunog sustava. Pojačanje funkcije crijevne barijere smatra se važnim zaštitnim učinkom mikrobiote, a postiže se stimulacijom razvoja mikrovila i spojeva između crijevnih epitelnih stanica. Bakterije također mogu stimulirati epitelne stanice na pojačano lučenje mucina, molekule koja formira glikokaliks kao fizikalnu i antibakterijalnu barijeru. Uz to crijevne bakterije imaju sposobnost zaštititi naš organizam od infekcija patogenim bakterijama. Postoji više različitih načina na koji one to postižu, a najčešće se zaštita od patogenih bakterija odvija pomoću kompeticije za hranidbene tvari, kompeticije za adherentna mjesta na crijevnoj stjenki i pomoću bakterijske bjelančevine bakteriocina, koji može selektivno ili neselektivno sprječavati rast drugih bakterija.<sup>5,6</sup>

Smatra se da u ljudskom tijelu možemo naći više od  $10^{14}$  mikroba odnosno više od 100 trilijuna stanica mikroorganizama, što je 10 puta više od ukupnog broja stanica čovjekova organizma<sup>7</sup> Ljudski mikrobiom, ako gledamo od najbrojnijih do najmanje prisutnih organizama se sastoji od bakterija, virusa, gljiva, arhea i protozoa.<sup>1</sup> Osim same količine mikroba, važno je napomenuti i da sveukupni genom mikroorganizama, koji nazivamo mikrobiom sadrži najmanje 100 puta više gena nego ljudski genom, a 99% mikrobioma čine bakterijske DNA sekvence.<sup>1,3</sup> Mikroorganizme kod čovjeka možemo naći na koži, u respiratornom traktu i u gastrointestinalnom traktu.<sup>1,3,7</sup>

Ljudska crijeva su naseljena složenom i dinamičnom populacijom od oko 1000 različitih vrsta bakterija, dok jedna osoba udomljuje oko 160 vrsta. Od oko 50 poznatih bakterijskih koljena

povezanih sa ljudima, njih 10ak se nalazi naseljenih u jednoj osobi.<sup>8</sup> Bakterijska koljena koja dominiraju u ljudi neovisno o mjestu na tijelu jesu *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria*. Unatoč tomu što ova koljena dominiraju u cijelom tijelu, na različitim mjestima u tijelu nalazimo ih u različitim udjelima. Tako postoji velika razlika između sastava koljena bakterija u gastrointestinalnom traktu u odnosu na kožu, čak i sama koža pokazuje predominaciju različitih koljena ovisno o mjestu na tijelu i količini vlažnosti. Tako koljeno *Bacteroidetes* predstavlja manjinu na većini različitih mjesta na koži, dok *Firmicutes* predstavlja većinu samo u vagini, dok su ova dva koljena glavna sastavnica mikrobiote u crijevima.<sup>3,7</sup> U crijevima sedam koljena čini glavninu mikrobiote, a to su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verucomicrobia*, *Cyanobacteria* i *Actinobacteria*, od čega više od 90% čine *Firmicutes* i *Bacteroidetes*.<sup>2</sup>

Uspoređujući sastav mikrobiote novorođenčeta i mlađeg djeteta i u odrasle osobe mogu se primijetiti značajne razlike, što ukazuje na to da se mikrobiom čovjeka kroz vrijeme razvija. Pravilan razvoj sastava mikrobiote bitan je, jer omogućuje normalan razvoj imunološkog sustava. Najveće promjene u sastavu događaju se u prvim godinama života i smatra se da se do treće godine postigne sastav koji je približno sličan onome koji možemo naći u odrasle osobe, dok se u periodu između treće godine života i odrasle dobi mogu zamijetiti samo manje promjene.<sup>7</sup>

U prvim danima života gastrointestinalni trakt novorođenčeta naseljavaju fakultativno anaerobne i aerobne bakterije koje se nalaze u majčinoj vagini i na koži oko vagine, a tu spadaju *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp,  $\alpha$ -hemolitički streptokoki i *Staphylococcus* spp. Nakon nekoliko tjedana, radi potrošnje kisika stvaraju se anaerobni uvjeti, što u kombinaciji sa oligosaharidima iz majčinog mlijeka pogoduje prebacivanju sadržaja na pretežno anaerobne bakterije kao što su *Bacteroides*, bifidobakterije, i klostridije.<sup>7</sup> U prvih 6 mjeseci mikrobiotom

dominira jedan ili nekoliko rodova, no prelaskom na solidnu hranu različitost mikrobiote ubrzano raste i nastavlja kontinuirano rasti do oko treće godine života kada usporava.<sup>3</sup>

### **3.2 Razvoj imunosti i mikrobiota**

U razvoju imunosti i tolerancije kontakt sa kolonizirajućim mikrobima ima važnu ulogu. Kako bi se pripremio na izloženost velikoj količini bakterija pri rođenju, fetus u zadnjem trimestru trudnoće guta velik broj trofičkih faktora koji mu pomažu u sazrijevanju imunog odgovora. Stoga je pri rođenju novorođenče sposobno za obranu od okolišnih utjecaja. Ipak, za razvoj eferentne komponente imunološkog sustava potrebna je adekvatna kolonizacija bakterijama.<sup>5</sup>

Eksperimentalna istraživanja su dokazala da ključnu ulogu u razvoju tolerancije u kontaktu sa mikrobima imaju Toll-like receptori 4 (TLR4), koji su dio prirodene imunosti. Prolazna aktivacija i posljedično sazrijevanje imunološkog sustava u miševa bez crijevne flore (germ-free) mogu biti potaknuti samo jednim bakterijskim sojem, kao što je *B.fragilis*. Kontinuirana stimulacija ovom bakterijom u početku dovodi do pojačane aktivacije TLR4 i aktivacije proinflamatornih puteva, ali nakon nekog vremena dolazi do hiporeaktivnosti TLR4, što dovodi do tolerancije na antigene unesene hranom. U prilog navedenom idu studije u kojima je primijećeno da se kod životinja sa deficitarnom funkcijom TLR4 može pojaviti senzitivizacija na alergene hrane.<sup>9</sup>

Intestinalni komenzali također mogu sudjelovati i u sazrijevanju stečene imunosti, što se očituje prelaskom sa pretežno TH2 imunog odgovora na ujednačeni TH2, TH1 odgovor. Novorođenčad su rođena sa imunološkim sustavom u kojem prevladava TH2 imuni odgovor iz razloga što se kao fetusi trebaju zaštititi od intrauterinog odbacivanja. Kako bi došlo do balansa između TH1 i TH2 stanica stečenog imunološkog sustava potrebna je adekvatna kolonizacija bakterijama. U stvaranju balansirano imunološkog odgovora sudjeluju dendritičke stanice koje protežu svoje nastavke u lumen crijeva između epitelnih stanica. Receptori za prepoznavanje obrazaca,

aktivirani kontaktom sa bakterijskim antigenima nadalje stimuliraju dendritičke stanice na lučenje citokina, pri čemu nastaje mikrookoliš koji omogućava naivnim TH0 stanicama da stvore balansirane podklase TH stanica. Ove teorije su poduprte istraživanjima koja su pokazala perzistentan TH2 odgovor u miševa bez crijevne flore.<sup>5</sup>

### **3.3 Karakteriziranje mikrobiote**

Nekad su zlatni standard za identifikaciju mikrobiote bile tehnike kultivacije bakterija. Međutim od 1990-ih godina tehnike koje su neovisne o kultivaciji znatno su unaprijedile naša znanja o sastavu mikrobiote. Ove se tehnike baziraju na prepoznavanju razlika u sekvencama male podjedinice ribosomalne RNA (16S rRNA) bakterija. Većina tehnika se bazira na ekstrakciji bakterijske DNA i amplifikaciji 16S rRNA slijeda baza koji je specifičan za svaku vrstu bakterije, što nam omogućava njihovu identifikaciju. Njihova primjena je najveća u karakterizaciji crijevne mikrobiote, a njima možemo demonstrirati raznolikost mikroorganizama u crijevima, kvalitativne i kvantitativne informacije o vrstama bakterija i promjene u crijevnoj mikrobioti koje su povezane sa određenim bolestima.

Metagenomika predstavlja novi način proučavanja mikrobiote, a definirana je kao proučavanje kolektivnog genoma bakterija. Proučavanjem genoma bakterija možemo predviđati funkcije mikrobiote. Iz tog se razloga vjeruje da će metagenomika znatno proširiti naša znanja o povezanosti između mikrobiote i bolesti i što je najvažnije pomoći u otkrivanju uzročnih mehanizama.<sup>2</sup>

### **3.4 Vanjski utjecaji na mikrobiotu**

Mikrobiom se razlikuje od osobe do osobe. Sekvenciranje humanog mikrobioma pokazalo je da razlike u sastavu mikrobiote postoje čak i u jednojajčanih blizanaca, no u njih ipak postoji veća sličnost nego u osoba koje nisu u rodu. Postoje teorije da se mikrobiota nasljeđuje, no više dokaza ide u prilog da razlog razlika u sastavu leži u vanjskim čimbenicima koji utječu na

promjene kompozicije bakterija. Glavni faktori koji utječu na mikrobiom jesu prenatalni utjecaji, način poroda, prehrana dojenčeta, gestacijska dob i duljina hospitalizacije, prehrana nakon dojenačkog doba, antibiotici i stres.<sup>1,10,11</sup>

### 3.4.1 Prenatalni utjecaji

Do nedavno se mislilo da kolonizacija djeteta započinje tek rupturom amnijske vreće, u posljednje vrijeme brojne su studije donijele dokaze koji se tome protive. Prisutnost bakterija iz majčinih crijeva dokazana je u placenti, fetalnim membranama, amnijskoj tekućini, krvi pupčane vrpce i mekoniju, što upućuje na postojanje kontakta fetusa sa bakterijama majčine mikrobiote.<sup>10</sup>

Iako još nije poznato na koji način bakterije prelaze iz majčinih crijeva u placentu, amnijsku tekućinu i u fetus, jedan od načina na koji se objašnjava taj proces jest transfer pomoću dendritičkih stanica crijeva koje bakterije prvo prenese kroz stjenku crijeva i dalje ih prenose krvlju do placentu. Iz placentu bakterije mogu prijeći u amnijsku tekućinu gdje ih fetus može progutati.<sup>10,12</sup>

Kao što je poznato u trudnoći dolazi do promjena u mnogim sustavima poput kardiovaskularnog, endokrinog, skeletomuskularnog i drugih, no novi dokazi ukazuju na to da se i majčina mikrobiota tijekom trudnoće uvelike mijenja. Postoji značajna razlika u mikrobioti prvog i trećeg trimestra. Mikrobiota u prvom trimestru slična je onoj u žena koje nisu trudne, dok u trećem trimestru mikrobiotu možemo razlikovati od one u prvom trimestru, iz razloga što dolazi do porasta proteobakterija i aktinobakterija.<sup>10</sup>

Glavni čimbenici koji uzrokuju promjene u mikrobioti trudnice i time utječu na adekvatan prijenos mikrobiote majke na djetete jesu zdravlje majke i kompozicija tijela majke. Bolesti u majke kao što su dijabetes tipa 2 i povijest alergijskih bolesti pokazali su utjecaj na sastav



mikrobiote mekonija. Ostali čimbenici koji su pokazali značajan učinak na sastav jesu majčin BMI i porast težine tijekom trudnoće.<sup>12</sup>

Istraživanje na trudnicama koje su provodile vrijeme na farmama u blizini životinja, što pridonosi većem kontaktu sa mikrobima i kontrolne skupine žena koje su većinu svoje trudnoće provele u gradskoj sredini pokazala je da djeca majki koje su u trudnoći bile u kontaktu sa životinjama imaju manji rizik od razvoja ekcema.<sup>9</sup> Slično tomu primjećeno je da primjena probiotika tijekom trudnoće može smanjiti rizik od nastanka atopijskog dermatitisa.<sup>10</sup>

#### 3.4.2 Način poroda

U zemljama zapada primijećen je trend porasta elektivnih carskih rezova, čiji udio danas iznosi preko 15% ukupnih poroda, a istraživanja su pokazala da djeca rođena carskim rezom imaju veći rizik od atopičkih bolesti, astme, celijakije i pretilosti uz mnoge druge bolesti.<sup>12</sup>

Postoji velik broj dokaza koji upućuju na razliku između mikrobiote u novorođenčadi rođene vaginalnim putem u odnosu na novorođenčad rođenu carskim rezom. U mikrobioti novorođenčeta rođenog vaginalnim putem nalazimo bakterije koje možemo detektirati u majčinoj vaginalnoj i intestinalnoj mikrobioti, dok novorođenčad rođena carskim rezom pokazuje rodove bakterija koje možemo naći na majčinoj koži, kao što su npr. *Staphylococcus* spp. Kod vaginalno porođene djeca možemo pronaći nekoliko dominantnih rodova kao što su *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus*.<sup>7</sup>

U obzir kod načina poroda bi se trebalo uzeti i djelovanje endogenih stres signala induciranih porodom, pa je tako objavljeno da kod žena čije je dijete rođeno elektivnim carskim rezom kod kojeg još nisu počeli trudovi postoji aberantna mikrobiota u mlijeku za razliku od žena čije je dijete rođeno neelektivnim carskim rezom. Međutim nije dokazana razlika u obrascima kolonizacije crijeva djeteta u ta dva oblika poroda.<sup>12</sup>

### 3.4.3 Dojenačka prehrana

Nakon rođenja formiranje mikrobiote djeteta se nastavlja, a jedan od najvažnijih čimbenika koji utječe na sastav je dojenačka prehrana. Osim prehrambenih sastojaka majčino mlijeko sadrži i brojne druge komponente, koje utječu na mikrobiom, podupiru imunitet i promiču zdravlje djeteta. Neki od tih sastojaka jesu regulatorni citokini, faktori rasta, oligosaharidi ljudskog mlijeka i mikrobiota mlijeka.<sup>12</sup>

Pozitivni zdravstveni učinci majčinog mlijeka očituju se u smanjenom riziku od nekrotizirajućeg enterokolitisa i infekcija gastrointestinalnog i respiratornog sustava, smanjenog rizika od atopijskih bolesti, celijakije, pretilosti, šećerne bolesti i povoljnog učinka na kognitivni razvoj.<sup>9</sup>

Usporedbe mikrobiote u dojenčeta hranjenog majčinim mlijekom i dojenčeta hranjenog formulama pokazale su da dojenčad hranjena majčinim mlijekom imaju veći udio bifidobakterija i laktobacila u odnosu na dojenčad hranjenu formulama.<sup>5</sup> U skladu s navedenim, kod dojenčadi hranjene formulama dokazana je povećana kolonizacija bakterijama koje su sličnije bakterijama crijevne flore odraslih osoba, kao što su bakterije roda *Clostridium*, osobito bakterijom *Clostridium difficile*, što se može povezati sa većom incidencijom atopijskog dermatitisa u djece hranjene formulama.<sup>7,3</sup>

Jedan od čimbenika iz majčinog mlijeka koji utječu na sastav crijevnih bakterija su oligosaharidi ljudskog mlijeka. Oligosaharidi ljudskog mlijeka su ugljikohidratne molekule koje djeluju kao prebiotici, konkretno oni u crijevima novorođenčeta potiču na rast bakterije roda *Bifidobacterium*, čime selektivno mijenjaju sastav mikrobiote.<sup>7</sup> Jedan od načina na koji potiču rast bifidobakterija jest da prolaze kroz tanko crijevo nepromijenjeni dok ih u debelom crijevu bakterije fermentiraju i stvaraju kiseli mlijek, koji je pogodan za razvoj bifidobakterija. Tako je primijećeno da je sadržaj crijeva dojenčadi hranjene majčinim mlijekom kiseo (pH 5.0)

i sadrži veću količinu KLMK, osobito mliječne kiseline, dok je sadržaj crijeva dojenčadi hranjene formulama više alkaličan (pH 7.1) i sadrži manje KLMK-a. Nedavne studije su usporedbom humanih oligosaharida i komercijalnih oligosaharida došle do zaključka da humani oligosaharidi osim što potiču proliferaciju povoljnih bakterija, potiču i ekspresiju gena, kao primjer se navodi gen za glikan, molekulu koja ima protuupalno djelovanje.<sup>5</sup>

Poznato je da se u majčinom mlijeku nalaze bakterije koje možemo naći i u crijevima. Što možemo uzeti u obzir kao drugi čimbenik iz majčinog mlijeka koji djeluje na sastav bakterija djeteta. U početku se mislilo da se u majčinom mlijeku mogu naći samo bakterije koje se nalaze na koži bradavica, no sekvenciranje je pokazalo da se osim tih bakterija u majčinom mlijeku nalaze i bakterije crijeva. Smatra se da one u mlijeko dospjevaju radi povećane propusnosti crijeva uzrokovane promjenama u razini hormona pred kraj trudnoće i u početku dojenja. Bakterije koje na taj način dospiju u krvotok, se dalje prenose preko limfocita do tkiva dojke.<sup>5</sup> Mikrobiota mlijeka se mijenja u prvih šest mjeseci dojenja.<sup>12</sup> Kao što je gore navedeno na sastav mikrobiote majčinog mlijeka utječe način poroda, kao i zdravlje majke tijekom trudnoće.<sup>9</sup> Unatoč promijenama, najčešće prisutne bakterije u majčinom mlijeku su stafilokoki, streptokoki, bifidobakterije i bakterije mliječne kiseline.<sup>3</sup>

#### 3.4.4 Prehrana nakon dojenačke dobi

S porastom dobi promjene sastava mikrobiote sve su manje naglašene, te je teže utjecati na njih. Tako je utjecaj prehrane u osoba odrasle dobi na mikrobiotu manji nego kod djece. Ipak, dugotrajnim djelovanjem prehrane moguće je postići promjene. Suprotno tomu prehrana u djece može imati veliki utjecaj na sastav mikrobiote.

Različita istraživanja su pokazala razliku između kompozicije crijevnog mikrobiote u djece koja se hrane pretežno ugljikohidratima u odnosu na djecu koja se hrane pretežno zasićenim mastima i životinjskim proteinima. Ako uspoređujemo djecu u ruralnim dijelovima Afrike, čija

prehrana u velikoj količini sadržava ugljikohidrate sa djecom koja se hrane zapadnjačkom prehranom, možemo vidjeti da kod afričke djece u mikrobioti prevladavaju bakterije roda *Prevotella* u odnosu na europsku djecu kod koje prevladavaju bakterije roda *Bacteroides*.<sup>7</sup> Smatra se da je oblikovanje mikrobiote ovisno o prehrani kako bi se postigla bolja iskoristivost hrane pa npr. kod prehrane složenim ugljikohidratima pojačano rastu bakterije koje imaju sposobnost razgradnje složenih šećera i vlakana.<sup>5</sup>

#### 3.4.5 Antibiotici

Učinak antibiotika na patogene bakterije opće je poznat, no njihov učinak na komenzalne bakterije često se zanemaruje. Antibiotici smanjuju raznovrsnost crijevne mikrobiote ovisno o spektru djelovanja, dozi, načinu primjene i trajanju terapije. Nakon prestanka djelovanja antibiotika dolazi do oporavka bakterijske zajednice, međutim potpuni oporavak se rijetko postigne. Učinak antibiotika je posebno izražen u djece mlađe od jedne godine sa značajnim smanjenjem bifidobakterija i bakteroidesa. Također, dolazi i do smanjenja ukupne raznolikosti bakterija, te porasta u broju potencijalno štetnih bakterija kao što su *Klebsiella* i *Clostridium*.<sup>3,7</sup> Uz sve navedeno primjena antibiotika u crijevima dovodi do selekcije rezistentnih sojeva bakterija, što može potaknuti razvoj proljeva povezanog sa bakterijom *C.difficile*.<sup>7</sup>

Kasniji efekt antibiotika može se očitovati kao povećan rizik od razvoja debljine u djece koja su primala antibiotike u ranoj dobi. Također, jedna studija provedena na 36 pacijenata sa upalnom bolesti crijeva i na 360 zdravih kontrola u Kanadi pokazala je da je veći postotak bolesnika s upalnom bolesti crijeva u prvoj godini života koristio antibiotike.<sup>13</sup> Slični rezultati su objavljeni u jednoj studiji u Finskoj.<sup>12</sup>

U novije vrijeme se istražuje i utjecaj primjene antibiotika za vrijeme trudnoće na mikrobiotu u djeteta, osobito u perinatalnom razdoblju. Perinatalna primjena antibiotika je česta kod korioamnionitisa i kod profilakse infekcije streptokokom grupe b. Uporaba antibiotika u ovom

periodu može dovesti do promjene majčine mikrobiote, što ima za posljedicu prijenos neadekvatne mikrobiote na dijete.<sup>9</sup>

Ovi podatci upućuju na oprez pri propisivanju antibiotika jer se često ne misli o njihovim dugotrajnim posljedicama u koje ne spada samo rezistencija, već promjenom mikrobiote neprimjerena primjena antibiotika može povećati rizik od raznih bolesti.

#### 3.4.6 Gestacijska dob

Postotak prijevremeno rođene djece iznosi oko 5-13%, stoga nedonoščad predstavlja važan klinički problem. Nedonoščad nisu dovoljno razvijena kako bi se nosila sa kolonizacijom velikom količinom bakterija s kojima dolaze u kontakt po rođenju. Postoji više čimbenika kojima su nedonoščad izložena, a koja utječu na mikrobiotu. Neki od tih čimbenika jesu primjena antibiotika širokog spektra, izolacija, parenteralna prehrana, odgođeno dojenje i porod carskim rezom. Sve ovo dovodi do odgođene kolonizacije nedonoščadi, odnosno potencijalne kolonizacije sporama bolničkih bakterija kao što je *C. difficile*, što ima za posljedicu razvoj bolesti kao što su nekrotizirajući enterokolitis i druge.<sup>9,7</sup>

#### 3.4.7 Stres

Postoji nekoliko mogućih mehanizama kojima se pokušava objasniti utjecaj psihičkog stresa na kompoziciju mikrobiote. Jedna mogućnost je djelovanje preko stresnih hormona, pa je tako pronađeno da noradrenalin može djelovati na genom bakterija i poticati rast određenih sojeva kao što su npr. nepatogeni izolati *E. Coli*. Jedan od ostalih načina je utjecaj stresa na povećanu permeabilnost crijeva, čime dolazi do ulaska bakterija u krvotok i aktivacije imunskog sustava, koji naknadno mijenja kompoziciju mikrobiote. Mogući uzrok su i povećane koncentracije citokina poput IL-6 ili CCL2 (MCP1).<sup>11,14</sup> Kao dokaz ovoj teoriji možemo priložiti istraživanja na štakorima, koja su pokazala da stres u postnatalnom razdoblju može prouzrokovati trajne promjene, što se očituje u različitom sastavu mikrobiote u odraslih štakora koji su bili izloženi

maternalnoj separaciji u odnosu na one koji nisu. Promjene koje nastaju nakon izloženosti kroničnom stresu u miševa uključuju relativni porast *Bacteriodes spp* i smanjenje *Clostridium spp*.<sup>14</sup>

### 3.5 Terapijske mogućnosti

#### 3.5.1 Probiotici i prebiotici

Djelovanje na mikrobiotu se nameće kao oblik terapije kojim bi mogli prevenirati odnosno liječiti bolesti koje su uzrokovane disbiozom mikrobiote. Probiotici, prebiotici i sinbiotici, uz transplantaciju mikrobiote predstavljaju oblike ove vrste terapije.

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije probiotici su živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina. Najčešće korišteni probiotici jesu bakterije roda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus*. Mišljenje je da probiotici pomažu lokalnoj mikrobioti u prevenciji adherencije patogena, smanjenju proizvodnje proinflamatornih citokina, u poticanju stvaranja imunoglobulina A i pojačanju funkcije crijevne barijere i epitelnog integriteta.<sup>7</sup> Uz to oni i moduliraju crijevnu mikrobiotu. Načini na koje probiotici postižu svoje djelovanje u prevenciji razmnožavanja patogenih bakterija jesu kompeticija za prehrambene tvari, izlučivanje bakteriocina, te smanjenje pH u lumenu crijeva, jer fermentiraju ugljikohidrate u kiseline, a takav kiseli milje potiče razvoj laktobacila i bifidobakterija. Za učinkovitost probiotika moraju se ispuniti određeni preduvjeti, a to su podrijetlo iz čovjeka, da može preživjeti prolaz kroz želudac, produkcija antimikrobnih supstanci, te kompetitivno isključenje patogena i štetnih antigena.<sup>15</sup>

Postojale su sumnje da bi probiotici u novorođenčadi, posebno u one koja su kronično bolesna mogli uzrokovati sepsu. Međutim u nedavnim istraživanjima je viđeno da je njihova primjena sigurna čak i u kritično bolesne djece.<sup>15</sup> Ipak, pošto postoje opisani slučajevi sepse uzrokovane

probioticima, za koju se smatra da je učestalost oko 0.3/100 000, treba biti oprezan kod davanja probiotika djeci koja nisu imunokompetentna.<sup>10</sup>

Za razliku od probiotika, prebiotici su neprobavljivi ugljikohidrati koji potiču na rast i pojačavaju aktivnost određenih rodova povoljnih bakterija, te na indirektan način imaju povoljno djelovanje na zdravlje domaćina. Dvije kategorije prebiotika uključuju galakto-oligosaharide koje možemo naći u majčinom mlijeku i frukto-oligosaharide koje možemo naći u povrću.<sup>4</sup> Prebiotici mogu pojačati efektivnost protuupalnih lijekova stimulacijom proizvodnje kratkolančane masne kiseline butirata i supresijom proizvodnje proupalnih citokina.<sup>7</sup>

Prema aktualnim podacima koje možemo pronaći u literaturi djelovanje prebiotika je još nepotpuno dokazano. Ubacivanje prebiotika u dojenačke formule u Europi je pokazalo da oni utječu na modulaciju proizvodnje antitijela i da smanjuju incidenciju ekcema. Suprotno tomu, upotreba žitarica obogaćenih oligofruktozom u djece u zemljama u razvoju nije uspjela smanjiti pojavu proljeva.<sup>9</sup>

Sinbiotici predstavljaju kombinaciju probiotika sa prebioticima, takvu kombinaciju nalazimo i u majčinom mlijeku. Upotreba sinbiotika može smanjiti pojavu akutnog gastroenteritisa, dok su podaci za smanjenje incidencije ekcema dvojbeni.<sup>9</sup>

Pošto je jedna od glavnih funkcija mikrobiote sudjelovanje u razvoju imunološkog sustava, čijim se adekvatnim razvojem može spriječiti pojava nekih od bolesti koje su povezane sa mikrobiotom kao što su atopijske bolesti i dijabetes tipa 1, da bi se vidjeli efekti uzimanja probiotika, prebiotika i sinbiotika primjena bi trebala započeti već u trudnoći ili u prvim mjesecima života.<sup>7</sup>

### 3.5.2 Transplantacija mikrobiote

Kao još jedan način manipulacije mikrobiotom, transplantacija mikrobiote predstavlja budućnost u liječenju poremećaja uzrokovanih disbiozom crijevne bakterija. Trenutno je jedina indikacija za transplantaciju mikrobiote rekurentna infekcija bakterijom *C.dificille*. U ovoj indikaciji transplantacija mikrobiote pokazuje uspješnost od preko 90% izliječenih pacijenata.

Za transplantaciju mikrobiote kao i kod svake tranplantacije potrebni su nam davatelj i primalac. Od davatelja se uzima fekalni klistir koji se zatim ubrizgava u primaoca. Put ubrizgavanja fekalnog klistira u primaoca ovisi o indikaciji, no to se najčešće obavlja kolonoskopski . Iako zvuči jednostavno postoje problemi na čijem se rješavanju radi kako bi ovaj postupak mogao ući u svakodnevnu praksu. Neki od problema koji su prisutni jesu kako izabrati pravog donora, kao i kako adekvatno sačuvati uzorke uzete od donora. Pošto naše znanje nije došlo do te razine da znamo što je savršena mikrobiota, odabir donora se uglavnom vrši na način da se biraju osobe sa što manje bolesti, osobito onih bolesti za koje se smatra da su uzrokovane disbiozom mikrobiote.

Za razliku od probiotika transplantacija mikrobiote je usmjerena na popravak već etablirane mikrobiote, dok se probiotici koriste kako bi se mikrobiota pravilno razvila. Zato, kada se prevladaju prepreke koje su na putu ovom postupku, smatra se da će se postići uspjesi u liječenju upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog kolona, pretilosti, anoreksije nervoze, alergija na hranu, kao i neurodegenerativnih i neurorazvojnih poremećaja.<sup>16</sup>



## 4. DISBIOZA MIKROBIOTE I KRONIČNE BOLESTI U DJECE

Disbioza mikrobiote je stanje u kojem je sastav mikrobiote promijenjen, te se razlikuje od normalnog. Iako aktualno znanje nije došlo do te razine da možemo točno definirati određenu bakteriju koja je uzrok neke bolesti, možemo vidjeti da kod nekih bolesti mikrobiota pokazuje slične obrasce, koji se razlikuju u odnosu na mikrobiotu zdravih osoba. Ipak, ne možemo zasigurno znati da li je mikrobiota uzrok tih bolesti, jer postoji mogućnost da same bolesti utječu na oblikovanje mikrobiote. Iz tog razloga su potrebne prospektivne kohortne studije koje bi riješile ovu dilemu. Osim kolonizacije neadekvatnim bakterijama u disbiozu spada i smanjenje raznolikosti mikrobiote.<sup>5</sup>

Neke od bolesti na koje mikrobiota utječe jesu crijevne bolesti kao što su nekrotizirajući enterokolitis, akutni gastroenteritis, upalne bolesti crijeva, sindrom iritabilnog kolona, celijakija, te atopijske bolesti kao što su astma i atopijski dermatitis.

### 4.1 Atopijske bolesti

Uzrok atopijskih bolesti je u neadekvatnom imunološkom odgovoru, koji se u ovim bolestima odvija pretežito preko TH2 stanica. Kao što je ranije navedeno mikrobiom ima veliki utjecaj na razvoj imunološkog sustava i skretanja TH2 imunog odgovora u balansirani TH2/TH1 odgovor.

Prevalencija atopijskih bolesti je tijekom posljednjih desetljeća dramatično porasla.<sup>17</sup> Prebrzo da bi se mogle otkriviti promjene u genetskoj konstituciji, te se smatra da su u porast prevalencije uključene promjene povezane sa zapadnjačkim načinom života. Mikrobiota u čovjeka je pretpostavljena kao glavni čimbenik koji opisuje povezanost zapadnjačkog načina života sa etiologijom atopijskih bolesti.<sup>18</sup>

Proveden je velik broj studija kojima je za cilj bilo odrediti da li disbioza crijevne mikrobiote u ranom životu može utjecati na senzitivizaciju i manifestaciju alergijskih bolesti. Nizozemska

studija KOALA u kojoj je sudjelovalo 957 dojenčadi stare jedan mjesec, pokazala je da se prisutnost *E.coli* i *C.difficile* u stolici mogu dovesti u vezu sa povećanim rizikom od razvoja ekcema.<sup>19</sup> Dvije longitudinalne studije provedene u Danskoj i Švedskoj, na temelju uzorkovanja stolice u više vremenskih točaka unutar prve godine života, pokazale su da je razvoj atopijskih bolesti povezan sa smanjenom raznovrsnosti bakterija, a ne sa prevalencijom određenog bakterijskog soja.<sup>20,21</sup>

Probiotske bakterije se nude kao jedan od najviše obećavajućih oblika intervencije za primarnu prevenciju bakterijskih bolesti. Postoje dokazi koji ukazuju na to da probiotici mogu smanjiti incidenciju atopijskih bolesti mijenjajući intestinalnu mikrobiotu, preko koje utječu na funkciju imunološkog sustava. Međutim, dokazi za upotrebu probiotika u liječenju već uspostavljene atopijske bolesti su još nedostatni.

Do 2012 godine provedeno je 14 randomiziranih kliničkih studija koje su ispitivale utjecaj različitih probiotika, samih ili u kombinaciji sa drugim probioticima, na prevenciju alergijskih bolesti. Devet od njih je uključivalo kombiniranu prenatalnu (zadnjih 2-6 tjedana trudnoće) i postnatalnu (6-24 mjeseca), četiri samo postnatalnu, dok je jedna ispitivala samo prenatalnu primjenu probiotika. Od devet studija koje su uključivale prenatalnu i postnatalnu primjenu, njih 6 je pokazalo značajno smanjenje kumulativne incidencije atopijskog dermatitisa u prve dvije godine života. Kod ostalih alergijskih bolesti nije viđen povoljan učinak probiotika.<sup>22</sup> Jedna studija je čak pokazala trostruko povećanu incidenciju respiratornih alergijskih bolesti nakon kombinirane prenatalne i postnatalne primjene LGG soja probiotika.<sup>23</sup> Od 4 studije koje su uključivale postnatalnu primjenu probiotika, tek je jedna pokazala smanjenu incidenciju ekcema, a studija koja je ispitivala samo prenatalnu primjenu probiotika nije pokazala smanjenje incidencije alergijskih bolesti.<sup>22</sup>

Rezultati meta-analize u kojoj je obrađeno dvadeset kliničkih ispitivanja, pokazali su da ne postoji zaštitni učinak primjene probiotika u perinatalnom razdoblju na razvoj astme i piskutanja u djece.<sup>24</sup>

U prilog navedenom Svjetska alergijska organizacija (WAO), na osnovu sakupljenih dokaza, preporuča smjernice za prevenciju alergijskih bolesti pomoću probiotika. Prema njihovim podacima još nije dokazan učinak probiotika na prevenciju svih alergijskih bolesti, no postoje jasni dokazi da oni imaju zaštitno djelovanje na razvoj atopijskog dermatitisa. Postoje tri preporuke prema kojima bi se probiotici trebali koristiti. Prva preporuka ima visoku vrijednost dokaza za prevenciju ekcema, a ona predlaže korištenje probiotika u trudnica koje nose dijete sa visokim rizikom od razvoja atopijskih bolesti, međutim ima nisku vrijednost dokaza za moguće neželjene učinke. Druga i treća imaju slične vrijednosti dokaza kao i prva, a druga predlaže primjenu probiotika u dojilja čija djeca imaju visok rizik od alergijskih bolesti, dok treća sugerira primjenu u dojenčadi sa visokim rizikom od atopijskih bolesti. Visoki rizik obolijevanja od alergijskih bolesti definiran je pozitivnom obiteljskom anamnezom ovih bolesti u rođaka prvog koljena. Iako su ovi podatci obećavajući, postoje još neke nerazjašnjene dileme u njihovoj interpretaciji. Nedostaju dokazi o najadekvatnijem soju probiotika koji bi se trebao upotrebljavati, kao i o duljini primjene i primjerenom vremenskom periodu u kojemu bi se probiotici trebali koristiti.<sup>25</sup>

Iako su otkrivene razlike u mikrobioti kože na mjestima na kojima se nalaze lezije specifične za atopijski dermatitis u odnosu na mjesta kože na kojima nema promjena, kao i razlike u iste osobe na koži u vrijeme aktivnih lezija i nakon provedene terapije, još nisu razvijeni probiotici koji bi se mogli primjenjivati na kožu, stoga je prevencija atopijskog dermatitisa usmjerena na oralnu primjenu probiotika u trudnica ili novorođenčadi.<sup>26</sup>

Slično kao i kod mikrobioma kože o mikrobiomu respiratornog trakta postoji puno manje znanja nego o mikrobiomu crijeva. Unatoč tomu nekoliko studija je pokazalo da se mikrobiota

dišnog sustava u djece sa astmom i onih bez astme ne razlikuje znatno. Kod jedne i druge djece najbrojnija koljena bakterija jesu *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, međutim važna je značajka da je kod djece sa astmom dokazan veći broj bakterija roda *Haemophilus* u odnosu na zdravu djecu.<sup>3</sup>

## 4.2 Gastrointestinalne bolesti

### 4.2.1 Nekrotizirajući enterokolitis

Nekrotizirajući enterokolitis(NEC) je često stanje u prijevremeno rođene djece, što je jedan od gore navedenih čimbenika koji utječu na kompoziciju mikrobiote. Posljedice prijevremenog rođenja koje mogu biti uzrok NEC-a jesu nezrelost crijeva, pretjerani upalni odgovor na poticaj mikrobima, te kolonizacija mikrobima. Razlika u mikrobiomu uočena kod djece sa nekrotizirajućim enterokolitisom, u odnosu na zdravu djecu, obuhvaća porast  $\gamma$ -*Proteobakterija*, uključujući *Citrobakter*, te smanjenu raznolikost crijevne mikrobiote. Porast  $\gamma$ -*Proteobakterija* dokazan je i prije pojave simptoma bolesti.<sup>1,7</sup>

Još jedan od dokaza koji nas upućuje na ulogu mikrobiote u ovoj bolesti jest da dojenje smanjuje rizik od razvoja NEC-a.<sup>7</sup>

Pokušaji prevencije NEC-a usmjereni su na otkrivanje probiotika koji bi smanjili incidenciju bolesti osobito u nedonoščadi. Pošto je otkriveno da je povećana incidencija NEC-a povezana sa administracijom blokatora histaminskih 2 receptora u nedonoščadi, histaminski signalni putevi predstavljaju mogući cilj djelovanja probioticima koji su sposobni pretvarati aminokiselinu L-histidin u histamin. Histamin bi na taj način mogao smanjiti upalu preko aktivacije H2 receptora.<sup>1</sup>

#### 4.2.2 Rekurentna infekcija *C.dificille*

U posljednjem desetljeću incidencija infekcije *C.dificille* u pedijatrijskoj populaciji se značajno povećala. Uzrok leži u povećanoj primjeni antibiotika. Jedna studija je pokazala uspješno liječenje ove infekcije probiotikom soja *Lactobacillus rhamnosus*(LGG). Nekoliko drugih studija pokazalo je da uporaba probiotika može smanjiti incidenciju proljeva uzrokovanog antibioticima. Razlog tomu je što probiotici mogu ubrzati obnovu mikrobioma nakon primjene antibiotika i time smanjuju mogućnost nastanka proljeva. Osobe koje imaju smanjenu raznolikost mikrobiote osobito su podložne razvoju rekurentne infekcije *C.dificille*, a kao što je navedeno primjena probiotika može potaknuti razvoj raznolikosti, stoga je logična upotreba probiotika u prevenciji ove infekcije. Uspjeh postignut transplantacijom mikrobiote u liječenju rekurentne infekcije *C.dificille* također ukazuje na važnu ulogu mikrobiote u ovoj bolesti.<sup>1</sup>

#### 4.2.3 Upalne bolesti crijeva

Razlika u sastavu mikrobiote može se vidjeti i između osoba koje boluju od upalnih bolesti crijeva(IBD) u odnosu na zdrave osobe. Smatra se da mikrobiota oboljelih od upalnih bolesti crijeva može imati proinflamatorni učinak, koji je osnova za nastanak IBD. U jednoj studiji je primijećeno da postoji razlika u raznovrsnosti mikrobiote između blizanaca koji boluju od IBD u odnosu na zdrave blizance, u smislu da oni blizanci koji imaju dijagnosticiranu IBD imaju smanjenu raznolikost crijevnih bakterija.<sup>8</sup> Druge studije su pokazale da mikrobiota kod oboljelih od IBD ima smanjen udio koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, a povećan udio koljena *Proteobacteria*. Osim toga, smanjena količina bakterije *Faecalibacterium prausnitzii*, koja spada u koljeno *Firmicutes*, može se dovesti u vezu sa ilealnom Chronovom bolesti. Kako *F.prausnitzii* ima protuupalno djelovanje možemo shvatiti da bi njen nedostatak mogao imati ulogu u razvoju Chronove bolesti.<sup>7</sup> Isto tako provedena su istraživanja u kojima je primijećeno da u bolesnika sa IBD imamo povećanu količinu bakterija roda *Escherichia* i *Shigella*, što je

bitno za napomenuti jer se *E.coli* koristi kao probiotik. Ipak, pokušaji liječenjem probioticima nisu dali zadovoljavajuće rezultate.<sup>1</sup>

#### 4.2.4 Sindrom iritabilnog kolona

Sindrom iritabilnog kolona (IBS) je bolest koja je karakterizirana pojavom rekurentne abdominalne boli i izmjenama proljevaste stolice sa konstipacijom i tvrdom stolicom. IBS je jedna od nekoliko bolesti kod kojih je dokazan povoljan učinak probiotika na smanjenje simptoma bolesti. Davanjem bifidobakterija otkriveno je smanjenje simptoma IBS-a, što nam ujedno ukazuje da kod pacijenata IBS-om imamo smanjenu količinu bifidobakterija. Važnost manjka bifidobakterija potvrđena je i time što kod primjene samih laktobacila ne dolazi do smanjenja simptoma, dok kod njihove primjene zajedno sa bifidobakterijama dolazi do poboljšanja. Sekvenciranje bakterijske RNA je pokazalo da osim manjka bifidobakterija imamo i manjak bakterija roda *Verrucomicrobium* i povećanu količinu  $\gamma$ -Proteobakterija kod pacijenata sa IBS-om u kojem dominira proljev.<sup>1,7</sup>

IBS kao bolest na koju psihička komponenta ima veliki utjecaj se često uzima kao jedno od objašnjenja postojanja osi crijeva-mozak o kojoj ću nešto više reći u području o djelovanju mikrobiote na mozak.<sup>1</sup>

### 4.3 Dijabetes mellitus tipa 1

Dijabetes mellitus tipa 1 (T1DM) je bolest koja nastaje kao rezultat interakcije genetskih, okolišnih i imunoloških faktora koji u konačnici dovode do destrukcije beta stanica pankreasa i nedostatka inzulina..<sup>27</sup>

Iako uzroci ove bolesti nisu potpuno jasni postoje pretpostavke da crijevna disbioza, zajedno sa povećanom propusnosti crijeva i poremećenim imunim odgovorom predstavlja takozvanu „savršenu oluju“ (perfect storm), koja može biti okidač razvoj T1DM.<sup>28</sup> Da bi uzrok dijabetesu mogao biti u promijeni mikrobiote pokazala je jedna nova longitudinalna studija provedena na

33 djece koja su imala predispoziciju za razvoj T1DM u obliku pozitivnih rizičnih HLA alela. Od 33 djece njih 11 je razvilo protutijela, te su u njih videne promjene u mikrobioti karakteristične za T1DM. Međutim, važno je za napomenuti da su se te promjene javile godinu dana prije razvoja protutijela, što upućuje na mogući uzrok bolesti u crijevnim bakterijama.<sup>29</sup>

Da postoji veza između imunog sustava crijeva i imunog sustava pankreasu pokazale su brojne studije. To je donekle logično jer razvoj crijeva kao i pankreasa potiče iz endoderma. U miševa je dokazano da davanje antigena peroralnim putem dovodi ne samo do aktivacije i proliferacije T stanica u mezenterijalnim čvorovima već i u pankreatičnim limfnim čvorovima. Stoga je za pretpostaviti da se intervencijom u crijevima može utjecati na razvoj T1DM. Disbioza mikrobiote može uzrokovati poremećaje u razvoju tolerancije na antigene i na taj način može dovesti do upale u crijevima koja se dalje može odraziti i na pankreas, a upala u gušterači može potaknuti razvoj T1DM.<sup>30</sup>

Druga stvar važna u razvoju T1DM mogla bi biti povećana propusnost u crijevima. Preko stjenke crijeva različiti antigeni mogu dospjeti do pankreasa, gdje se dolazi do nastanka upale, koja može biti okidač za razvoj autoimunosti. U skladu sa pretpostavkom da pojačana propusnost stjenke crijeva može potaknuti razvoj T1DM, pokazano je da kod bolesnika sa T1DM imamo smanjenu količinu bakterija koje proizvode butirat. Butirat je kratko lančana masna kiselina koja može potaknuti sintezu mucina i pojačati barijerne mehanizme u crijevima, te ima protuupalno djelovanje.<sup>31</sup> U prilog ovim navodima idu rezultati jedne nizozemske studije koja je pokazala smanjenu količinu bakterija Clostridium cluster IV i Clostridium ckusterXIVa u djece sa šećernom bolesti tipa 1, a ove bakterije spadaju u bakterije koje proizvode butirat.<sup>32</sup>

Također, ulogu mikrobiote u razvoju T1DM je pokazala studija u kojoj se vidjelo da su NOD miševi bez MyD88, signalne molekule prirodene imunosti, otporni na razvoj dijabetesa. Međutim, ova otpornost se izgubila kada su MyD88 deficijentni miševi uzgajani u okolišu bez bakterija, što upućuje na zaštitinu ulogu bakterija. Uz to, nedostatak MyD88 je doveo do

promjena u mikrobioti, u obliku porasta koljena *Bacteroidetes*. Smatra se da bi bakterije iz ovog koljena mogle spriječiti razvoj T1DM preko imunomodulatornih tvari.<sup>33</sup> Novije studije su pokazale da se prijenosom mikrobiote iz MyD88 deficijentnih u miševa sklonih dijabetesu može smanjiti inzulitis i odgoditi nastanak T1DM, uz porast *Lachnospiraceae* i *Clostridaceae* i smanjenje *Lactobacillaceae*.<sup>34</sup>

U jednoj studiji kontroliranih slučajeva provedenoj na 32 ispitanika, od kojih 16 oboljelih od T1DM i 16 zdravih kontrola, pronađene su razlike u kompoziciji mikrobiote. Kod ispitanika sa T1DM viđen je porast koljena *Bacteroidetes* u kojem je rod *Bacteroides* bio povećan, dok je rod *Prevotella* bio smanjen, te je primijećeno i smanjenje koljena *Firmicutes* što se može prikazati i kao smanjeni omjer *Firmicutes* prema *Bacteroidetes*. Osim toga, pronađena je i redukcija u koljenu *Actinobacteria* u kojem je smanjen rod *Bifidobacterium*.<sup>35</sup>

Druga studija provedena na meksičkoj djeci u kojoj su se uspoređivale tri skupine ispitanika, uz slične promjene u sastavu bakterija kao i prethodna studija, pokazala je i da je razlika u mikrobioti zdravih ispitanika i ispitanika sa novootkrivenim T1DM veća nego u zdravih ispitanika i ispitanika koji se liječe od T1DM duže od dvije godine. Ova studija je također ukazala na jednu zanimljivu činjenicu. Usporedbom između mikrobiote djece meksičkog podrijetla koja žive u SAD-u i one koja žive u Meksiku pronađeno je da kod djece u Meksiku puno veći udio u razvoju bolesti čini genetska komponenta, a poznato je da je incidencija T1DM u te djece znatno manja. U skladu s tim viđeno je da djeca meksičkog podrijetla iz SAD-a u crijevima imaju povećan broj bakterija roda *Bacteriodes*, dok djeca u Meksiku imaju povećan broj bakterija roda *Prevotella*. Kao što je spomenuto u dijelu o vanjskim utjecajima na mikrobiotu porast *Bacteriodes* bakterija se javlja kod pretežno zapadnjačke prehrane, dok je porast bakterija *Prevotella* značajka prehrane bogate ugljikohidratima. Stoga možemo pretpostaviti da je način prehrane čimbenik koji povećava rizik od nastanka T1DM.<sup>36</sup>



Trenutno je u tijeku jedna velika prospektivna kohortna studija koja obuhvaća 8676 djece pozitivne na HLA-DR-DQ alele povezane sa šećernom bolesti tipa 1, a provodi se u 4 zemlje. Ta studija je do sada pokazala da kod djece koja uzimaju probiotike, a počela su ih uzimati u prva tri mjeseca života postoji smanjena pojava T1DM za oko 30%. Dok redukcija incidencije nije primijećena u djece koja su počela uzimati probiotike nakon 3 mjeseca života, što nam ukazuje na važnost pravovremene intervencije Ovi podatci imaju veliki značaj, iako se još ne zna točan princip kojim probiotici smanjuju incidenciju T1DM, uspješnost probiotika primijećena u ovoj studiji ne smije se zanemariti.<sup>37</sup>

#### **4.4 Pretilost**

Zbog izrazito velikih zaliha hrane u razvijenim zemljama pretilost postaje sve veći globalni problem. Pretilost možemo podijeliti na prekomjernu težinu( BMI 25-29.9), pretilost prvog stupnja( BMI 30-34.9), pretilost drugog stupnja(BMI 35-39.9) i pretilost trećeg stupnja, sa BMI iznad 40. 2008. godine je procijenjeno da u svijetu ima 1.5 milijarda ljudi sa prekomjernom težinom, od kojih je 502 milijuna pretilo.<sup>38</sup> Uzrok pretilosti je u nesrazmjeru između unosa energije i potrošnje energije, što je karakteristika današnjeg društva koje živi sjedilačkim životom, dok postoji velika dostupnost hrani, koja je uglavnom niske cijene. Pretilost predstavlja važan javnozdravstveni problem jer povećava rizik od raznih kroničnih bolesti kao što su dijabetes mellitus tipa 2, aterosklerotska bolest koronarnih krvnih žila, nealkoholna masna bolest jetre, Alzheimerova bolest i razni karcinomi.<sup>39</sup> Iz svega navedenog možemo zaključiti da se nameće potreba za intervencijom u smislu prevencije pretilosti.

Opservacija da se presađivanjem crijevne mikrobiote iz pretilog u mršavog štakora može izazvati pretilost, dovela je do pretpostavke da promjena sastava intestinalnih bakterija može biti jedan od načina prevencije pojave pretilosti.

Neki od načina ispitivanja djelovanja mikrobiote na pretilost, jesu transplantacija mikrobiote i opservacija ispitanika sa mikrobiotom i bez mikrobiote u različitim uvjetima. Pošto je ove uvjete izuzetno teško postići u čovjeka, radi tehničkih i etičkih razloga, takva se istraživanja uglavnom provode na miševima i štakorima.<sup>40</sup>

Koristeći se ovim tehnikama, istraživanja su pokazala da kolonizacija prethodno mršavih i inzulin osjetljivih miševa bez bakterijske flore povećava njihov adipozitet za 60%, kao što i povećava inzulinsku rezistenciju. Unatoč tomu što je unos hrane kod tih životinja smanjen. Kasnije je pokazano i da kolonizacija miševa bez bakterijske flore, mikrobiotom pretilih miševa, dovodi do značajno većeg adipoziteta nego kolonizacija mikrobiotom mršavih miševa.<sup>40</sup>

Promatranje utjecaja prehrane na miševima bez bakterijske flore, pokazalo je da se kod miševa bez bakterijske flore koji su se hranili zapadnjačkom dijetom kroz 8 tjedana nije vidjela razlika u porastu težine u odnosu na miševima koji su se hranili normalnom dijetom.<sup>41</sup>

Brojne studije na ljudima uglavnom su usmjerene na otkrivanje bakterija koje su povezane sa pojavom pretilosti u ljudi. Do sada je viđeno da su kod pretilih ljudi, u većoj količini nego kod mršavih ljudi, prisutne bakterije koljena *Firmicutes*, dok je količina bakterija koljena *Bacteroidetes* kod pretilih osoba manja nego kod mršavih.<sup>34</sup>

Osim utjecaja pojedinih vrsta bakterija utvrđeno je i da raznovrsnost bakterija ima ulogu u razvoju pretilosti. Tako je nedavna metagenomska studija objavile rezultate u kojima možemo vidjeti da su ispitanici sa manjom raznolikošću bakterijskih gena više dobili na težini, te da su imali jače izražene upalne parametre, veću inzulinsku rezistenciju i dislipidemiju u odnosu na ispitanike sa većim brojem bakterijskih gena.<sup>34</sup> Pokazano je da su kod osoba sa niskim brojem bakterijskih gena u većoj količini bile prisutne bakterije roda *Bacteriodes* i *Ruminococcus*, dok

su kod osoba s višim brojem gena predominirale bakterije roda *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Aslipites* i *Akkermansia*.<sup>42</sup>

U kohortnoj studiji u kojoj je sudjelovalo 49 dojenčadi objavljeno je da razlika u sastavu mikrobiote u dobi od 6-12 mjeseci prethodi prekomjernoj težini, što je viđeno kod te iste djece sa 7 godina. Kod djece koja su postala pretila, u dobi od 6-12 mjeseci nađen je veći broj bakterija *Staphylococcus aureus*, dok su djeca koja su sa 7 godina bila mršava, u dobi od 6-12 mjeseci sadržavala više bifidobakterija.<sup>43</sup> Studija provedena u Danskoj na 330 djece u dobi od 9-36 mjeseci pokazala je pozitivnu korelaciju između porasta težine u djece i porasta u klostridijima koji proizvode KLMK.<sup>44</sup>

#### 4.4.1 Mehanizmi djelovanja mikrobiote na pretilost

Do sada poznati dokazi ukazuju nam na veliku ulogu sistemske, kronične upale niskog stupnja, potaknute od crijevnih bakterija u nastanku pretilosti i drugih metaboličkih bolesti.<sup>45</sup> Osim same upale smatra se da razlika u metaboličkoj funkciji mikrobioma može pridonijeti varijaciji u ekstrakciji kalorija iz hrane, pohrane kalorija u masnom tkivu i dostupnosti energije za proliferaciju mikroba.<sup>46</sup>

**Metabolička endotoksemija.** LPS je sastavni dio stjenke gram negativnih bakterija i njegov ulazak u cirkulaciju izaziva upalu. Lipid A, komponenta LPS-a sadrži endotoksičnu aktivnost i njegova pojava u cirkulaciji se naziva metabolička endotoksemija.<sup>40</sup> Utjecaj upale na razvoj pretilosti je prvi put opisan na miševima. Pretili miševi hranjeni visoko-masnom hranom pokazuju 2-3 puta veće razine LPS-a u krvi nego nepretili, te također pokazuju znakove blage sistemske upale. Nadalje, ubrizgavanje LPS-a E.Coli 4 tjedna miševima hranjenim normalnom dijetom, dovelo je do razvoja upale, pretilosti i inzulinske rezistencije.<sup>47</sup> Pokušaji smanjivanja LPS-a pomoću antibiotika doveli su do smanjene upale, poboljšane tolerancije na glukozu i smanjene debljine.<sup>40</sup>

Prehrana bogata mastima može poticati rast potencijalnih patogena, što može potaknuti upalni odgovor u crijevima, aktivacijom prirodene imunosti. Sama upala može dovesti do povećane propusnosti stjenke, što omogućuje prelazak proinflammatoryh bakterijskih komponenti u krvotok. Drugi mehanizam kojim LPS može prijeći u krvotok je pomoću hilomokrona koji prenose masne kiseline kroz stjenku crijeva. Prehrana bogata mastima povećava aktivnost hilomikrona i olakšava prijelaz LPS-a unutar cirkulacije.<sup>46</sup> Nakon što LPS uđe u cirkulaciju veže se na LPS-vezajući protein(LPB), koji ga dovodi do CD14 i TLR4, koji dalje okinu ekspresiju i produkciju proinflammatoryh citokina(TNF, IL-1, IL-6). Proinflammatoryh citokini uzrokuju blokadu inzulinske signalizacije u mišićima i masnim stanicama i induciraju inzulinsku rezistenciju. Ovi podatci nam ukazuju na povezanost LPS-a sa pretilosti, što je i pokazano u kliničkim studijama, u kojima su gubitak težine i poboljšanje inzulinske rezistencije popraćeni padom serumskog LPB- a i inflamatornih citokina.<sup>40</sup>

**Pohrana energije.** Nakon usporedbe miševa bez crijevnih bacila i konvencionalno koloniziranih miševa, pretpostavka je bila da mikrobiota povećava našu sposobnost da izvučemo energiju iz prehrane i skladištimo je u perifernom tkivu, što može dovesti do inzulinske rezistencije. Unatoč tome što bakterije crijevne flore cijepaju neprobavljive polisaharide te proizvode KLMK-e i dovode do ekstrakcije energije iz njih, postoje kontradiktornosti koje pobijaju ovu teoriju. Kao prvo energija koja se stvara iz neprobavljivih ugljikohidrata je puno manja od one iz probavljivih. Također, zapadnjačka prehrana koja je najveći krivac za pretilost u društvu sadrži malo neprobavljivih ugljikohidrata, dok se uglavnom sastoji od jednostavnih šećera i masti. KLMK imaju i različite pozitivne učinke koji se suprotstavljaju pretpostavki da uzrokuju debljanje. One povećavaju sitost i smanjuju unos kalorija preko modifikacije produkcije crijevnih peptida, te ojačavaju crijevnu barijeru.<sup>46</sup>

#### 4.4.2 Antibiotici i pretilost

Antibiotici predstavljaju jedan od vanjskih čimbenika koji utječe na sastav mikrobiote. Sastav mikrobiote se najviše mijenja tijekom prve tri godine nakon čega se ustali i poprimi kompleksnost kakva je prisutna u odrasle osobe. Kao što je prije navedeno sastav mikrobiote može utjecati na metabolizam čovjeka, stoga vanjski utjecaji u prve tri godine mogu dovesti do razvoja metaboličkih bolesti uključujući i pretilosti.<sup>45</sup>

Provedene su brojne studije koje su ispitale hipotezu učinka izloženosti antibioticima u ranom životu na rizik od prekomjerne težine. U studiji sa preko 28 000 parova majka-dijete ekspozicija antibioticima u prvih šest mjeseci povezana je sa prekomjernom težinom u sedmoj godini života.<sup>48</sup> Slično je pokazala Avon Longitudinalna studija roditelja i djece u kojoj je sudjelovalo preko 10 000 djece, utvrđena je povezanost između uzimanja antibiotika u prvih šest mjeseci i prekomjerne težine u dobi od 10, 20, i 38 mjeseci.<sup>49</sup> U obje studije se primijetilo, da je više izražen porast težine u djece čije su majke bile normalne težine u odnosu na onu djecu čije su majke bile pretile, te da je utjecaj na porast težine veći u dječaka.<sup>48,49</sup>

U jednoj kanadskoj studiji, u kojoj su se korigirali ostali čimbenici koji utječu na porast težine kao što su prehrana, fizička aktivnost i majčino pušenje u trudnoći, antibiotici primijenjeni u prvoj godini života povećali su rizik od razvoja pretilosti u dobi od 9 i 12 godina.<sup>50</sup> Longitudinalna studija provedena u SAD-u pokazala je da utjecaj na porast težine ovisi o količini tretmana antibioticima i dobi uzimanja antibiotika, što je veći broj tretmana i što je ranija dob upotrebe antibiotika izraženiji je utjecaj na porast težine. Također, ovom se studijom pokazalo da su učinci povezani samo sa antibioticima širokog spektra.<sup>51</sup> U svim navedenim studijama postoji izraženiji učinak na mušku djecu što do sada nije objašnjeno.<sup>45</sup>

Osim davanja antibiotika djeci, mogući utjecaj na sastav crijevne flore u djece ima i primjena antibiotika kod majke. Promjena vaginalne flore majke primjenom antibiotika u drugom i

trećem trimestru također može biti uzrok pretilosti u djece zbog promjene u kolonizaciji novorođenčeta. Studija od 436 parova majka-dijete pokazala je 84% povećan rizik za pretilost u dobi od 7 godina, ako je majka primala antibiotik u drugom ili trećem trimestru trudnoće.<sup>45</sup>

#### 4.4.3 Mogućnosti djelovanja

Trenutačno, mogućnosti djelovanja u svrhu prevencije pojave pretilosti su u fazi istraživanja. Većina do sada objavljenih studija provedena je na životinjama, stoga za bolje razumijevanje i dokaze djelovanja, potrebne su kohortne, prospektivne studije na ljudima, koje su neophodne za uvođenje probiotika i prebiotika u liječenje i prevenciju pretilosti.

Istraživanja sa probioticima i prebioticima u početku su bila vezana uz druge bolesti, tek se 2007. godine počelo razmišljati da mikrobiota ima utjecaj na pretilost. Kroz istraživanja se vidjelo da su neki probiotici pozitivno povezani sa debljinom, a neki negativno. Visoke količine *Lactobacillus reuteri* pozitivno su povezane sa pretilošću, dok su visoke količine *Lactobacillus casei/paracasei* i *Lactobacillus plantarum* u gastrointestinalnom sustavu negativno povezane sa pretilošću. Također, *Lactobacillus acidophilus* pokazuje povoljno djelovanje na razinu kolesterola u odraslih veprova. Protuupalni efekti *Lactobacillus casei* se očituju u negativnom djelovanju na NF- $\kappa$ B p50/p65 aktivaciju, koja je inducirana od LPS-a preko TLR4 aktivacije i u aktivaciji PPAR $\gamma$  što dovodi do povećanja ekspresije GLUT4 transportera za glukozu i smanjenja inzulinske rezistencije. Kod miševa koji su primali *Lactobacillus rhamnosus* viđeni su povoljni učinci na pretilost induciranu prehranom, smatra se da je uzrok tih učinaka konjugirana linoleična kiselina, koja je aktivator PPAR $\gamma$ .<sup>52</sup>

Što se tiče prebiotika, istraživanja su pokazala da su se kod pretilih miševa hranjenih inulinom i oligofruktozom povećale razine anoreksogenih peptida kao što su GLP-1 i GLP-2 i sojeva bakterija koje su negativno povezane sa debljinom, a smanjila razina glukagona.<sup>52</sup> U dobrovoljaca koji su primali inulin kroz 2 tjedna viđen je porast GLP-1, povećana sitost i

smanjen unos kalorija, kao i smanjena postprandijalna hipoglikemija. Ekstracelularni polisaharidi su još jedna od potencijalnih mogućnosti djelovanja, iz razloga što su oni antagonisti LPS-a i potiču imunosti sustav na borbu protiv bakterija.<sup>52,53</sup>

Sposobnost bakterija koja se može iskoristiti u terapiji pretilosti je i stvaranje bakteriocina. Bakteriocin je antimikrobna bjelancevina, koja može imati široku ili usku aktivnost protiv drugih bakterija, na koju je bakterija koja ga stvara imuna.<sup>6</sup> Tako se u jednom istraživanju provedenom na miševima u kojem su se uspoređivali učinci bakteriocina bakterije *L.salivarius* i vankomicina na pretilost vidjelo da oba imaju povoljan utjecaj na porast težine iako je taj utjecaj samo privremen, dok je terapija vankomicinom rezultirala i poboljšanjem u metaboličkim abnormalnostima. Međutim postoje negativne strane terapije vankomicinom, koje nadmašuju njegove dobre učinke na porast težine i poboljšanje metaboličkih abnormalnosti, a to je porast rezistencije na vankomicin.<sup>54</sup>

Kao što je prije navedeno smatra se da je jedan od čimbenika rizika za razvoj debljine i prekomjerna uporaba antibiotika u trudnoći i u ranom djetinjstvu.<sup>45</sup>

Analize pokazuju da se antibiotici u djece koriste u velikim količinama, pa tako u SAD-u prosječno dijete do druge godine života primi tri ture antibiotika, do desete oko 10, a do dvadesete oko 17 tura antibiotika.<sup>55</sup> U Švedskoj djeca primaju 40% od onoga što se prima u SAD-u, što nam govori da se većina antibiotika prepisuje bez razloga.<sup>56</sup> Drugi veliki problem je prisutnost antibiotika u hrani i vodi. Antibiotici se daju govedu za rast, pa tako njihovo meso i mlijeko može biti kontaminirano. Važno je napomenuti i da više od 30% žena prima prepartalnu profilaksu protiv Streptokoka grupe b, što isto može utjecati na sastav mikrobiote u djeteta.<sup>57</sup>

Iz navedenog možemo zaključiti da se incidencija pretilosti može smanjiti redukcijom izloženosti djece i trudnica antibioticima. Prije svega trebalo bi se zabraniti korištenje

antibiotika u svrhu boljeg rasta stoke, na čemu FDA trenutno radi. Također, primjena antibiotika u dječjoj dobi trebala bi biti racionalnija. Trenutna primjena antibiotika u djece prelazi okvire racionalne uporabe, pa se oni daju u situacijama u kojima njihova primjena nije indicirana. Zato se prije njihove primjene trebaju uzeti svi parametri u obzir kako se antibiotik ne bi nepotrebno dao.<sup>45</sup>

#### **4.5 Spektar autističnih poremećaja**

U zadnjih nekoliko godina provedena su razna istraživanja usmjerena na dokazivanje postojanja veze između mozga i probavnog sustava, a njima je dokazana obostrana komunikacija i djelovanje između crijeva i mozga, što se naziva os crijeva-mozak. Utjecaj intestinalne mikrobiote na mozak objašnjava se pomoću nekih od funkcionalnih i upalnih crijevnih bolesti, kao što je npr. IBS, kod kojega često postoje pridruženi psihički poremećaji. Također, primijećeno je da primjena antibiotika može dovesti do poboljšanja encefalopatije u bolesnika sa dekompenziranom jetrenom bolešću. Dok su istraživanja na životinjama ukazala i na utjecaj mikrobiote na neke psihičke komponente kao što su anksioznost, depresija i osjet boli.<sup>58</sup>

Međusobna signalizacija između crijeva i mozga je regulirana na neuralnoj, hormonalnoj i imunološkoj razini. Stoga os crijeva-mozak uključuje SŽS, neuroendokrini i neuroimuni sustav, simpatičku i parasimpatičku komponentu autonomnog živčanog sustava, enterički živčani sustav i crijevnu mikrobiotu.<sup>11</sup>

Spektar autističnih poremećaja(SAP) je skupina neurorazvojnih bolesti brzo rastuće incidencije koja je karakterizirana deficitom socijalnih vještina, i ograničenim, ponavljajućim i stereotipiziranim obrascima ponašanja, interesa i aktivnosti, dok je kašnjenje u razvoju govora prisutno samo kod autizma. Incidencija SAP u SAD-u iznosi 1 na 91 djece. Za postavljanje dijagnoze služi nam Dijagnostički intervju za autizam-dopunjen (ADI-R) i Dijagnostička



opservacijska skala za autizam (ADOS-G).<sup>59</sup> U moždanom tkivu pacijenata sa autizmom možemo uočiti abnormalnosti, osobito u onim dijelovima koji su uključeni u govor, ekspresiju lica, pokrete i socijalno ponašanje.<sup>60</sup> Uzrok SAP-a je još uvijek nepoznat i smatra se da je etiologija SAP-a multifaktorijalna sa različitim genetičkim i okolišnim čimbenicima. Iako se prije smatralo da SAP ima jaku genetsku komponentu, novija istraživanja su pokazala da monogenske mutacije i kromosomalne abnormalnosti uključuju samo mali dio uzroka SAP-a.<sup>61</sup>

Prisutni simptomi u crijevnom traktu upućuju na mogućnost sudjelovanja mikrobiote u nastanku bolesti koje spadaju u SAP. Mikrobiota se najčešće dovodi u vezu sa kasno nastupajućim formama spektra autističnih poremećaja, koje se javljaju u djece starije od 18 mjeseci.<sup>14</sup>

Prevalencija gastrointestinalnih poremećaja u autizmu je značajna. Pojavljuju se uobičajeni simptomi kao što su proljev, konstipacija, povraćanje, meteorizam. Također, primijećeno je da pojedinci sa autizmom koji imaju prisutne gastrointestinalne smetnje pokazuju i više izraženu iritabilnost, anksioznost i socijalno povlačenje u odnosu na one bez gastrointestinalnih simptoma.<sup>62</sup> Gastrointestinalni poremećaji u autizmu pokazuju iznimnu sličnost sa onima u IBS-u, stoga se sistem za ocjenjivanje IBS simptoma koristi i u procjenjivanju gastrointestinalnih simptoma autizma<sup>63</sup>

U jednoj maloj studiji u kojoj je sudjelovalo 11 djece sa kroničnim proljevom i kasno nastupajućim fenotipom SAP-a, primijećen je utjecaj *Clostridium* roda na autizam. Ispitanici su tretirani vankomicinom kroz 8 tjedana, pri čemu su se njihovi bihevioralni i komunikacijski rezultati na testovima značajno popravili. Međutim poboljšanje je bilo privremeno i nakon prestanka uzimanja vankomicina došlo je do ponovnog pogoršanja. Ali ipak ove rezultate moramo uzeti u obzir i razmišljati o utjecaju bakterija roda *Clostridium* na simptoma SAP-a.<sup>64</sup>

Utjecaj metabolita bakterija na SAP se u zadnje vrijeme također razmatra. Propionska kiselina i kratkolančane masne kiseline su razgradni produkti bakterija koje su povezane sa SAP-om (*Clostridia*, *Bacteroidetes*, *Desulfovibrio*), a pokazano je da imaju razne utjecaje na mozak i ponašanje. Intraventrikularna administracija propionske kiseline i KLMK-a u štakora potiče abnormalne motoričke pokrete, ponavljajuće interese, kognitivni deficit, perseveraciju i poremećenu socijalnu interakciju. Osim toga, moždano tkivo štakora tretiranih sa propionskom kiselinom i KLMK-a pokazuje brojne sa SAP-om povezane neurokemijske promjene, koje uključuju neuroinflamaciju, povećani oksidativni stres, depleciju glutationa i promijenjen fofolipidi/acilkarnitin profil. Kod pacijenata sa SAP-om, osim što možemo vidjeti veću koncentraciju propionske kiseline u stolici i povećan broj bakterija koje je proizvode, nedostaju studije koje bi sistematski proučile propionsku kiselinu i njezine metabolite.<sup>60</sup>

Kod djece sa SAP-om postoji razlika u sastavu mikrobiote u odnosu na zdravu djecu. Istraživanja su pokazala da djeca sa SAP-om imaju čak deseterostruko povećan broj bakterija *Clostridium spp.* sa povećanom raznolikošću primijećenom u *Clostridium spp.*<sup>65</sup> Drugo istraživanje je pokazalo da je osobito povećan broj triju grupa iz *Clostridium spp.*; *Clostridium boltae* i *Clostridium cluster I* i *XI* u djece sa SAP-om.<sup>66</sup> Za bakterije iz roda *Clostridium* se smatra da mogu stvarati egzotoksine, propionat i p-cresol, koji uzrokuje smanjenje glutationa u mozgu, te derivate indola i fenole.<sup>67</sup> Na osnovu drugih istraživanja smatra se da je kod djece sa SAP-om povećan broj koljena *Bacteroidetes*, te rodova *Desulfovibrio*, *Suterella*, a smanjen broj koljena *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* i roda *Bifidobacterium*. Također, djeca sa SAP-om imaju povećan broj bakterija rodova *Roseburia* i *Coprococcus* koji pripadaju porodici *Lachnospiraceae*, a za koje se smatra da fermentiraju ugljikohidrate u kratkolančane masne kiseline. Jedna od bakterija čiji je broj povećan kod djece sa SAP-om je i *Akkermansia muciniphila*, koja ima mogućnost razgradnje mucina.<sup>68</sup> Odnos između utjecaja samog autizma na crijevnu floru i crijevne flore kao uzroka autizma još nije razjašnjen, jer nisu provedene

dovoljno velike studije koje bi ukazale na mikrobiotu kao uzrok spektra autističnih poremećaja. Također, do danas nije napravljena nijedna dobro organizirana velika studija u kojoj bi se vidjela korist probiotika u sprječavanju nastanka spektra autističnih poremećaja.

## 5. RASPRAVA

Mikroorganizmi se nalaze na svim dijelovima ljudskog tijela koji su u kontaktu sa okolišem, no najbrojniji su mikroorganizmi u gastrointestinalnom traktu. Intestinalna mikrobiota igra ulogu u metaboličkim, fiziološkim i imunološkim procesima u ljudskom tijelu. Ona pridonosi važnim metaboličkim aktivnostima ekstrakcijom energije iz inače neprobavljivih ugljikohidrata kao što su npr. vlakna. Preko metaboličkih aktivnosti također dovodi i do stvaranja važnih prehrambenih tvari, kao što su kratkolančane masne kiseline, vitamini( vitamin K, B12 i folna kiselina) i aminokiseline, koje ljudski organizam ne može sam proizvesti. Uz to, intestinalna mikrobiota sudjeluje i u obrani od patogenih bakterija, kompeticijom za nutrijente i za mjesto na sluznici, te antimikrobnim tvarima. Nadalje, intestinalna mikrobiota je uključena u razvoj gastrointestinalnih senzoričkih i motoričkih funkcija, crijevne barijere i imunološkog sustava.<sup>69</sup>

S obzirom na navedeno, za pretpostaviti je da disbioza crijevnih bakterija može dovesti do razvoja raznih bolesti. Do sada su istraživanja bila usmjerena na pokušaj otkrivanja specifičnog soja bakterija, čiji bi nedostatak ili višak mogao biti okidač razvoju bolesti. No, danas je glavni fokus istraživanja stavljen na funkcionalni doprinos humanog mikrobioma domaćinu. Metagenomika predstavlja prvi korak u istraživanju funkcionalnog kapaciteta mikrobioma. Ona se temelji na usporedbi sakupljenih DNA sekvenci bakterija sa referentnim bazama bakterijskih gena kao što su COG(clusters of orthologous groups) i KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes). Međutim, metagenomika nam govori samo o prisutnosti gena u bakterijama, odnosno o genetskom potencijalu, a ne daje nam podatke o aktivnosti gena. Stoga, za bolje razumijevanje funkcija mikrobioma, odnosno ekspresije bakterijskih gena potrebne su nam još neki od funkcionalnih mikrobiomičkih pristupa, kao što su metatranskriptomika, metaproteomika i metabolomika.<sup>69</sup>

Formiranje mikrobiote započinje još u fetalnom razdoblju, a nastavlja se nakon poroda, kada se događaju najintenzivnije promjene. Nakon poroda mikrobiotu čine uglavnom bakterije prenesene od majke, što ovisi o načinu poroda. U prvotnom je sastavu raznovrsnost bakterija mala, tek se nakon uvođenja solidne hrane broj vrsta bakterija povećava, te nastavlja rasti i mijenjati se do treće godine života, kada se formira sastav sličan onome u odrasloj osobi, nakon čega dolazi do tek manjih promjena do odrasle dobi.<sup>7</sup>

Vanjski čimbenici uvelike utječu na sastav mikrobiote, a najznačajniji su način poroda, dojenje, prehrana, antibiotici i stres. Djelovanjem na vanjske čimbenike može se utjecati na sastav mikrobiote. Stoga povoljni učinci vaginalnog poroda, dojenja, pravilne prehrane, te izbjegavanja stresa i antibiotika u nepotrebnim indikacijama, mogu pridonijeti zdravlju u dječjoj i u odrasloj dobi.<sup>7</sup>

Probiotici su bakterije čija primjena u domaćina izaziva različite povoljne učinke u crijevima, koji se odnose na promjenu sastava i funkcije mikrobioma. Njihova primjena je pokazala pozitivne učinke na različite bolesti kao što su NEC, IBS, ekcem i druge. Ipak, potrebno je bolje poznavanje učinaka probiotika na mikrobiom, kako bi se za određenu bolest mogao upotrijebiti točno određeni soj probiotika. Imajući ovo u vidu, istraživanja u budućnosti bi se trebala usmjeriti na otkrivanje učinaka probiotika na mikrobiom. Ove studije bi mogle uključivati ispitivanje kompozicije mikroba u in vitro modelima, humaniziranim animalnim modelima, koji sadržavaju bakterije karakteristične za ljude i kliničke studije koje bi određivale učinke na humani mikrobiom praćene administracijom probiotika. Ispitivanje promjena u kompoziciji moglo bi također biti prošireno na ispitivanje promjena u funkciji mikrobioma pomoću metagenomike. Razumijevanjem kako probiotici mijenjaju specifične funkcije u mikrobiomu na različitim mjestima u tijelu, selekcija sojeva probiotika bi mogla biti optimizirana za specifičnu bolest.<sup>1</sup>

Ono što danas znamo jest da se primjena probiotika treba započeti u doba kada je mikrobiota u razvoju, a ne kada je ona već formirana. To podrazumijeva primjenu probiotika u fetalnom razvoju i u ranom dojenačkom razdoblju, što možemo uzeti u razmatranje kao obećavajuću intervenciju u smanjenju pojavnosti autoimunih i alergijskih bolesti, kao i pretilosti i metaboličkih poremećaja.<sup>12</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

1. Mikrobiota sudjeluje u metaboličkim, fiziološkim i imunološkim funkcijama u tijelu, a uz to i štiti od patogenih mikroorganizama.
2. Smatra se da disbioza, odnosno abnormalan sastav mikrobiote, može dovesti do razvoja raznih alergijskih, autoimunih i metaboličkih bolesti, kao što su atopijski dermatitis, astma, šećerna bolest tipa 1, pretilost, neke gastrointestinalne i neurorazvojne bolesti.
3. Vanjski čimbenici koji djeluju na sastav mikrobiote, jesu prenatalni utjecaji, način poroda, dojenje, prehrana, antibiotici i stres.
4. Probioticima možemo djelovati na sastav i funkciju mikrobioma, a oni se prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji definiraju kao: „živi mikroorganizmi, koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina“.
5. Primjena probiotika trebala bi započeti za vrijeme trudnoće ili u rano dojenačko doba kako bi se vidjeli rezultati na prevenciju bolesti, jer je to period u kojemu se sastav mikrobiote najintenzivnije mijenja.
6. Danas se transplantacija mikrobiote koristi kod rekurentne infekcije *C.dificille*, a smatra se da će se transplantacijom mikrobiote u budućnosti postići uspjesi u liječenju upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog kolona, pretilosti, anoreksije nervoze, alergija na hranu, kao i neurodegenerativnih i neurorazvojnih poremećaja
7. Metagenomika će nam omogućiti bolje razumijevanje funkcije mikrobioma i efekata probiotika na mikrobiom, što je ključno za shvaćanje mehanizama nastanka bolesti kao i za odabir pravog soja probiotika za određenu bolest.

## 7. SAŽETAK

Ako uzmemo u obzir koliko bakterija nastanjuje naš organizam, vrlo je jednostavno zaključiti da one igraju važnu ulogu u njegovu razvoju i funkcijama. Bakterije sudjeluju u metaboličkim, fiziološkim i imunološkim funkcijama, tako da poremećaj sastava mikrobiote dovodi do poremećaja tih funkcija, odnosno do razvoja raznih bolesti.

Probiotici su u brojnim studijama pokazali povoljno djelovanje na neke dječje bolesti. Uglavnom su to bolesti gastrointestinalnog sustava, kao što su nekrotizirajući enterokolitis, sindrom iritabilnog kolona, i akutni gastroenteritis. Postoje i mnoge bolesti dječje dobi kod kojih su istraživanja pokazala moguću ulogu mikrobiote u razvoju, međutim nedostaju kvalitetne studije koje bi dokazale djelotvornost probiotika u njihovoj prevenciji. Neke od njih jesu alergijske bolesti kao što su atopijski dermatitis i astma, metaboličke, kao što je pretilost, autoimune poput dijabetesa mellitusa tipa 1, te neurorazvojne bolesti, kao što je autizam.

Naša znanja o funkcijama mikrobiote brzo napreduju, te se otkriva puno novih bolesti kojima bi disbioza bakterija mogla biti okidač za razvoj. Nove tehnologije su nam omogućile da možemo odrediti količinu bakterija u našem organizmu, kao i prepoznati većinu bakterijskih vrsta koje se nalaze u ljudskom tijelu. Također, pomoću novih tehnika karakteriziranja mikrobiote možemo odrediti i funkcionalni kapacitet bakterija. Ipak, iako naša znanja brzo napreduju, postoji još mnogo rupa u poznavanju funkcionalnog kapaciteta mikrobioma, koje tek trebamo popuniti.

Ključne riječi: mikrobiom, mikrobiota, atopijske bolesti, pretilost, dijabetes mellitus tip 1, autizam



## 8. SUMMARY

If we consider how many bacteria inhabit our organism , it is easy to conclude that they play an important role in its development and functions. The bacteria are involved in the metabolic, physiological and immunological functions, so disorder of the microbiota composition leads to disruption of these functions, or to the development of various diseases .

Probiotics have shown beneficial effects in numerous studies, on some children's diseases . These are mostly diseases of the gastrointestinal system, such as necrotizing enterocolitis, irritable bowel syndrome , and acute gastroenteritis. There are also many childhood diseases for which studies have shown the possible role of microbiota in the development, but there is lack of quality studies to prove the efficacy of probiotics in the prevention of these diseases. Some of them are the allergic diseases, such as atopic dermatitis and asthma, metabolic, such as obesity, autoimmune, such as diabetes mellitus type 1 and neurodevelopmental diseases such as autism.

Our knowledge about the functions of microbiota is rapidly progressing, and a lot of new diseases for whose development dysbiosis of bacteria may be a trigger, are discovered. New technologies have enabled us to determine the amount of bacteria in our bodies , as well as to recognize most of the bacterial species that we can found in the human body. Also, using new techniques to characterize the microbiota we can determine the functional capacity of bacteria. However , although our knowledge is making rapid progress, there are still many gaps in knowing the functional capacity of the microbiome, which need to be filled.

Key words: microbiome, microbiota, allergic diseases, diabetes mellitus type 1, obesity, autism

## 9. LITERATURA

1. Versalovic J. The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. *Ann Nutr Metab* 2013;63:42-52.
2. Fraher MH, et al. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:312-322.
3. Collado MC, et al. Microbial ecology and host –microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 2012;4:352-365.
4. Hsieh MH, Versalovic J. The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008;38(10):309-327.
5. Walker WA, Iyengar RS. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatric RESEARCH* 2015;77(1):220-228.
6. Murphy EF, et al. Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health? *Gut Microbes* 2013;4(1):48-53.
7. Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *PEDIATRICS* 2012;129(5):950-960.
8. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;13(4):260-270.
9. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:565-576.
10. Gohir W, Ratcliffe EM, Sloboda DM. Of the bugs that shape us: maternal obesity, the gut microbiome, and long-term disease risk. *Pediatric Research* 2015;77(1):196-204
11. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbiome communication in health and disease. *Frontiers in physiology* 2011;2(94):1-15.

12. Collado M., Rautava S, Isolauri E, Salminen S. Gut microbiota: a source of novel tools to reduce the risk of human disease? *Pediatric Research* 2015;77(1):182-188
13. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2687-92.
14. Cryan JF, Dinan TG. Mind altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nat Rev Neuroscience* 2012;13:701-712.
15. Brzozowski T. New advances in the basic and clinical gastroenterology. Intech. Web. 18. Travanj, 2012.
16. Borody TJ, Khoruts A. fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;9:88-96.
17. Ngoc PL, Gold DR, Tziabinos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:161–166.
18. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. the role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007;62:1223-36.
19. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 2007;56:661-667.
20. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan-Müller G, Stockholm J, Smith B, Krogfelt KA. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:646-652.
21. 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;129:434–440.

22. Ismail IH, Licciardi PV, Tang MLK. Probiotic effects in allergic disease. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2013;49:709–715.
23. Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A, Urbanek R. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus* GG supplementation. *Pediatrics* 2008;121:e850–6.
24. Azad Banting MB, et al. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2013;347:f6471.
25. Fiocchi et al.. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organization Journal* 2015; 8(1): 4.
26. Kong HH, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research* 2012;22:850-859.
27. Longo DL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 18. izdanje. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division 2012.
28. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The “perfect storm” for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008;57:2555–62.
29. Kostic AD, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in the progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 2015;17:260–273.
30. Vaarala O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunology and Cell Biology* 2012;90:271–276.
31. Vaarala O. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *The Review of DIABETIC STUDIES* 2012;9(4):251-259.

32. de Goffau MC, et al. Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia* 2014;57(8):1569-77.
33. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109–13.
34. Sanz Y, Olivares M, Moya-Perez A, Agostoni C. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk. *Pediatric Research* 2015;77(1):236-244.
35. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case–control study. *BMC Med* 2013;11:46.
36. Mejia-Leon MA, et al. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific reports* 2014;4:3814.
37. McCall B. Probiotics cut autoimmunity 33% in infants at risk for diabetes. *Medscape*. 2014. dostupno na: <http://www.medscape.com/viewarticle/831982>
38. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass indeks since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011;377:557–567.
39. Harley TW, Karp CL. Obesity and the gut microbiome: Striving for causality. *Molecular Metabolism* 2012;1:21–31.
40. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev MICROBIOLOGY* 2013;11:639-647.
41. Ding S, *et al.* High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS ONE* 2005;5:e12191

42. . Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;500:541–6.
43. Kalliomäki 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.
44. Bergström A, Skov TH, Bahl MI, et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:2889–900.
45. Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:182–190.
46. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes. *Clin Chem* 2013;59(4):617–628.
47. Cani PD, *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–1772.
48. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sørensen TIA, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes* 2011;35:522–529.
49. Trasande L, *et al.* Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes* 2013;37:16–23.
50. Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozylskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int. J. Obes.* 2014;38:1290–1298.
51. Bailey LC, *et al.* Association of antibiotics in infancy with early childhood obesity. *JAMA Pediatr.* 2014;168:1063–1069.

52. Nakamura YK, Omaye ST. Metabolic Diseases and Pro- and Prebiotics. *Nutr Metab* 2012;9:60
53. Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinology* 2011;7:639-646
54. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 2012;PMID:22345653; <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300705>.
55. Hicks LA, Taylor TH, Hunkler RJ. U.S. outpatient antibiotic prescribing, 2010. *N Engl J Med* 2013;368:1461–1462.
56. Ternhag, A. & Hellman, J. More on U.S. outpatient antibiotic prescribing, 2010. *N Engl J Med* 2013;369:1175–1176.
57. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1–32.
58. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiology* 2012;10:735-742.
59. Plauche Johnson C, Myers SM. Identification and Evaluation of Children With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics* 2007;120:1183
60. MacFabe DF. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microbial Ecology in Health & Disease* 2012;23:19260
61. Toh MC, Allen-Vercoe E. The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microbial Ecology in Health & Disease* 2015;26:26309

62. Nikolov RN, Bearss KE, Lettinga J, et al. Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2009;39:996-1005.
63. Handen BL, Melmed RD, Hansen RL, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of oral human immunoglobulin for gastrointestinal dysfunction in children with autistic disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2009;39:796-805.
64. Sandler ARH, Finegold SM, Bolte ER, et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of Child Neurology*. 2000;15(7):429-435.
65. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases* 2002;35(1):S6-S16.
66. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(11):6459-6465.
67. Kang DW, et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *Plos one* 2013;8(7):e68322
68. De Angelis M, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *Plos one* 2013;8(10):e76993
69. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 2011;6:209–240.



## 10. ŽIVOTOPIS

Mateo Madunić rođen je 30. prosinca 1990. godine u Zadru. Završio je Osnovnu školu Šimuna Kožičića Benje u Zadru, te Gimnaziju Franje Petrića također u Zadru. Studij medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci upisao je 2009. godine, te ga završio u redovnom roku 2015. godine. Tijekom studija bio je učlanjen u udruhu CroMSIC i volontirao na njihovim projektima. Služi se engleskim i njemačkim jezikom.