

# Mikrobiota novorođenčeta kao ogledalo dugoročnog zdravlja

---

Šojat, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:184:734493>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



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

Ivona Šojat

MIKROBIOTA NOVOROĐENČETA KAO OGLEDALO DUGOROČNOG ZDRAVLJA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Ivona Šojat

MIKROBIOTA NOVOROĐENČETA KAO OGLEDALO DUGOROČNOG ZDRAVLJA

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: doc.dr.sc. Iva Bilić Čače, dr.med.

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Goran Palčevski, dr.med

2. Prof.dr.sc. Jelena Roganović, dr.med

3. Doc.dr.sc. Ana Milardović, dr.med

Rad sadrži \_\_46\_\_ stranica, \_\_3\_\_ slika, \_1\_\_ tablica \_\_101\_\_ literaturnih navoda.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc.dr.sc. Iva Bilić Čače, dr.med., na suradnji i na svim pruženim savjetima. A još važnije od toga, hvala joj na poticanju da pišem, istražujem i govorim o onome što me istinski zanima i veseli.*

*Voljela bih se zahvaliti svim prijateljima i kolegama koji su mi fakultetsko razdoblje učinili nezaboravnim dijelom života i zbog kojih se je toliko teško oprostiti od studentskih dana.*

*Nadam se da ćemo se nastaviti družiti i surađivati i dalje.*

*Na kraju, posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, koja mi pruža bezuvjetnu podršku od prvoga dana moga obrazovanja i bez koje sve ovo ne bi bilo moguće.*

1. Uvod.....	1
2. Svrha rada.....	1
3.Pregled literature na zadanu temu .....	2
3.1. Mikrobiota.....	2
3.2. Mikrobiota u trudnoći.....	2
3.2.1. Vaginalna mikrobiota u trudnoći.....	3
3.2.2. Crijevna mikrobiota u trudnoći .....	5
3.2.3. Mikrobiota placente.....	6
3.3. Kolonizacija novorođenčeta mikrobiotom .....	7
3.3.1. Čimbenici koji utječu na kolonizaciju novorođenčeta .....	8
3.3.1.1. Način poroda .....	9
3.3.1.2. Prehrana novorođenčeta i socioekonomski čimbenici .....	9
3.3.1.3. Gestacijska dob .....	10
3.3.1.4. Primjena antibiotika .....	11
3.4. Crijevna mikrobiota novorođenčeta i gastrointestinalni poremećaji.....	11
3.4.1. Nekrotizirajući enterokolitis.....	11
3.4.2. Upalne bolesti crijeva.....	13
3.4.3. Celijakija .....	15
3.4.4. Konstipacija.....	16
3.4.5. Dijareja .....	18
3.5. Crijevna mikrobiota novorođenčeta i ekstraintestinalni poremećaji.....	20
3.5.1. Pretilost.....	20

3.5.2. Utjecaj osovine mikrobiota-crijevo-mozak na neurorazvoj .....	22
3.5.2.1. Pervazivni razvojni poremećaji .....	24
3.5.3. Alergijske bolesti.....	26
4. Rasprava .....	28
5. Zaključak .....	31
6. Sažetak .....	32
7. Summary .....	33
8. Literatura .....	34
9. Životopis.....	46

Popis skraćenica i akronima:

ADHD- engl. Attention Deficit Hyperactivity Disorder, poremećaj pozornosti s hiperreaktivnošću

CD- engl. Chron's disease, Chronova bolest

CFU- engl. Colony-forming Unit, jedinica koja formira koloniju

DNA- engl. Deoxyribonucleic Acid, deoksiribonukleinska kiselina

HLA- humani leukocitni antigen

IBD- engl. Inflammatory Bowel Disease, upalna bolest crijeva

IC- engl. Inteminate colitis, nerazvrstani kolitis

MTT- engl. Microbiota Transfer Therapy

NEC- engl. Necrotizing Enterocolitis, nekrotizirajući enterokolitis

NGS- engl. Next Generation Sequencing, sekvenciranje slijedeće generacije

PCDAI- engl. Pediatric Chron's Disease Index, indeks aktivnosti Chronove bolesti u pedijatrijskoj dobi

TLR- Toll-like receptor

TNF- $\alpha$  – engl. Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ , faktor tumorske nekroze  $\alpha$

UC- engl. Ulcerative colitis, ulcerozni kolitis

VEO-IBD – engl. Very Early Onset-Inflammatory Bowel Disease, upalna bolest crijeva vrlo ranog početka



## 1. Uvod

Ljudski probavni sustav dom je velikom broju bakterija koje žive u simbiozi s njihovim domaćinom. One imaju važnu ulogu u regulaciji pravilnog rasta i razvoja tokom dojenačke dobi i dječje dobi, ali isto tako i prije samog rođenja. Dugo se smatralo da se mikrobiota stječe tijekom i nakon poroda, no novija istraživanja govore u prilog sticanju mikrobiote *in utero* i povezuju je s mikrobiotom placente i uterusa. Neke od funkcija koje obavlja mikrobiota su sinteza esencijalnih nutrijenata (npr. vitamin K), metabolizam dijetalnih vlakana u kratkolančane masne kiseline te regulacija pravilnog razvoj imunološkog sustava.(1, 2) Obzirom na sve uloge koje ima gastrointestinalna mikrobiota, njena disregulacija, odnosno pojavom disbioze sve njene uloge su promijenjene što dovodi do imunološke disfunkcije i razvoja mnogih bolesti u ranoj dječjoj ali i odrasloj dobi. Disbioza se povezuje s nastankom sindroma iritabilnog crijeva, upalnih bolesti crijeva, astmom, pretilošću, neurološkim bolestima i mnogim drugima. (1-3)

## 2. Svrha rada

Rezultati brojnih recentnih studija ukazuju na činjenicu kako promjene mikrobiote rezultiraju aktivacijom imunološkog sustava i posljedično razvojem mnogih intestinalnih, ali i ekstraintestinalnih oboljenja. Upravo iz tog razloga, cilj ovog rada je prikazati razvoj mikrobiote novorođenčeta i faktore koji utječu na njen sastav. Nadalje, cilj ovog diplomskog rada je ukazati na povezanost razvoja disbioze s razvojem različitih oboljenja u kasnijem životu, sukladno dosadašnjim spoznajama. Predstavljaju se potencijalne intervencije kojima se utječe na sastav mikrobiote novorođenčeta s ciljem prevencije bolesti ali i mogućnost da se u svrhu rane dijagnostike koriste obrasci promjena u mikrobioti u određenim bolestima.

### **3.Pregled literature na zadanu temu**

#### **3.1. Mikrobiota**

Ljudska mikrobiota broji oko  $3.8 \times 10^{13}$  mikroorganizama, što znači da je omjer bakterijskih stanica naspram stanica ljudskog organizma 1:1. Samo u crijevima, koja ujedno čine i organ najgušće naseljen mikroorganizmima, prisutno je više od 500 bakterijskih vrsta. (3) Broj i raznolikost tih bakterija razlikuje su između pojedinih dijelova crijeva. Najznačajniji čimbenici koji utječu na raznolikost bakterija u crijevu su pH, peristaltika, prisutnost nutrijenata i količina imunoglobulina u sluzi. Shodno tome, najveći broj bakterija prisutan je u debelom crijevu, zbog neutralnog pH i sporog prolaska sadržaja kroz lumen debelog crijeva. (2)

Prisutni mikroorganizmi ostvaruju simbiotski odnos s domaćinom te imaju nekoliko vitalnih funkcija. Najvažnija uloga je zaštita od kolonizacije patogenim bakterijama. Taj efekt postižu produkcijom bakteriocina, kompeticijom za nutrijente ali i stimulacijom urođene imunosti domaćina aktivacijom npr. Toll-like receptora (TLR). Druga važna uloga crijevne mikrobiote je metabolička. Ostvaruje se putem fermentacije neprobavljivih ugljikohidrata što utječe na apsorpciju elektrolita i vode, proliferaciju stanica, sekreciju hormona i aktivaciju imunološkog sustava. Konačno, mikrobiota sudjeluje u razvoju i sazrijevanju stanično posredovane imunosti te nakon sazrijevanja sudjeluje u njezinoj modulaciji. (2, 3)

#### **3.2. Mikrobiota u trudnoći**

Ljudska mikrobiota sastoji se od stotina različitih vrsti mikroorganizama koje najvećim djelom čine bakterije, no uključuje i viruse i gljive. Ti mikroorganizmi ostvaruju simbiozu s domaćinom i imaju važne metaboličke, imunološke i endokrine učinke na ljudski organizam. Kao i svaki drugi dio ljudskog organizma, i mikrobiota doživljava promjene tokom ljudskog života.(1) Na nju utječu razni ekstrinzični faktori, kao što su promjene u prehrani i primjena

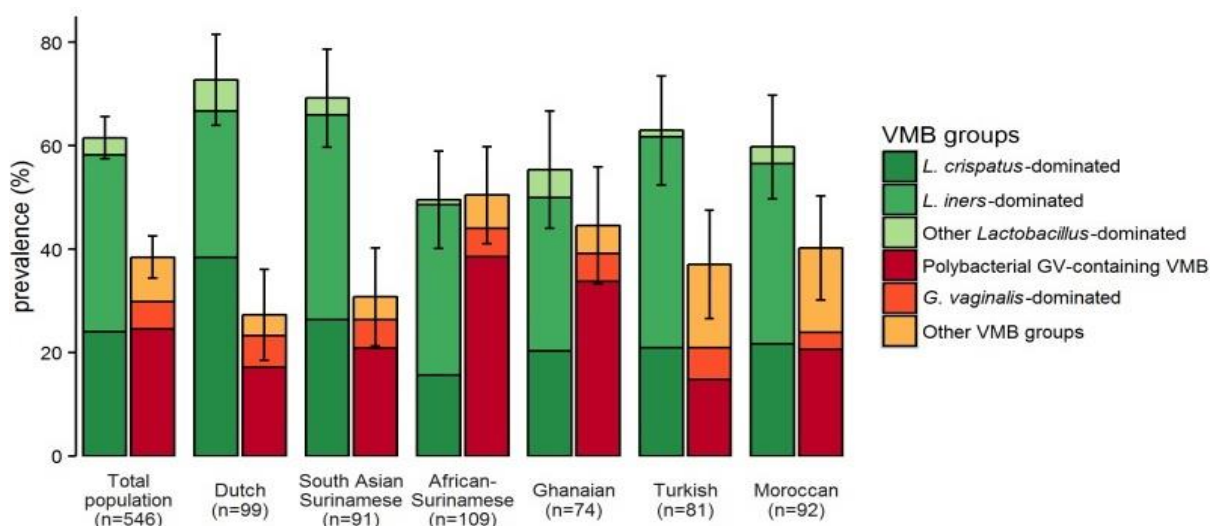
antibiotika, ali i intrinzični faktori kao što su imunološke i hormonalne promjene. Imajući na umu ove činjenice, nije začuđujuće niti saznanje da do velikih promjena u mikrobioti dolazi tijekom trudnoće, s obzirom na to da je trudnoća složen fiziološki proces kojeg prate simultane hormonalne, imunološke i metaboličke promjene. Dapače, te specifične promijene mikrobiote važne su za održavanje trudnoće i pravilan razvoj fetusa i utječu na sastav mikrobiote novorođenčeta.(4)

### 3.2.1. Vaginalna mikrobiota u trudnoći

Ženski se reproduktivni sustav u trudnoći mijenja u svrhu zaštite ploda, te sukladno s time nastupaju i promjene u vaginalnoj mikrobioti.(5) Usprkos početnim promjenama sastava vaginalne mikrobiote u trudnoći, daljnjim tijekom trudnoće vaginalna mikrobiota kvalitativno i kvantitativno ostaje stabilnog sastava, što se objašnjava promjenama u seksualnom ponašanju i izostankom menstrualnih ciklusa.(6)

Općenito, dolazi do smanjenja raznolikosti mikrobiote s predominacijom *Lactobacillus spp.*(7) Laktobacili su bakterije koje stvaranjem mliječne kiseline snižavaju vaginalni pH i povećavaju vaginalnu sekreciju i tijekom i izvan trudnoće, te na taj način sprečavaju porast broja patogenih bakterija te nastanak bakterijske vaginoze.(8) U vagini trudnica dokazano je nekoliko vrsta laktobacila, no čini se kako nisu sve vrste laktobacila povezane s normalnom vaginalnom mikroflorom u trudnoći. Tako *L. crispatus* promiče stabilnost normalne vaginalne mikroflore dok *L. gasseri* i *L. iners* predisponiraju vaginalnoj disbiozi. To sugerira da u određenom broju žena obrana genitalnog sustava od patogenih bakterija koju čine laktobacili nije adekvatna kao što bi se dalo zaključiti ako se promatra samo prisutnost koljena *Lactobacillus*, te je za precizniju procjenu bolje uzeti u obzir broj pojedinih vrsta laktobacila.(9)

Iako je to dominantna bakterijska vrsta, ostatak mikrobiote izrazito varira među trudnicama ovisno o etnicitetu trudnice, dobi, geografskom položaju i mnogim drugim faktorima.(7) Nizozemska studija provedena na 610 žena koje pripadaju u jednu od šest velikih etničkih skupina prikazala je kako postoji različita predominacija bakterijskih vrsta vaginalne flore među ispitivanim etničkim skupinama. (Slika 1) Usprkos tom i drugim sličnim istraživanjima koja su povezala određene tipove vaginalne mikroflore i određene etničke skupine, i dalje ostaje nepoznanica je li ta povezanost uzrokovana sociodemografskim, bihevioralnim, genetskim ili okolišnim čimbenicima. (10) Rezultati studije provedene u Finskoj povezuju sastav vaginalne mikrobiote s dobi i stupnjem obrazovanja, pa su tako žene kod kojih postoji predominacija *L. crispatus* bile mlađe i s višim stupnjem obrazovanja nego žene s predominacijom *L. iners* za koje smo već naveli da predisponiraju razvoju bakterijske vaginoze..(11)Ako uzmemo u obzir da novorođenče porodom prolazi vaginalnim kanalom i da na taj način dolazi do kolonizacije djeteta vaginalnom mikrobiotom, onda sukladno tome zaključujemo kako svi navedeni faktori koji utječu na promjene vaginalne mikrobiote u trudnoći utječu i na mikrobiotu novorođenčeta.



**Slika 1. Prevalencija bakterijskih vrsta u vaginalnoj mikrobioti u različitim etničkim skupinama (10)**

### 3.2.2. Crijevna mikrobiota u trudnoći

Različite promijene u gastrointestinalnoj mikrobioti zabilježene su tijekom trudnoće. Do trećeg trimestra trudnoće prati se smanjenje raznolikosti bakterijskih vrsta, s predominacijom bakterija koljena *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Ono što je još zanimljivije je smanjenje broja *Faecalibacterium* koje produciraju butirate protuupalnog učinka.(12) Taj isti obrazac pojavljuje se u žena koje nisu trudne a imaju metabolički sindrom. Ta dva stanja, metabolički sindrom i trudnoću, povezuju neke zajedničke karakteristike kao što su povećanje tjelesne mase, inzulinska rezistencija, povišene vrijednosti glukoze u krvi i veće koncentracije proupalnih čimbenika u krvi.(5) No, za razliku od bolesnika s metaboličkim sindromom, u trudnoći ove su pojave poželjne, obzirom da osiguravaju adekvatan transfer energije za rast i razvoj fetusa.(4) Obzirom da se crijevna mikrobiota mijenja trajanjem trudnoće niti ovaj metabolički učinak nije jednako izražen u sva tri trimestra. Sukladno tome, udio proupalnih bakterija raste od prvog ka trećem trimestru trudnoće. ( Tablica 1 ) Kada su se fekalni uzorci žena u trećem trimestru trudnoće prenijeti u *germ-free* miševima, pokazalo se da dolazi do jačeg debljanja i inzulinske rezistencije nego kod prenošenja uzoraka žena u prvom trimestru trudnoće.(12)

Zdravstveno stanje trudnice koje mijenja njenu gastrointestinalnu mikrobiotu utječe i na sastav mikrobiote novorođenčeta. Tako žene koje su bile pretile prije trudnoće i one koje su postale pretile tokom trudnoće u crijevnoj mikrobioti imaju smanjen broj bifidobakterija i povećan broj stafilokoka, *Bacterioides* i *Enterobacteriaceae*. Sličan je obrazac mikroorganizama prisutan i u fekalnim uzorcima njihove novorođenčadi. Takve promijene mikrobiote su prediktivne za razvoj pretilosti u djetinjstvu ali i nekih drugih bolesti kao što su npr. alergijske bolesti što znači da sastav crijevnih mikrobiota majke može utjecati na razvoj bolesti u njihove djece.(5)

### Tablica 1. Udio proupalnih bakterijskih koljena izoliranih iz fekalnih uzoraka u prvom i trećem trimestru trudnoće

\*T1, prvi trimestar ( $13,84 \pm 0,16$  tjedana); T3, treći trimestar ( $33,72 \pm 0,12$  tjedana)(12)

	T1*	T3*
Proteobacteria	0,73%	3,2%
Acinetobacteria	5,1%	9,3%

### 3.2.3. Mikrobiota placente

Sterilnost placente istražuje se već gotovo 150 godina. Konačno, drugom polovicom 20. stoljeća postignut je konsenzus da je placenta sterilna. Tada je ustanovljeno kako se mikrobiota novorođenčeta stječe tokom poroda od majke i nakon poroda iz okoline te je ova teorija nazvana „paradigma sterilne maternice“ ( engl. *Sterile womb paradigm*).(4) U većini istraživanja kojima se potvrdila ta paradigma koristile su se tradicionalne metode kao što su kultivacija bakterija i mikroskopija.(13)

No, u posljednje vrijeme, napretkom medicine i razvojem molekularnih metoda kao što je sekvenciranje slijedeće generacije (NGS, engl. *Next generation sequencing*), ponovno se počelo sumnjati u valjanost tvrdnji o sterilnosti placente. Hipoteza takvih studija je kako niti placenta, niti amnionska tekućina, a niti sam fetus nisu sterilni te kako proces kolonizacije novorođenčeta počinje još *in utero* s placente koja ima svoj mikrobiom.(13) Upravo je jedna takva studija provedena na više od 300 ispitanica, gdje se sekvenciranjem slijedeće generacije dokazala postojanja bakterija u placenti. Taj mikrobiom uključivao je *Fusobacterium spp.*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria polysaccharea*, *Propionibacterium acne*, *Bacterioides spp.* itd.(14) Navedena mikrobiota najviše je slična oralnoj mikrobioti majke što i ne iznenađuje previše ako uzmemo u obzir da su se periodontalne bolesti povezivale s povišenim rizikom od

porođajnih komplikacija. Takvi rezultati nagnali su autore na razmišljanje o hipotetskom hematogenom načinu prijenosa bakterija od usne šupljine majke do placente(4, 15)

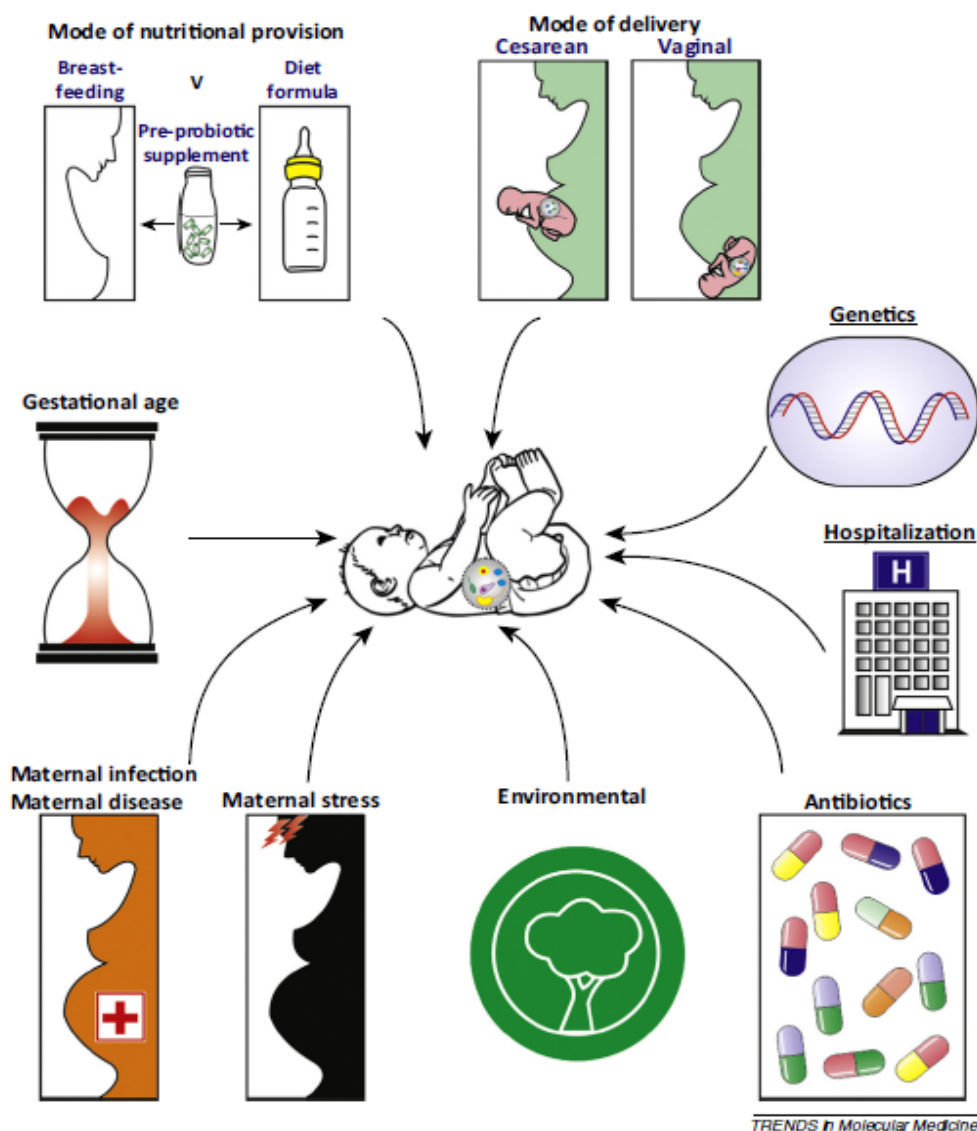
No, i ovo istraživanje, kao i većina sličnih ima nekoliko ograničenja. Ukoliko se i dokaže prisutnost bakterija uglavnom se radi o vrlo maloj biomasi te postoji mogućnost da se radi o kontaminaciji prilikom uzimanja uzorka. Također, iako se bakterije dokažu molekularnim metodama, uglavnom se ne uspijevaju potvrditi klasičnim metodama. Najčešći uzrok toga je što iako se molekularnim metodama može dokazati prisutnost bakterijske DNA, to ne mora značiti i prisutnost vijabilnih bakterija. Upravo je prisutnost živih bakterija ključna kako bi se opovrgnula paradigma sterilne placente obzirom na to da epitel placente posjeduje anatomski i imunološki antimikrobni svojstva. (13) Osim tih, postoje mnogi drugi limiti u istraživanju placentarne mikrobiote što i dalje na vodećoj poziciji ipak ostavlja hipotezu sterilne placente.

### **3.3. Kolonizacija novorođenčeta mikrobiotom**

Kako je ranije navedeno, dugi niz godina vrijedilo je mišljenje da kolonizacija novorođenčeta bakterijama započinje pucanjem plodovih ovoja, obzirom na to da se smatralo kako fetus živi u sterilnim uvjetima. No, mnoga nedavna istraživanja otvorila su mogućnost kolonizaciji fetusa *in utero* potkrepljujući hipotezu o postojanju placentarnog mikrobioma ali i mikrobioma amnionske tekućine i pupčane vrpce. Jedno od tih istraživanja je randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana studija koja je pokazala da primjerno probiotika u trudnice dolazi do promjene u ekspresiji gena za Toll-like receptore placente i fetalnih crijeva.(16) To svakako sugerira da na ekspresiju gena i aktivaciju imunološkog sustava u fetalnim crijevima ima utjecaj kontakt s mikrobima još *in utero*. Usprkos mnoštvu takvih i sličnih istraživanja ovo je i dalje kontroverzna tema. (1)

### 3.3.1. Čimbenici koji utječu na kolonizaciju novorođenčeta

Sasvim je sigurno kako kolonizacija crijeva novorođenčeta napreduje rapidno rupturom membrana .(3) Kolonizacija dakako ovisi o mnogim perinatalnim čimbenicima kao što su način poroda novorođenčeta, prehrana trudnice i prehrana novorođenčeta, gestacijska dob prilikom rođenja, primjena antibiotika intrapartalno i postpartalno ali i o raznim okolišnim čimbenicima kao što su socioekonomski status majke, geografski položaj ili izloženost kućnim ljubimcima (Slika 2).(3, 17)



Slika 2. Faktori koji utječu na razvoj mikrobiote novorođenčeta (18)



### 3.3.1.1. Način poroda

Najpoznatiji čimbenik u akviziciji mikrobiote novorođenčeta je način poroda. Novorođenčad koja se rađa carskim rezom dolazi u kontakt s mikroorganizmima s drugačijih anatomskih lokacija nego novorođenčad rođena vaginalnim putem. Tijekom poroda carskim rezom prvi kontakt se ostvaruje s bakterijama iz okoliša u koji uglavnom spada zrak i medicinsko osoblje te majčina koža. Za razliku od toga, novorođenče rođeno vaginalnim putem prvenstveno dolazi u kontakt s vaginalnom i crijevnom mikrobiotom majke kao što su *Lactobacillus*, *Prevotella*, i *Sneathia* spp..(3) Većina istraživanja pokazala je da se mikrobiota dojenčadi razlikuje u ovisnosti o načinu poroda sve do kraja prve godine života kada karakteristike mikrobiote postaju sličnije neovisno o načinu poroda. Neke različitosti ipak perzistiraju i nakon prve godine života, što se ne može smatrati beznačajnim ako se uzme u obzir da je u Hrvatskoj prema Hrvatskom Zavodu za Javno Zdravstvo 2018. godine 24,39% djece porođeno carskim rezom.(19, 20)

### 3.3.1.2. Prehrana novorođenčeta i socioekonomski čimbenici

Druga determinanta o kojoj ovisi kolonizacija gastrointestinalnog sustava je tip prehrane novorođenčeta. Crijevna mikrobiota djece koja su isključivo dojena pokazuje dominaciju bakterijskih vrsta kao što su *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Staphylococcus* koje imaju poznate pozitivne učinke na zdravlje.(21) Suprotno tome, crijevna mikrobiota novorođenčadi hranjena mliječnim formulama sadrži bakterijske vrste povezane s proinflammatornim učincima, kao što su *Roseburia*, *Clostridium* i *Anaerostipes* spp. (21) Učinak majčinog mlijeka pripisuje se kompleksnim neprobavljivim oligosaharidima koji postaju supstrati mikroorganizmima u crijevu,odnosno djeluju kao prebiotici i tu pospješuju rast određenih bakterijskih vrsta.(3, 21-23)

Također, novija istraživanja prikazuju prisutnost laktobacila i bifidobakterija u majčinom mlijeku u količini od  $10^1$ - $10^5$  CFU/ml . (24) No, i prebiotska i probiotska svojstva majčinog mlijeka podložna su raznim utjecajima kao što su dob majke, majčin indeks tjelesne mase i geografska lokacija. U ovisnosti o navedenim faktorima, mijenja se i sastav mikrobiote novorođenčeta.(25) Osim što su dokazane razlike u mikrobioti djece na velikim geografskim udaljenostima, provedene su i studije u kojima se ukazuje na različitost mikrobiote među novorođenčadi nekoliko jedinica neonatalne intenzivne njege u relativnoj blizini. (26)

Usporedbom mikrobiote isključivo dojene novorođenčadi iz zemalja u razvoju i s onom isključivo dojene novorođenčadi iz industrijaliziranih zemalja zaključeno je kako mikrobiota djece iz razvijenih zemalja sadrži manji broj bifidobakterija u odnosu na crijevnu mikrobiotu djece iz zemalja u razvoju, što se u konačnici povezuje s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa melitusa tipa 1 i alergijskim bolestima.(5) Mogućnost da bioraznolikost životnog prostora trudnice i novorođenčeta utječe na bioraznolikost mikrobiote novorođenčeta predmet je ispitivanja mnogih studija. Tako se pokazalo da novorođenčad trudnica koje su bile izložene krznenim kućnim ljubimcima imaju veću mikrobiološku raznolikost u uzorku mekonija bez obzira na način poroda, perinatalnu primjenu antibiotika ili probiotika.(17)

### **3.3.1.3. Gestacijska dob**

Gestacijska dob prilikom rođenja važan je čimbenik koji utječe na kolonizaciju crijeva mikroorganizmima. Studije su pokazale značajnu razliku u mikrobioti prijevremeno rođene djece i zdrave djece rođene u terminu poroda.(3) Mekonij nedonoščeta sadrži uglavnom bakterije vrste *Enterobacter*, *Enterococci* *Clostridium*.(27) Ovakav sastav mikrobiote i razlike u odnosu na zdravu novorođenčad može se pripisati činjenici da su ta djeca porođena uglavnom carskim rezom, brzo se odvajaju od majki, ranu neonatalnu dob provode u

jedinicama intenzivnog liječenja, hrane se mliječnim formulama i često primaju antibiotike širokog spektra. (1, 3)

#### **3.3.1.4. Primjena antibiotika**

Primjena antibiotika intraportalno ili u ranom neonatološkom razdoblju, ali i same infekcije, također utječu na akviziciju mikrobiote. Primjena antibiotika utječe tako da smanjuje bioraznolikost mikrobiote i uočava se pojačan rast potencijalno patogenih bakterija koje su rezistentne na antibiotike. (3, 28-33) No, izgleda da te promjene mikrobiote nisu trajne. Kada su se fekalni uzorci dojenčadi izložene antibioticima usporedili s fekalnim uzorcima te iste djece nakon dojenačke dobi, usprkos toj prethodnoj primjeni antibiotika sveukupna je rezistencija mikrobiote na antibiotike bila smanjena i došlo je do povećane raznolikosti mikroorganizama. To sugerira da promjene u mikrobiote uzrokovane primjenom antibiotika ipak nisu uvijek trajne. Usprkos tome, dugoročne posljedice rane izloženosti antibioticima kao što su povećan rizik za razvoj prehranjenosti i pretilosti u kasnijoj dječjoj dobi i dalje postoje. (34)

### **3.4. Crijevna mikrobiota novorođenčeta i gastrointestinalni poremećaji**

#### **3.4.1. Nekrotizirajući enterokolitis**

Nekrotizirajući enterokolitis (NEC, engl. *necrotizing enterocolitis*) jedna je od najčešćih komplikacija prematuriteta. U faktore rizika za razvoj nekrotizirajućeg enterokolitisa ubrajaju se prematuritet, prehrana mliječnom formulom i primjena antibiotika. Kao posljedica hipoksije, prematuriteta i sepse razvija se ishemija crijeva koja dovodi do nekroze stijenke koja može biti praćena perforacijom i razvojem peritonitisa. Usprkos intenzivnoj neonatalnoj skrbi prevalencija smrtnosti kod nekrotizirajućeg enterokolitisa je i dalje 20-30%. (2, 35) Neki od kliničkih kriterija za dijagnozu bolesti su distenzija crijeva, zastoj prolaza kroz probavni trakt i retencija želučanog sadržaja, krv u stolici, letargija i hipoperfuzija s prisutnošću

pneumatoze crijeva na rendgenogramu trbušnih organa.(35) Bolest je fulminantnog tijeka te nerijetko zahtjeva intenzivnu terapiju a čak i ukoliko je liječenje uspješno nerijetko ostaju trajne posljedice u vidu stenozе crijeva.

Povezanost mikrobiote novorođenčeta s nastankom enterokolitisa uvelike se istražuje u svrhu korištenja tih saznanja u ranijoj dijagnostici, ali i prevenciji razvoja nekrotizirajućeg enterokolitisa. Mnoge studije dokazale su povezanost razvijanja NEC-a i predominacije bakterijskog roda *Enterobacteriaceae* u stolici novorođenčadi. Jedna takva studija provedena na uzorcima stolice 40 prijevremeno rođene djece, od kojih je kasnije 11 razvilo NEC dokazala je povećanu prisutnost dviju vrsta iz tog roda u djece koja su razvila tu komplikaciju: *Klebsella pneumoniae* i *Citrobacter koseri*. Također, u te nedonošćadi detektirana je smanjena bioraznolikost crijevne mikrobiote.(26) Velika meta-analiza u koju je uključeno 14 studija pokazala je smanjen broj bakterija Firmicutes i Bacteroidetes u nedonošćadi prije nego su razvili NEC.(36) Ovi rezultati potencijalna su osnova razvoja biomarkera za raniju dijagnozu ili pak skrininga rizične novorođenčadi na NEC.

Mogućnost da se razvoj nekrotizirajućeg enterokolitisa spriječi primjenom probiotika uvelike se istražuje. (37) Način na koji bi probiotici mogli prevenirati razvoj NEC-a temelji se na osnovnim mehanizmima djelovanja probiotika kao što su: djelovanje na gensku ekspresiju, stvaranje butirata koji prehranjuju kolonocite te obnavljaju epitelnu barijeru, te na navedene ali i još mnoge druge načine sprečavaju porast patogenih bakterija. Najčešće primjenjivani probiotici koji su pokazali klinički značajan učinak sadrže bifidobakterije i/ili laktobacile.(38) Usprkos meta-analizama koje prikazuju uspješnost terapije probioticima, i dalje postoje otvorena pitanja koja se tiču praktične primjene probiotskih preparata o kojima ovisi uspjeh liječenja, a to su: manjak kontrole kvalitete proizvoda, terapijska doza, dob započinjanja i duljina trajanja terapije.(37) Mjesta u prevenciji i terapiji nekrotizirajućeg enterokolitisa za

primjenu probiotika zasigurno ima, no potrebno je još studija u kojima će se ispitati prije navedena pitanja.

### 3.4.2. Upalne bolesti crijeva

Glavna karakteristika upalnih bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) kronična je upala gastrointestinalnog sustava s varijabilnim periodima remisije i egzacerbacije. Klinički upalna bolest crijeva obuhvaća tri klinička entiteta: Chronovu bolest (CD, engl. *Crohn's disease*) i ulcerozni kolitis (UC, engl. *ulcerative colitis*) te nerazvrstani kolitis (IC, engl. *intermediate colitis*). Vodeći simptomi u odraslih sudijareja, krvave stolice, bol u abdomenu i gubitak tjelesne mase, dok su kod djece češći nespecifični simptomi poput anemije i zaostajanja u rastu. Etiologija bolesti je nerazjašnjena, a patogenezu čini interakcija genetičkih čimbenika, promijenjenog imunološkog odgovora sluznice na mikroorganizme, disrupcije sluznične barijere i okolišnih čimbenika. (2, 31, 39)

Iako postoje brojne studije u kojima se istražuju uzroci upalnih bolesti crijeva odraslih, vrlo je malo onih koja istražuju uzroke upalne bolesti crijeva vrlo ranog početka (VEO-IBD, engl. *very early onset inflammatory bowel disease*). VEO-IBD definira se pojavom bolesti prije šeste godine života djeteta, često s pozitivnom obiteljskog anamnezom na upalne bolesti crijeva i rektalnim krvarenjem kao dominantnim simptomom. Uglavnom se kao uzrok ovome entitetu predlažu nasljedni čimbenici. (39) No, postoji nekolicina istraživanja u kojima se istražila promjena mikrobiote i promjena u imunološkom odgovoru na gastrointestinalnu mikrobiotu u sluznici kao uzrok ovih bolesti. Obzirom da se ulcerozni kolitis i Chronova bolest pretežito razvijaju u dijelu probavnog sustava koji ponajviše obiluje bakterijama upravo je sastav mikrobiote tih djelova crijeva bio istraživan. Bolesnici uglavnom imaju smanjenu raznolikost mikrobiote s prevalencijom *Clostridia*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria* i posebice *E. coli*. (40, 41) Potonja nije česta u ljudi koji ne boluju od ovih bolesti.

Pacijenti s upalnom bolesti crijeva imaju više IgG protutijela i T limfocita na mukozi, što ukazuje na supresiju lokalnih imunotolerancijskih mehanizama. (10) Mikrobiota zdravih osoba producira kratkolančane masne kiseline, stimulira imunološki i lokalni živčani sustav te osigurava funkcionalnost epitelne barijere crijeva. Pojavom disbioze većina tih protektivnih učinaka nestaje, te svi čimbenici koji mogu uzrokovati disbiozu crijeva umanjuju i zaštitni učinak mikrobiote. Pretpostavka je da upotreba antibiotika u trudnoći i u ranom dojenačkom dobu povećava rizik za pojavu VEO-IBD uzrokujući smanjenu raznolikost bakterijskih vrsta i nastanak disbioze. Studija provedena na više od 800 000 djece pokazala je da postoji povezanost između primjene antibiotika u zadnjem trimestru trudnoće i razvoja Chronove bolesti u djece, ali ne i ulceroznog kolitisa. Također, ta ista studija nije dokazala povezanost primjene antibiotika u novorođenčadi i povećanog rizika za razvoj VEO-IBD. (31) Važno je napomenuti kako je apsolutni rizik za razvoj VEO-IBD izrazito nizak te je antibiotici i dalje trebaju biti primjenjivani u trudnica kada za to postoji indikacija.

Probiotici sprečavaju prerastanje bakterija, održavaju integritet mukozalne barijere tako što poboljšavaju funkciju, stabilnost i indukciju T stanične apoptoze. (2) Ta svojstva probiotika korištena su u svrhu regulacije imunskog odgovora u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Pokazalo se da upotreba probiotika koji sadrže *E.coli*, Nissle, 1917, *Bifidobacteria* i *Lactobacili* GG pomaže u održanju remisije ulceroznog kolitisa iako ne pomaže u indukciji remisije bolesti. (42) Primjena *Lactobacillus* GG u dozi od  $10^{10}$  CFU dva puta dnevno tokom šest mjeseci u djece s Chronovom bolešću dovela je do poboljšanja u indeksu aktivnosti Chronove bolesti u pedijatrijskoj dobi (PCDAI, engl. Pediatric Crohn's Disease Index).(43) Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se utvrdila efikasnost primjene probiotika u upalnim bolestima crijeva, posebice Cronhovoju bolesti, čija je incidencija među djecom u Hrvatskoj ipak veća nego incidencija ulceroznog kolitisa. (44)

### 3.4.3. Celijakija

Celijakija je imunosno posredovana bolest koja zahvaća tanko crijevo, a glavna joj je karakteristika doživotna intolerancija na gliadin i srodne prolamine. (2) Bolest se pojavljuje u individua koji nose humani leukocitni antigen DQ2 ( HLA-DQ2) ili humani leukocitni antigen DQ8 haplotip. Kao posljedica neadekvatnog imunološkog odgovora na gluten postepeno se razvija atrofija crijevnih resica s produbljenjem kripte. Glavne kliničke karakteristike su nadutost, proljevi, malapsorpcijski sindrom, osteopenija, osteoporoza i ekstraintestinalne manifestacije bolesti. (45, 46) Osnova terapije je isključenje namirnica koje sadrže gluten iz prehrane čime se postiže klinička i histološka remisija bolesti. Procjenjuje se da će svako stoto novorođenče razviti celijakiju tokom života.(47)

Uloga mikrobiote u patogenezi celijakije još nije utvrđena. Iako se smatra da je imunomodulatorni učinak crijevne mikrobiote potencijalno povoljan za ove pacijente, postoje istraživanja u kojima je dokazana redukcija u količini blagotvornih bakterija, posebice *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, kod osoba koje su na bezglutenskoj dijeti.(48) Kod novorođenčadi koja imaju visoki genetski rizik za razvitak celijakije postoji povišena prisutnost *B.fragilis* i *Staphylococcus spp.* u crijevima, dok je broj *Bifidobacterium spp.* i *B. longum* smanjena kao što je već i navedeno. (49) Također, omjer Gram-pozitivnih naspram Gram-negativnih bakterija pokazao se nižim kod liječenih i neliječenih bolesnika nego kod kontrolnih skupina. (50) Međutim, iako se mikrobiota oboljelih od celijakije pokazala promijenjenom u odnosu na kontrolne skupine, jedinstven obrazac mikrobiote za celijakiju još uvijek nije ustanovljen te su daljnja saznanja o mikrobioti potrebna kako bi se mogla koristiti u svrhu prevencije ove bolesti. (2, 45)

Pretpostavlja se da dojenje protektivno djeluje na razvoj ove bolesti zbog njegovog modulatornog djelovanja na sastav mikrobiote, posebice u vidu povećanja broja

Bifidobacteria, te su na tu temu provedena mnoga istraživanja koja imaju oprečne rezultate. (22, 45) Studija provedena na 164 novorođenčadi koja imaju HLA-DQ visokog rizika prikazuje snižen broj *Bifidobacterium spp.* kod te novorođenčadi bez obzira na to što su hranjeni isključivo majčinim mlijekom, a isto je potvrdila još jedna studija u kojoj se uspoređivalo 11 visokorizične novorođenčadi i 11 novorođenčadi niskoga rizika. (49, 51) Trenutačni konsenzus je da dojenje i vrijeme uvođenja glutena u prehranu ne igraju značajnu ulogu u razvoju bolesti, no svakako su potrebna daljnja istraživanja na ovu temu.

Drugi čimbenici koji mogu mijenjati mikrobiotu novorođenčeta kao što su tip porod carskim rezom, infekcije i primjena antibiotika također se povezuju s razvojem celijakije, posebice u djece s genetskom predispozicijom za razvoj bolesti. Primjena probiotika uz bezglutensku dijetu pokazala se korisnom u smislu obnove crijevne mikrobiote u oboljelih, smanjenje broja CD3<sup>+</sup> T limfocita i faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , engl. *tumour necrosis factor alpha*), no značajne kliničke manifestacije terapije probioticima još nisu ustanovljene. (45)

#### **3.4.4. Konstipacija**

Konstipacija je često stanje u pedijatriji. Čini 3% razloga svih dolazaka liječnicima primarne zdravstvene zaštite te čak 25% dolaska specijalistima pedijatrijske gastroenterologije. Konstipacija označava neredovitu defekaciju, obično suhe ili tvrde stolice, koju može pratiti napinjanje ili bol. U pedijatrijskoj medicini najčešće su uzorci funkcionalne naravi, što znači da ne postoji organi uzrok konstipaciji. Faktori rizika za razvoj konstipacije razni su, te uključuju čimbenike koji mogu biti dijetarni, psihosocijalni, medikamentozni i anatomske. (52, 53)

Disrupcija crijevne mikrobiote smatra se etiološkim faktorom u razvoju funkcionalne konstipacije u djece te je intervencija primjenom probiotika postala temom od interesa kada je



u pitanju terapija funkcionalne konstipacije. Preduvjet za racionalnu i učinkovitu primjenu probiotika dakako je znanje o sastavu crijevne mikrobiote u djece koja imaju funkcionalnu konstipaciju. Obrazac bakterija djece s konstipacijom razlikovao se onoga zdrave djece u kontrolnoj skupini te se sastojao od povećanog ukupnog broja klostridija u studiji provedenoj na 42 djece, što se može definirati kao disbioza.(54) Ipak, većina studija u kojima se istražuje sastav mikrobiote u djece daju oprečne rezultate, što se može objasniti relativno dinamičnom mikrobiotom djece ali i različitim tehnikama koje su korištene kako bi se okarakterizirala mikrobiota.(54, 55) Unatoč nekim razlikama, većina studija provedenih na odraslima prikazuje smanjenu količinu *Bifidobacterium* i *Lactobacillus genera* a povećanim brojem *Bacterioidetes* i *Enterobacteriaceae*. Gram negativne bakterija, u čiju skupinu pripadaju i *Enterobacteriaceae*, sadrže endotoksin lipopolisaharid koji uzrokuje usporeno pražnjenje želuca, disfunkciju sfinktera i dismotilitet crijeva te samim time djeluju u prilog razvoja konstipacije. Nasuprot tome, bifidobakterije, koje su se pokazale najčešće zahvaćenima promjenom u osoba s konstipacijom, potiču motilitet crijeva i time sprečavaju zastoj fekalnih masa. (55)

Prilikom ispitivanja sastava mikrobiote dojenčadi primijećeno je da prehrana mliječnim formulama povećava rizik za razvoj konstipacije za 4.5 puta u usporedbi s dojenčadi koja se hrane dominantno majčinim mlijekom. (56) U djece koja su dojena, kao što smo već naveli, postoji predominacija *Bifidobacterium spp.*, ponajviše zbog prebiotskog svojstva majčinog mlijeka. Dodatak prebiotika u prehranu djece koje se hrane mliječnom formulom povećava ukupno količinu *Bifidobacterium spp.* te posljedično tome i broj stolica. (2) Probiotici su naveliko ispitivani u liječenju konstipacije, pa tako postoje studije u kojima se opisuje poboljšanje simptoma primjenom određenih bakterijskih vrsta u odraslih. Randomizirana kontrolna studija provedena na dojenčadi mlađoj od šest mjeseci pokazala je povećanje broja stolica i poboljšanje u konzistenciji stolice prilikom primjene mliječne formule

suplementirane LGG-om.(57)Slične rezultate imala je i studija u kojoj je primijenjen jogurt obogaćen *Bifidobacterium longum*.(2) S druge strane, takva poboljšanja nisu primijećena tokom primjene *B. lactis* i *B.longum* BL 999 na dojenčadi u drugim studijama, što uzrokuje mnoge nejasnoće glede učinka probiotika u ranijoj dječjoj dobi. (58).

### 3.4.5. Dijareja

Dijareja je simptom raznih intestinalnih ali i ekstraintestinalnih bolesti, koji je karakteriziran vodenastim i neformiranim stolicama koje se javljaju više od tri puta u danu ili defekacijom volumena stolice većeg od 200mL na dan.(2) Glavni je i najčešći simptom akutnih gastroenteritisa te je temelj definicije istih. Akutni gastroenteritis karakterizira smanjenje fekalne konzistencije i/ili povećanje broja stolica sa ili bez popratnog povraćanja koje obično traje kraće od 7 dana. Zbog toga česta je popratna pojava dehidracija koja u djece nastupa vrlo brzo ukoliko se ne vrši rehidracija. Do dehidracije dolazi zbog promijene u metabolizmu vode i sekreciji elektrolita kroz crijevnu sluznicu.

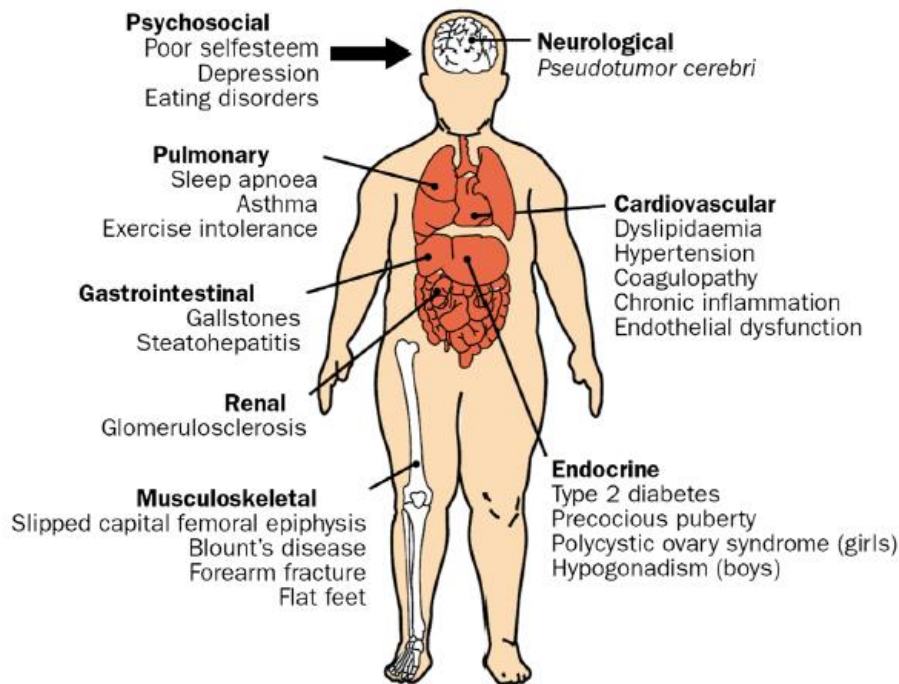
Najčešća etiologija je infektivna, a glavni uzročnici su Rotavirusi te *Campylobacter* i *Salmonella*. (59)Vrlo čest uzrok proljeva je primjena antibiotika tekoja uzrokuje crijevnu disbiozu. Kao dodatak terapiji dijareje,u svrhu regulacije crijevne disbioze, koriste se probiotici.(60) Mehanizam njihova djelovanja temelji se na očuvanju crijevnog epitela te smanjenju permeabilnosti istoga. Također, produciraju baktericide i natječu se za nutrijente s patogenim bakterijama zbog čega sprečavaju njihov porast. Isto tako pospješuju reapsorpciju natrija u kolonocitima zbog produkcije kratkolančanih masnih kiselina. (61, 62) Najčešće ispitivani mikroorganizmi su *Lactobacillus* GG i *Saccharomyces boulardii*koji poseban benefit imaju na prevenciju pojave dijareje povezane s primjenom antibiotika. Meta-analiza podataka pet randomiziranih kontrolnih studija pokazala je kako primjena *Saccharomyces boulardii*uz primjenu antibiotika smanjuje rizik za razvoj proljeva uzrokovanog antibioticima

sa 17,2% na 6,7%.(60) Kada se primjenjuju u visokim dozama ( >5 milijardi CFU na dan) smanjuju trajanje proljeva u djece s rotavirusnom infekcijom iako nije zabilježena redukcija u volumenu fecesa.(63-65) Što se tiče primjene drugih mikroorganizama u liječenju proljeva još ne postoje čvrsti dokazi o njihovoj učinkovitosti. (63)

### 3.5. Crijevna mikrobiota novorođenčeta i ekstraintestinalni poremećaji

#### 3.5.1. Pretilost

Jedan od najvećih javnozdravstvenih problema današnjice svakako čini pretilost. Sama epidemija pretilosti razvila se kroz posljednja tri desetljeća (66), te se smatra da će prevalencija pretilosti do 2025. godine biti 20%, što u apsolutnim brojkama znači da će više od milijarde ljudi biti izravno ugroženo metaboličkim posljedicama pretilosti. (67) Rizična podskupina među pretilima su djeca, kod koje prevalencija pretilosti raste jednako kao i kod odraslih. Pretila djeca postaju pretili odrasli s komplikacijama pretilosti kao što su dijabetes tipa 2, arterijska hipertenzija, nealkoholna masna bolest jetre, metabolički sindrom i mnoga druga stanja (Slika 3). (68)



**Slika 3. Komplikacije pretilosti u dječjoj dobi (68)**

Etiologija pretilosti je multifaktorijalna. Uzrokuju je različiti genetski, bihevioralni i okolišni čimbenici. No, obzirom na nagli porast broja pretilih ljudi u posljednja tri desetljeća, genetički faktor kao uzrok tom naglom porastu je isključen.(68) Najočitiiji uzrok prekomjernom povećanju tjelesne mase je povećan energetska unos sa skladištenjem viška energije u obliku masti, ali dodatni uzroci su i smanjena fizička aktivnost i svakodnevna izloženost stresu. (66, 68) Nedavna istraživanja u fokus kao faktor u etiopatogenezi razvoja pretilosti postavljaju mikrobiotu. Jednom ustanovljena mikrobiota složen je metabolički centar koji na nekoliko različitih načina regulira tjelesnu težinu pojedinca. Kao što smo već spominjali, metabolizmom neprobavljivih kompleksnih ugljikohidrata u kratkolančane masne kiseline osigurava se prehrana kolonocita. Ti isti metaboliti utječu na sekreciju želučanih peptida i tako reguliraju motilitet, sitost, apsorpciju nutrijenata i homeostazu energije. Ukoliko dođe do razvoja disbioze, dolazi i do smanjene zaštite integriteta sluznice probavnog sustava te posljedične translokacije lipopolisaharida u krv. To uzrokuje stanje stalne upalne reakcije niske razine te metaboličke poremećaje. (66, 68) Također, u mnogim studijama se predlaže i istražuje kako ovakvo okruženje dovodi do epigenetičkih promjena.(68)

U pretilih odraslih osoba uočena je promjenjena mikrobiota s predominacijom *Firmicutes* i smanjenim brojem *Bacteroidetes*. Iako još nije točno razjašnjeno je li to posljedica ili uzrok pretilosti, većina studija pokazuje da ovakva kompozicija prethodi razvoju pretilosti. (69) Sve je više dokaza da se predispozicija za razvoj pretilosti ustanovljuje u najranijoj dobi i da mikrobiota novorođenčeta ima ključnu ulogu u tome. Norveška studija povezala je promjene u sastavu mikrobiote u dobi djece od 10 dana i 730 dana starosti s vrijednostima indeksa tjelesne mase u dobi od 12 godina. (70) Primjena antibiotika tokom trudnoće i u ranom dojenačkom razdoblju, porod carskim rezom i prehrana mliječnim formulama novorođenčeta utječu na razvoj mikrobiote a samim time i na povećanje predispozicije za razvoj pretilosti u odrasloj dobi. Fekalni uzorci sakupljeni i analizirani u

jednoj kohortnoj studiji pokazali su da novorođenčad rođena carskim rezom imaju smanjen broj bifidobakterija i *Bacteriodes* spp. koje djeluju protektivno na razvoj pretilosti kasnije u životu. (71, 72)

Razne epidemiološke studije pratile su utjecaj primjene antibiotika u različitim fazama dojenačke dobi na antropološke mjere kod djece dobi od 5-12 godina. (73) Većina ih je potvrdila da izloženost antibioticima, ali isto tako i infekcijama, tokom prvih 6 mjeseci života utječe na ekscesivno povećanje tjelesne mase i pretilosti u kasnijem djetinjstvu. (29, 30, 32, 74) Izloženost antibioticima *in utero* također se povezuje sa višim rizikom za razvoj pretilosti, višim indeksom tjelesne mase i postotkom tjelesne masti u djece starosti 7 godina.(28) Primjenom animalnih modela pokazalo se kako određeni antibiotici kao što su vankomicin i klortetraciklin imaju veći utjecaj na povećanje udjela masti u tijelu nego pencilinski antibiotici. (33) Također su ukazali na činjenicu da veći utjecaj ima primjena antibiotika prilikom rođenja nego u kasnijem životu. Još važnije, čak i nakon što je antibioticima uzrokovana disbioza regulirana, izloženi miševi svejedno su imali metabolički fenotip pretilih. (75)

Svi ovi učinci djeluju sinergistički s djetetom bogatom mastima u kasnijem životu. Iako je pretilost složeno stanje, važno je uložiti puno truda u prevenciju. Obzirom na dosadašnja saznanja, uz uobičajene mjere prevencije trebalo bi naglasiti oprezniju upotrebu antibiotika u ranom djetinjstvu, poticati na vaginalni porod i dojenje kad je to moguće, te u konačnici dodatno istražiti korist alteracije mikrobiote probioticima. (73)

### **3.5.2. Utjecaj osovine mikrobiota-crijevo-mozak na neurorazvoj**

Pojam osovine crijevo-mozak poznat je i prisutan u medicini još od početka 20.st., no nedavno se u taj termin umetnula još jedna varijabla- mikrobiota. Ta je osovina složena te su njene varijable međusobno zavisne i uključuju promjene u imunološkom sustavu,

gastrointestinalnom sustavu i u centralnom živčanom sustavu. Zbog toga, promjenom jedne od sastavnica osi, dolazi do narušavanja homeostaze i pojave raznih poremećaja. (18)

Sam razvoj živčanog sustava složeni je proces koji uključuje neurogenezu, migraciju, sinaptogenezu, apoptozu, mijelinizaciju i remodeliranje novonastalih sinapsi i započinje formacijom neuralnog grebena u trećem tjednu gestacije. Iako se razvoj centralnog živčanog sustava odvija i *in utero*, upravo je postnatalni period od ključne važnosti za neurorazvoj. Upravo tada dolazi do diferencijacije stanica, morfološkog razvoja mozga i ustanovljenja funkcija. Važno je spomenuti da broj sinapsi raste do druge godine života djeteta, kada je broj sinapsi za 50% veći nego što je to u mozgu odraslih, a to je ujedno i godina u kojoj dolazi do sazrijevanja crijevne mikrobiote. (1, 18, 76) Obzirom na to da se razvoj mikrobiote odvija gotovo istovremeno s razvojem centralnog živčanog sustava te da os mikrobiota-crijeva-mozak ima važnu ulogu u neurorazvoju, postoji mogućnost da se utjecajem na mikrobiotu u tom periodu stvori predispozicija za razvoj neurorazvojnih poremećaja. (77) Način na koji mikroorganizmi u crijevima utječu na neurorazvoj je složen i za sada još uvijek nedovoljno istražen, no osnovom djelovanja smatra se produkcija neurotransmitora koji prelaskom u krvotok dolaze do ciljnog organa i tu ostvaruju svoje učinke. (78, 79) Na isti taj način disbioza dovodi do poremećene reakcije na stres, neurokemijskih poremećaja te poremećaja percepcije boli. (18)

Djelovanjem noksi na majku, još u prenatalnom periodu, dolazi do izmjene mikrobiote majke a samim time i novorođenčeta, što se povezuje nastankom neurorazvojnih poremećaja. Faktori rizika za razvoj nekih od tih poremećaja kao što su autizam, poremećaj pozornosti s hiperreaktivnošću (ADHD, engl. *attention deficit hyperactivity disorder*) i schizofrenia su promjena majčine prehrane, infekcije i prenatalni stres u majke. (18, 80) Kao što je već prethodno navedeno, novorođenčad koja se hrani majčinim mlijekom ima različitu mikrobiotu od one koja se hrani mliječnim formulama. Iako povezanost tih razlika u mikrobioti s

utjecajem na neurorazvoj nije dokazana, uočene su razlike u kognitivnim sposobnostima djece koja se dominantno dojena naspram djece koja su pretežito hranjena mliječnim formulama. Tako su u jednoj randomiziranoj studiji bolje kognitivne sposobnosti u dobi od 6.5 godina imala djeca koja su se hranila majčinim mlijekom u novorođenačko doba. Iako je povezanost dojenja i boljih kognitivnih performansi u ovoj studiji bila očita, i dalje ostaje nejasno je li pozitivan utjecaj na kogniciju uzrokovan nekim od sastojaka majčinog mlijeka koji dovodi do promjena u mikrobioti ili su posljedica socijalne i fizičke interakcije majke i dojenčeta tijekom dojenja. (81)

### **3.5.2.1. Pervazivni razvojni poremećaji**

Pervazivni razvojni poremećaj obuhvaća skupinu neurorazvojnih poremećaja nepoznate etiologije. Autizam, koji spada u skupinu pervazivnih razvojnih poremećaja, najčešći je poremećaj iz te skupine i nastupa najkasnije do treće godine života djeteta. Smatra se kako važnu ulogu u etiopatogenezi bolesti imaju genetički i okolišni čimbenici. Tu skupinu poremećaja povezuju karakteristike kao što su poteškoće komunikacije i socijalne interakcije te prisutnost stereotipnih radnji. One su prisutne u svih bolesnika te mogu biti više ili manje izražene. (82) Djeca koja imaju pervazivne razvojne poremećaje često imaju i simptome bolesti probavnoga sustava, što ukazuje na moguću ulogu mikrobiote u razvoju ovih poremećaja putem osi mikrobiota – crijevo – mozak. (83, 84) Posebice se ističe povećana permeabilnost crijeвне sluznice koja rezultira prisutnosti citokina u krvi kao što su interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 i interferon- $\gamma$  ali i djelova bakterija kao što je lipopolisaharid Gram negativnih bakterija. Oni direktno prolaze krvno-moždanu barijeru ali i aktiviraju imunski odgovor u mozgu te uzrokuju neke od bihevioralnih simptoma ovog spektra poremećaja. (85)



Razlike u mikrobioti djece s pervazivnim razvojnim poremećajima u odnosu na djecu bez njih postoje. Djeca s tim poremećajem imaju manje raznoliku mikrobiotu, manju količinu *Bifidobacterium spp.* i *Fimricutes spp.* i više razine *Lactobacillus*, *Clostridium* i *Bacteroidetes*. (86) Usprkos ovim saznanjima, do sada nije ustanovljen specifičan obrazac promjena mikrobiote koji bi mogao poslužiti u dijagnostici ili praćenju osoba s pervazivnim razvojnim poremećajima. (87)

Animalni modeli pokazali su kako miševi koji su porođeni carskim rezom češće pokazuju znakove anksioznosti, lošije socijalno funkcioniraju i imaju repetitivne radnje, što su potvrdile neke studije na ljudima. (88) Osim toga, njihova je mikrobiota narušena te pokazuju znakove povećane crijevne permeabilnosti što i inače čini česte komorbiditete pervazivnih razvojnih poremećaja. (76) Način života majke također ima utjecaj na promjenu mikrobiote te posljedično tome i razvoj autizma. No, primjenom probiotika koji sadrže *Lactobacillus reuteri* dolazi do regulacije mikrobiote što govori u prilog reverzibilnosti ovih procesa. (89) Još jedan čimbenik koji utječe na raznolikost mikroorganizama u crijevima je prehrana majčinim mlijekom, koja se pokazala kao protektivni čimbenik. (23, 90)

Sve ove činjenice otvaraju mogućnost za nove vrste terapije koje će biti usmjerene ka regulaciji mikrobiote. Iako su provedena istraživanja na životinjskim modelima koja ukazuju na mogući benefit primjene prebiotika i probiotika, potrebno je provesti velike multicentrične, dvostruko-slijepo, randomizirane kontrolne studije. Novi oblik liječenja predstavlja „*Microbiota transfer therapy*“ (MTT). Protokol uključuje inicijalnu primjenu antibiotika od četrnaest dana nakon koje slijedi čišćenje crijeva te konačnu primjenu probiotika sa standardiziranom humanom crijevnom mikrobiotom tokom 7-8 tjedana. Ovaj oblik terapije zasad je pokazao poboljšanje simptoma gastrointestinalnog sustava ali i onih koji karakteriziraju autistični spektar poremećaja. (91)

### 3.5.3. Alergijske bolesti

Alergijske bolesti zahvaćaju sve veći broj djece te mogu perzistirati kao problem i u odrasloj dobi. Obzirom na porast prevalencije u kratkom razdoblju od pedeset godina, kao glavni uzrok porasta učestalosti alergijskih bolesti smatra se poboljšanje u higijeni i promjene u prehrani. Ta hipoteza naziva se „hipoteza higijene“ za koju se smatra kako također utječe na promjene razvoja mikrobiote. (3) Mikrobiota utječe na imunološki odgovor domaćina, pa tako i na razvoj imunološkog sustava u najranijoj dobi, a kako je patogeneza alergijskih bolesti izravno povezana s imunološkim sustavom onda je uloga mikrobiote kao kofaktora u razvoju alergijskih bolesti očita. Crijevni mikroorganizmi, ali i svi ostali mikroorganizmi s kojim novorođenče dolazi u kontakt, usmjeravaju razvoj njegovog predominantno Th2 imunološkog odgovora u imunološki odgovor sličniji odraslim osobama te sazrijevanju regulacijskih T limfocita. Taj „nezreli“ Th2 imunološki odgovor uzrokuje povećanu produkciju imunoglobulina E na različite okolišne antigene i razvoj alergijskih reakcija. Narušavanjem normalnog tijeka uspostavljanja crijevne mikrobiote dolazi do povećanog rizika za razvoj alergijskih bolesti kao što su ekcem, alergijski rinitis i astma.

Jedan od čimbenika koji promjenom mikrobiote u djece stvaraju predispoziciju za razvoj alergijskih bolesti je primjena antibiotika. U studiji provedenoj na 193 412 djece uzimanje antibiotika u djece dobi do godine dana povezano je s povećanom učestalošću astme ali i težim simptomima astme u dobi od 6 i 7 godina. Jači simptomi rinokonjunktivitisa i ekcema u dobi od 6 i 7 godina su u toj istoj studiji također povezani s primanjem antibiotika u dojenačkoj dobi. (92) Novorođenčad porođena carskim rezom ima različitu crijevnu mikrobiotu u odnosu na vaginalno rođenu djecu. Studije u kojima se istraživala povezanost poroda carskim rezom s predispozicijom za razvoj alergijskih bolesti dale suprotne rezultate. (93, 94) Zanimljivo je da elektivni carski rez nosi viši rizik za razvoj alergijskih bolesti nego hitan carski rez, što se objašnjava činjenicom da kod većine hitnih carskih rezova ipak dolazi

do pucanja porođajnih membrana prije odluke o zahvatu. (3) Smatra se da dojenje štiti dijete od razvoja alergijskih bolesti svojim probiotskim i prebiotskim komponentama. (95) Također se pokazalo kako djeca hranjena hidroliziranim proteinskim formulama s dodatkom neprobavljivih oligosaharida imaju mikrobiotu ali i metabolitni profil mikrobiote sličniji djeci hranjenoj majčinim mlijekom nego djeci hranjenoj kravljim mlijekom. (96)

Do promjene sastava mikrobiote dolazi prije razvoja simptoma alergijskih bolesti što bi se u budućnosti moglo koristiti u svrhu ranog dijagnosticiranja. S tim ciljem, provedena su brojna istraživanja kojima se pokušala okarakterizirati mikrobiota djece s visokim rizikom za razvoj bolesti ali i one djece koja već imaju dijagnosticiranu neku od alergijskih bolesti. *Clostridium difficile* je pronađen u većem broju kod djece koja su kasnije razvila alergijske bolesti. (97) Razne druge studije pokazale su promjene u sastavu mikrobiote kod novorođenčadi s povećanim rizikom za razvoj alergijskih bolesti, no neke ističu kako je važnija činjenica da postoji disbioza nego sam sastav mikrobiote. (98) Ova saznanja otvaraju mogućnost ranoj intervenciji i sprečavanju razvoja alergijskih bolesti kod novorođenčadi s povećanim rizikom. Pokazalo se kako primjenom pripravaka koji sadrže *Lactobacillus GG* i *Lactobacillus fermentum* tokom trudnoće i u ranom životu djeteta dolazi do smanjenja rizika za pojavu alergijskog dermatitisa ali i smanjenja težine simptoma bolesti. (99, 100)

#### 4. Rasprava

Prvih 1000 dana života djeteta ključan je period koji je izravno povezan s dugoročnim zdravljem. Više je čimbenika koji u tom periodu mogu utjecati na očuvanje zdravlja i razvoj bolesti, no, čini se da su mikroorganizmi koji koloniziraju crijevo i tu formiraju trajnu mikrobiotumeđu najistaknutijim faktorima. Točan trenutak u kojem započinje kolonizacija novorođenčeta još uvijek je predmet diskusije, no nakon pregleda literature zaključujemo da je i dalje malo dokaza kojima bi se uspješno opovrgnula „paradigma sterilnog uterusa“.(1, 13)

Kada bi se kultivacijom i mikroskopijom dokazala prisutnost bakterija u placenti, amnionskoj tekućini i pupčanoj vrpci, to bi promijenilo kliničku praksu i preporuke, što se posebice odnosi na promjenu stavova o elektivnom carskome rezu. Važno je naglasiti kako je neupitno da medicinski indiciran carski rez treba biti proveden, no u većini se provedenih istraživanja potvrdio negativan utjecaj ovog zahvata na etabliranje početne crijevne mikrobiote i epidemiološki se povezao s povećanim rizikom za razvoj nekih od kroničnih bolesti u kasnijem životu. Stoga stremljenje k tome da se preveniraju medicinska stanja koja zahtijevaju porod carskim rezom te ograničavanje ovog načina poroda samo na medicinski indicirane slučajeve i dalje ostaju od velikoga značenja, ne samo zbog komplikacija samog zahvata već i zbog njegovog utjecaja na razvoj kroničnih bolesti. (13)

Po našem mišljenju, nužna su daljnja istraživanja u kojima je fokus utjecaj primjene antibiotika i probiotika u trudnice, ali i metabolita mikrobiote trudnice, na fetus. Postojeće studije potvrđuju da je primjena antibiotika u prenatalnom i u ranom novorođenačkom periodu povezana sa alteriranim imunološkim odgovorom novorođenčeta, ali i povećanom podložnosti razvoju nekrotizirajućeg entrokolitisa i mnogim kroničnim bolestima u kasnijem životu kao što su upalne bolesti crijeva, pretilost i alergijske bolesti. Antibiotici često spašavaju život oboljelima od infektivnih bolesti, no problem predstavlja njihova nekritična i nesvršishodna primjena, posebice u dojenčadi i male djece. Obzirom na tu široku primjenu

antibiotika posljedice koje nastaju zbog izloženosti u ranoj životnoj dobi značajne su kada sagledamo širu populaciju, čak i ako su rizici za razvoj pojedinačnih kroničnih bolesti niski.

Isto tako, primjena probiotika u trudnoći utječe na ekspresiju Toll-like receptora u mekoniju djeteta što upućuje na to da promjena mikrobiote trudnice utječe na imunološki sustav djeteta već u najranijoj fazi njegovog života. (31) Primjena probiotika je svakako odličan način kojim bi se moglo utjecati na promjenu u mikrobioti trudnice ali i novorođenčeta što bi u konačnici omogućilo prevenciju bolesti povezanih s disbiozom. Meta analize pokazuju da primjena probiotika tijekom trudnoće sprečava razvoj atopijskog dermatitisa u djece, a kohortne studije indiciraju kako su djeca trudnica koje su uzimale pripravke koji sadržavaju laktobacile i bifidobakterije imala manju učestalost ekcema i rinokonjunktivitisa. Iste benefite probiotici su pokazali i u primjene kod novorođenčadi.(5) Usprkos tome probiotici i dalje nisu okosnica prevencije niti terapije navedenih stanja i bolesti. Smatramo kako je razlog tome nemogućnost kontrole kvalitete proizvoda i razlike koje postoje između stastava otisnutog na pakiranju i stvarnog sastava proizvoda. Također, još uvijek nisu utvrđene točne doze, optimalno vrijeme započinjanja terapije niti vremensko trajanje primjene probiotika koja bi bila adekvatna u prevenciji ili liječenju određenih stanja i bolesti. (37) U svakom slučaju, potrebno je provesti dodatne randomizirane, dvostruko slijepe studije kako bi se razjasnile nejasnoće glede primjene probiotika u trudnoći i novorođenačkom dobu, što često nije moguće zbog etičkih dilema.

Kako bi uopće bilo moguće ustanoviti koje bakterijske vrste treba uvrstiti u sastav probiotskih pripravaka, valja točno kvalitativno i kvantitativno okarakterizirati sastav mikrobiote novorođenčadi koja imaju visoku predispoziciju za razvoj određenih stanja i bolesti ili novorođenčadi koja već boluju od bolesti u kojoj želimo probiotike koristiti kao adjuvantnu terapiju u liječenju. Iako su mnoge studije pokušale upravo to, zaključak većine istih je da nije ustanovljen točan obrazac promjene mikrobiote u ispitivanim uzorcima već da

je stalna samo činjenica da dolazi do disbioze. Stoga je svakako nužno provesti daljnja istraživanja kojima bi se omogućio ne samo razvoj probiotika, već bi se i otvorila mogućnost da se specifični obrazac promjene mikrobiote koristi kao svojevrsni mikrobiološki biomarker u procesu ranog dijagnosticiranja bolesti kod novorođenčadi visokog rizika. To bi imalo velik učinak na prevenciju i umanjeње posljedica kroničnih bolesti koje predstavljaju velik javnozdravstveni problem kao što su pretilost, upalne bolesti crijeva, alergijskih bolesti, celijakija i neurorazvojni poremećaji. Osim poboljšanja kvalitete života tih osoba i njihovih obitelji, smanjili bi se i troškovi u zdravstvu koje uzrokuje liječenje bolesnika s kroničnim bolestima.(101)

Usprkos velikom interesu i mnoštvu studija u čijem središtu bavljenja mikrobiota novorođenčeta, i dalje smo tek na početku shvaćanja interakcije ovih mikroorganizama s organizmom novorođenčeta u najranijim danima života te posljedica te interakcije na dugoročno zdravlje. Očekujemo da će istraživanje novorođenačke mikrobiote biti temelj razumijevanja zdravlja i bolesti, te da će novi eksperimentalni pristupi ovoj temi omogućiti primjenu tih saznanja u preventivne, dijagnostičke i terapijske svrhe, posebice kod novorođenčadi kod kojih je proces kolonizacije mikrobiotom bio alteriran.

## 5. Zaključak

Crijevna mikrobiota utječe na zdravlje domaćina tijekom cijeloga života. To uključuje i rano novorođenačko doba koje je period u kojem se mikrobiota izrazito brzo mijenja. Od sterilnog, ili barem veoma slabo koloniziranog crijeva, u kratkom razdoblju dolazi do nagle kolonizacije velikim brojem mikroorganizama. Ta je novorođenačka crijevna mikrobiota još uvijek nestabilna i izrazito sklona promjenama, pa tako razni faktori utječu na njezin sastav: način poroda, prehrane, primjena antibiotika i probiotika u majke, okolina, socioekonomski status majke, geografska lokacija, infekcije patogenim mikroorganizmima i mnogi drugi. Svi ti faktori mogu dovesti do disbioze koja stvara predispozicije za razvoj bolesti od novorođenačkog doba, pa sve do odrasle dobi. Upravo bi taj novorođenački period mogao biti ključan za intervencije na crijevnoj mikrobioti a sve kako bi se ispravljanjem disbioze smanjili rizici za razvoj kroničnih bolesti. Te kronične bolesti velik su javnozdravstveni problem te smanjuju kvalitetu života bolesnika.

U ovom smo radu saželi dosadašnja saznanja o razvoju mikrobioma i utjecaju disbioze na razvoj različitih intestinalnih i ekstraintestinalnih poremećaja. Nužno je provesti daljnja istraživanja kojima će se opisati sastav mikrobiote u novorođenčadi s predispozicijama za razvoj različitih bolesti i stanja te konstruirati dvostruko slijepu, multicentričnu, placebo kontroliranu studiju kojima bi se utvrdila učinkovitost i sigurnost probiotika u prevenciji i terapiji bolesti u čijoj je etiopatogenezi disbioza važan čimbenik.

## 6. Sažetak

Crijevna je mikrobiota važan čimbenik za pravilan rast i razvoj od rođenja pa sve do odrasle dobi. Kolonizacija bakterijama započinje direktnim kontaktom novorođenčeta s majčinom vaginalnom, crijevnom i kožnom mikrobiotom. Sastav mikrobiote ovisi o tome je li dijete porođeno carskim rezom ili vaginalnim putem, je li dojeno ili se hrani mliječnim formulama, je li primalo antibiotike te koje je gestacijske dobi bilo pri rođenju. Sastav ovisi i o socioekonomskom statusu majke te o geografskoj lokaciji.

Sve je više dokaza kako kvalitativne i kvantitativne promjene mikrobiote pridonose promjenama aktivacije imunološkog sustava sluznice s posljedičnim razvojem intrainestinalnih i ekstraintestinalnih bolesti. Pa tako je crijevna disbioza tijekom novorođenačke i dojenačke dobi ustanovljena u djece koja su kasnije razvila nekrotizirajući enterokolitis, upalne bolesti crijeva, celijakiju, konstipaciju i proljev, ali i ekstraintestinalne bolesti kao pretilost, alergijske bolesti i neurorazvojne poremećaje.

Probioticima i prebioticima moguće je ciljano mijenjati sastav mikrobiote u svrhu ostvarivanja zdravstvenih benefita. Mehanizam djelovanja probiotika složen je te uključuje regulaciju genske ekspresije pro-inflamatornih gena, produkciju kratkolančanih masnih kiselina koje suprimiraju rast patogenih bakterija, pružaju potporu sluzničnoj epitelnoj barijeri i reguliraju celularnu imunost. Na taj način dovode do korekcije intestinalne mikrobiote te djeluju preventivno i terapijski na nabrojene pedijatrijske gastrointestinalne ali i ekstraintestinalne bolesti.

Ključne riječi: novorođenče, mikrobiota, disbioza, probiotici, prebiotici



## 7. Summary

The intestinal microbiota is an important factor for proper growth and development from birth to adulthood. Bacterial colonization initiates direct contact of the newborn with the mother's vaginal, intestinal, and skin microbiota. The composition of the microbiota depends on whether the baby was born by caesarean section or vaginal route, was breastfed or fed with milk formulas, was receiving antibiotics, or which gestational age was at birth. The composition of microbiota also depends on the socioeconomic status of the mother and the geographical location.

It has been shown that qualitative and quantitative changes in the microbiota contribute to changes in the activation of the mucosal immune system with the consequent development of intractable and extraintestinal diseases. Intestinal dysbiosis during neonatal and infant period was present in children who later developed necrotizing enterocolitis, inflammatory bowel disease, celiac disease, constipation and diarrhea, but also extraintestinal diseases such as obesity, allergic diseases and neurodevelopmental disorders.

Probiotics and prebiotics can promote changes in the composition of the microbiota in order to achieve various health benefits. The mechanism of action of probiotics is complex and includes regulation of gene expression of pro-inflammatory genes, production of short-chain fatty acids that suppress the growth of pathogenic bacteria, support the mucosal epithelial barrier and regulation of cellular immunity. By correcting the intestinal microbiota, they have a preventive and therapeutic effect on the previously mentioned pediatric gastrointestinal and extraintestinal diseases.

Key words: newborn, microbiota, dysbiosis, probiotics, prebiotics

## 8. Literatura

1. Ihekweazu FD, Versalovic J. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *Am J Med Sci.* 2018;356(5):413-23.
2. Weber TK, Polanco I. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:676585.
3. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis.* 2018;9(6):590-7.
4. Neuman H, Koren O. The Pregnancy Microbiome. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2017;88:1-9.
5. Sohn K, Underwood MA. Prenatal and postnatal administration of prebiotics and probiotics. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(5):284-9.
6. Kervinen K, Kalliala I, Glazer-Livson S, Virtanen S, Nieminen P, Salonen A. Vaginal microbiota in pregnancy: Role in induction of labor and seeding the neonate's microbiota? *J Biosci.* 2019;44(5).
7. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome.* 2014;2(1):4.
8. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4680-7.
9. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 2009;9:116.

10. Borgdorff H, van der Veer C, van Houdt R, Alberts CJ, de Vries HJ, Bruisten SM, et al. The association between ethnicity and vaginal microbiota composition in Amsterdam, the Netherlands. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181135.
11. Virtanen S, Rantsi T, Virtanen A, Kervinen K, Nieminen P, Kalliala I, et al. Vaginal Microbiota Composition Correlates Between Pap Smear Microscopy and Next Generation Sequencing and Associates to Socioeconomic Status. *Sci Rep*. 2019;9(1):7750.
12. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470-80.
13. Perez-Munoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017;5(1):48.
14. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6(237):237ra65.
15. Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms Involved in the Association between Periodontitis and Complications in Pregnancy. *Front Public Health*. 2014;2:290.
16. Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*. 2012;102(3):178-84.
17. Tapiainen T, Paalanne N, Tejesvi MV, Koivusaari P, Korpela K, Pokka T, et al. Maternal influence on the fetal microbiome in a population-based study of the first-pass meconium. *Pediatr Res*. 2018;84(3):371-9.

18. Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med.* 2014;20(9):509-18.
19. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016;16(1):86.
20. Porodi u zdravstvenim ustanovama u Hrvatskoj 2018. goodie [Internet]. 2019. Available from: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2019/07/Porodi\\_2018.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2019/07/Porodi_2018.pdf).
21. Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(6):852.
22. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):914-21.
23. Penn AH, Carver LJ, Herbert CA, Lai TS, McIntire MJ, Howard JT, et al. Breast Milk Protects Against Gastrointestinal Symptoms in Infants at High Risk for Autism During Early Development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;62(2):317-27.
24. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract.* 2017;32(3):354-64.
25. Boix-Amoros A, Puente-Sanchez F, du Toit E, Linderborg KM, Zhang Y, Yang B, et al. Mycobiome Profiles in Breast Milk from Healthy Women Depend on Mode of Delivery, Geographic Location, and Interaction with Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(9).
26. Dobbler PT, Procianoy RS, Mai V, Silveira RC, Corso AL, Rojas BS, et al. Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Front Microbiol.* 2017;8:2243.

27. Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strommen K, Nakstad B, Ronnestad AE, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep*. 2018;8(1):2453.
28. Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Oberfield S, Dominguez-Bello MG, Widen EM, et al. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(4):665-70.
29. Li DK, Chen H, Ferber J, Odouli R. Infection and antibiotic use in infancy and risk of childhood obesity: a longitudinal birth cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(1):18-25.
30. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(1):16-23.
31. Ortqvist AK, Lundholm C, Halfvarson J, Ludvigsson JF, Almquist C. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gut*. 2019;68(2):218-25.
32. Mbakwa CA, Scheres L, Penders J, Mommers M, Thijs C, Arts IC. Early Life Antibiotic Exposure and Weight Development in Children. *J Pediatr*. 2016;176:105-13 e2.
33. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methe BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621-6.
34. Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24(6):753-9.
35. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics*. 2010;125(5):921-30.

36. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 2017;5(1):31.
37. Patel RM, Underwood MA. Probiotics and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2018;27(1):39-46.
38. Sawh SC, Deshpande S, Jansen S, Reynaert CJ, Jones PM. Prevention of necrotizing enterocolitis with probiotics: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*. 2016;4:e2429.
39. Snapper SB. Very-Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2015;11(8):554-6.
40. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol*. 2011;17(5):557-66.
41. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.
42. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999;354(9179):635-9.
43. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31(4):453-7.
44. Krznaric Z, Kolacek S, Bender DV, Kelecic DL, Cukovic-Cavka S, Sincic BM, et al. [Croatian guidelines for use of enteral nutrition in Crohn's disease]. *Lijec Vjesn*. 2010;132(1-2):1-7.
45. Lee GJ, Kao JY. Recent advances in pediatric celiac disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(6):583-92.

46. Polanco I. Celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47 Suppl 1:S3-6.
47. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(10):1538-44; quiz 7, 45.
48. Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 12):1669-74.
49. Palma GD, Capilla A, Nova E, Castillejo G, Varea V, Pozo T, et al. Influence of milk-feeding type and genetic risk of developing coeliac disease on intestinal microbiota of infants: the PROFICEL study. *PLoS One.* 2012;7(2):e30791.
50. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol.* 2010;10:63.
51. Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut.* 2015;64(3):406-17.
52. van den Berg MM, Benninga MA, Di Lorenzo C. Epidemiology of childhood constipation: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(10):2401-9.
53. Madani S, Tsang L, Kamat D. Constipation in Children: A Practical Review. *Pediatr Ann.* 2016;45(5):e189-96.
54. Zoppi G, Cinquetti M, Luciano A, Benini A, Muner A, Bertazzoni Minelli E. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatr.* 1998;87(8):836-41.
55. Ceresola ER, Ferrarese R, Preti A, Canducci F. Targeting patients' microbiota with probiotics and natural fibers in adults and children with constipation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(20):7045-57.

56. Aguirre AN, Vitolo MR, Puccini RF, de Morais MB. [Constipation in infants: influence of type of feeding and dietary fiber intake]. *J Pediatr (Rio J)*. 2002;78(3):202-8.
57. Vendt N, Grunberg H, Tuure T, Malminiemi O, Wuolijoki E, Tillmann V, et al. Growth during the first 6 months of life in infants using formula enriched with *Lactobacillus rhamnosus* GG: double-blind, randomized trial. *J Hum Nutr Diet*. 2006;19(1):51-8.
58. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(2):238-50.
59. Guarino A, Albano F, Ashkenazi S, Gendrel D, Hoekstra JH, Shamir R, et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: executive summary. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;46(5):619-21.
60. Szajewska H, Mrukowicz J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(5):365-72.
61. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr*. 2002;88 Suppl 1:S39-49.
62. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2006;130(3):731-46.
63. Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(11):CD004827.



64. Szajewska H, Skorka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(3):257-64.
65. Szajewska H, Skorka A, Ruszczynski M, Gieruszczak-Bialek D. Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(8):871-81.
66. Reinhardt C, Reigstad CS, Backhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48(3):249-56.
67. Collaboration NCDRF. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* 2016;387(10026):1377-96.
68. Chang L, Neu J. Early factors leading to later obesity: interactions of the microbiome, epigenome, and nutrition. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2015;45(5):134-42.
69. Cox LM, Blaser MJ. Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metab.* 2013;17(6):883-94.
70. Stanislowski MA, Dabelea D, Wagner BD, Iszatt N, Dahl C, Sontag MK, et al. Gut Microbiota in the First 2 Years of Life and the Association with Body Mass Index at Age 12 in a Norwegian Birth Cohort. *mBio.* 2018;9(5).
71. Bennet R, Nord CE. Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection.* 1987;15(5):332-6.
72. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511-21.
73. Azad MB, Moossavi S, Owora A, Sepehri S. Early-Life Antibiotic Exposure, Gut Microbiota Development, and Predisposition to Obesity. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2017;88:67-79.

74. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sorensen TI, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(4):522-9.
75. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 2014;158(4):705-21.
76. O'Mahony SM, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Early-life adversity and brain development: Is the microbiome a missing piece of the puzzle? *Neuroscience*. 2017;342:37-54.
77. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):3047-52.
78. O'Mahony SM, Felice VD, Nally K, Savignac HM, Claesson MJ, Scully P, et al. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience*. 2014;277:885-901.
79. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res*. 2015;277:32-48.
80. Marques AH, O'Connor TG, Roth C, Susser E, BJORKE-MONSEN AL. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci*. 2013;7:120.
81. Kramer MS, Aboud F, Mironova E, Vanilovich I, Platt RW, Matush L, et al. Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(5):578-84.

82. Happe F, Booth R, Charlton R, Hughes C. Executive function deficits in autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder: examining profiles across domains and ages. *Brain Cogn.* 2006;61(1):25-39.
83. Chaidez V, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord.* 2014;44(5):1117-27.
84. Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:120.
85. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.* 2011;25(1):40-5.
86. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One.* 2013;8(10):e76993.
87. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry.* 2017;81(5):411-23.
88. O'Neil A, Itsiopoulos C, Skouteris H, Opie RS, McPhie S, Hill B, et al. Preventing mental health problems in offspring by targeting dietary intake of pregnant women. *BMC Med.* 2014;12:208.
89. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell.* 2016;165(7):1762-75.

90. Schultz ST, Klonoff-Cohen HS, Wingard DL, Akshoomoff NA, Macera CA, Ji M, et al. Breastfeeding, infant formula supplementation, and Autistic Disorder: the results of a parent survey. *Int Breastfeed J.* 2006;1:16.
91. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome.* 2017;5(1):10.
92. Foliaki S, Pearce N, Bjorksten B, Mallol J, Montefort S, von Mutius E, et al. Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old: International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):982-9.
93. Gabet S, Just J, Couderc R, Seta N, Momas I. Allergic sensitisation in early childhood: Patterns and related factors in PARIS birth cohort. *Int J Hyg Environ Health.* 2016;219(8):792-800.
94. Brix N, Stockholm L, Jonsdottir F, Kristensen K, Secher NJ. Comparable risk of childhood asthma after vaginal delivery and emergency caesarean section. *Dan Med J.* 2017;64(1).
95. Verhasselt V. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol.* 2010;3(4):326-33.
96. Wopereis H, Sim K, Shaw A, Warner JO, Knol J, Kroll JS. Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: Effects of prebiotics and role in eczema development. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1334-42 e5.
97. Blazquez AB, Berin MC. Microbiome and food allergy. *Transl Res.* 2017;179:199-203.

98. Melli LC, do Carmo-Rodrigues MS, Araujo-Filho HB, Sole D, de Moraes MB. Intestinal microbiota and allergic diseases: A systematic review. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016;44(2):177-88.
99. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001;357(9262):1076-9.
100. Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child*. 2005;90(9):892-7.
101. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;81(4).

## 9. Životopis

Ivona Šojat rođena je 03.01.1996. godine u Rijeci. Završila je Osnovu Školu “Čavle” kao učenik generacije, nakon čega upisuje Prvu Riječku Hrvatsku Gimnaziju. Maturirala je 2014. godine s odličnim uspjehom. Akademske godine 2014./2015. upisuje Intergrirani preddiplomski i diplomski stručni studij Medicine u Rijeci.

Tijekom studija obavlja dužnost demonstratora na Zavodu za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju. Aktivni je član udruge CroMSIC u sklopu koje je sudjelovala na razmjeni studenata IFMSA organizacije na odjelu Anestezije Sveučilišne bolnice u Ghentu, Belgija. Također je tijekom studija bila aktivni član udruge SOSS.

Sudjelovala je na više kongresa tijekom studija. Autor je jednog, a koautor dva sažetka prezentirana na domaćim studentskim kongresima.

U slobodno vrijeme bila je član odbojkaških klubova “Grobničan” i “Drenova” od 2002.-2018. gdje je niz godina sudjelovala u Prvoj Hrvatskoj Odbojkaškoj Ligi. Trenutno se rekreativno bavi sportom te je član čitateljskog kluba Gradske Knjižnice Rijeka.